



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**Caracterización parcial de las proteínas tirosina fosfatasas de bajo peso
molecular (PTPLMWA y PTPLMWB) de *Entamoeba histolytica***

TESIS

Que presenta

Biól. Francisco Sierra López

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

en

Infectómica y Patogénesis Molecular

Director de Tesis: **Dr. José Luis Rosales Encina**

México, D.F.

Julio, 2013

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, bajo la tutoría del Dr. José Luis Rosales Encina, y bajo la asesoría de la Dra. Patricia Talamás Rohana y del Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández.

Durante el desarrollo de esta tesis, el autor fue becario del Consejo Nacional de Ciencia Y Tecnología (CONACyT), bajo número de becario: 262834

Dedicatorias:

A mis padres Pablo Sierra Juárez y Maura del Carmen López Hernández, por siempre estar conmigo y apoyarme, durante la maestría, me di cuenta como realmente me apoyaron en cualquier decisión que tomase por mi cuenta, ustedes me han mostrado su confianza, he considerado que el apoyo emocional es mucho más importante que otras cosas, y este lo he recibido de ustedes, de mi padre, de mi madre, este trabajo es principalmente dedicado a ustedes junto con Cindy

A mi Cinthia Anselmo Caballero, por escucharme cada vez que le conté de este trabajo, ayudarme a estudiar para las diversas presentaciones y materias que tuve en los cursos, por apoyarme en las decisiones que he tomado tanto socialmente como en lo académico, también se que tu y yo hemos de hacer muchas cosas juntas en nuestras vidas, hasta en la conclusión de este trabajo hemos compartido grandes momentos y me da gusto que hemos superado los obstáculos que se nos han presentado. Cindy, tu eres mi fuente de ánimo, inspiración, de creatividad artística y de superación, así como de recordatorio que la humildad la debo cultivar siempre.

A mi hermano Javier Sierra López, por qué encontré en ti un gran apoyo, comparándolo con tu actitud a cuando curse la licenciatura, ya no fuiste un obstáculo a superar, y eso lo valoro mucho, definitivamente las personas pueden cambiar, el trato que tuvimos fue digno y agradable, te comparto mi éxito y deseo que también tengas éxito en tus planes futuros.

A la familia Anselmo Caballero, bueno, que puedo decir, también fue de bastante ayuda el apoyo que recibí de ustedes, también en el aspecto psicológico, artístico y social, me han ayudado a ser más sociable, además, del gran apoyo y ayuda que he recibido de ustedes en mis planes a futuro y la realización de éstos.

A José Luis Acosta, eres un buen amigo, desde la preparatoria, de gran confianza, por lo tanto, sé que puedo contar contigo en los momentos clave, así igualmente espero poder corresponder de igual forma a la amistad que tenemos.

A mis compañeros y amigos Jorge Saldaña y Roberto Ramos, realmente fue una buena experiencia el conocerlos, en primer lugar a Jorge como compañero de laboratorio y a Roberto como de institución y de piso, espero seguir y nunca olvidar esos buenos consejos que me han proporcionado, y la estima que les tengo.

A mi compañero y amigo Alejandro Carabarin, ya que fuiste una persona muy grata, creo haberte observado muy buenas cualidades como persona, te considero un buen ejemplo de cómo deben de ser los estudiantes tanto en el doctorado y una vez que terminan, eres más grande como persona. Además, siempre estuviste accesible en cuanto cuestión se me presentaba en tanto a analizar artículos para este trabajo y datos experimentales.

A Armando Isibasi Araujo (Dr. Isibasi), aunque ya hace un par de años que no estoy en su laboratorio, pude traerme una muy buena experiencia de haber estado en la UIMIQ, sin temor a equivocarme, en muchas ocasiones he reflexionado sobre ello y agradezco mucho el haberlo conocido, se que nunca le olvidaré ya que es de las personas que ha dejado huella en mi mente.

A mi hermano y mentor Santos Moscosa, bueno, espero y en años posteriores a este, ya no lo saque de sus casillas jejeje, bueno, también se la dedico, ya que me ha ayudado mucho a observar las cosas más importantes de la vida, el conocimiento en todos sentidos es bueno, pero, es mejor saber orientar la mente a las prioridades de nuestra existencia individual, nuestra espiritualidad, la mente y el cuerpo. Quizás haya objetivos que este sistema de cosas nos haga ver que son lo más importante, pero no lo es así, realmente ser altivo, soberbio, engreído, con poca humildad y otras cuantas cosas que no son producto de una espiritualidad no cultivada, definitivamente eso no es bueno y no nos hace mejores personas, eso lo tendré bien presente. Primero mi espiritualidad sobre todas las cosas.

A Patricia Espíritu, por estar disponible en casi todo momento en cuando necesite de algún consejo, guía, noticia, auxilio en el experimento, y un sinfín de circunstancias de laboratorio y más. Siempre conté de tu apoyo, y te he llegado a estimar como amiga. Eres una persona que veo alegre, tú junto a Lidia, le dan esa chispa que tiene el Labo 7. ☺

A Patricia Pulido, por ser también una gran compañera y amiga, espero y te deseo también mucho éxito en los próximos años, compartimos información de forma bastante agradable, me deja una buena experiencia tener compañeras trabajadoras como tú, eso también me motivó a echarle ganas en las desveladas.

A Marisol Fuentes, mutuamente nos estuvimos consultando diversas cosas sobre el trabajo de tesis, los experimentos, lo laboral, lo social, si de vez en cuando nos sacábamos de quicio y nos gritábamos feo, pero bueno, hay muchas más buenas experiencias, eres una persona agradable e hiciste agradable la estancia en el laboratorio, me ayudaste en ocasiones en buscar información, al igual que Paty's, has sido un buen apoyo emocional jejeje, en esos momentos de depre que existieron, lo bueno fue que solo tuve uno de un par de días durante los dos años

En especial, el labo 7, lo he considerado un buen lugar y he estado contento trabajando con todos los que han pasado por allí. Pasé buenos momentos con todos mis compañeros, aunque yo soy el reservado. La primera en recibirme fue la Ana Lilia, y fue un excelente recibimiento, ya he estado en distintos sitios, y siempre había considerado que falta esa calidez humana, compañeros (as) como Ana Lilia en ese punto, creo que hicieron más falta en los labos aledaños. Te deseo un buen futuro Ana, y que tengas mucho éxito, te dedico de igual forma la tesis, y, a mi parecer, fuiste la persona-alumno quien más me asesoro en el trabajo presente. ☺

A Dios Jehová

Por todo lo bueno que me ha pasado, y pido que me ayude a dirigir mis pasos por el buen camino, sé muy bien del libre albedrío de nuestras decisiones como personas que somos los humanos, personalmente, espero hacer de mí, lo más grato ante los ojos de Dios, espero dar siempre el mayor posible respeto que pueda a todas las formas de vida con las que tenga interacción, aun así, conozco que eso no es suficiente, espero también poder ayudar a demás personas en las circunstancias que se me presenten.

Samos 25: 4-5

Hazme conocer tus propios caminos, oh Jehová;
enséñame tus propias sendas.

Hazme andar en tu verdad y enséñame, porque tú eres mi
Dios de salvación.

Agradecimientos:

A mi tutor:

Dr. José Luis Rosales Encina, con mucha estima, admiración y gratitud. Por haberme aceptado en el laboratorio, la dirección en el trabajo y también por buenos consejos que surgieron en ocasiones que van más allá de solamente el trabajo. En particular le considero una persona muy agradable.

A mis asesora.

Dr. Patricia Talamás Rohana, por la asesoría en este trabajo junto con la revisión del escrito, por darme buenos consejos, por ser una persona muy honesta, directa en cuanto lo que desea comunicar al estudiante, y sobre todo, porque lo que me trato de comunicar, lo hace de tal forma que lo comprendía muy bien. También le agradezco mucho la aportación de sustratos fosforilados.

A mi asesor

Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández, por la revisión del escrito, su disponibilidad y por contar siempre con usted, hasta en momentos que no lo creí, fue un buen maestro en las clases, es un gusto para mí el tenerlo como asesor.

A Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez

Por su orientación y revisión del escrito, y darme un buen aporte de ideas en los seminarios que presenté. Durante los cursos lo observe como un buen maestro accesible, definitivamente lo es. Aunque no haya estado el día de mi examen, le agradezco mucho su apoyo.

A Lidia Bailón.

Por enseñanza en la elaboración y ejecución de distintos experimentos, ayudarme en el transcurso de ellos, además de otros ámbitos extra académicos. Creo que eres una excelente persona, que nos escuchaste y aconsejaste en otros ámbitos a los estudiantes del laboratorio, eres excelente como persona.

A Patricia Espíritu.

Quien también me ayudaste bastante en la realización de técnicas, comprensión de experimentos y bases, además, te considero una persona muy inteligente, quien me apoyo mucho.

A Dra. Margarita Guaderrama.

Por su apoyo en la elaboración de los plásmidos, y ser una agradable compañera en el laboratorio.

Al laboratorio del Dr. Martínez Palomo.

Por proporcionarnos de forma oportuna la cepa de *Entamoeba dispar* y ser muy accesibles en cuanto a detalles en que necesite de su apoyo. Les agradezco mucho su apoyo y consejo, a todos los miembros del laboratorio.

A QFB. María Guadalupe Aguilar González

Por la asistencia en las lecturas de secuenciación con el equipo Perkin Elmer/Applied Biosystems 377-18E InDNA Sequencer, del Departamento de Genética y Biología Molecular del Cinvestav.

ÍNDICE

Índice de tablas	IV
Índice de figuras	V
Abreviaciones	VII
Resumen	IX
1. Introducción	1
1.1. La amibiasis	1
1.2. Descripción de <i>E. histolytica</i>	3
1.3. Taxonomía	4
1.4. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	4
2. Patología, patogénesis y virulencia	6
2.1. Colitis amibiana	10
2.2. Absceso hepático amibiano	11
3. Proteína tirosina fosfatasas (PTPasas)	13
3.1 PTPasas clásicas	14
3.2 PTPasas de especificidad dual (DUSPasas)	16
3.2.1 MKP fosfatasas	17
3.2.2 Las fosfatasas –homólogo de tensina (PTEN)	18
3.2.3 Slingshot fosfatasas	19
3.2.4 Miotubularinas	20
3.2.5 CDC14s	21
3.2.6 Fosfatasas regenerantes de hígado (PRLs)	22
3.2.7 DUSPasas atípicas	22
3.3 Cdc25 fosfatasas	23
3.4 Basadas en aspartato EyA fosfatasas	24
3.5 Proteínas tirosina fosfatasas de bajo peso molecular (PTPLMW)	24
3.5.1 PTPLMW en protozoarios	27
3.5.2 PTPLMW humanas y el cáncer	27
3.6 PTPasas en <i>E. histolytica</i>	30
3.7 Proteínas tirosina fosfatasas de bajo peso molecular de <i>E. histolytica</i>	32

4	Justificación	33
5	Hipótesis	34
6	Objetivo general	34
6.1	Objetivos particulares	34
7	Materiales y métodos	35
7.1	Cultivo de trofozoítos de la cepa HM1:IMSS	35
7.2	Trofozoítos recuperados de absceso hepático amibiano	35
7.3	Purificación de RNA y DNA	35
7.4	Plásmidos	36
7.5	Células competentes <i>E. coli</i> Top 10F' y BL21(DE3)pLysS	37
7.6	Transformación de células <i>E. coli</i> Top 10F' y BL21(DE3)pLysS	37
7.7	Purificación de DNA plasmídico	37
7.8	Reacción de secuenciación	38
7.9	Reacción de Retro-transcripción (RT)	39
7.10	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	39
7.11	Digestión enzimática del DNA	40
7.12	Purificación de las proteínas recombinantes	40
7.13	Electroforesis e inmunotransferencias	41
7.14	Preparación de extracto total amebiano	42
7.15	Actividad enzimática	42
7.16	Obtención de anticuerpos	44
7.17	Inmunofluorescencia indirecta	44
7.18	Análisis <i>in silico</i>	45
8	Resultados	48
8.1	Secuenciación de los genes EhPTPLMWA y EhPTPLMWB	48
8.2	Comparación de EhPTPLMWs y otras PTPLMW	49
8.3	Expresión de los genes EhPTPLMWA y EhPTPLMWB en trofozoítos de cultivo axénico y recuperados de absceso hepático amibiano	57
8.4	Purificación de las proteínas recombinantes y obtención de anticuerpos anti-6His-rEhPTPLMWA.	59

8.5 Actividad de fosfatasa de la 6His-rEhPTPLMWA y 6His-rEhPTPLMWB	62
8.5.1 pH óptimo y Km	62
8.5.2 Temperatura y actividad enzimática	64
8.5.3 Inhibidores y actividad enzimática	66
8.6 Detección de posibles sustratos para EhPTPLMWA y EhPTPLMWB	67
8.7 Análisis <i>in silico</i> entre EhPTPLMWA y EhPTPLMWB	72
8.8 Localización subcelular de las PTPLMWs de <i>E. histolytica</i>	76
9 Discusión	87
10 Resumen de resultados	93
11 Conclusiones	94
12 Bibliografía	95

Índice de tablas

Tabla I.	PTPasas en los genomas de <i>E. histolytica</i> y el humano.	31
Tabla II.	PTPLMWs de diferentes organismos.	50
Tabla III.	Análisis comparativo entre distintas PTPLMWs.	52
Tabla IV.	Km de distintas PTPLMWs	64
Tabla V.	Afinidad de unión entre EhPTPLMWA ó EhPTPLMWB contra posibles sustratos.	68
Tabla VI.	Distancias entre el ligando pNPP contra átomos del sitio catalítico de las EhPTPLMW.	69
Tabla VII.	Distancias entre átomos del ligando fosfotirosina contra átomos del sitio catalítico de las EhPTPLMW.	71
Tabla VIII.	Distancia entre átomos del ligando OMFP contra átomos del sitio catalítico de las EhPTPLMW.	72
Tabla IX.	Distancia entre átomos representativos cercanos al sitio catalítico de las EhPTPLMWs.	73
Tabla X.	En las PTPLMW la sustitución de un aminoácido puede afectar la Km.	75

Índice de figuras

Figura 1.	Representación esquemática del trofozoíto y del quiste de <i>E. histolytica</i> .	3
Figura 2.	Ciclo biológico de <i>E. histolytica</i> .	5
Figura 3.	Modelo de daño al tejido por <i>E. histolytica</i> en la colitis amibiana.	12
Figura 4.	Clasificación de las proteínas tirosina fosfatasas.	14
Figura 5.	Estructura de listones Wzb de <i>E. coli</i> .	25
Figura 6.	Mapa de los plásmidos pRSETA, pRSETB.	36
Figura 7.	Caja delimitante de la región dentro de la cual están los residuos del centro activo de la PTPLMWB PDB.	47
Figura 8.	Comparación de las secuencias de los genes EhPTPLMWA y EhPTPLMWB (ClustalW).	48
Figura 9.	Electroferograma correspondiente a un fragmento de los genes EhPTPLMWA (a) y EhPTPLMWB (b).	49
Figura 10.	Comparación de las secuencias de amino ácidos de las proteínas EhPTPLMWA y EhPTPLMWB (ClustalW).	49
Figura 11.	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las PTPLMWs representativas.	51
Figura 12.	Representación en cintas de distintos homólogos de PTPLMW	53
Figura 13.	Árbol filogenético para la comparación de las EhPTPLMWA y EhPTPLMWB con las PTPLMW de otras especies.	55
Figura 14.	Comparación de las secuencias de los genes (A) y proteínas (B) para las PTPLMWs de <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i> .	56
Figura 15.	Expresión de los genes EhPTPLMWA y EhPTPLMWB en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> en cultivo axénico y en trofozoítos recuperados de AHA, y expresión del gene EdPTPLMW en trofozoítos de <i>E. dispar</i> en cultivo.	58
Figura 16.	Expresión relativa de los genes EhPTPLMWA, EhPTPLMWB y EdPTPLMW.	58
Figura 17.	Purificación de las proteínas recombinantes.	59
Figura 18.	Obtención de anticuerpos anti-6HisEhPTPLMWA	60
Figura 19.	Detección de PTPLMWs nativas.	61
Figura 20.	Determinación del pH óptimo de actividad de la 6His-rEhPTPLMWA y 6His-rEhPTPLMWB.	62
Figura 21.	Diagrama de doble recíproco de Lineweaver Burk de la cinética enzimática de 6His-rEhPTPLMWA y 6His-rEhPTPLMWB.	63

Figura 22.	Efecto de la temperatura en la actividad enzimática de 6His-rEhPTPLMWA y 6His-rEhPTPLMWB.	65
Figura 23.	Efecto de la temperatura en la estabilidad de la actividad de 6His-rEhPTPLMWA y 6His-rEhPTPLMWB.	65
Figura 24.	6His-rEhPTPLMWA y 6His-rEhPTPLMWB vs inhibidores de fosfatasa.	66
Figura 25.	Actividad enzimática de las rEhPTPLMWs contra OMFP, pNPP, FTy, FTh y FSe.	67
Figura 26.	Representación 3D de las EhPTPLMWs con el ligando p-nitrofenol fosfato.	69
Figura 27.	Representación 3D de las EhPTPLMWs con el ligando fosfotirosina.	70
Figura 28.	Representación 3D de las EhPTPLMWs con el ligando OMFP	71
Figura 29.	Representación de la superficie hidrófoba de la EhPTPLMWA (a) y EhPTPLMWB (b).	72
Figura 30.	Distancia entre átomos cercanos a la cisteína de las EhPTPLMWs.	73
Figura 31.	Diagrama comparativo de las estructuras 3D de EhPTPLMWA y EhPTPLMWB.	74
Figura 32.	Visualización del potencial electrostático ± 5 kt/e de EhPTPLMWA y EhPTPLMWB mostrado en la superficie molecular.	76
Figura 33.	Localización subcelular de las EhPTPLMWs en trofozoítos adheridos a vidrio.	77
Figura 34.	Localización subcelular de EhPTPLMWs mediante imágenes de microscopia confocal.	78
Figura 35.	Localización subcelular de las EhPTPLMWs en trofozoítos adheridos a fibronectina	80
Figura 36.	Localización subcelular de EhPTPLMWs mediante imágenes de microscopia confocal.	81
Figura 37.	Expresión de las EhPTPLMWs en trofozoítos adheridos a fibronectina.	83
Figura 38.	Distribución de actina y EhPTPLMWs en trofozoítos adheridos a fibronectina.	84
Figura 39.	Distribución subcelular de las EhPTPLMWs en trofozoítos adheridos a fibronectina.	85
Figura 40.	Separación del complejo reconocido por los anticuerpos anti-rEhPTPLMW.	86

Abreviaturas.

AHA	Absceso hepático amibiano	EhPTPLMWA	Proteína tirosina fosfatasa de bajo peso molecular A de <i>E. histolytica</i>
AKT/PKB	Proteína cinasa específica de serina/treonina	EhPTPLMWs	Proteínas tirosina fosfatasas de bajo peso molecular de <i>E. histolytica</i>
Arp 2/3	Proteína relacionada a actina	EhPTPLMWB	Proteína tirosina fosfatasa de bajo peso molecular B de <i>E. histolytica</i>
ADF	Factor de despolimerización de la actina	Eph	Epinefrina
Asp	Ácido aspártico	EcoRI	<i>E. coli</i> endonucleasa, G ^A AATT_C
Bcr-Abl	Principal breakpoint cluster / Abselon	FN	Fibronectina
BamHI	<i>Bacillus amyloli</i> endonucleasa del tipo II, G ^A GATC_C	FAK	Cinasa de adhesión focal
BL21(DE3)pLysS	<i>E. coli</i> lisogénico para λ-DE3, contiene un plásmido pLysS con la lisozima de T7.	Gal/GalNAc	Galactosa N- acetil galactosamina
C3a	Anafilotoxina formada del rompimiento del C3 del complemento	GTPasa Arf	Proteína de unión a GTP y factor de ADP-ribosilación.
C5a	Anafilotoxina originada de la escisión de C5	GTPasa Rho	Homólogo de Ras proteína de unión a GTP
CD45	Antígeno común de linfocitos, fosfatasa	HM1:IMSS	Cepa de <i>E. histolytica</i> aislada en el Instituto Mexicano del Seguro Social.
CXXXXXR	Aminoácidos del motivo de identificación de fosfatasas	HCXXGXXR	Aminoácidos del motivo específico de la gran familia PTPasa
Cdc25	Proteína del ciclo de división celular, fosfatasa de especificidad dual PTP.	HAD	Superfamilia de deshalogenasa halo ácida, un grupo de proteínas fosfatasas
CDC14s	Fosfatasa 14 del control del ciclo de división celular	HCX5R	Aminoácidos del motivo específico de la gran familia PTPasa
CDKs	Cinasa dependiente de ciclina	GST-EhPTPA	Marcaje de EhPTPA con Glutati6n-S-transferasa
CsK	C-src tirosina cinasa	HeLa	Linaje de células derivada de cáncer cérvico-uterino de Henrietta Lacks
DUSPasas	PTPasas de especificidad dual	IgA, G	Inmunoglobulina clase A, clase G
DAC	Dauchshund	IL-1 ^a	Interlucina 1a
DEPC	Dietil pirocarbonato	IF1	Isoforma 1 de PTPLMW humana
Ehcp-5	Cisteína proteinasa 5 de <i>E. histolytica</i>	IF2	Isoforma 2 de PTPLMW humana
EhCPs	Cisteínas proteinasas de <i>E. histolytica</i>	JNK	c-Jun N-terminal cinasa
Ella	Fosfatasa del ojo	KDa	Kilo dalton
ERK	Cinasa de regulación de la señal extracelular	K562	Línea humanas tipo eritro-leucemia
ED	Dominio del extremo C-terminal de EyA	Km	Constante de Michaelis-Menten
EhPTPA	Proteína tirosina fosfatasa A de <i>E. histolytica</i>	Lin-11/Is-1Mec-3	Proteína muscular estructural LIM
EhPTPB	Proteína tirosina fosfatasa B de <i>E. histolytica</i>	LMW	Bajo peso molecular (low molecular weight)

LMWF	Oligonucleótido “forward” de EhPTPLMW	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
LMWR	Oligonucleótido “reverse” de EhPTPLMW	pH	Potencial de hidrógeno
MDCK	Células derivadas de riñón de perro	PKC	Proteína cinasa C
MKP	Proteína fosfatasa de especificidad dual	RNA	Ácido ribonucleico
MAPK	Cinasa de la proteína activada por mitógeno	RTKs	Receptor tipo proteína tirosina cinasa
MAPKKs	Cinasa de la proteína MAPK	RNAsa	Ribonucleasas
MAPKKKs	Cinasa de la proteína MAPKK	RPTPasas	Receptor tipo tirosina fosfatasa
MTM	Miotubularina fosfatasa	Rac/cdc 42	GTPasa de la familia Rho / proteína 42 de control de la división celular
MTMR	Proteína relacionada a miotubularina fosfatasa	RhoGAP	Dominio conservado con actividad GTPasa
PKA	Proteína cinasa A	rEhPTPLMW	6His-rEhPTPLMWA y 6His-rEhPTPLMWB
PTP	Proteína tirosina fosfatasa	SAW760	Cepa de <i>E. dispar</i>
PTKs	Proteína tirosina cinasa	SH2	Dominio conservado Src-homologo 2
PTPLMW	Proteína tirosina fosfatasa de bajo peso molecular (Protein tyrosine phosphatase of low molecular weight)	Ser-3	Tercera serina
P-Tyr	Fosfotirosina	SSH	Gene que codifica a la proteína fosfatasa homologo a Slingshot 1
p61/62m	Dominio carboxilo terminal de PTP de <i>Drosophila</i> con 24 aminoácidos	Src	No receptor, proteína tirosina cinasa
p61/62n	Dominio carboxilo terminal de PTP de <i>Drosophila</i> con 11 aminoácidos	STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
PRL	Fosfatasa de regeneración hepática tipo PTP	SO	<i>Sine oculis</i>
p38	MAPK14	SV3	Variante de corte y empalme 3
PKs	Proteínas cinasas	SAP	Fosfatasa ácida de secreción
PTEN	Fosfatasa homologo de tensina, tipo PTP	TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
PIP3	Fosfatidil inositol 3, 4, 5 trifosfato	TES-cinasas	Proteína testicular cinasa
PIP2	Fosfatidil inositol 4, 5 bifosfato	TPTP	PTPLMW de <i>Tritrichomonas foetus</i>
PDK1	Cinasa 1 dependiente de fosfoinosítidos	TYI-S-33	Medio empleado para cultivo axénico
PIs	Fosfoinosítidos		
PI3	Posición 3' de fosfoinosítidos		
PI2	Posición 2' de fosfoinosítidos		
p130cas	Factor de supervivencia susceptible a apoptosis celular		
PKs Wee 1	Proteína cinasa Wee 1		

Resumen

Las proteínas tirosina fosfatasas (PTPasas) son enzimas importantes en la regulación de la transducción de señales, participan principalmente en la regulación de la desfosforilación reversible de residuos de tirosina, controlando de esta manera procesos fisiológicos fundamentales como son: adhesión, ciclo celular, metabolismo, motilidad, migración, crecimiento, tráfico vesicular y respuesta a estrés, entre otros. Por otro lado, el desbalance en actividad de las PTPs se ha relacionado con el desarrollo de autoinmunidad, diabetes, distintos tipos de cáncer, etc. En el caso de las proteínas tirosina fosfatasa de bajo peso molecular que por sus siglas en inglés se les conoce como PTPLMW ó LMW-PTP, se le ha asociado en el humano su sobre-expresión en distintos tejidos como diagnóstico de progresión a cáncer más agresivo y metastásico.

Entamoeba histolytica es un parásito protozoario entérico exclusivo de los humanos y agente causal la amibiasis, la cual se caracteriza en su fase invasiva por la destrucción de células y matriz extracelular del huésped. El trofozoíto, forma móvil del parásito, puede residir en el intestino humano y ocasionalmente invadir la mucosa intestinal, penetrarla y de ahí migrar a otros órganos, tales como el hígado, pulmones o cerebro. El genoma de *E. histolytica* codifica para 42 PTPasas, comparado con las 107 que se codifican en el genoma humano, dentro de las cuales se encuentran las PTPLMW denominadas en este trabajo como EhPTPLMWA y EhPTPLMWB, ambas solo poseen como diferencia entre ellas un aminoácido distinto en la posición 85, siendo una alanina para EhPTPLMWA y una valina para EhPTPLMWB. El objetivo del presente trabajo es la caracterización parcial de ambas proteínas, para posteriormente establecer su papel dentro de la fisiología del parásito y su posible participación en los mecanismos de patogenicidad de los trofozoítos. A este respecto, en el presente trabajo se estudió el efecto del pH y temperatura en la actividad enzimática de ambas proteínas mediante la utilización de proteínas recombinantes con marcaje de histidinas, encontrando como pH óptimo el de 6.0, como temperaturas de máxima actividad entre los rangos de 55-60 °C, se observaron distintas Km a la temperatura fisiológica de 37 °C.

Por análisis *in silico* con distintos programas de modelaje molecular 3D se analizó el efecto de la sustitución de un aminoácido, debido a lo observado en las diferencias entre las actividades enzimáticas; mediante Docking se han encontrado posibles sustratos para EhPTPLMWA y EhPTPLMWB, esto fue corroborado con el método modificado de Chen para cuantificar los fosfatos producto de la hidrólisis de los sustratos enzimáticos; por RT-PCR se caracterizó la expresión de ambas proteínas en diferentes condiciones de cultivo de los trofozoítos encontrando que para trofozoítos recuperados de absceso hepático amibiano en hámster se expresa principalmente la forma EhPTPLMWB.

Ratones Balb/c se inmunizaron con proteínas recombinantes, se obtuvo sueros anti 6His-rEhPTPLMW con los cuales se logró detectar tanto la proteína nativa como la desnaturalizada de *E. histolytica* y *E. dispar*. Por inmuno-fluorescencia se estudio su localización subcelular en los trofozoítos de la cepa HMI:IMSS de *E. histolytica*, encontrando que se encuentra el marcaje para EhPTPLMWs en membrana y ampliamente distribuido en citoplasma. En trofozoítos estimulados con fibronectina se apreció la inducción de una mucha mayor cantidad de EhPTPLMWs, generándose sitios de localización muy intensa en membrana, esto principalmente observado a los 120 minutos. La relación actina polimerizada vs EhPTPLMWs en trofozoítos no permeabilizados usando fibronectina como sustrato, se observó co-localización principalmente en tiempos tempranos como a 10 minutos y 30 minutos, se apreció la formación de sitios focalizados de mayor contenido de EhPTPLMWs a las 2 h, observado de forma cualitativa.

1 Introducción

1.1 La amibiasis

La amibiasis es una enfermedad entérica que puede mostrar un cuadro clínico asintomático ó sintomático y es provocada por el parásito protozoario intestinal *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*). La amibiasis, es la tercera causa de muerte por parásitos en el humano después de la malaria y la esquistosomiasis (Stanley, 2003). Los datos estadísticos sobre el comportamiento de la amibiasis en la población mundial, muestran que aproximadamente 40 000 a 100 000 muertes se producen al año debido a la parasitosis por *E. histolytica* (World Health Organization, 1997; Stanley, 2003). El sistema de vigilancia epidemiológico de México ha reportado una disminución constante de casos de amibiasis intestinal (Vigilancia Epidemiológica semana 12, 2009), se ha reportado en la semana 23 del 2013 un total de 161 329 casos en México (Vigilancia Epidemiológica semana 23, 2013). Asimismo, la incidencia de esta parasitosis es elevada en las comunidades rurales e inclusive en las zonas urbanas del país; y está asociada a varios factores de la población, entre ellos, las condiciones precarias de vivienda y la pobreza de sus habitantes, mismas que favorecen la transmisión oral-fecal, y por tanto, la mayor probabilidad de infección por el parásito (Ramos *et al.* 2000; Ramos *et al.*, 2005; Ximénez, 2006), debido a estos factores principalmente, en México la amibiasis se encuentra entre las primeras 20 causas de morbilidad.

Es necesaria la reevaluación de la epidemiología de la amibiasis, ya que las cifras mencionadas probablemente no correspondan a la realidad, si se consideran las infecciones principalmente por *Entamoeba dispar*, debido a que son morfológicamente casi idénticas, por lo que prácticamente no se pueden diferenciar con un microscopio óptico en el diagnóstico ordinario. En 1925, fue cuando Brumpt, propuso una explicación a los casos asintomáticos de amibiasis: la existencia de otra especie morfológicamente idéntica a *E. histolytica* (Brumpt, 1925; Pritt y Graham, 2011), con características de patogenicidad distinta: La *E. dispar*, esta especie de *Entamoeba* es confirmada por el trabajo de Sargeaunt y colaboradores (Sargeaunt *et al.*, 1982), al utilizar un análisis de isoenzimas (zymodemos), se observan diferencias en el patrón de zymodemos de ambas especies, también se han reportado diferencias por métodos moleculares, entre

ellos, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sobre aislados clínicos de amiba. Estos datos fueron los principales para que hace unas pocas décadas diversos autores propusieran la reclasificación de *Entamoeba* en dos especies: *E. dispar* (comensal) y *E. histolytica* (patógena) (Sargeant *et al*, 1982). Los estudios genéticos, bioquímicos e inmunológicos realizados con *E. dispar*, indican que es un comensal no invasor, sin embargo, existen algunos reportes con evidencia genética de la presencia de *E. dispar* en abscesos hepáticos de pacientes, lo que hasta el momento se ha observado en casos aislados (Ximénez *et al*, 2010).

La morfología de los quistes y trofozoítos de *E. histolytica* y *E. dispar* es muy parecida en ciertos momentos de su ciclo de vida, con mínimas diferencias genómicas. Recientes estudios, *in vitro* e *in vivo*, han ofrecido evidencia de que cepas de *E. dispar* de diferentes orígenes son capaces de producir daño hepático y destruir líneas celulares en cultivo. Por ejemplo, se ha reportado una cepa con características inusuales de *E. dispar* obtenida de un paciente brasileño ha sido capaz de inducir la necrosis hepática en un modelo de hámster; además, la reacción ser más severa que la producida por *E. histolytica* y también *in vitro* causó un daño mucho mayor en la destrucción de cultivos MDCK (células epiteliales de riñón canino Madin-Darby), exhibiendo alta actividad proteolítica, por lo que esta cepa específica es distinta a la cepa más frecuentemente utilizada de *E. dispar* SAW 760 que se caracteriza por ser no patógena (Dolabella *et al*, 2012). Analizando más a fondo algunas características de una de las variante de la cepa SAW 760, se ha reportado que presentan grandes depósitos de glucógeno que rara vez se observan en cepas de *E. histolytica* HM1:IMSS, además, poseen distinta sensibilidad a aglutinarse con concavalina A, poseen una mayor carga negativa superficial, el efecto citopático de *E. dispar* es mucho más lento y rara vez se le ve fagocitando células MDCK (Espinosa-Cantellano *et al*, 1998).

La familia *Entamoebidae* comprende tres géneros y siete especies, que pueden colonizar el lumen intestinal del humano: *E. histolytica*, *E. coli*, *E. hartmanni*, *E. gingivalis*, *E. moshkovskii*, *Iodamoeba buetschlii* y *Endolimax nana*. Actualmente debe considerarse dentro del diagnóstico de especie a *Entamoeba moshkovskii*, debido a su morfología, también poco distinguible de las *E. histolytica*/*E. dispar*,

aunque se desconocen en buena medida los aspectos relacionados con su epidemiología y patogenicidad (Olivos-García *et al*, 2009; Ralston y Petri, 2011). Sin embargo, a la fecha solamente *E. histolytica* se considerada patógena.

1.2 Descripción de *E. histolytica*

En su ciclo de vida adopta dos fases principalmente: el quiste, que es la causa de la infección, y el trofozoíto que es la forma invasiva. El quiste de *E. histolytica* es de forma esférica u oval, mide entre 10 a 16 μm de diámetro y está cubierta por una gruesa capa de quitina; esta cubierta le permite sobrevivir en condiciones adversas que serían letales para el trofozoíto. Está descrito que dependiendo del grado de madurez, el quiste puede contener de uno a cuatro núcleos y éstos se caracterizan por una membrana plasmática con frecuentes y profundas invaginaciones en su citoplasma, además de observarse polirribosomas, vacuolas y depósitos de glucógeno (Gómez *et al*, 2007). En contraste, el trofozoíto es una célula ameboide pleofórmica de gran movilidad, caracterizada por un ectoplasma hialino o claro, un endoplasma granular, puede medir entre 15 y 40 μm de diámetro, contiene pocos organelos en su interior y al análisis por microscopía de luz se observan numerosas vacuolas y un núcleo ovalado, con un nucléolo central. La ameba carece de mitocondrias y de aparato de Golgi y su retículo endoplásmico consiste de vesículas finas rodeadas de algunos ribosomas (figura 1). Además el trofozoíto es considerado la forma invasiva, en el ciclo de vida del parásito (Pérez-Tamayo, 2006).

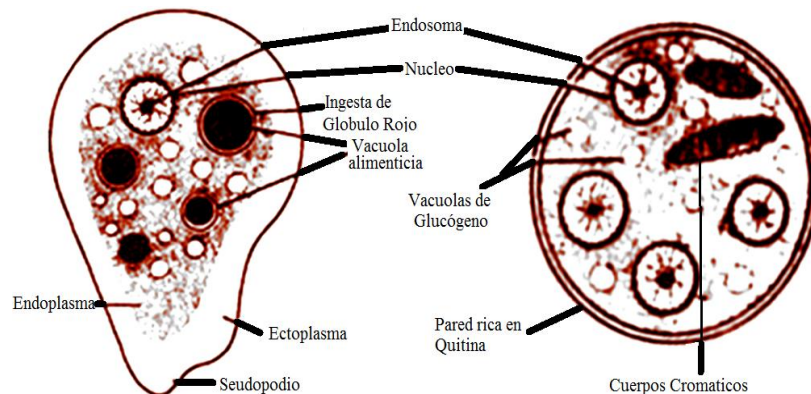


Figura 1. Representación esquemática del trofozoíto y quiste de *E. histolytica*. Se indican algunas características del trofozoíto y del quiste.

1.3 Taxonomía

Entamoeba histolytica es uno de los eucariontes mencionado por numerosos autores como de los más primitivos, perteneciente al reino *Protozoa*, familia *Entamoebidae*, orden *Amoebida*, subfilo *Sarcodina*, superclase *Rhizopoda* que son formadores de pseudópodos, de la clase *Lobosea* (Bakker-Grunwald, 1993; Riquelme, 2004)

1.4 Ciclo de vida de *E. histolytica*.

La infección por *E. histolytica*, es provocada por la ingestión de quistes maduros presentes en agua y/o alimentos contaminados, estos quistes son resistentes al pH gástrico (los trofozoítos son muy lábiles a pH ácidos). Cuando los quistes pasan a través del aparato digestivo sufren un proceso llamado desenquistamiento (en el intestino delgado) debido a las condiciones favorables. En este proceso, se pierde la cubierta de quitina y se inicia la diferenciación del parásito a trofozoíto, la división del quiste cuatri-nucleado da origen a 8 núcleos, los cuales mediante la división citoplasmática darán origen a 8 trofozoítos, la división citoplásmica continúa. Mientras tanto pueden migrar a lo largo del intestino, multiplicándose por división simple (Van Hal *et al*, 2007; Gómez *et al*, 2007).

Los trofozoítos exitosos continuarán dividiéndose, se dirigen hacia el intestino grueso, por lo que iniciarán su colonización, penetraran la mucosa con la ayuda de su batería de enzimas, produciendo algunas formas de ulceraciones de poco tamaño (algunos milímetros) de botón de camisa y otros de mayor tamaño de forma irregular. La amiba se alojará en las lesiones que ha provocado, en las criptas del tejido, ahí se alimentará de bacterias y restos celulares. Comúnmente ya alojados en el colon ascendente, transversal y descendente, así como en algunos casos en el colon sigmoideo, es posible que los trofozoítos en algún momento carezcan de las condiciones adecuadas, entrarán entonces a un proceso de enquistamiento y serán expulsados en las heces, los trofozoítos del colon descendente suelen ser expulsados antes de poder diferenciarse a quistes maduros, al ser muy lábiles estos morirán en poco tiempo, en cambio, los quistes son resistentes y pueden infectar a otras personas, por lo que se completa el ciclo (Van Hal *et al*, 2007; Gómez *et al*, 2007) (Figura 2).

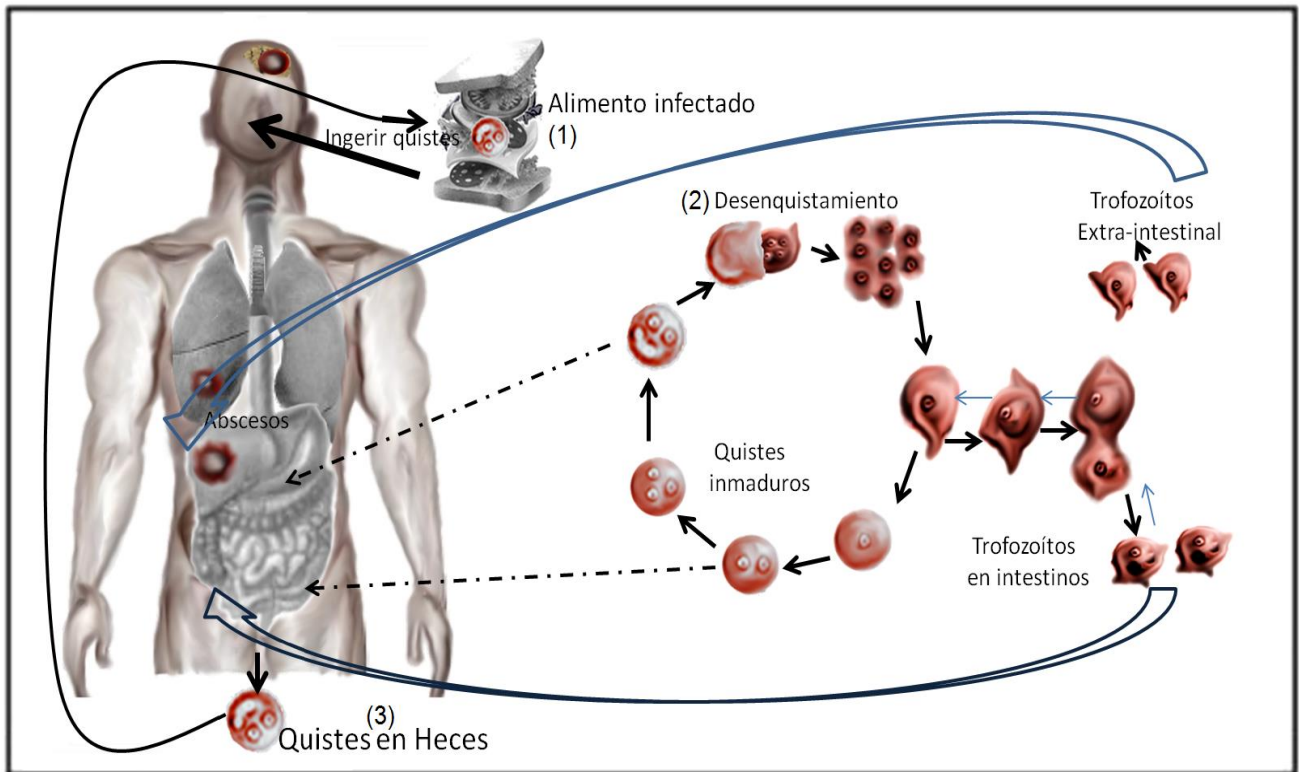


Figura 2. Ciclo biológico de *E. histolytica*. La infección por *E. histolytica* puede agruparse en tres fases: (1) La ingestión de quistes maduros del parásito presentes en alimentos y/o agua contaminada. (2) Desenquistamiento y/o pérdida de la cubierta de quitina en los quistes ingeridos con desarrollo de trofozoítos y la multiplicación por división simple o binaria, y (3) La excreción de los quistes del individuo infectado, cerrando así el ciclo de vida del parásito (Basado de Trejos-Suárez y Castaño-Osorio, 2009).

El trofozoíto puede penetrar el tejido intestinal y llegar a sistema porta, de ahí alcanzar otros tejidos, principalmente al hígado, provocando absceso hepático, también es posible que los trofozoítos puedan infectar otros órganos como el pulmón y el cerebro, produciendo abscesos en éstos. Los casos de amibiasis extra intestinal son bajos, pero se incrementa la gravedad de la infección muchas veces, poniendo en riesgo de muerte al paciente (Loulergue y Mir, 2009; Albert y Childress, 1956).

En el intestino, es donde se producen las diferentes manifestaciones clínicas más comunes de la enfermedad, los quistes de individuos infectados pueden ser secretados en las heces, siendo los responsables de la transmisión aunque sean asintomáticos, como se había señalado anteriormente, estas formas en el ciclo de vida del parásito pueden sobrevivir por semanas en el ambiente externo,

dependiendo de las condiciones en el medio en que se encuentren y de la temperatura; por el contrario, los trofozoítos son más lábiles y pueden ser eliminados rápidamente por el microambiente gástrico en caso de ser ingeridos (Martínez-Palomo, 1982).

En la mayoría de los individuos la infección con *E. histolytica* es asintomática, pero en las infecciones sintomáticas las formas clínicas de la amibiasis intestinal incluyen: la colitis ulcerosa (la más frecuente), la apendicitis amibiana, el megacolon tóxico, la disentería amibiana fulminante y el ameboma de colon (González y Wrigth, 1998). Como se mencionó anteriormente, la infección puede diseminarse a través de la vena porta hacia el hígado y provocar el absceso hepático amibiano, siendo la complicación más grave de la amibiasis extra-intestinal, la cual se presenta con mayor frecuencia en los hombres que en las mujeres (Stanley, 2003; Roberts *et al*, 2001).

En México, los reportes epidemiológicos de la amibiasis extra-intestinal (principalmente absceso hepático amibiano), desde hace un par de décadas han declinado notablemente y son muy pocos casos los reportados recientemente (Vigilancia Epidemiológica semana 23, 2013); sin embargo la colitis ulcerativa se mantuvo en un rango importante desde el 2004 (Ramos *et al*, 2005); por ejemplo, en el año 2000 por cada 100 000 habitantes se reportaron 1 353.4 casos de colitis ulcerativa vs 6.37 casos de amibiasis extra-intestinal (Secretaría de Salud, 2001). Los efectos por la infección sintomática por *E. histolytica* son provocados por la citólisis dependiente del contacto del trofozoíto-epitelio y otras células, también se ven influenciado por otros factores, entre ellos: la relación hospedero-parásito y las moléculas asociadas a su capacidad de virulencia y patogenicidad.

2 Patología, patogénesis y virulencia

Hasta la fecha, mucho ya se ha avanzado en el conocimiento de diversos aspectos de la biología de *E. histolytica* desde los primeros medios de cultivo y su posterior mejoramiento; aún así, el papel de numerosos mecanismos del parásito no están bien establecidos, menos aún el peculiar comportamiento de estos parásitos, el cual ha sido estudiado por varias décadas, también el hecho de que

con frecuencia actúa como comensal y más raramente como invasor (Gómez *et al*, 2007). Debido a que es difícil el diagnóstico exacto de la amibiasis por la similitud estructural entre *E. histolytica* y *E. dispar*, ya se han usado sondas de RNA o DNA y éstas han indicado diferencias genéticas entre estas dos especies de *Entamoeba* (Freitas *et al*, 2004), con lo que también se ha podido distinguir entre cepas patogénicas de las no patogénicas. En relación con la existencia de diferencias antigénicas entre *E. histolytica* y *E. dispar*, se han encontrado epitopos en la subunidad pesada 170 kDa de la lectina inhibible por galactosa presentes en *E. histolytica*, que no están en *E. dispar* (Freitas *et al*, 2004; Riquelme, 2004).

En general la patogenia depende de las sustancias tóxicas que libere (ya sea enzimas o citotoxinas), de su asociación con bacterias, y del estado inmunológico y nutricional del huésped, además, otros autores reportan que la abundancia de hierro, sin sobrepasar los niveles fisiológicos, facilita la invasión del tejido (Riquelme, 2004). Entre los diversos factores que participan en la virulencia de *E. histolytica* se encuentra la lectina (Gal/GalNAc) de 260 kDa, la cual participa en una colonización inmediata, es altamente inmunogénica y juega un papel esencial en la citólisis y fagocitosis. Otro factor descrito que se involucra directamente en la virulencia del parásito es un péptido de 77 aminoácidos denominada amebaporo, capaz de formar poros en células humanas, de esta proteína se han descrito tres isoformas: A, B y C, las cuales están presentes *in vivo* en una proporción respectivamente de 35:10:1. Estos factores de virulencia han mostrado tener una gran actividad lítica de células humanas en experimentos *in vitro* (Freitas *et al*, 2004; Espinosa Cantellano y Martínez Palomo, 2000).

Otros factores involucrados en el mecanismo de patogenicidad son las cisteína proteasas, llevando a cabo diversas actividades en el sitio en que ejercen su función, como la destrucción de la hemoglobina por la hemoglobinasa de 80 kDa, también hay histolisinasas de 29 kDa, entre otras. Además, las cisteína proteasas se han involucrado en la invasión al tejido, participan en la evasión de la respuesta inmune del hospedero y de la inducción de la inflamación (Pérez Saldaña, 2008), son muy importantes en la adquisición de nutrientes y el desarrollo del ciclo de vida. La actividad de las cisteína proteasas de *E. histolytica* (EhCPs) contra

diversos componentes de la matriz extracelular es conocida, pero también se ha descrito un efecto citopático directo sobre las células huésped (Trejos-Suárez y Castaño-Osorio, 2009). Se sabe que la EhCP-5 rompe la capa de mucina en su dominio carboxi-terminal, lo cual favorece la invasión. Entre otras cualidades de las cisteína proteasas se han descrito sus efectos en la evasión de la respuesta inmune, por degradación directa de la IgA, y en la disrupción de la IgG que confiere resistencia a la lisis mediada por complemento e interrumpe la amplificación de la respuesta inmune por degradación de anafilo-toxinas C3a y C5a. Por otro lado, se ha reportado diferencias entre las cisteína proteasas de *E. histolytica* y de *E. dispar*, lo cual puede ser importante en la capacidad patógena de una y la inocuidad de la otra (Gómez *et al*, 2007).

Se ha reportado que los trofozoítos de *E. histolytica* son capaces de degradar distintos componentes de la matriz extracelular, tales como fibronectina, laminina, colágena, elastina, oligosacáridos, y a la vez son capaces de inducir la formación de canales por los que se difunden el agua, los iones (salida de Na⁺, K⁺ y la entrada de Ca²⁺) y otras pequeñas moléculas, trayendo como consecuencia que el medio celular interno cambie y se pueda producir la lisis celular por choque osmótico (Trejos-Suárez y Castaño-Osorio, 2009). Algunos de los componentes de la matriz extracelular y sus características son:

Fibronectina (FN): Es una glucoproteína formada por dos cadenas de polipéptidos unidos por uniones disulfuro, puede aparecer formando fibras insolubles en tejidos conectivos o soluble en fluidos corporales como la sangre, posee dominios que le permiten unirse al colágeno, ciertos proteoglicanos, glucosaminoglicanos, a la fibrina, heparina y proteínas de la membrana plasmática como las integrinas. Cuando interacciona con trofozoítos de *E. histolytica* se promueve la adhesión cuya unión se lleva a cabo a través de una molécula tipo integrina $\beta 1$ (Sengupta *et al*, 2009) localizada en la superficie de las células del parásito; la unión a superficies cubiertas con FN induce la reorganización del citoesqueleto de los trofozoítos dando como resultado la formación de placas de adhesión de actina y múltiples contactos focales entre amibas-sustrato, lo que lleva más adelante a la degradación de la FN *in situ*.

Existe además una fosforilación específica de proteínas del citoesqueleto, hay indicios de que el inositol trifosfato y la proteinasa cinasa C actúen como mensajeros secundarios posterior a la interacción del trofozoíto con la FN (Trejos-Suárez y Castaño-Osorio, 2009; Meza *et al*, 1996; Meza *et al*, 2006).

Laminina: la laminina es una glicoproteína que forma parte de la lamina basal asociada a otras proteínas como el colágeno, fibronectina, tiene sitios de unión para proteínas integrinas de la membrana plasmática, por lo que una de sus funciones es la de anclar a las células a la lamina densa. La laminina es uno de los principales componentes de la matriz extracelular que es degradada por las proteasas de *E. histolytica* (Gómez *et al*, 2007). Cuantitativamente es la más importante en la matriz proteica no colagénica de la membrana basal; en estudios sobre carcinomas, se ha reportado que existe un daño en la laminina y la colágena IV conforme es mayor el grado de metástasis y migración de células cancerígenas (Santos García, 2006).

Colágeno: es una familia de proteínas muy abundante, su principal misión en los tejidos es formar un armazón resistente a las fuerzas de tensión mecánica que sirve de sostén a los tejidos, puede formar fibras paralelas u orientadas en forma de malla, las células se sostienen de las moléculas de colágeno mediante diversas proteínas de adhesión (como las integrinas, con dominios tipo inmunoglobulina, anexinas, etc). *E. histolytica* posee enzimas tipo colagenasa, ya que se ha reportado que en ensayos donde se incuban trofozoítos sobre geles de colágeno, los trofozoítos son capaces de iniciar la degradación de los geles a los 30 min y degradan prácticamente todo el gel a las 16 h, la enzima degrada a pH fisiológico al sustrato nativo, también han observado un aumento en la expresión de moléculas como Fos y la secreción de gránulos electrodensos que tienen actividad de colagenasa, proteasa y enzimas líticas (Muñoz Moreno, 2009).

Elastina: proteína abundante en muchas matrices extracelulares, es componente de las fibras elásticas, las cuales son agregados insolubles, tienen la capacidad de estirarse en respuesta a tensiones mecánicas y contraerse para recuperar su longitud inicial, además de la elastina las fibras elásticas están

formadas por fibrilina (y otras glucoproteínas, proteoglucanos) (Silvera y Barrientos, 2002). Entre los factores de virulencia de *E. histolytica* se encuentra su alta capacidad de degradar la elastina por medio de proteinasas de cisteína, pero aún no se conocen todos los mecanismos que surgen a partir de la interacción trofozoítos-elastina (Trejos-Suárez y Castaño-Osorio, 2009).

2.1 Colitis amibiana

El nivel patológico de la colitis amibiana abarca desde mucosa espesa, múltiples úlceras separadas por regiones de mucosa del colon aparentemente normales hasta inflamación difusa, mucosa edematosa, necrosis y perforación de la pared intestinal. La inflamación del intestino puede ser tan severa que puede confundirse con una enfermedad inflamatoria intestinal en el diagnóstico. Se ha reportado que entre las moléculas implicadas se encuentra la lectina específica de Gal/GalNac, células que carecen de N-galactosa terminal o N-acetilgalactosamina terminal suelen poseer algún grado evidente de resistencia a la adherencia de trofozoíto (Li *et al*, 1989). En otro aspecto, se ha observado el efecto del contacto entre los trofozoítos y las proteínas de la matriz extracelular en el comportamiento del parásito, por ejemplo, al contacto con la fibronectina, esta interacción activa cascadas de señalización en donde intervienen proteína cinasa C (PKC) y la proteína cinasa A (PKA), produciéndose rearrreglos en estructura de actina, procesos que facilitarán la adhesión y la invasión (Meza, 2000; Meza *et al*, 2006).

Por otro lado *E. histolytica* posee una gran capacidad citolítica pero las bases moleculares aun no se conocen por completo, algunas moléculas efectoras importantes que le confieren a éste parásito su capacidad citolítica son sus proteínas amebaporo. Los amebaporos se encuentran dentro de gránulos citoplasmáticos y pueden exocitarse hacia la membrana de la célula blanco al presentarse el contacto entre ambos (Pérez Saldaña, 2008; Ackers y Mirelman, 2006).

Se ha reportado en modelos animales de absceso hepático amibiano que los trofozoítos de *E. histolytica* causan apoptosis de los hepatocitos indicando que es posible que las células del epitelio humano pueden sufrir lo mismo, y se ha

sugerido que las proteínas del amebaporo participan tanto en las vías líticas como apoptóticas (Figura 3), en concentraciones sub-líticas de las proteínas formadoras del amebaporo pueden inducir apoptosis en las células blanco (Ralston y Petri, 2011).

2.2 Absceso hepático amibiano (AHA)

El absceso hepático amibiano (AHA) puede presentarse con fiebre aguda, dolor y sensibilidad en la parte derecha del abdomen, algunas veces con pérdida de peso (Gómez *et al*, 2007; Ximénez, 2006), es la principal complicación de amibiasis extra intestinal. Se ha estimado que el 10 % de los individuos a quienes se les ha diagnosticado colitis amibiana llegan a desarrollar el absceso hepático a través de la diseminación de los trofozoítos desde el intestino hacia la circulación porta (Sierra, 2011; Trejos-Suárez y Castaño-Osorio, 2009; Pérez Saldaña, 2008).

Un buen modelo animal de estudio para el AHA es el hámster, en donde es reproducible la formación del AHA (Flisser y Pérez, capítulo 36, 2006) y por lo tanto, en este modelo *in vivo* es donde se ha descrito la evolución de esta enfermedad parasitaria, aunque también se han reportado trabajos de absceso hepático amibiano en modelo de ratones con inmunodeficiencia severa combinada (Marinets *et al*, 1997). En el hombre, en las etapas iniciales los trofozoítos se diseminan por el torrente sanguíneo penetrando por el sinusoides hepático, lugar en donde son rápidamente rodeados por neutrófilos, formándose sitios de inflamación (Ackers y Mirelman, 2006). Durante las etapas posteriores, los focos de inflamación adquieren una organización característica en donde se aprecia una región necrótica central compuesta por debris celular, suele estar rodeada por dos capas periféricas, la primera compuesta por trofozoítos y la segunda compuesta de células del sistema inmune que separan la región de la infección del tejido hepático. Se ha observado que el contacto hepatocito-trofozoítos se da ocasionalmente, por lo que la muerte de los hepatocitos de forma masiva puede ser ocasionada por productos liberados de los trofozoítos así como de las mismas células del sistema inmunitario (Pérez Saldaña, 2008; Espinosa Cantellano y Martínez Palomo, 2000).

Tanto los macrófagos como los neutrófilos son importantes en la patogénesis del AHA en la capacidad del hospedero para controlar la infección, hay sugerencias de que la lisis de neutrófilos ocasiona la liberación de los mediadores que ocasionan la muerte de los hepatocitos, incrementando el daño tanto en el foco del AHA (Ackers y Mirelman, 2006), pero también se ha observado que son muy importantes los neutrófilos en la defensa contra AHA así como la participación de los macrófagos. Algunos autores han destacado que los macrófagos de personas que sufrieron antes una infección con *E. histolytica* son más eficientes en la destrucción de los trofozoítos del parásito (Espinosa Cantellano y Martínez Palomo, 2000).



Figura 3. Modelo de daño al tejido por *E. histolytica* en la colitis amibiana. (A) Lisis por citólisis mediada por contacto, originan necrosis celular. Las células que mueren por necrosis lítica liberan IL-1 α . (B) Células del epitelio intestinal en contacto con trofozoítos podrían morir también por apoptosis, con la liberación de interlucina-1 α . Puede ser activadas células distales al sitio de infección mediante NF- κ B para producir más IL-1 α . Este proceso puede ser facilitado por las EhCPs, ocasionando que IL-1 α se encuentre madura. (C) Las citocinas y quimiocinas liberadas de células epiteliales atraen macrófagos y neutrófilos. La transmigración de neutrófilos a la superficie del lumen crea canales que facilitan la invasión de los trofozoítos. Las EhCPs pueden ayudar a la invasión directa del parásito por digestión de proteínas de matriz extracelular, causan disrupción de células epiteliales e invasión en la submucosa. (D) Los mediadores liberados en la lisis de neutrófilos exagera el daño. Los macrófagos pueden liberar mediadores como TNF α , contribuyendo a la inflamación. (Tomado de Ackers y Mirelman, 2006).

3 Proteínas tirosina fosfatasas (PTPasas)

Las proteínas tirosina fosfatasas (PTPasas) son críticas en la regulación de la transducción de señales, junto con las proteínas tirosina cinasas (PTKs) regulan la fosforilación reversible de residuos de tirosina en las proteínas sujetas a procesos de fosforilación, controlando de esta manera procesos fisiológicos fundamentales como son: crecimiento, diferenciación, ciclo celular, metabolismo, regulación de la dinámica del citoesqueleto, adhesión y migración, por lo que la desregulación del delicado balance entre la acción de PTKs y PTPasas se ha relacionado en el desarrollo de enfermedades humanas como autoinmunidad, diabetes y cáncer (Tonks, 2006). Considerando el gran progreso realizado en las últimas décadas para elucidar el papel fisiológico de los miembros de la familia PTPasas (Hunter, 2000; Tonks 2013), inicialmente se pensó que estaban presentes en un número limitado y se consideraban como enzimas “housekeeping” con una especificidad de sustrato muy amplia. Actualmente se sabe que las PTPasas presentan especificidad de sustrato restringida y que forman una familia compleja de enzimas relacionadas (Tonks y Neel, 2001; Tonks 2013).

A partir de la purificación de la primera PTPasa, PTP1B (Tonks *et al*, 1998), y la comprobación de actividad de PTPasa de CD45 (Charbonneau *et al*, 1998), la búsqueda de similitud entre las secuencias de amino ácidos ha identificado al motivo CXXXXXR como general y al motivo HCXXGXXR como específico de la gran familia de PTPasas (Neel y Tonks, 1997; Andersen *et al*, 2001; Tonks, 2013). Esta superfamilia incluye 4 grupos de enzimas: (i) PTPasas clásicas, (ii) PTPasas de especificidad dual (DUSPasas), (iii) Cdc25 PTPasas y (iv) PTPasas de bajo peso molecular. Otros autores agrupan a las proteínas tirosina fosfatasas de la siguiente forma: (i) Tipo-1 PTPs basadas en cisteína que incluye a las PTPasas clásicas y a las PTPasas de especificidad dual (DUSPasas), (ii) Tipo-II PTPs basadas en cisteína que incluye a las PTPLMW, (iii) Tipo-III PTPs basadas en cisteína que incluyen a Cdc25 PTPasas y (iv) PTPs basadas en aspartato que incluye a las proteínas EyA y las HAD proteínas (figura 4) (Patterson *et al*, 2009).

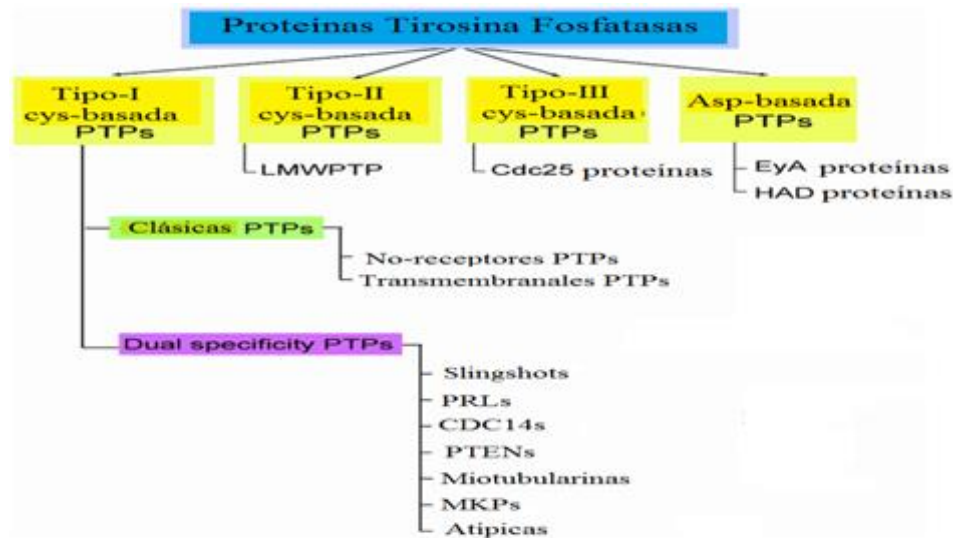


Figura 4. Clasificación de las Proteínas Tirosina Fosfatasa. PTP se pueden clasificar en subgrupos sobre la base de su similitud de secuencia y la presencia de dominios funcionales o de unión (Modificado de Patterson *et al*, 2009).

3.1 PTPasas clásicas

Este grupo de enzimas tiene como sustrato a la P-Tyr presente en las proteínas fosforiladas, y consta de dos subgrupos: PTPasas transmembranales tipo receptor (RPTPasas) y PTPasas citoplásmicas o no receptor (NRPTPasas). Las PTPasas tipo receptor o transmembranales tienen un dominio extracelular, un solo dominio transmembranal, y el dominio intracelular que contiene frecuentemente dos dominios catalíticos (D1 y D2), siendo uno de ellos generalmente inactivo (Saito y Streuli, 1991), pero a diferencia del dominio citoplásmico de las PTPasas, el cual está siempre localizado en la célula y es altamente conservado, el dominio extracelular de estas proteínas es estructuralmente divergente. Algunos de los dominios extracelulares de las PTPasas tienen secuencias repetidas de tipo inmunoglobulinas y dominios de fibronectina tipo III, similares a proteínas de adhesión celulares conocidas como N-CAMs. Los dominios extracelulares están con frecuencia separados alternativamente y contienen N y O carbohidratos (CD45 o HLAR) (Furukawa *et al*, 1998). Se ha demostrado que el dominio extracelular de estas PTPasas puede mediar la agregación célula-célula, estas observaciones sugieren que el dominio extracelular de estas PTPasas puede servir como su propio ligando y puede funcionar para regular interacciones célula-célula (Gebbinck *et al*, 1993; Brady-Kalnay *et al*, 1993).

Las PTPasas no transmembranales (citoplásmicas) o intracelulares tiene un solo dominio catalítico, la secuencia de aminoácidos fuera de este dominio es muy divergente. Parece ser que una de las funciones principales de las secuencias que flanquean al dominio catalítico es de localización intracelular específica de las PTPasas (Mauro y Dixon, 1993).

Las PTPasas han sido encontradas en lugares específicos de las membranas en la célula (verbi gratia el retículo endoplásmico) así como en el núcleo. Algunas PTPasas tienen dominios homólogos a src 2 (SH2), que son blanco de receptores de factores de crecimiento específicos, otras PTPasas tienen estructuras que sugieren que forman parte de la arquitectura del citoesqueleto celular (Dixon, 1996). El cómo estas secuencias blanco en la proteína gobiernan la localización y probablemente también definen la especificidad de sustrato de las PTPasas fue descrito por McLaughlin y Dixon en 1993.

En la década de los 90' se reportó la existencia de una PTP de *Drosophila* que tiene dos distintas localizaciones intracelulares debido a "splicing" alternativo (McLaughlin y Dixon, 1993), en donde el gene que codifica esta fosfatasa experimenta "splicing" alternativo en el extremo 3' del mensajero, esto resulta en dos transcritos de RNA que codificaran para proteínas que tendrán distinto carboxilo terminal comparándolas, en tanto al carboxilo terminal de la proteína larga (designada p61/62m) contiene 24 aminoácidos hidrofóbicos que sirven como señal de asociación a membrana, la isoforma corta (designada p61/62n) contiene 11 aminoácidos hidrofílicos con la característica de contener secuencias consenso de localización nuclear. La sobreexpresión de p61/62m en células COS-1 permite la localización de la proteína en la membrana de la cadena reticular (retículo endoplásmico) así como a los organelos tipo mitocondrias, a diferencia de p61/62n quien se encuentra localizada solamente en el núcleo.

Análisis cinéticos de PTPasas asociadas a membranas o a núcleo no revelan una diferencia en la actividad catalítica o preferencias de sustrato. Estos resultados sugieren que la actividad y la especificidad del sustrato de estas isoformas están determinadas por su localización. La PTPasa nuclear es particularmente

interesante ya que podría funcionar regulando la transcripción de genes por la modulación de factores de transcripción tirosina fosforilados, podría participar en la regulación del ciclo celular (David *et al*, 1993; Pagarigan *et al*, 2013).

3.2 PTPasas de especificidad dual (DUSPasas)

DUSPs (fosfatasas de especificidad dual) son un grupo heterogéneo de proteínas fosfatasas que pueden desfosforilar tanto fosfotirosina como residuos de fosfoserina/fosfotreonina del mismo sustrato (Tonks, 2013). DUSPs han sido implicadas como moduladores importantes de vías críticas de señalización que se desregulan en diversas enfermedades (Ducret *et al*, 2005; Patterson *et al*, 2009). Las DUSPs se pueden dividir en seis subgrupos, basándose en la similitud de secuencias que incluyen a “slingshots”, PRL (fosfatasas de regeneración hepática), fosfatasas Cdc14 (CDC=ciclo de división celular), PTENs (fosfatasa y tensina homólogo-suprimidos del cromosoma 10), miotubularina, MKPs (fosfatasa de la proteína cinasa activada por mitógeno) y DUSPs atípicos. De estos subgrupos, una gran cantidad de investigación se ha centrado en caracterizar las MKPs. Como su nombre sugiere, MKPs desfosforilan a MAPK (proteína cinasa activada por mitógeno) las proteínas ERK (quinasas reguladas por señales extracelulares), JNK (c-Jun N-terminal cinasa) y p38 con una especificidad distinta de la de las proteínas MKP individuales (Liu *et al*, 2007).

DUSPs atípicas son en su mayoría de baja masa molecular y carecen del dominio de homología CH2 en el extremo N-terminal común para MKPs. El descubrimiento de la mayoría de las DUSPs atípicas se ha producido en la última década, generalmente se han agrupado junto con los MKPs y caracterizado por su papel en cascadas de señalización de MAPK, en efecto, algunas han demostrado que desfosforilan MAPKs (Patterson *et al*, 2009). Las DUSPs juegan un papel crucial en las rutas de transducción de señales, y se les conoce principalmente por la regulación que ejercen sobre las proteína cinasas (PKs) activadas por MAPK y sobre la progresión del ciclo celular (Tonks, 2006).

Ambas enzimas, PTP clásicas y DUSPs, comparten un mecanismo similar para la catálisis de la hidrólisis del sustrato fosforilado, que implica la formación de un

intermediario-fosforil estable (Denu y Dixon 1995; Patterson *et al*, 2009). El dominio altamente conservado catalítico contiene la secuencia consenso HCXXXXXR y el residuo de cisteína crítico se coloca en la base de la hendidura catalítica y el residuo de arginina se pliega hacia la hendidura de unión a fosfato para ayudar con la catálisis. También hay un residuo conservado de ácido aspártico río arriba de este motivo conservado, que actúa como un ácido/base general catalizador y ayuda a estabilizar la fosforil-intermedio. La hendidura catalítica de DUSPs es poco profunda, pero más amplia que la de las PTP clásicas, que se cree que es el mecanismo por el cual DUSPs simultáneamente puede acomodar más de un residuo fosforilado (Patterson *et al*, 2009).

Hay 61 DUSPs que se pueden agrupar sobre la base de la presencia de dominios específicos y similitud de secuencia. Aun así, ha existido una cierta confusión en torno a la clasificación de algunas DUSPs, que comparten similitud de secuencia con uno de los subgrupos, debido a que la especificidad de sustrato o papel fisiológico es semejante a la de otro subgrupo (Patterson *et al*, 2009). En general las DUSPs se clasifican en uno de los subgrupos a continuación.

3.2.1 MKP fosfatasas

Las proteína cinasas activadas por mitógeno (MAPK) pertenecen a un grupo de Serina/Treonina proteína cinasas que se encuentran altamente conservadas en eucariotes, y juegan un papel importante en diferentes procesos celulares tales como proliferación, respuesta a estrés, apoptosis y en la respuesta inmune (Liu *et al*, 2007). En organismos multicelulares, las MAPKs son necesarias para la diferenciación celular, el desarrollo, la memoria y la secreción de factores paracrinós y autocrinós (Johnson y Lapadat, 2002; Dong *et al*, 2002). En células de mamífero existen tres rutas bien definidas en las que participan las MAPKs: la ruta de las cinasas regulada por señales extracelulares (ERK), la ruta de las cinasas terminales JUN N (JNK o MAPK8), y la ruta p38 (MAPK14) (Liu *et al*, 2007; Johnson y Lapadat, 2002).

Las señales que conducen a la activación de las MAPKs se inician regularmente en la superficie celular a través de diferentes receptores. Las rutas de las MAPKs

se activan a través de una cascada de eventos de fosforilación secuenciales, iniciando con la fosforilación de las MAPK cinasas (MAPKKS) por las MAPK cinasas cinasas (MAPKKKs), y las MAPKKs activadas a su vez fosforilan a las MAPKs (Liu *et al*, 2007). Las MAPKs activadas fosforilan una gran variedad de sustratos, incluyendo proteína cinasas y factores de transcripción que facilitan la expresión de genes regulados por MAPK (Davis, 1993; Hazzalin y Mahadevan, 2002). Estas cascadas de señalización no solo se llevan a cabo en procesos celulares normales, sino también se han implicado en la patología de varias enfermedades como cáncer, diabetes, aterosclerosis, artritis y choque séptico (Dumitru *et al*, 2000; Kotlyarov, 1999).

A nivel molecular, las MAPKs pueden ser reguladas por varios mecanismos, entre ellos, y quizás el más importante, se encuentra su desfosforilación, la cual es llevada a cabo por fosfatasas específicas para tirosina, para serina/treonina y por fosfatasas duales específicas para MAPK (MKPasas). Las MKPasas se dividen en dos grupos de acuerdo a su localización subcelular y a los patrones de regulación transcripcional. El primer grupo se localiza en el núcleo y está codificado por genes de respuesta inmediata e incluyen a MKP1, MKP2, DUSP2 y DUSP5, y la expresión de este grupo responde al mismo estímulo que activa a las MAPKs (Sun *et al*, 1993; Keyse, 2000). El segundo grupo de MKPasas no está codificado por genes tempranos, se localizan en el citoplasma o en núcleo, y su expresión es mucho más lenta comparada con la del primer grupo (Keyse, 2000; Matsuguchi *et al*, 2001).

3.2.2 Las fosfatasas-homólogo de tensina (PTEN)

La fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN) se identificó en 1997 como un gene relevante en una región del cromosoma 10 que muy a menudo se pierde en tumores humanos, especialmente en aquéllos presentes en cerebro, próstata y endometrio (Li *et al*, 1997). Poco tiempo después se descubrió que PTEN presentaba actividad de fosfatasa hacia fosfoinosítidos (PI) producidos por PI3-Cinasa (Maehama *et al*, 2001). Siete especies de fosfoinosítidos se encuentran en eucariotes, y cada especie es producida y convertida en otra especie por fosforilación y desfosforilación llevadas a cabo por la acción regulada de PI-

Cinasas y fosfatasas respectivamente (Fruman *et al*, 1998). Los fosfoinosítidos funcionan como moléculas de señalización intracelular y regulan diversos procesos como proliferación, apoptosis y motilidad; por lo que la desregulación de su producción e intercambio debido a la inactivación de la dupla PI-Cinasas/Fosfatasas da lugar a varias enfermedades en el humano (Engelman *et al*, 2006; Maehama, 2007).

PTEN convierte PIP₃ en PIP₂ en el citoplasma, por lo que antagoniza directamente con la actividad de PI3-Cinasa (Leevers *et al*, 1999). La pérdida de la función de PTEN, ya sea en las células madre derivadas de embrión murino o en líneas celulares derivadas de tumores humanos, da por resultado la acumulación de PIP₃, mimetizando el efecto de la PI3-Cinasa disparando la activación de sus efectores río abajo PDK1, AKT/PKB y Rac/cdc42 (Li y Sun, 1998). Por otro lado, se ha demostrado que PTEN desfosforila sustratos proteicos como FAK (PTK2) (Tamura M *et al*, 1999), a sí mismo (Raftopoulou *et al*, 2004), y PTEN recombinante es capaz de desfosforilar péptidos fosforilados en serina, treonina y tirosina (Myers *et al*, 1997).

3.2.3 Slingshot fosfatasas

La reorganización de actina en el eje frontal de las células eucarióticas, es un aspecto fundamental de la motilidad celular que requiere de la función coordinada de factores que permitan su polimerización y despolimerización. Para inducir el movimiento de las células, es necesaria la generación de filamentos ramificados de actina en el eje frontal por medio de la acción del complejo Arp2/3 y/o filamina (Stossel *et al*, 2001; Pollard y Borisy, 2003). Factores que despolimerizan a la actina, como las proteínas de la familia Cofilina/ADF, desensamblan F-actina de la parte posterior de la red de actina para reciclar los monómeros hacia la parte frontal para posteriores rondas de polimerización. La regulación espacial de la despolimerización de actina dependiente de Cofilina es crucial para el movimiento celular, ya que la activación sitio-especifica de la Cofilina puede determinar la dirección del movimiento (Ghosh *et al*, 2004). La Cofilina y proteínas de la familia ADF se fosforilan en Ser-3 de la región N-terminal, la cual esta conservada en estas proteínas (Bamburg, 1999). La fosforilación de la Cofilina la vuelve incapaz

de unirse a la actina, y su desfosforilación reactiva su actividad despolimerizante (Agnew, 1995). Se ha demostrado que dos familias de cinasas fosforilan a Cofilina, LIM cinasas (Lin-11/Isl-1/Mec-3) y TES-cinasas (proteína testicular), las cuales son específicas para esta proteína (Mizuno *et al*, 1994; Ikebe *et al*, 1997), y dos tipos de fosfatasa actúan selectivamente para desfosforilarla, la familia Slingshot fosfatasa y la Cronofina fosfatasa.

En humano y en ratón las Slingshot fosfatasa están representadas por tres genes (SSH-1, -2 y -3), con patrones de expresión tisular distintos (Huang *et al*, 2006). Estudiando los productos de estos genes, se ha encontrado evidencia de que SSH1-L participa en el proceso de división celular, ya que se ha localizado en el surco y cuerpo medio durante la citocinesis. La localización en estos sitios correlaciona con la actividad elevada de SSH-1L durante la telofase y citocinesis, y coincide con el patrón temporal de desfosforilación de la cofilina durante estas etapas. La sobreexpresión de SSH1 inactivada da por resultado la acumulación aberrante de F-actina y fosfofilina durante las etapas tardías de la citocinesis acompañada de la regresión de la ruptura del surco y la formación de células multinucleadas (Kaji *et al*, 2003).

3.2.4. Miotubularinas

Se han identificado siete distintos fosfoinosítidos (PIs), los cuales se generan por la fosforilación del inositol en las posiciones D3, D4 y D5. Como moléculas de señalización ancladas a la membrana, los PIs regulan el tráfico membranal, el crecimiento celular, la sobrevivencia, la división y motilidad celular. El mecanismo por medio del cual los PIs llevan a cabo su función, se propone sea a través del reclutamiento de proteínas efectoras, que contienen dominios de unión a PI, a sitios concretos de la membrana (Balla, 2005), en los cuales se encuentran PIs específicos, lo que sugiere la existencia de micro-dominios (Carlton y Cullen, 2005). La función de los PIs en el tráfico de membranas está asociada a la que lleva a cabo Rab y la familia de GTPasas Arf, las cuales facilitan numerosos eventos de tráfico vesicular (Zerial y McBride, 2001). Varias proteínas efectoras requieren de la unión de PIs específicos y de otra proteína (Rab activado o GTPasa Arf) para localizarse en su membrana blanco. La distribución de PIs

específicos es el resultado de la acción de PI cinasas, fosfatasas y lipasas (Robinson y Dixon, 2006).

Las fosfatasas que actúan sobre los PIs, además de las PTEN fosfatasas, son las miotubularinas (MTM) fosfatasas y las fosfatasas relacionadas a miotubularinas (MTMR). Inicialmente se pensó que las MTM eran proteína fosfatasas, pero utilizando la MTM1 recombinante se encontró que ésta remueve eficientemente el 3-fosfato de PI3 (Taylor *et al*, 2000); subsecuentemente se determinó que MTMR1, 2, 3, 4, 6, y 7 hidrolizan selectivamente PI3, y que MTM1, MTMR1, MTMR2 y MTMR6 utilizan como sustrato a PI2 y PI3 (Zhao *et al*, 2001; Berger *et al*, 2001). La sobreexpresión de las miotubularinas en levaduras da como resultado el incremento del tamaño de las vacuolas, fenotipo consistente con la depleción de PI2 ó PI3 (Robinson y Dixon, 2006). Este mismo efecto se ha observado cuando MTM1 se sobre expresa en células COS7, teniendo como consecuencia estructuras endosomales alargadas (Tsujita *et al*, 2004). Debido a que PI2 y PI3 se encuentran localizados principalmente en la membrana de los endosomas, la familia de las miotubularinas participa en el tráfico endosomal (Robinson y Dixon, 2006).

3.2.5 CDC14s.

Las CDKs (ciclina-dependientes cinasas) regulan varias de las transiciones del ciclo celular, incluyendo la citocinesis, proceso en el cual las Cdc14 (Cell division cycle 14) fosfatasas revierten los eventos de fosforilación de las CDKs permitiendo que el ciclo celular se lleve a cabo (Stegmeier y Amon, 2004). Al igual que otros reguladores mitóticos, Cdc14 se localiza en una gran variedad de estructuras celulares dependiendo del ciclo celular. Durante la mitosis se encuentran en los centrosomas, cinetocoro, uso mitótico, cuerpo medio y en el sitio de la división celular. En todos estos sitios se presume que desfosforilan a su sustrato, incluyendo a aquéllos que participan en la citocinesis (Trautmann y McCollum, 2002). Durante la interfase se concentran en el núcleo o centrosomas de eucariontes superiores, inhibiendo su actividad enzimática (Clifford *et al*, 2008).

3.2.6 Fosfatasa regenerantes de hígado (PRLs).

Las fosfatasa re-generantes de hígado (PRLs del inglés Phosphatases of regenerating Liver) PRL-1, PRL-2 y PRL-3 forman otro subgrupo de DUSPasas. La PRL-1 fue originalmente descrita como un gene de expresión temprana en el hígado en regeneración (Diamond *et al*, 1994). Posteriormente las PRL se han implicado en el desarrollo de numerosos procesos de tumorigénesis (Stephens *et al*, 2005). La PRL-3 ha recibido mucha atención ya que está involucrada en metástasis de tumores, se sobre expresa en metástasis a hígado del cáncer colo-rectal (Saha *et al*, 2001), y también se ha encontrado su mRNA en casi todas las lesiones metastásicas derivadas del cáncer colo-rectal (hígado, pulmón, cerebro u ovario) (Bardelli *et al*, 2003). También la expresión elevada de PRL-3 se ha detectado en otros tipos de cáncer, como linfoma de Hodgkin (Schwering *et al*, 2003), carcinoma de hígado (Wu *et al*, 2004), cáncer de seno (Parker *et al*, 2004) y progresión de cáncer de ovario (Polato *et al*, 2005). Se ha encontrado evidencia que indica que PRL-3 regula a la Src cinasa (Csk), lo cual conduce a una activación de Src, posteriormente, Src-activado inicia una serie de rutas de señalización, incluyendo a las proteína cinasas 1 y 2 reguladas por señales extracelulares (ERK1/2), al transductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT3) y a p130cas, proporcionando un mecanismo probable por medio del cual PRL-3 promueve la migración celular y la proliferación (Liang *et al*, 2007).

3.2.7 DUSPasas atípicas.

Las DUSPasas incluyen a un grupo de enzimas que aún no han sido caracterizadas completamente, en principio no presentan el motivo de reconocimiento para las MAP cinasas y son de un tamaño menor (menos 250 aa) que las MKPasas (Alonso *et al*, 2004). Algunos autores han mencionado que existen aproximadamente por lo menos 16 DUSPs atípicas con algunas características de las MKPs y son más similares a la VH1 (marco de lectura abierta H1 del virus vaccinia) fosfatasa presente en virus vaccinia, pero no comparten un ancestro común proximal y filogenéticamente son muy distintas de las PTP clásicas y MKPs. De estas fosfatasa, 13 muestran un peso molecular menor a 27 kDa y las tres restantes son de mayor tamaño debido a otros dominios funcionales o de unión (Patterson *et al*, 2009).

3.3 Cdc25 fosfatasas

Las primeras DUSPasas descritas de esta subfamilia fueron las fosfatasas Cdc25, las cuales se definieron como promotoras de la división celular (Millar y Russell, 1992). Las fosfatasas Cdc25 desfosforilan y activan a las proteínas Cdks, las cuales son participantes clave en el programa de división celular inducido en respuesta a señales extracelulares incluyendo factores de crecimiento. Las Cdk acopladas a su ciclina correspondiente son mantenidas en un estado inactivo por la fosforilación dual de treonina y tirosina adyacentes localizadas en el extremo amino terminal (fosforilaciones mediadas por las PKs Wee1 y Myt1) (Honda *et al*, 1992; Liu *et al*, 1997). Las Cdc25s activan a las proteínas Cdk por desfosforilación de los residuos de fosfotreonina y fosfotirosina.

La regulación de la actividad de cinasa de las Cdk es un área que permanece abierta para su estudio ya que se han propuesto a éstas y a las Cdc25 como blanco terapéutico para el tratamiento de varias enfermedades como cáncer, diabetes, enfermedad de Alzheimer (Ducret *et al*, 2005).

Como controladores clave en la división celular, las Cdc25 están sujetas a una regulación precisa, incluyendo la retroalimentación enzima-sustrato que comprende complejos específicos CDKs/ciclina y su activador Cdc25 correspondiente. Por ejemplo, la actividad de Cdc25A en humano es regulada por Cdk2/ciclina E con su subsiguiente activación, y la estabilidad de la proteína Cdc25A se incrementa por la fosforilación de Cdk1/ciclina B (Hoffmann *et al*, 1994; Mailand *et al*, 2002); la actividad de Cdk2 regula negativamente la estabilidad de Cdc25A (Ducret y Lazo, 2003); la estabilidad de la proteína Cdc25B es regulada negativamente por el complejo Cdk1/ciclina A (Baldin *et al*, 1997) y la actividad catalítica de Cdc25 se ve incrementada por la interacción con el complejo Cdk1/ciclina B (Hoffmann *et al*, 1993). Además, las Cdc25 son reguladas por “splicing” alternativo de sus genes, lo cual resulta en la expresión de 12 variantes. El papel preciso del “splicing” alternativo no está claro, pero se sugiere que las variantes puedan tener actividad diferencial en distintos tejidos y durante las diferentes fases del ciclo celular (Forrest *et al*, 1999; Wegener *et al*, 2000).

3.4 Basadas en aspartato EyA fosfatasa

Esta clase se definió en el año 2003 cuando se observó en mutantes de *Drosophila* que la proteína ausente en ojo (EyA) desempeña una actividad de tirosina fosfatasa (Plaxton y McManus, 2006). Las PTPs de la clase I, II y III están basadas en cisteína y estructuralmente muestran un pliegue ancestral común, pero, por otra parte, las enzimas de la clase IV tienen un mecanismo catalítico completamente distinto, ya que utilizan para esto un residuo de ácido aspártico y un catión (Plaxton y McManus, 2006). Durante el desarrollo normal del ojo intervienen varios factores de transcripción, entre los que se encuentra EyA, el cual se ha determinado que está conservado desde gusanos hasta el humano. Las proteínas EyA tienen como característica poseer dos dominios conservados: el dominio del extremo C-terminal (ED) que mide 271 aminoácidos de longitud y está altamente conservada en la familia EyA, el cual interacciona con otros factores de transcripción SO (sine oculis) y DAC (dauchshund); en el extremo N-terminal se encuentra un dominio menos conservado, conocido como EyA-dominio 2 (ED2); en la área central presenta una secuencia prolina-serina-treonina, también la proteína contiene dos sitios de fosforilación por MAPK (Briedis, 2008); además, la proteína contiene un motivo catalítico de PTPasa (Chen *et al*, 1997; Li *et al*, 2003; Tootle *et al*, 2003). La yuxtaposición de las funciones de factor de transcripción y de fosfatasa de EyA es un aspecto intrigante, pero se ha determinado que ambas funciones son requeridas para el desarrollo del ojo (Rayapureddi *et al*, 2003), además, se ha reportado que la actividad de EyA en *Drosophila* es regulada positivamente por sus sitios de fosforilación (Briedis, 2008).

3.5 Proteínas tirosina fosfatasa de bajo peso molecular (PTPLMW)

La secuencia y la estructura global de las enzimas tirosina fosfatasa ha mostrado que varían mucho de una familia a otra, pero aún así, estas enzimas pertenecientes a la superfamilia de las PTP, comparten un dominio catalítico central formado por 4 hojas β paralelas que están rodeadas por hélices α , en el caso concreto de Wzb de *E. coli*, 3 α hélices por un lado y 2 por el otro (figura 5), presenta tres bucles esenciales: el bucle-P contiene la cisteína catalítica (en el motivo conservado HCX₅R), el bucle WPD que contiene el residuo aspártico

conservado junto con residuos implicados en la catálisis, y el bucle Q que está relacionado con el reconocimiento de la fosfotirosina sustrato coordinándolo junto con una molécula de agua (García Hernández, 2008).

Las PTPLMW son una familia de enzimas de las cuales se ha reportado que la mayoría posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a un peso aproximado de 18-kDa. Están implicadas en la regulación del crecimiento celular. A pesar de que la similitud de secuencia es muy limitada a la gran familia PTP, muestran un motivo de la familia de las PTP conservado en el sitio catalítico (Raugei *et al*, 2002). Las PTPLMW se han implicado en algunas líneas celulares transformadas, en donde su sobre-expresión tiene un efecto oncogénico (Kikawa *et al*, 2002). Ha habido por lo tanto un creciente y considerable interés por parte de diversos grupos en las PTPLMW como objetivos de terapia anti-tumoral, así como la búsqueda de modelos *in vivo* y celulares para el ensayo de posibles inhibidores de esta enzima (Andreeva y Kutuzov, 2008).

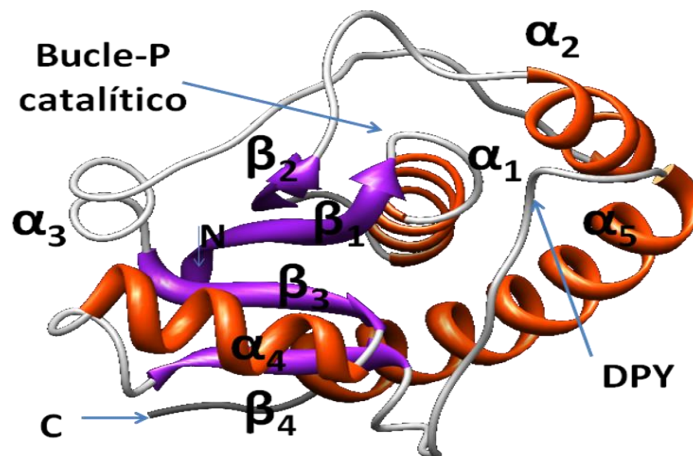


Figura 5. Estructura en listones Wzb de *E. coli*. Perteneciente a la familia PTPLMW, documento PDB 2FEK vista con el software UCSF Chimera, en donde se representan las cadenas y bucles principales (Tomado de Lescop *et al*, 2006).

Las PTPLMW interactúan con varios receptores tirosina cinasas (RTKs) incluyendo el receptor del factor de crecimiento epidermal (Ramponi *et al*, 1989), el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) (Raugei *et al*, 2002), el receptor de insulina (Taddei *et al*, 2000) y el receptor epinefrina (Eph) (Stein *et al*, 1998). Una vez que se estimulan fibroblastos a través del PDGFR, las

PTPLMW interaccionan con éste, lo desfosforilan, teniendo como consecuencia la reducción en proliferación (Cirri *et al*, 1998). Lo anterior ha llevado a la conclusión de que estas PTPasas inhiben la proliferación celular inducida por factores de crecimiento, pero en algunas instancias actúan como reguladores positivos, por ejemplo, en células transformadas con v-Ha-Ras (Ramponi *et al*, 1997).

La actividad de las PTPLMW se modula generalmente por la fosforilación de tirosinas específicas de su secuencia, y su actividad sobre sustratos específicos depende de su localización subcelular. Estas enzimas pueden ser oxidadas reversiblemente durante la señalización inducida por factores de crecimiento trayendo como consecuencia la inhibición de su actividad enzimática. En algunos organismos la recuperación de la actividad de fosfatasa dependerá de la disponibilidad de glutatión reducido (Raugei *et al*, 2002). Las PTPLMW están asociadas a la desfosforilación de muchos receptores de factores de crecimiento que inducen la mitosis, como PDGF-R, actuando a través de la desfosforilación del PDGFR activado, y en la reorganización/rearreglo del citoesqueleto, mediante la desfosforilación de p190RhoGAP y la consecuente regulación de pequeñas GTPasas Rho (Raugei *et al*, 2002).

Diversos autores han reportado que las PTPLMW están implicadas en la regulación de la mitosis, la reorganización del citoesqueleto y regulación de procesos que dependen de eventos de fosforilación-desfosforilación. Sin embargo, las PTPLMW se han asociado también a moléculas como β -catenina, en donde con análisis de microscopía confocal se ha mostrado que β -catenina colocaliza con PTPLMW en el sitio de la membrana plasmática, esto, tanto *in vitro* como *in vivo*, y en casos de una sobre expresión de PTPLMW se potencia fuertemente la adhesión célula-célula mediada por cadherina, pero una forma dominante negativa de PTPLMW induce el fenotipo opuesto (en líneas celulares de carcinoma NIH3T3 y células MCF.7). La pérdida de la asociación β -catenina-cadherina se ha correlacionado con la transición de un tumor benigno hacia un cáncer invasivo metastásico (Taddei *et al*, 2002). Estudiando las proteínas PTPLMW de mamíferos, algunos autores han reportado que las isoformas IF1 y IF2 son capaces de interactuar con regiones bien definidas de caveolina-1,

acompañada por una modulación de la actividad enzimática, además, existe un efecto inhibitor mayor en la isoforma IF1 que contra IF2, sin embargo, la secuencia motivo putativo de unión a la caveolina-1 no es la responsable de esta asociación (Caselli *et al*, 2007).

3.5.1 PTPLMW en protozoarios

Actualmente se ha reportado que homólogos de PTPLMW pueden ser detectados prácticamente en todos los protozoos parásitos examinados, excepto en apicomplexa (Andreeva y Kutuzov, 2008). Aunque ha sido posible identificar en el cinetoplasto homólogos de las PTPLMW, éstas no poseen la actividad de fosfatasas en donde algunas teorías lo adjudican a una sustitución del residuo de catálisis cisteína por una glicina (Zhang *et al*, 1994). En cuanto a otros protozoarios como *T. vaginalis*, esta especie cuenta con 8 isoformas de estas PTPasas, pero son inactivas. Se ha sugerido que han reducido mucho su actividad o evolutivamente hayan perdido la capacidad de fosfatasas, debido a una sustitución del residuo ácido aspártico que sirve como un donador de protones para el grupo tirosil (Andreeva y Kutuzov, 2008).

La mutación correspondiente al ácido aspártico involucrado en la catálisis de las PTPLMW en mamíferos, reduce drásticamente la V_{max} de la enzima (Zhang *et al*, 1994). Una PTPLMW de parásitos de las más citadas por el momento es la de *Tritrichomonas foetus* (denominado TPTP), la cual se ha caracterizado enzimáticamente (Thomas *et al*, 2002) y su estructura cristalina resuelta (Gustafson *et al*, 2005). Las funciones biológicas de ésta y otras PTPLMW de protozoarios se desconocen, aunque cabe resaltar que se han hecho estudios de sus actividades enzimáticas con sustratos artificiales, y uno en común para la mayoría de estas PTPLMW es el p-nitrofenol-fosfato (pNPP).

3.5.2 PTPLMW humanas y el cáncer

Recientemente en humano se han encontrado dos isoformas activas de PTPLMW, conocidas como A y B, y dos variantes catalíticamente inactivas, isoforma C y SV3 (variante de corte y empalme 3). Las dos isoenzimas activas se originan por splicing alternativo del ARN transcrito causando que las isoformas difieran en un

bucle formado por 40 – 73 residuos de aminoácidos que estarían en una posición adyacente al sitio catalítico (Maccari y Ottanà, 2012), por lo que esta variación determinaría la especificidad de las isoenzimas. Las PTPLMW humanas operan 'rio abajo' en las rutas de señalización de factores de crecimiento y se han relacionado con la transformación en diferentes tipos de cánceres humanos (Malentacchi *et al*, 2005). Se ha observado que los niveles de las PTPLMW tanto en su ARNm y de proteína, aumentan significativamente en los tumores de mama, colon, vejiga y renales (Marzocchini *et al*, 2008; Malentacchi *et al*, 2005). La sobreexpresión de PTPLMW en las células tumorales es suficiente para inducir neoplasia en células normales (Maccari y Ottanà, 2012) Además, los altos niveles de PTPLMW son generalmente pronóstico de un cáncer mucho más agresivo (Homan *et al*, 2010).

Se ha reportado que diversos receptores de membrana plasmática sirven de sustrato para la PTPLMW humana, entre ellos el de epinefrina, este sustrato endógeno tipo epinefrina A2 (Eph A2) está estrechamente relacionado con el potencial oncogénico de PTPLMW (Maccari y Ottanà, 2012). La actividad de esta enzima tirosina cinasa Eph A2 está asociada fuertemente en los cánceres humanos, como por ejemplo los de próstata, riñón, y cánceres de pulmón (Miao *et al*, 2009). El mecanismo de acción en el que interviene EphA2, es que mediante la estimulación de EphA2 independiente de ligando, se incrementa la migración de las células y también la progresión de los tumores, además, la sobreexpresión de EphA2 está asociada con el aumento de expresión de PTPLMW (Maccari y Ottanà, 2012). Cuando se asocia PTPLMW con EphA2, PTPLMW está menos disponible para desfosforilar p190RhoGap, lo que conduce a pérdida de la adhesión célula-matriz. (Marzocchini *et al*, 2008). Cabe recordar que las Rho GTPasas son instrumentos importantes en la regulación de la reorganización del citoesqueleto (Miao *et al*, 2009).

Para las PTPLMW de distintos organismos, principalmente del humano, se ha reportado que diversas moléculas pueden modular su actividad enzimática, las cuales incluyen los flavonoides, quercetina y Morin, adenina, y purinas (Miranda *et al*, 2006; Tanizaki *et al*, 1977).

Se ha reportado que la sobre-expresión de las PTPLMW en líneas celulares como K562 conduce a la resistencia a algunos fármacos como la vincristina, por lo que las PTPLMW sobre-expresadas en líneas celulares humanas coopera con un fenotipo de desarrollo de multi-resistencia, al menos en parte, a través de mantener cinasas Src y Bcr-Abl en estados más activos. Esto sugiere que la inhibición de las PTPLMW puede ser una estrategia útil para el desarrollo de terapias contra leucemia mielógena crónica multi-resistente (Ferreira *et al*, 2012). Diversos grupos han hecho intentos para sintetizar inhibidores de PTPLMW, pero éstos se han visto obstaculizados por la escasez de datos tanto sobre el inhibidor y las interacciones de éste con la proteína (Forghieri *et al*, 2009). Ya se han encontrado algunos inhibidores para estas PTPLMW, pero éstos también son cofactores necesarios para la actividad de otras enzimas, por lo que han carecido de la especificidad necesaria y requerida. Uno de estos inhibidores es el Pyridoxal 5'-fosfato (PLP), sobre el cual han reportado que presenta una fuerte unión con una constante de inhibición (Ki) de 7.6 a pH 5, (pH necesario para que muestre una fuerte inhibición) (Zhou y Etten, 1999).

Se ha sugerido que es importante tener en cuenta las diferentes y a veces opuestas funciones mostradas por las PTPLMW dependiendo de su estado de activación, ya que por un lado la forma catalíticamente activa de PTPLMW es capaz de desfosforilar receptores y moléculas de señalización, lo que da como resultado la inhibición de la proliferación celular, sin embargo, cuando se encuentra la forma catalíticamente inactiva de PTPLMW como en el humano, también puede actuar como un andamio de proteínas que contienen dominios SH2, lo que puede contribuir a la regulación positiva de vías de señalización, supervivencia y proliferación (Souza *et al*, 2009). La contribución real de las PTPLMW en el desarrollo y progresión de un tipo específico de cáncer deberá ser analizada teniendo en cuenta el estado de la actividad catalítica de la enzima, además de los niveles de su expresión, ya que también se le ha asociado a enfermedades como la diabetes (Bottini E y Bottini F; 2013). Dado la actividad promitogénica de la enzima con actividad no catalítica, el aumento de expresión de PTPLMW en las células tumorales no siempre podría ser acompañado por un aumento celular de la actividad enzimática total (Souza *et al*, 2009).

3.6 PTPasas en *E. histolytica*.

La invasión amibiana a través de la mucosa y dentro de los tejidos submucosales produce la colitis amibiana. Esta invasión conlleva al contacto entre los trofozoítos amibianos y proteínas de matriz extracelular como la fibronectina, lo cual provoca una cascada de señalización en el parásito, causando rearrreglos de actina que alteran la adherencia y la motilidad (Meza, 2000). Esta motilidad permite que el parásito invada otros tejidos y órganos, causando principalmente el absceso hepático amibiano.

Se ha reportado que *E. histolytica* contiene dos actividades de fosfatasa ácida, de las cuales una es secretada (SAP) y la otra se encuentra unida a membranas (MAP). Por otro lado, en *E. dispar*, amiba no patógena para el humano, solamente se ha detectado la actividad unida a membrana pero es incapaz de secretarla (Talamás-Rohana *et al*, 1999; Aguirre-García *et al*, 1997; Anaya-Ruiz *et al*, 1997; Aguirre-García *et al*, 2000). Estudios realizados con SAP purificada del medio de cultivo indican que esta posee actividad de PTPasa, y que esta actividad es requerida para producir la desestabilización del citoesqueleto de actina y el despegado del substrato de las células HeLa (Anaya-Ruiz *et al*, 2003). Los datos anteriores sugieren que la actividad PTPasa de SAP puede ser un elemento importante del mecanismo patogénico de este parásito.

A la fecha se han aislado de *E. histolytica* los genes *EhPTPA* y *EhPTPB* que codifican para proteínas con actividad de PTPasas clásicas. Las enzimas *EhPTPA* y *EhPTPB* son similares entre sí en un 37%, y presentan el dominio catalítico específico de las PTPasas, y son PTPasas no transmembranales tipo receptor. El análisis de homología con otras PTPasas de vertebrados, muestra los 10 motivos conservados dentro del dominio catalítico. Ensayos de PCR revelaron que la expresión del gene *EhPTPA* aumenta en trofozoítos recuperados de absceso hepático amibiano (AHA) de 96 horas de desarrollo con respecto a trofozoítos de cultivo. Lo anterior sugiere que este gene puede participar en el mecanismo de daño al huésped ó que el aumento en su expresión se deba a la respuesta al estrés inducido por el huésped. Por otro lado, una proteína recombinante GST-*EhPTPA* tiene actividad enzimática sobre el substrato pNPP a un pH óptimo de

6.0, siendo inhibida por inhibidores típicos de PTPasas tales como el ortovanadato de sodio y el molibdato de amonio. Anticuerpos anti-GST::EhPTPA, han revelado que la proteína nativa tiene un peso molecular aproximado de 45 kDa, y su expresión se ha detectado en trofozoítos recuperados de AHA, trofozoítos en proceso de fagocitosis y en trofozoítos resistentes a complemento (Herrera-Rodríguez *et al*, 2006)

Utilizando diferentes estrategias de búsqueda de genes (resultados preliminares) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/blast_table.cgi?taxid=Protozoa, <http://www.genedb.org/genedb/ehistolytica/>) que codifiquen para PTPasas en el genoma de *Entamoeba histolytica*, miembros del grupo de trabajo han encontrado que están codificadas 42 PTPasas (Tabla I) , comparado con las 107 que se encuentran en el genoma humano (Alonso *et al*, 2004).

Tabla I. PTPasas en los genomas de *E. histolytica* y de Humano

Grupo	<i>E. histolytica</i>	Humano
Clásicas	2	38
Especificidad dual	31+1*	65
Cdc25	7	3
LMW	1**	1
TOTAL	42	107

NE, No Encontrado. * Presenta homología con las PTEN. **Se encuentran 2 genes con solo un nucleótido de diferencia, de ahí que se creía que era el mismo gene.

Otro autores también han identificado y reportado varios genes que codifican para PTPasas (Andreeva y Kutuzov, 2008): clásicas (Herrera-Rodríguez *et al*, 2006) MKPasas, PTEN, Miotubularinas, PRLs, Cdc25, PTPLMW. La discrepancia en el número de genes encontrados por nuestro grupo y el reportado puede deberse a las diferentes estrategias empleadas para su búsqueda.

3.7 Proteínas tirosina fosfatasa de bajo peso molecular de *E. histolytica*.

En nuestro grupo se clonaron 2 genes que codifican para proteínas tirosina fosfatasa de bajo peso molecular a partir de DNA genómico de trofozoítos de *E. histolytica* y utilizando oligonucleótidos específicos. Con el fin de caracterizar la actividad enzimática de estas PTPasas y de obtener anticuerpos, estos genes (EhPTPLMWA y EhPTPLMWB) se subclonaron en el vector pRSETA para obtener los plásmidos pRSETB-EhPTPLMWA y pRSETB-EhPTPLMWB para iniciar la purificación de las proteínas recombinantes correspondientes.

4 Justificación

Ya que las PTPasas participan en una gran variedad de eventos celulares normales y en diversos estados patológicos, nuestro grupo de trabajo se propone continuar con la línea de investigación que estudia el papel que juegan las PTPasas en la biología del parásito *E. histolytica*, en su virulencia y en los mecanismos de patogenicidad.

En particular, las PTPLMW participan en la mitosis inducida por factores de crecimiento y en el rearreglo del citoesqueleto. Por otro lado, se ha encontrado una expresión incrementada de PTPLMW en varios tipos de tumores. A nivel molecular, su actividad catalítica es importante para desfosforilar EphA2, p190 RhoGAP y FAK, moléculas que participan en la transformación celular y en migración, por lo que posiblemente juegue un papel importante en metástasis (Raugei *et al*, 2002; Souza *et al*, 2009). Debido a que los trofozoítos de *E. histolytica* son células altamente móviles y con capacidad migratoria, es importante estudiar la participación de la EhPTPLMW en estos eventos. Si bien los miembros de la familia de PTPLMW poseen un bajo grado de homología entre ellos, a nivel de secuencia primaria de amino ácidos, la conformación estructural de algunas de ellas ha mostrado que está conservada en gran medida, por lo que *E. histolytica* podría ser un buen modelo de estudio de inhibidores y activadores para PTPLMW de humano.

5 Hipótesis

Las proteínas EhLMWPTPs recombinantes se comportan como proteínas tirosina fosfatasa de bajo peso molecular, además de estar presentes en citoplasma de *E. histolytica* de manera similar a como se ha descrito en otros organismos.

6 Objetivo general:

Caracterizar parcialmente las proteínas tirosina fosfatasas de bajo peso molecular PTPLMWA y PTPLMWB de *Entamoeba histolytica*

6.1 Objetivos particulares

- Analizar *in silico* las proteínas EhPTPLMWA y EhPTPLMWB
- Identificar diferencias a partir de un modelo virtual generado en SWISS-MODEL
- Comparar las secuencias de aminoácidos con diversas especies.
- Identificar posibles ligandos.

- Analizar la expresión de los genes EhPTPLMW (mRNA) en trofozoítos de cultivo axénico y recuperados de absceso hepático amibiano.

- Analizar la actividad enzimática de las proteínas recombinantes 6His-rEhPTPLMWA y 6His-rEhPTPLMWB.
- Expresar y purificar 6His-rEhPTPLMWA y 6His-rEhPTPLMWB.
- Determinar el pH óptimo de actividad
- Determinar la Km con el sustrato pNPP a condiciones fisiológicas de 37 °C

- Obtener anticuerpos anti-6His-rEhPTPLMW

- Estudiar la localización subcelular de EhPTPLMW en trofozoítos adheridos a vidrio y fibronectina.

7 Materiales y métodos.

Cultivo de trofozoítos de la cepa HMI:IMSS:

Los trofozoítos de *E. histolytica* se cultivaron en medio TYI-S-33 (Diamond *et al*, 1978) complementado con 3% de vitaminas de Diamond y suplementado con 10% de suero bovino (previamente desnaturalizado a 56 °C), 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina.

Trofozoítos recuperados de absceso hepático amibiano.

Hámsteres (*Mesocricetus auratus*) machos se inocularon por miembros del grupo de trabajo vía intra-hepática con trofozoítos procedentes de medio de cultivo. Después de 6 días del reto, los animales fueron sacrificados y los hígados con los abscesos se removieron. Se cortó el hígado en piezas pequeñas, se transfirieron a medio TYI-S-33 a 37 °C. Los trofozoítos recuperados del absceso hepático amibiano en cultivo, se colectaron tras 7 días para guardarlos a -70 °C para ensayos posteriores (Chávez-Munguía *et al*, 2004).

Purificación del RNA y DNA

A partir de 5×10^6 trofozoítos se purificó RNA total utilizando el kit TRIzol (GIBCO BRL), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. De un cultivo de trofozoítos, se empastillaron a 1 500 rpm durante 10 min. Brevemente a la pastilla celular se le adicionó 1 ml de trizol resuspendiendo durante 1 min, se agregó 250 µl de cloroformo, se agitaron las muestras vigorosamente, se dejó reposar 1 min. Los tubos se centrifugaron a 14 000 rpm durante 10 min, la fase acuosa se transfirió a un tubo cónico Eppendorf, se agregaron 500 µl de isopropanol por cada ml de trizol, se incubó durante 10 min a T° ambiente, posteriormente se incubaron a -20 °C durante al menos 1 hora. El RNA precipitado se colectó a 14 000 rpm durante 10 min. La pastilla se lavó con 600 µl de etanol al 70-75%, se secó a T° ambiente y finalmente el RNA se resuspendió en agua DEPC. Se incubaron de 55-60 °C 15 min para inactivar a alguna proteína que pueda dañar el RNA.

La extracción del DNA de *E. histolytica* se realizó para confirmar la funcionalidad de los “primers” utilizados para extraer una sección de las secuencias

correspondientes a los genes de las PTPLMW, y tener las condiciones adecuadas del RT-PCR de una sección de los genes de EhPTPLMW, realizar digestión enzimática y así identificar el gen de EhPTPLMWA ó el gen de EhPTPLMWB. Para la extracción de DNA amibiano se utilizaron 2×10^6 trofozoítos, se empastilló a 1500 rpm durante 5 min, se les pulverizó en un mortero con nitrógeno liquido, se mezcló en 6 ml de buffer de lisis (Tris HCl 200 mM pH 8.5, NaCl 200 mM, SDS 0.5 %, EDTA 25 mM y 1 mg/ml de proteinasa K), después a 65 °C por 30 min, se centrifugó 1 ml de la mezcla a 14 000 rpm por 15 min, el sobrenadante se recuperó, fue lavado con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (24:24:1) y un lavado con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se recuperó 450 μ l del sobrenadante, se agregó 45 μ l de acetato de amonio 5 M y 900 μ l de etanol al 100 % frio, tras mezclar los tubos, se incubaron a -20 °C por 2 h, fueron descongelados y centrifugados a 14 000 rpm por 15 min, la pastilla se lavó con etanol al 70 %, tras secarlas, se disolvió las pastillas en 50 μ l de agua. El DNA fue incubado con RNAsa T (Roche 109193) y RNAsa A1 (Reseach Organic 12650-88) durante 30 min a 37 °C.

Plásmidos.

Se trabajó con el plásmidos pRSET A (figura 6), perteneciente al Dr. José Luis Rosales Encina, que tiene inserto 6HisEhPTPLMWA ó 6HisEhPTPLMWB.

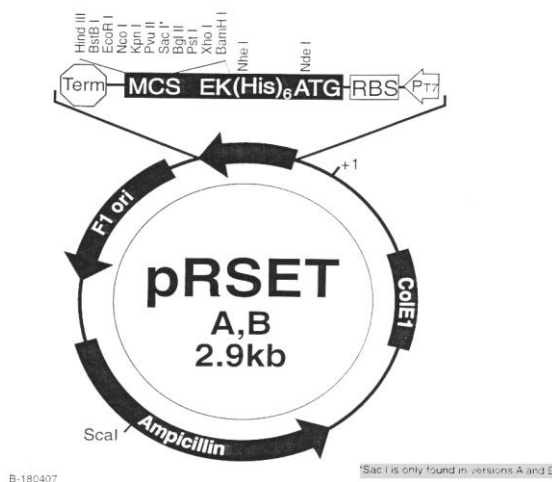


Figura 6. Mapa de los plásmidos pRSETA, pRSETB. Los vectores pRSET (A, B y C) fueron diseñados para la expresión y purificación de niveles altos de proteína. Tienen un tamaño de 2940 pb y contienen 11 sitios de clonación. La expresión está bajo el control del promotor T7 y contienen el gen de resistencia a ampicilina para la selección de clonas positivas.

Células competentes *E. coli* Top 10F' y BL21 (DE3) pLysS.

Las bacterias de *E. coli* de la cepa de interés (BL21 (DE3) pLysS y Top 10F') se crecieron en 10 ml de medio LB (Luria Bertani: Triptona 1 %, Glucosa 0.2 %, extracto de levadura 0.5 %, NaCl 0.5 %) durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se inoculó 5 ml de estas bacterias en 10 ml de medio LB fresco, se mantuvo en movimiento a 37 °C con aeración constante hasta una D.O₆₀₀ de 0.5. Las bacterias se colectaron a 4 000 rpm durante 10 min, la pastilla se resuspendió en 1 ml de CaCl₂ 50 mM en frío, por un periodo de entre 25–35 min. Después las bacterias se colectaron por centrifugación a 3 000 rpm 5 min, la pastilla se resuspendió en 100 µl de CaCl₂ 50 mM y se incubaron en hielo durante 20 min.

Transformación de células *E. coli* Top 10F' y BL21 (DE3) pLysS.

A 100 µl de las células competentes se les adicionó por separado los plásmidos pRSETA-EhPTPLMWA y pRSETA-EhPTPLMWB, se incubaron en hielo durante 20 min y después se incubaron por 2 min a 42 °C ó por 5 min a 37 °C. Los tubos se colocaron nuevamente en hielo durante 2 min, se agregó 1 ml de medio LB sin antibiótico y se incubó a 37 ° por 35 min. Los tubos se centrifugaron durante tres min a 2 500 rpm, el sobrenadante resultante se desechó por decantación, las células se resuspendieron en aproximadamente 100 µl de medio sobrante en el mismo tubo cónico. Las células fueron espatuladas en placas LB/Amp (100 µg/ml de ampicilina), se incubaron a 37 °C durante toda la noche.

Purificación de DNA plasmídico.

Una colonia transformada con el plásmido de interés se seleccionó al azar de las placas LB/Amp, se inoculó en 25 ml de medio LB/ampicilina incubando toda la noche a 37° C. Al otro día se purificó el DNA de cada colonia de *E. coli* Top 10F' por el método de miniprep por lisis alcalina (Maniatis *et al*, 1989). El procedimiento: Se tomó 2 ml del cultivo de toda la noche y se centrifugó durante 20 seg a máxima velocidad; la pastilla se resuspendió en 100 µl de STE (Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8 y sacarosa 50 mM), se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Se adicionó 200 µl de la solución "II" e incubó en hielo 5 min. Posteriormente se adicionaron 150 µl de acetato de potasio 3 M pH 4.8 y se colocó en hielo 5 min. Se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm 3 min para

separar el debris y el DNA cromosomal, se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf con 500 µl de etanol al 95 % por cada 300 µl de muestra, se incubó durante 15 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min para precipitar los ácidos nucleicos. Se removió el sobrenadante, la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70 %, se secó a T° ambiente para diluirla en 30 µl de agua estéril. El DNA se incubó con RNAsa A-T1 a 37° C durante 2 h.

Para las reacciones de secuenciación, el DNA plasmídico se purificó en columna QIAGEN-tip 20. Antes de comenzar, se equilibró la columna con 2 ml de amortiguador QBT, posteriormente se adicionaron 300 µl del plásmido correspondiente pRSETA-EhPTPLMWA ó pRSETA-EhPTPLMWB por separado, se lavó con 4 ml del amortiguador QC para posteriormente eluir el DNA con 800 µl de amortiguador QF. El eluido se precipitó utilizando 700 µl de isopropanol, se centrifugó a 14 000 rpm durante 30 min, finalmente la pastilla se lavó con 1 ml de etanol 70 %, se dejó la pastilla secar a temperatura ambiente, se resuspendió en amortiguador TE. Finalmente el DNA se corrió en un gel de agarosa al 1 % y en un transiluminador de luz UV se identificaron las bandas correspondientes a los plásmidos de pRSETA-EhPTPLMWA y pRSETA-EhPTPLMWB, se guardaron las muestras a -70 °C para su posterior uso.

Reacción de secuenciación.

Se utilizaron tubos de PCR estériles donde se colocaron 1000-500 ng de DNA plasmídico, 8 µl de MIX y 10 p moles de oligonucleótido T7 para una reacción y el oligonucleótido T3 para la otra, se llevó a 20 µl con agua estéril. Se sometieron al programa: 96 °C por 30 segundos, seguido de 30 ciclos de 96 °C por 20 s, 53 °C por 20 s y 60 °C por 4 min. Posteriormente se hidrataron columnas para purificación, se colocaron las muestras y centrifugaron a 3000 rpm durante 2 min, en ellas se colocó 20 µl de la reacción de PCR, las columnas se centrifugaron a 3000 rpm 2 min, se colectó y secó la muestra en “speed vac”. Se guardó a -20 °C y se secuenció de forma automatizada utilizando el kit Taq Fluorescence-Based Dye Terminator Cycle Sequencing. Las lecturas de la reacción de secuenciación se obtuvieron con el equipo Perkin Elmer/Applied Biosystems 377-18EIn DNA

Sequencer, del Departamento de Genética y Biología Molecular del Cinvestav-México a cargo de la QFB. María Guadalupe Aguilar González.

Reacción de Retro-transcripción (RT).

Para este ensayo se utilizó RNA total de trofozoítos de *E. histolytica* y de *E. dispar*. Brevemente, en tubos eppendorf estériles se adicionaron 1-3 µg de RNA total y 500 ng/µl de oligonucleótido poli (dT) (Invitrogen), random primers 50 ng/µl (Invitrogen), 1 µl de dNTP Mix 10 mM (Invitrogen), en un volumen total de 12 µl, se calentaron las muestras 10 min a 70° C y posteriormente se enfriaron rápidamente en hielo por 2 min. Se adicionaron: 4 µl del amortiguador de primera cadena 5X, 2 µl de DTT 0.1 M, y 1 µl de la mezcla de dNTP's (10 mM ó 2.5 mM) (Perkin Elmer). Los tubos se incubaron 2 min a 42° C. Finalmente, se adicionó 1 µL de enzima SuperScript II (Invitrogen) y se incubó durante 50 min a 42 °C. La reacción se inactivó por 15 min a 70 °C, y el cDNA se utilizó como templado para la reacción de PCR.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para la amplificación se utilizó el cDNA de los trofozoítos de *E. histolytica* y *E. dispar*, el cual se cuantificó en un equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific); para los ensayos comparativos entre los distintos cultivos de trofozoítos se incluyó la expresión del gen de actina en todos los experimentos .

La reacción de amplificación (PCR) se preparó a partir de 1 µL (5 % de la reacción total de RT) del producto de la reacción anterior en la mezcla de reacción que consistió en amortiguador 1X, 2.0 mM MgCl₂, 2.5 mM de la mezcla de dGTP, dTTP, dATP, dCTP, 20 pmoles de cada oligonucleotido y 5 U AmpliTaq (Applied Biosystems). Las condiciones de la amplificación en un equipo PCR Sprint IP20 (Thermo Scientific) fueron: calentamiento inicial a 94 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 55 °C por 30 s y amplificación a 72 °C por 1 min. Los productos de la reacción de PCR se analizaron en geles de agarosa 1-1.8% y visualizados con bromuro de etidio (BIO-RAD), se utilizaron como marcadores de PCR, fragmentos de 100-1,000 pb Bio-ladder (Bio-Synthesis).

Los oligonucleótidos empleados para amplificar un segmento de los transcritos de LMWPTP de *E. histolytica* y *E. dispar* son:

Oligo1 LMW A (R) 5'- CTGCTGCAGAAGCAGTTATGAA 3'

Oligo2 LMW B (F) 5'- GGGTCAGGAACTTCAGTTGTTT 3'

Los oligonucleótidos empleados para amplificar el transcrito de actina de *E. histolytica* y *E. dispar* son:

Oligo1 ACTR 5'- CAAGTCTAAGAATAGCATGTG 3'

Oligo2 ACTF 5'- GGGACGATATGGAAAAGATC 3'

Digestión enzimática del DNA.

Los amplicones obtenidos de la reacción de RT-PCR se sometieron a digestión con la enzima BsrD1 (R05745 BioLabs) durante 2.5 h a 65 °C en el amortiguador NEBuffer 2 (B7002S BioLabs) complementado con 0.1 µg de albumina sérica bovina.

Para la liberación del inserto contenido en los plásmidos pRSET-EhPTPLMWB y pRSET-EhPTPLMWB se utilizaron las enzimas EcoR1 (R01015 BioLabs) y BamH1 (R01365 BioLabs), en el amortiguador NEBuffer 2 complementado con albumina sérica bovina (400-2000 ng). La mezcla de reacción se incubó durante 1 h a 37 °C.

Los productos de la reacción se analizaron en geles de agarosa al 1 % y visualizados con bromuro de etidio (BIO-RAD), se utilizaron como marcadores los fragmentos de 100-1,000 pb Bio-ladder (Bio-Synthesis).

Purificación de las proteínas recombinantes.

Bacterias BL21 (DE3) pLysS transformadas con los plásmidos correspondientes (pRSETA-EhPTPLMWA y pRSETA-EhPTPLMWB) se incubaron toda la noche a 37 °C en agitación en 5 ml de medio LB con ampicilina. Al otro día se inoculó 3 ml de estas a 50 ml de medio fresco con ampicilina, se incubó hasta una D.O₆₀₀ de 0.5. Posteriormente se agregó IPTG (Boehringer Mannheim) a una concentración de 1 mM. Los cultivos se incubaron durante 2 a 2.5 h aproximadamente a 37 °C con agitación constante, posteriormente las bacterias se centrifugaron a 8000 rpm

en un rotor JA10 Beckman. La pastilla de células se resuspendió en 15 ml de buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8.5, PMSF 1M, β Me 10 mM y una pastilla de inhibidor de proteasas complete EDTA-free Roche Diagnostics GmbH) incubándolo 5 min en hielo. Las muestras fueron sonicadas 5 veces por 1 min con intervalos de 2 min en hielo y después se centrifugaron a 10 000 rpm en el rotor JA20 por 10 min, se colectó el sobrenadante y se pasó a través de filtros de 0.45 μ m, posteriormente se pasó a una columna Ni-agarosa (Novagen 69670-3) previamente equilibrada con Buffer A (consiste en Tris-HCl 20 mM pH 8.5, KCl 100 mM, Imidazol 20 mM, glicerol al 10 %, β Me 10 mM), después de pasar la muestra por la columna, se lavó de forma secuencial con buffer A, buffer B (Tris-HCl 20 mM pH 8.5 con 0.1 % de Tritón X-100), buffer C (Tris-HCl 20 mM pH 8.5, KCl 1 M, glicerol al 10 %, β Me 10 mM), Las proteínas unidas a la columna se eluyeron en buffer D (500 mM de Imidazol).

Para comprobar la pureza y que las proteínas tuvieran el peso molecular esperado, éstas fueron analizadas en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras y posteriormente las bandas fueron visualizadas mediante tinción con azul de Coomassie.

Electroforesis e inmunotransferencias

Las proteínas recombinantes se separaron en geles de poliacrilamida–SDS al 12% (Gel separador: acrilamida al 12 %, bisacrilamida al 0.216 %, Tris-HCl 375 mM pH 8.8, SDS al 0.1 %, persulfato de amonio al 0.063 % y TEMED al 0.05 %; gel concentrador: acrilamida al 5 %, bisacrilamida al 0.090 %, Tris-HCl 500 mM pH 8.8, Tris-HCl 104 mM pH 6.8, SDS al 0.083%, persulfato de amonio al 0.062 % y TEMED al 0.0375 %) y se corrieron a 80 volts (Tanque Bio-Rad modelo Mini-PROTEAN® II Cell) en amortiguador de corrida (Tris 25 mM, glicina 190 mM y SDS al 0.1 %).

Posteriormente fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) usando un sistema miniprotean (Bio-Rad). Brevemente el ensayo de inmunotransferencia se realizó utilizando anticuerpos anti-histidinas (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:1000. Los anticuerpos unidos se revelaron con un

anticuerpo de chivo anti-IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (Invitrogen 62-6522) a una dilución 1:5000, donde NBT (Nitroblue Tetrazolium Chloride) y BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato) se usaron como sustratos. Finalmente la membrana se lavó con agua corriente para detener la reacción de la enzima (Gallagher *et al*, 2008).

Preparación de extracto total amebiano.

Brevemente los trofozoítos de 48 h de cultivo fueron lavados con PBS frío e incubados en hielo por 10 min para colectarlos por centrifugación a 1500 rpm. La pastilla se resuspendió en 300 μ l de amortiguador de lisis RIPA (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Na₂EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, pirofosfato de sodio 2.5 mM, β -glicerofosfato 1 mM, leupeptina 1 μ g/ml, sodio deoxicolato 1 %). Se tomaron las muestras para agregarles amortiguador de muestra (Glicerol 2%, SDS 4 %, Tris-HCl 50 mM pH 7.4, β Me 200 mM, Azul de bromofenol 0.2 %), las muestras se separaron en geles de poliacrilamida al 10 % y 12 %, en condiciones nativas y desnaturalizantes, y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa.

Actividad enzimática.

Brevemente la actividad enzimática de las proteínas recombinantes 6HisrEhPTPLMWA y 6HisrEhPTPLMWB se determinó mediante la hidrólisis del sustrato p-nitrofenil fosfato (pNPP) (Sigma) (Zhang *et al*, 1995). La reacción se llevó a cabo en el amortiguador A (0.1 M de acetato de sodio, 50 mM NaCl y 5 mM ditiotreitól (DTT), a pH 6.0), utilizando 1.0-3.0 μ g de proteína purificada y hasta 10 mM de pNPP en un volumen final de 100 μ l. La mezcla de reacción fue incubada a 37 °C a diferentes tiempos para posteriormente agregar 10 μ l de 2M NaOH. La absorbancia fue medida a 405 nm. El pH óptimo para la actividad enzimática se determinó utilizando amortiguadores con diferentes pH: amortiguador de acetato de sodio 100 mM pH 4.5-6.5, Tris-HCl 100 mM pH 7.0 – 9.0. En otros experimentos, las proteínas recombinantes se preincubaron a diferentes temperaturas y tiempos, para después analizar la actividad enzimática a 37 °C durante 10 min en presencia de sustrato pNPP y observar el efecto de la temperatura en la estabilidad de la actividad catalítica. Otros experimentos consistieron en preincubar las proteínas recombinantes a 37 °C por 10 min y

posterior pre-incubación 1 min a cada T° de entre 24 – 85 °C en acetato de sodio 100 mM pH 6.0, posteriormente se colocó pNPP 10 mM por solo 10 min para detener la reacción con 10 µl de 2M NaOH.

Para el cálculo de la cantidad de producto formado, se realizaron curvas de nitrofenol (10 mM hasta 0.008 mM), el cual consistió en las mismas condiciones y volúmenes que lo anteriormente descrito.

Se analizó el efecto sobre la actividad enzimática de los inhibidores ortovanadato de sodio, molibdato de amonio, fluoruro de sodio, ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) y ácido etilen-glicol-tetra-acético (EGTA). La mezcla de reacción consistió en amortiguador 0.1 M de acetato de sodio (pH 6.0), 50 mM NaCl y 5 mM ditiotreitól (DTT), la proteína recombinante 6His-rEhPTPLMWs (1-3 µg). La mezcla primero fue en condiciones activadoras de las proteínas recombinantes, posteriormente fue incubada con diferentes concentraciones de los inhibidores por 10 min, después se agregó el sustrato (10 mM pNPP), y se ajustó a 100 µl con amortiguador de acetato. La mezcla de reacción fue incubada a 37 y 50 °C por 10 min y concluyó al adicionar 10 µl de 2 M NaOH. La densidad óptica fue registrada a 405 nm.

También se determinó la capacidad de hidrólisis sobre los sustratos fosfoserina, fosfotreonina, fosfotirosina, ATP y 3-O-methylfluorescein 6-phosphate (3-OMFP) utilizando el método de Chen (modificado en el presente trabajo) (Chen *et al*, 1956 y Oltmans *et al*, 2004).

Para la preparación del reactivo de Chen se mezclaron las siguientes soluciones: H₂SO₄ 4 M, de molibdato de amonio tetrahidratado al 2.5 % (Sigma) y L-ácido ascórbico al 10 %. La reacción enzimática consistió en 2 o 5 mM del posible sustrato, DTT 5 mM, 0.03 µg/µl de enzima correspondiente, 100 mM de acetato de Sodio, pNPP 10 mM. La mezcla de reacción (100 µl) se incubó 40 min a 37 °C – 50 °C, al concluir el tiempo, se le agregó 100 µl del reactivo preparado de Chen, se le añadió 10 µl de HCL 0.4 M y se incubó en obscuridad durante 30 min. De acuerdo al rango de fosfato a determinar se agregó de una solución de molibdato

de amonio tetrahidratado al 10 %: 20 μ l (0.1 a 5 mM) ó 40 μ l (0.03 a 1 mM). Se incubó 20 min y después se determinó la absorbencia a 655 nm. Se prepararon curvas estándar para ambos rangos utilizando K_2HPO_4 .

Obtención de anticuerpos.

Brevemente, antisuero contra la proteína recombinante r6HisEhPTPLMWA fue obtenido por la inmunización de ratones hembras de la cepa BALB/c de 3 a 4 semanas de edad. Para generar anticuerpos, se realizó la primera inmunización con 10-15 μ g de la proteína recombinante en adyuvante completo de Freund (Sigma F-5881), y posteriormente se realizaron inmunización con adyuvante incompleto de Freund (Sigma F-5506) los días 14, 21, 49, 77, 103 y 198. Los animales se sangraron los días 30, 59, 84, 148, 206, 215 y 224 para la obtención de los sueros inmunes los cuales se ensayaron por inmunotransferencia con las proteínas recombinantes ó extracto total de trofozoítos de *E. histolytica* y *E. dispar*.

Inmunofluorescencia indirecta.

Brevemente, trofozoítos de *E. histolytica* adheridos a 37 °C en vidrio o a vidrio recubierto con fibronectina se fijaron con p-formaldehído al 2 % en PBS. Los parásitos fijados fueron permeabilizados o no permeabilizados en una solución de PBS/detergentes (SDS al 0.4 % y Tritón X-100 al 0.2 %), posteriormente todas las muestras en cubre objetos se incubaron en PBS con suero fetal bovino al 5 % como bloqueador durante 1 h. Después de lavar con PBS las muestras se incubaron con el suero anti-6His-rEhPTPLMWA o suero pre inmune diluido en PBS durante una hora a temperatura ambiente ó a 37 °C. Al término de la incubación las muestras se lavaron con PBS y se incubaron con IgG de cabra anti-IgG de ratón acoplado a FITC (isotiocianato de fluoresceína). Las laminillas se lavaron con PBS y se montaron en solución Vectashield con DAPI sobre porta objetos, para su posterior análisis por microscopía de fluorescencia (Microscopio Nikon modelo ECLIPSE 80i) y análisis por Confocal ZEISS LSM 700. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), forma un complejo fluorescente mediante la unión a secuencias ricas en A-T del DNA, se emplea para observar los núcleos de las células (Kapuscinski, 1995).

También se realizaron ensayos de distribución de la EhPTPLMW-Actina en trofozoítos sin permeabilizar y adheridos a vidrio recubierto con fibronectina, para ello se utilizó faloidina acoplada a rodamina específica a F-actina, de esta forma se logra observar el citoesqueleto de actina (Meza *et al*, 2006; Vidal *et al*, 2007). Se realizaron los ensayos desde 10 min hasta 150 min principalmente.

Análisis *in silico*.

El análisis de la secuencia de nucleótidos y la búsqueda de enzimas de restricción se realizó en el servidor http://pga.mgh.harvard.edu/web_apps/web_map/start, que usa el programa WebmapDNA.

Las imágenes de estructuras 3D fueron producidas usando el paquete de programas del Software UCSF Chimera. Las imágenes de energía superficial se obtuvieron mediante el Software PDBPQR Versión 1.8 trabajando la función de APBS http://kryptonite.nbcn.net/pdb2pqr_1.8/.

La selección de PTPLMW de otras especies para obtener sus secuencias de aminoácidos se obtuvieron empleando Geneious 5.4.4 el cual posee acceso directo a bases de datos como NCBI o EBI, también se obtuvieron con UCSF Chimera. La comparación de la secuencia de aminoácidos se realizó con MEGA 5.1 MUSCLE que es un programa para generar múltiples alineaciones de secuencias de aminoácidos y nucleótidos (La velocidad y la precisión de MUSCLE se ha comparado según como indica la información del mismo programa con T-Café, MAFFT y CLUSTALW, obteniendo excelentes resultados) (Edgard, 2004), se seleccionó para la figura de la filogenia Construct/Test Minimum-Evolution Tree.

El alineamiento de secuencias de PTPLMW de distintas especies se realizó con el programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

Docking: El diseño de los mapas de afinidad atómica y rejillas electrostáticas se realizaron utilizando el programa PyRx AutoDock de Vina (Trott y Olson 2010) utilizando una Laptop ASUS K53Z con procesador AMD®APU A4-3300M

(DualCore 2.0GHz) Memoria RAM 4GB. El procedimiento que se siguió consistió en cargar los archivos PDB tanto de la macro-molécula (Modelo PDB obtenido por SWISS model de las EhPTPLMW) como de los posibles ligandos que fueron obtenidos a partir de la pagina del Banco de datos de proteínas en Europa (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/pdbechem/>). Una vez cargados los archivos PDB se seleccionó AutoDock—“Make Macromolecule” o “Make Ligand” según corresponda. Una vez hecho la anterior, el programa generó los archivos para la macromolécula y ligando con terminación pdbqt, Con el comando Vina Wizard, se colocó una caja (figura 7) en el espacio que ocupan los residuos del centro activo de las enzimas estudiadas. El tamaño de dicha caja no debe ser menor que el de la molécula del ligando ya que éste se posiciona de diferentes formas dentro del espacio que comprenda la caja y así encontrar el sitio en el que el ligando genera menor energía de unión (docking).

Se integraron los archivos utilizando UCSF Chimera 1.6.2 y se guardan en un archivo único en formato PDB. Las páginas WEB en que se encuentran los ligandos analizados se enlistan a continuación.

Fosfoserina: O-phosphono-L-serine: Download links—Molfile: Representative
<http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/pdbechem/chemicalCompound/show/SEP>

Fosfotreonina: O-phosphono-L-threonine: Download links—Molfile: Representative
<http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/pdbechem/chemicalCompound/show/TPO>

Fosfotirosina: O-phosphono-L-tyrosine: Download links—Molfile: Representative
<http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/pdbechem/chemicalCompound/show/PTR>

Adenosina 5' trifosfato: adenosine 5'-(tetrahydrogen triphosphate):
<http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/pdbechem/chemicalCompound/show/ATP>

6'-Methoxy-3-oxo-3H-spiro [2-benzofuran-1, 9'-xanthen]-3'-yl dihydrogen phosphate. Nombres y sinónimos: 3-O-methylfluorescein 6-phosphate; 3-OMFP; ID: 13148742: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.13148742.html>

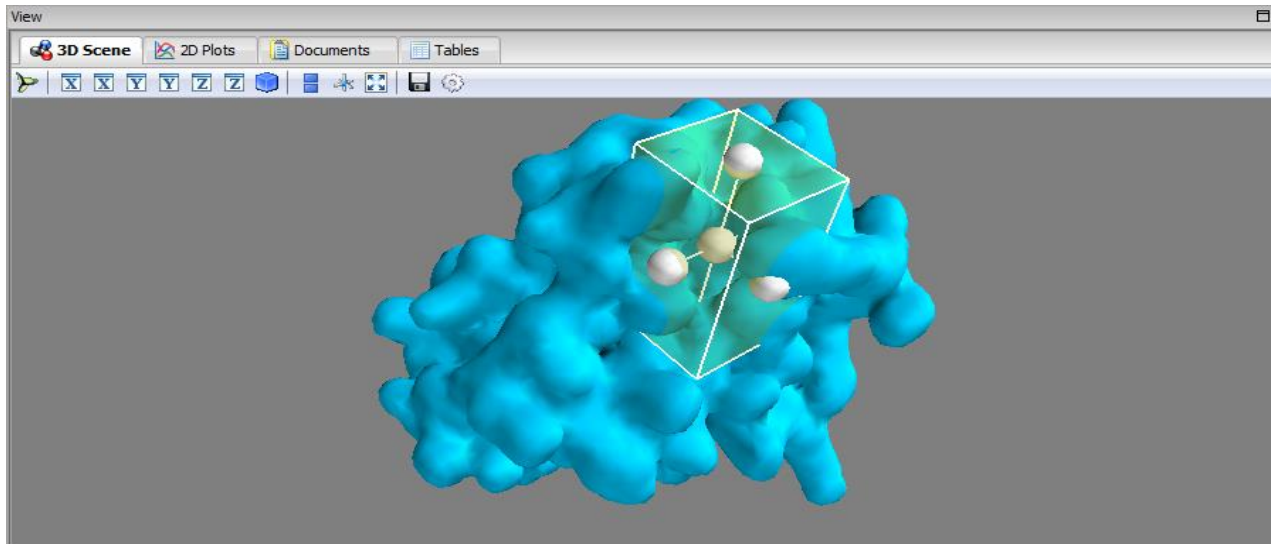


Figura 7. Caja delimitante de la región dentro de la cual están los residuos del centro activo de EhPTPLMWB PDB. Las dimensiones de la caja utilizada son: Vina Search Space X: 54.4013; Y: 75.6840; Z:-25.9645, Dimensiones en angstrom de la caja: X: 15.8011; Y: 9.4827; Z: 9.5526.

8 Resultados

8.1 Secuenciación de los genes EhPTPLMWA y EhPTPLMWB.

Las secuencias de nucleótidos empleadas en esta tesis se encuentran bajo las claves de NCBI: **XM_651267.1** (denominada para el trabajo presente como **DNA-EhPTPLMWA**, codifica a la secuencia de aminoácidos XP_656359.1) y **XM_648265.1** (denominada para el trabajo presente como **DNA-EhPTPLMWB**, codifica a la secuencia de aminoácidos XP_653357.1). Para iniciar la caracterización de los genes EhPTPLMWA y EhPTPLMWB, los amplicones obtenidos por RT-PCR se secuenciaron y sus secuencias nucleotídicas se compararon. Los resultados mostraron que ambos genes tienen una longitud de 474 nucleótidos y que su secuencia difiere solamente en un nucleótido en la posición 254, cambiando una “C” por una “T” para el gene EhPTPLMWB con respecto al gene EhPTPLMWA (Figuras 8 y 9).

```
EhPTPLMWA      ATGAAAGTTGTTGTTTGTATGTTTAGGCAACATTTGTCGATCTCCTGCTGCAGAAGCAGTT
EhPTPLMWB      ATGAAAGTTGTTGTTTGTATGTTTAGGCAACATTTGTCGATCTCCTGCTGCAGAAGCAGTT
*****

EhPTPLMWA      ATGAAAAAAGTAATTCAAAATCATCACCTAACTGAAAAATATATATGTGACTCTGCAGGA
EhPTPLMWB      ATGAAAAAAGTAATTCAAAATCATCACCTAACTGAAAAATATATATGTGACTCTGCAGGA
*****

EhPTPLMWA      ACATGTTTCATATCATGAAGGACAACAAGCTGATTCTCGAATGAGAAAAGTAGGAAAAGTCA
EhPTPLMWB      ACATGTTTCATATCATGAAGGACAACAAGCTGATTCTCGAATGAGAAAAGTAGGAAAAGTCA
*****

EhPTPLMWA      AGAGGTTATCAAGTTGATTCAATTCACGACCTGTTGTTTCGTCTGATTTCAAAAACTTT
EhPTPLMWB      AGAGGTTATCAAGTTGATTCAATTCACGACCTGTTGTTTCGTCTGATTTCAAAAACTTT
*****

EhPTPLMWA      GATTACATTTTTGCAATGGATAATGATAATTATTACGAATTACTTGATAGATGTCCTGAG
EhPTPLMWB      GATTACATTTTTGTAATGGATAATGATAATTATTACGAATTACTTGATAGATGTCCTGAG
*****

EhPTPLMWA      CAATATAAACAAAAAATATTCAAATGGTTGATTTTGTACTACTATTA AACAACTGAA
EhPTPLMWB      CAATATAAACAAAAAATATTCAAATGGTTGATTTTGTACTACTATTA AACAACTGAA
*****

EhPTPLMWA      GTTCCTGACCCTTACTATGGTGGAGAAAAAGGTTTTCATCGAGTCATTGATATTCCTGAA
EhPTPLMWB      GTTCCTGACCCTTACTATGGTGGAGAAAAAGGTTTTCATCGAGTCATTGATATTCCTGAA
*****

EhPTPLMWA      GATGCTTGTGAGAATTTAATCATTAACTAGAAGAAGGAAAACCTTATTAAT TAA
EhPTPLMWB      GATGCTTGTGAGAATTTAATCATTAACTAGAAGAAGGAAAACCTTATTAAT TAA
*****
```

Figura 8. Comparación de las secuencias de los genes EhPTPLMWA y EhPTPLMWB (ClustalW). Se indican los codones de inicio (verde) y paro (rojo), y los nucleótidos diferenciales (rectángulo).

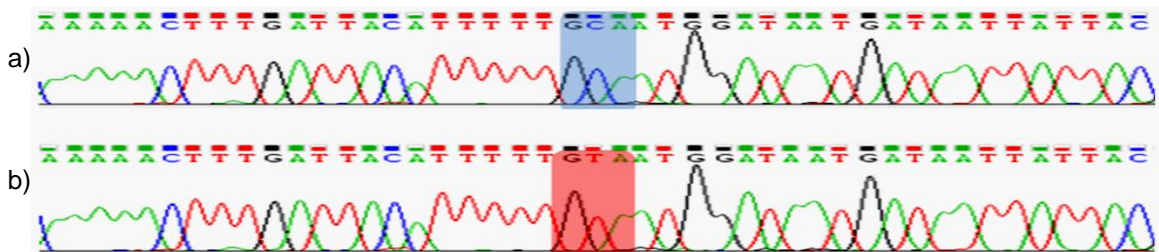


Figura 9. Electroferograma correspondiente a un fragmento de los genes EhPTPLMWA (a) y EhPTPLMWB (b). Se señala el triplete en donde hay cambio de nucleótidos.

Este cambio de nucleótidos trae como consecuencia que se pierda el sitio de restricción BsrD1 (TTGCAATG) presente en EhPTPLMWA y que se sustituya una alanina por una valina presente en EhPTPLMWB como se observa en la figura 10.

```

EhPTPLMWA      MKLLFVCLGNICRSPAAEAVMKKVIQNHHLTEKYICDSAGTCSYHEGQQADSRMRKVGKS
EhPTPLMWB      MKLLFVCLGNICRSPAAEAVMKKVIQNHHLTEKYICDSAGTCSYHEGQQADSRMRKVGKS
*****

EhPTPLMWA      RGYQVDSISRPPVSSDFKNFDYIFFAMDNDNYEYLLDRCPEQYKQKIFKMVDFCTTIKTTE
EhPTPLMWB      RGYQVDSISRPPVSSDFKNFDYFFAMDNDNYEYLLDRCPEQYKQKIFKMVDFCTTIKTTE
*****

EhPTPLMWA      VPDPYYGGEKGFHRVIDILEDACENLIIKLEEGKLIN
EhPTPLMWB      VPDPYYGGEKGFHRVIDILEDACENLIIKLEEGKLIN
*****

```

Figura 10. Comparación de las secuencias de amino ácidos de las proteínas EhPTPLMWA y EhPTPLMWB (ClustalW). Se indican los aminoácidos diferenciales (rectángulo), el motivo CXGXXR y el ácido aspártico (rojo).

El análisis de las secuencias con el programa Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) mostró que éstas contienen dentro de su secuencia de 157 aa el dominio catalítico característico de las PTPasas de bajo peso molecular (PF01451), el cual se extiende del amino ácido 4 al 146, y dentro del cual se encuentra el sitio catalítico caracterizado por el motivo CXXGXXR (aa 7-13) y el ácido aspártico (aa 123).

8.2 Comparación de EhPTPLMWs y otras PTPLMW.

Con el fin de determinar el grado de similitud de las proteínas EhPTPLMWA y EhPTPLMWB con PTPasas de bajo peso molecular de otros organismos, se realizó una búsqueda en el banco de genes de “The National Center for Biotechnology Information” (NCBI). De los resultados obtenidos, se seleccionaron varias PTPLMWs de diferentes organismos que presentaron una similitud que va del 51.7 % al 78.2 %, excepto la PTPLMW de *Entamoeba dispar*, que mostró una

homología del 98.1 % con las PTPLMWs de *E. histolytica*. Las PTPLMWs seleccionadas se muestran en la Tabla II.

Tabla II. PTPLMWs de diferentes organismos.

Especie	Nombre asignado	NCBI	Nombre NCBI GenPept
<i>Entamoeba histolytica</i> HM-1:IMSS	EhPTPLMWA	XP_656359	Proteína tirosina fosfatasa
<i>Entamoeba histolytica</i> HM-1:IMSS	EhPTPLMWB	XP_653357	Proteína tirosina fosfatasa
<i>Entamoeba dispar</i> SAW760	EdPTPLMW	XP_001736331	Proteína tirosina fosfatasa de bajo peso molecular
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	SspPTPLMW	NP_441960	Proteína fosfotirosina fosfatasa de bajo peso molecular
<i>Dysgonomonas gadei</i> ATCC BAA-286	DgPTPLMW	ZP_08475080.1	Proteína hipotética HMPREF9455_03246
<i>Populus trichocarpa</i>	PtPTPLMW	XP_002328065.1	Proteína predicción
<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. marinus str. CCMP1375	PmPTPLMW	NP_876138.1	Proteína tirosina fosfatasa
<i>Bos Taurus</i>	BtPTPLMW	AAI03028	Proteína ACP1
<i>Homo sapiens</i>	HPTPLMW	NP_004291	Proteína fosfotirosina fosfatasa de bajo peso molecular isoforma C
<i>Xenopus laevis</i>	XIPTPLMW	NP_001088763.2	Fosfatasa ácida 1, soluble
<i>Taeniopygia guttata</i>	TgPTPLMW	XP_002194905.1	Predicción: Fosfatasa ácida1, parcial
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	TnPTPLMW	CAG03566.1	Proteína sin identificar
<i>Amblyomma maculatum</i>	AmPTPLMW	AEO35725.1	Proteína hipotética
<i>Drosophila mojavensis</i>	DmPTPLMW	XP_001999272.1	PTPLMW GI24420
<i>Thermus thermophilus</i>	TtPTPLMW	YP_004789	Proteína tirosina fosfatasa
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	MtPTPLMW	NP_216750	PTPLMW Mptpa

Estas secuencias se compararon utilizando el programa ClustalW2, el resultado del alineamiento se muestra en la figura 11, los datos obtenidos *in silico* se encuentran en la tabla III junto con el análisis con LALING 36.3.5.

```

EHPTPLMWA -----MKLLFVCLGNICRSPAAEA VMKKVIQNHHLTEKYICDS AGTCSYHEGQQAD 51
EHPTPLMWB -----MKLLFVCLGNICRSPAAEA VMKKVIQNHHLTEKYICDS AGTCSYHEGQQAD 51
EdPTPLMW -----MKLLFVCLGNICRSPAAEA VMKKVIQNHHLTEKYICDS AGTCSYHEGQQAD 51
SspPTPLMW -----MKLLFVCLGNICRSPAAEN IMNAQIDQAG LGAKIVCDS AGTSSYHVGDSPD 51
DgPTPLMW -----MKEYKILFVCLGNICRSPAAEG I LKRMVREQGLDDKISVDS AGTSGYHGD LFD 54
PtPTPLMW MASSTETK PPAVL FVCLGNICRSPAAEG VFTDIVNKRGLDSKFRIDS AGTINYHEGN PAD 60
PmPTPLMW -----MIRKVL FICLGNICRSPAAEA I FLHHLRE IDLINEFIVDS AGTGGWHVGRKAD 53
MtPTPLMW -----MSD PLHVT FVCTGNICRSPMAEK MFAQQLRHRLG L GDAVRVT S AGTGNWHVGS CAD 55
TtPTPLMW -----MDR PVRVLFVCLGNICRSPMAEG I FRKLLKRG LEDRFEVDS AGTGAWHVGE FMD 55
BtPTPLMW --MAEQ-VTKSVLFVCLGNICRSPIAEA VFRKLVTDQN ISDNWRIDS AATSTYELGN PFD 57
HPTPLMW ---AEQ-ATKSVLFVCLGNICRSPIAEA VFRKLVTDQN ISENWRVDS AATSGYEIGN PFD 56
XlPTPLMW --MAQG-SGKSVLFVCLGNICRSPIAEA VFRKLVTDAG ISKEWTIDS AATSTYELGN PFD 57
TgPTPLMW --LAEK-STQLLVFCCLGNICRSPIAEA VFRKLVADER LEQKWRIDS AATSTYELIGS PFD 57
TnPTPLMW --MAAA-S SNSVLFVCLGNICRSPIAEA VFRKMATDMGVADKWRIDS AATSTYELIGN AFD 57
AmPTPLMW --MSDTE S KSVLFVCLGNICRSPIAEA VFRHVAKERGVLDSEWVDS AATGDWHVGRKPD 58
DmPTPLMW --MPQR----KILMICLGNICRSPIAET VMAETLAKAKL-DSVVVDS AATGSWHVGNRAD 53
      : : * ***** ** : : . : * * * * . : * *

```



```

EHPTPLMWA SRMRKVGK SRGYQVDSIS RPVVSSDFKN FDY-----IFAMDNDNYVELLD----- 96
EHPTPLMWB SRMRKVGK SRGYQVDSIS RPVVSSDFKN FDY-----IFVMDNDNYVELLD----- 96
EdPTPLMW SRMRKVGK SRGYQVDSIS RPVVSSDFKN FDY-----IFAMDNDNYVELLD----- 96
SspPTPLMW RRMTESLKRGRYRVQGRARQFFPEDFAE FDL-----ILAMDGDNYRNILA----- 96
DgPTPLMW HRMRQHGARRGYKFDLSLRRFTSLDFDR FDI-----ILAMDDSNYHNIMR----- 99
PtPTPLMW SRMRAASKRGGIEITISIRPIRPSDFR FDI-----ILAMDNDNYREHIME----- 105
PmPTPLMW SRMRSAL SRGIVIESRARQISLNDFNW FDL-----ILTMDQSNLDDVNS----- 98
MtPTPLMW ERAAGVLR AHGYPTDHRA AQVG-TEHLA ADL-----LVALDR-NHARLLR----- 98
TtPTPLMW FRARRVLE EEGAYFPHVARRLTREDVLA YDH-----ILVMDRENLEEVLR----- 100
BtPTPLMW CRGQACMRKHGIPMSHVARQVTKEDFVT FDY-----ILCMD-----ESN----- 96
HPTPLMW YRGQSCMRKHGIPMSHVARQITKEDFAT FDY-----ILCMD-----ESN----- 95
XlPTPLMW YRGQACMRKHGIPMSHTARQITSNDFLS YDY-----ILCMD-----ESN----- 96
TgPTPLMW YRGQNCMRKHGITMNHIA RQITKEDFQT FDH-----ILCMD-----ESN----- 96
TnPTPLMW DRGQACMRRHGVAMSHTARQVITDSGAT SDWNITGSLPDRNGLACLNRNHGIESSHRARQIF 117
AmPTPLMW RRAIQCMK DHKVEDMHRA RLVTDDFTT FQY-----IFGMD AN----- 97
DmPTPLMW PRALSTLQKHGLESKHIVRQITKQDFYE FDY-----IFGMD-----EDN----- 92
      : : . : : :

```



```

EHPTPLMWA ---RCPE-----QYKQKIFKMVDF CTTIKTTEVPDPYYGG-EGGFHRVIDILE DAC 143
EHPTPLMWB ---RCPE-----QYKQKIFKMVDF CTTIKTTEVPDPYYGG-EGGFHRVIDILE DAC 143
EdPTPLMW ---RCPE-----QYKQKIFKMVDF CTTIKTTEVPDPYYGG-EI GFHRVIDILE DAC 143
SspPTPLMW ---QDPAG-----QYHKKVVMICY TEKFGDREVDPYYGG-QAGFEHVIDLLE DAC 144
DgPTPLMW ---LAPDL-----ESKVVYRMVDF SKRFGHDHIPDPYYSG-ADGFELVLDLLE DAC 147
PtPTPLMW ---AFNKWKFKETLPDDA HKKVKMLCSF CKRKHDETEVPDPYYGG-PQGFPEKVLDDLE DAC 161
PmPTPLMW ---LAKELN-----ISYKRVKPLLEY ATNTDLVEVPDPYYGG-EKGFEDVNLLENAI 148
MtPTPLMW ---QLGVEA-----ARAVMLRSFDP RSGTHALDVE DPYYGD-HSDFEEVFAVIE SAL 146
TtPTPLMW ---RPFPEAR-----GKVRV L-LEE LGGG---EVQDPYYGD-LEDFREVYWTLE AAL 143
BtPTPLMW ---LRDLNRKSNQVKNCRAKIELLGSYDPQK-QLIIE DPYYGN-DAD FETVYQQCVRCC 150
HPTPLMW ---LRDLNRKSNQVKTCRAKIELLGSYDPQK-QLIIE DPYYGN-DSDFETVYQQCVRCC 149
XlPTPLMW ---LRDLKRRGGQVQNCRAKIELLGSYDPQK-KLIIE DPYYGR-DEDFETVYQQCVRCC 150
TgPTPLMW ---LRDLNRKSNQVKDCRAKIELLGTYPQK-QLIIE DPYYGN-EKDFETVYEQCLRCC 150
TnPTPLMW AKALHRDLKRRKAKSVKNCRAKIELLGLYDPQK-QLIIE DPYYGS-DKDFETVYEQCLRCC 175
AmPTPLMW ---ISDLHDLKP---KKS TAQIELLGSYDPEG-KTIIIRD PYYDDGSGDFETVYQQCLRCC 150
DmPTPLMW ---MSDLRRLAP---KDC KAE LLM LGDFGLSKEKRIIE DPYYQRGDE GFEVAYQQCVTAC 146
      : : . : * * * * . : . :

```



```

EHPTPLMWA ENLI IKLE EGKLIN---- 157
EHPTPLMWB ENLI IKLE EGKLIN---- 157
EdPTPLMW ENLI IKLQEGKLTN---- 157
SspPTPLMW GNLLTSLGK-ELVN---- 157
DgPTPLMW EGLLDKLLKNEL----- 159
PtPTPLMW ESLLDSILAENK----- 173
PmPTPLMW EGLIRDIK----- 156
MtPTPLMW FGLHDWVDER-LARNGPS 163
TtPTPLMW QAFLDRHGSPSPAAEGRA 161
BtPTPLMW RAFLEKVR----- 158
HPTPLMW RAFLEKAH----- 157
XlPTPLMW KSFLEKSS----- 158
TgPTPLMW KAFLEKYH----- 158
TnPTPLMW KAFLEEN----- 182
AmPTPLMW KAFLDQVS----- 158
DmPTPLMW EAFVKQRL LQ----- 156
      :

```

Figura 11. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las PTPLMWs representativas. Los asteriscos indican aminoácidos idénticos, los puntos aminoácidos conservados, el dominio DPYY en la caja gris claro, los aminoácidos del sitio catalítico se encuentran en gris oscuro.

Tabla III. Análisis comparativo entre distintas PTPLMWs. Se obtuvo por ClustalW2 y LALING 36.3.5 con los parámetros Blosum50 matrix (15:-5), open/ext: -12/-2.

SP*	Nombre	Long.	SS**	Nombre	Long.	Score	Identidad %	Similitud %	Sobrelapamiento
1	EhPTPLMWA	157	2	EhPTPLMWB	157	99.0	99.4	100	1-157:1-157
1	EhPTPLMWA	157	3	EdPTPLMW	157	97.0	97.5	98.1	1-157:1-157
1	EhPTPLMWA	157	4	PmPTPLMW	156	44.0	47.0	77.2	2-147:4-152
1	EhPTPLMWA	157	5	SspPTPLMW	157	50.0	51.9	73.4	1-157:1-157
1	EhPTPLMWA	157	6	DgPTPLMW	159	48.0	48.7	78.2	1-155:4-159
1	EhPTPLMWA	157	7	PtPTPLMW	173	49.0	50.6	74.7	3-147:12-165
1	EhPTPLMWA	157	8	BtPTPLMW	158	30.0	33.8	66.2	2-150:8-157
1	EhPTPLMWA	157	9	HPTPLMW	157	31.0	34.7	66.7	2-149:7-155
1	EhPTPLMWA	157	10	MtPTPLMW	163	28.0	30.1	61.0	1-146:5-149
1	EhPTPLMWA	157	11	XIPTPLMW	158	31.0	32.9	64.4	2-149:8-156
1	EhPTPLMWA	157	12	AmPTPLMW	158	32.0	39.3	68.1	2-135:9-142
1	EhPTPLMWA	157	13	TgPTPLMW	158	33.0	36.2	66.4	3-149:9-156
1	EhPTPLMWA	157	14	DmPTPLMW	156	35.0	37.4	69.4	2-147:5-150
1	EhPTPLMWA	157	15	TnPTPLMW	182	28.0	26.7	51.7	2-147:8-179
1	EhPTPLMWA	157	16	TtPTPLMW	161	33.0	36.1	65.3	1-147:5-147
2	EhPTPLMWB	157	3	EdPTPLMW	157	96.0	96.8	98.1	1-157:1-157
2	EhPTPLMWB	157	4	PmPTPLMW	156	44.0	47.0	77.2	2-147:4-152
2	EhPTPLMWB	157	5	SspPTPLMW	157	50.0	51.3	73.4	1-157:1-157
2	EhPTPLMWB	157	6	DgPTPLMW	159	47.0	48.1	78.2	1-155:4-159
2	EhPTPLMWB	157	7	PtPTPLMW	173	49.0	50.0	74.7	3-147:12-165
2	EhPTPLMWB	157	8	BtPTPLMW	158	30.0	33.8	66.2	2-150:8-157
2	EhPTPLMWB	157	9	HPTPLMW	157	31.0	34.7	66.7	2-149:7-155
2	EhPTPLMWB	157	10	MtPTPLMW	163	27.0	29.5	61.0	1-146:5-149
2	EhPTPLMWB	157	11	XIPTPLMW	158	31.0	32.9	64.4	2-149:8-156
2	EhPTPLMWB	157	12	AmPTPLMW	158	32.0	39.3	67.4	2-135:9-142
2	EhPTPLMWB	157	13	TgPTPLMW	158	33.0	36.2	66.4	3-149:9-156
2	EhPTPLMWB	157	14	DmPTPLMW	156	35.0	37.4	68.7	2-147:5-150
2	EhPTPLMWB	157	15	TnPTPLMW	182	28.0	28.5	53.5	2-147:8-179
2	EhPTPLMWB	157	16	TtPTPLMW	161	33.0	36.7	65.3	1-147:5-147

SP*: Secuencia principal; SS**: Secuencia secundaria

Las secuencias de PTPLMW y probables PTPLMW de las especies seleccionadas muestran el sitio catalítico altamente conservado, principalmente en las secuencias CLGNICRSP y DPYY, las cuales son características de las proteínas tirosina fosfatasa de bajo peso molecular. A pesar de pertenecer algunas de ellas a especies muy alejadas en la evolución y tener una baja proporción de aminoácidos conservados en sus secuencias, estas poseen una alta conservación de los sitios catalíticos y de la estructura terciaria; por ejemplo, la comparación entre las estructuras de EhPTPLMWs, MtPTPLMW, BtPTPLMW y HPTPLMW muestra gran similitud (Figura 12) a pesar de su distancia filogenética (Figura 13). Esto resalta la gran importancia que tiene la conservación de la estructura terciaria para que las proteínas realicen su función.

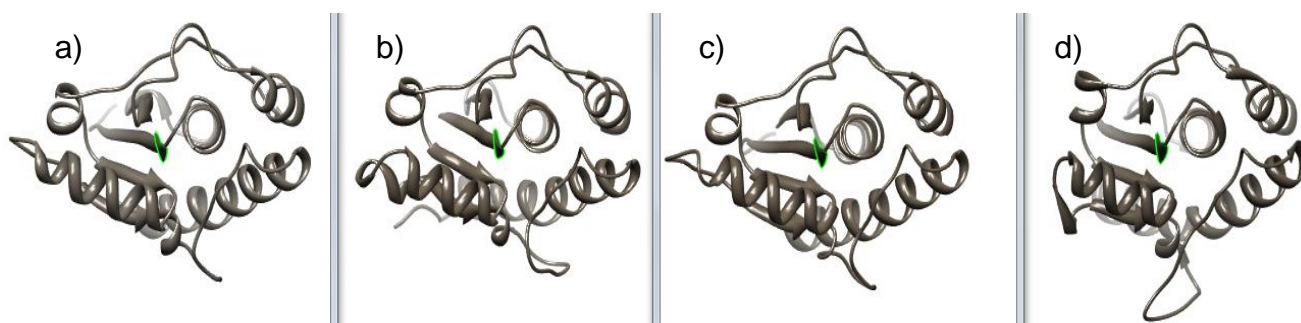


Figura 12. Representación en cintas de distintos homólogos de PTPLMW. a) Humana HPTPLMW (PDB 5PNT_A); b) *E. histolytica* EhPTPLMW (1PNT_A); c) *Bos taurus* BtPTPLMW (1PNT_A); d) *M. tuberculosis* MtPTPLMW (1U2Q_A). La cisteína catalítica se encuentra marcada en color verde. Se empleó UCSF Chimera para visualizar los archivos.

Las diferentes especies elegidas en la comparación de secuencias de aminoácidos mostrada en la tabla III, representan a amibas (*E. histolytica* y *E. dispar*), cianobacterias (*Prochlorococcus marinus*), eubacteria *Bacteroidacea* (*Synechocystis*), bacterias Termófilas (*Thermus thermophilus*), bacterias bacteroidetes (*Dysgonomonas gadei*), bacteria *Actinobacteria* (*Mycobacterium tuberculosis*), plantas angiospermas (*Populus trichocarpa*), artrópodos arácnidos (*Amblyomma maculatum*), artrópodos insectos (*Drosophilidae mojavensis*), mamíferos (*Bos taurus* y *Homo sapiens*), anfibios (*Xenopus laevis*), aves (*Taeniopygia guttata*), peces actinopterygii (*Tetraodon nigroviridis*).

En la figura 13 se aprecia el árbol filogenético óptimo de las distintas PTPLMWs (y probables) obtenido por el software MUSCULE de MEGA 5, cabe resaltar que la diferencia evolutiva entre algunas PTPLMW no es mucha, por lo que podrían tener las EhPTPLMW características antigénicas parecidas entre menos distantes se encuentren en la filogenia.

Debido a que la proteína PTPLMW de *E. dispar* mostró una alta homología con las proteínas PTPLMWs de *E. histolytica*, se decidió comparar las secuencias de sus genes y de sus proteínas. Esta comparación mostró principalmente que el sitio de restricción [BsrD1](#) está presente en el DNA de EdPTPLMW al igual que en el DNA de EhPTPLMWA (figura 14A), y a nivel de aminoácidos se conserva la alanina (figura 14B). Por otro lado, a pesar de que se detectaron varias sustituciones a nivel de nucleótidos comparando EhPTPLMWs vs EdPTPLMW (EhPTPLMWA vs EdPTPLMW poseen 27 nucleótidos distintos; EhPTPLMWB vs EdPTPLMW poseen 28 nucleótidos distintos), solamente se observaron 3 cambios de aminoácidos comparando EdPTPLMW con respecto a EhPTPLMWA y 4 con respecto a EhPTPLMWB.

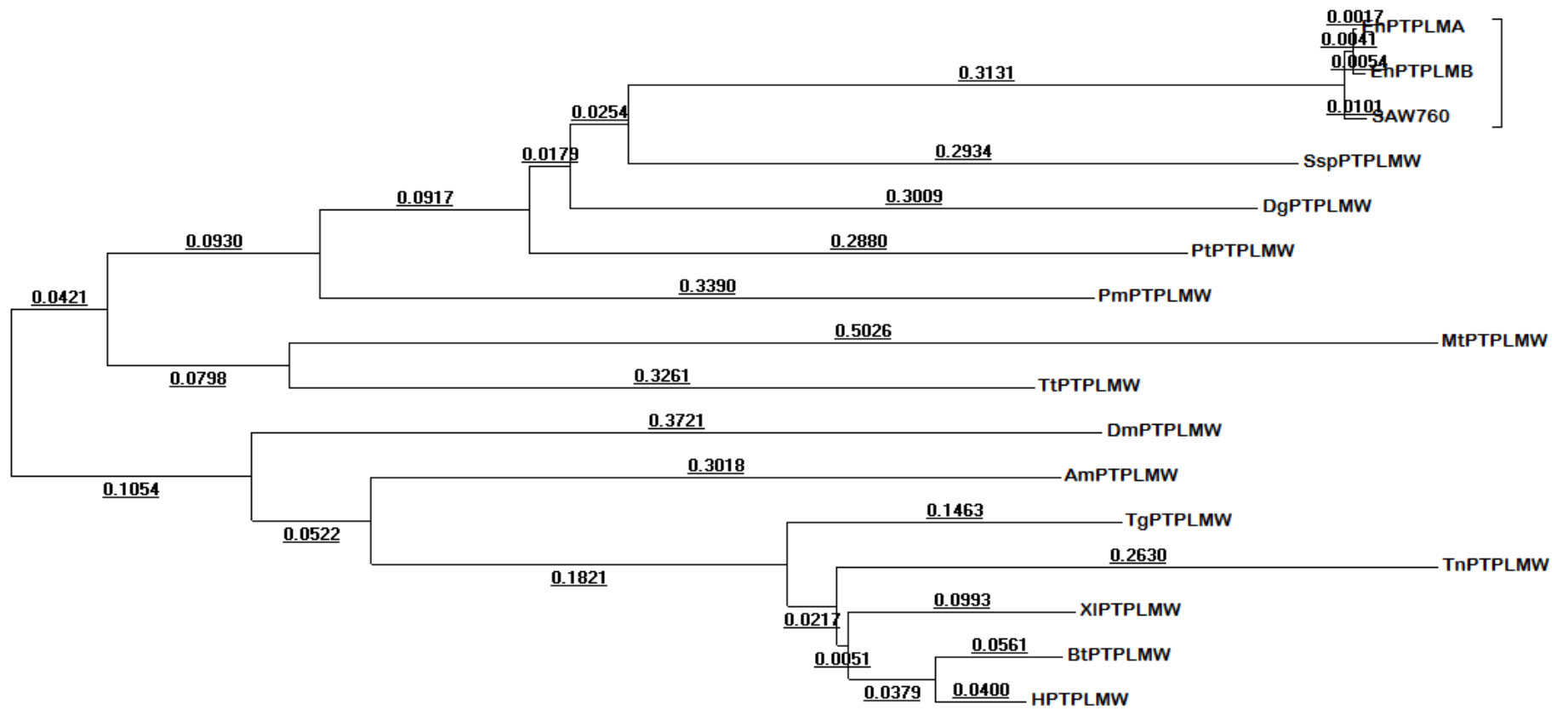


Figura 13. Árbol filogenético para la comparación de las EhPTPLMWA y EhPTPLMWB con las PTPLMW de otras especies. La historia evolutiva se infirió utilizando el método “Minimum-Evolution Tree” (Rzhetsky y Nei 1992). Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud ramal= 4.41723126. El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama a lado de las ramas, en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético, que fueron calculadas usando el método de corrección de Poisson (Zuckermandl y Pauling 1965) y se encuentran en las unidades del número de sustituciones de aminoácidos por sitio. El “ME tree” fue buscado usando el algoritmo de intercambio-cerrado-vecino (CNI) (Nei y Kumar) a un nivel de búsqueda de 1. El algoritmo de Neighbor-joining (Saitou y Nei 1987) fue usado para generar el árbol inicial. El análisis evolutivo se llevo a cabo en MEGA 5 (Tamura *et al*, 2011).

A

```

EhPTPLMWA ATGAAGTTGTTGTTTGTATGTTTAGGCAACATTTGTCGATCTCCTGCTGCAGAAGCAGTT
EhPTPLMWB ATGAAGTTGTTGTTTGTATGTTTAGGCAACATTTGTCGATCTCCTGCTGCAGAAGCAGTT
EdPTPLMW ATGAAATTGTTGTTTGTATGTTTAGGCAATATTTGTCGTTCTCCTGCTGCAGAGGCTGTT
*****.*****:***** *****:*****.**:***

EhPTPLMWA ATGAAAAAAGTAATTCAAAATCATCACCTAACTGAAAAATATATATGTGACTCTGCAGGA
EhPTPLMWB ATGAAAAAAGTAATTCAAAATCATCACCTAACTGAAAAATATATATGTGACTCTGCAGGA
EdPTPLMW ATGAAAAAAGTGATTCAAAACCATCACCTAACTGAAAAATATACATGTGACTCTGCAGGA
*****.***** ***** *****

EhPTPLMWA ACATGTTTCATATCATGAAGGACAACAAGCTGATTCTCGAATGAGAAAAGTAGGAAAAGTCA
EhPTPLMWB ACATGTTTCATATCATGAAGGACAACAAGCTGATTCTCGAATGAGAAAAGTAGGAAAAGTCA
EdPTPLMW ACATGTTTCATATCATGAAGGACAACAAGCTGATTCTCGAATGAGAAAAGTAGGAAAAGTCA
*****

EhPTPLMWA AGAGGTTATCAAGTTGATTCAATTCACGACCTGTTGTTTCGTCTGATTTCAAAAACTTT
EhPTPLMWB AGAGGTTATCAAGTTGATTCAATTCACGACCTGTTGTTTCGTCTGATTTCAAAAACTTT
EdPTPLMW AGAGGATATCAAGTTGATTCAATTCACGTCCTGTTGTTTCTTCTGATTTTAAAAACTTT
*****:*****:***** ***** *****

EhPTPLMWA GATTACATTTTTCGAATGGATAATGATAATTATTACGAATTACTTGATAGATGTCCTGAG
EhPTPLMWB GATTACATTTTTCGAATGGATAATGATAATTATTACGAATTACTTGATAGATGTCCTGAG
EdPTPLMW GATTATATCTTTTCGAATGGATAATGACAATTATTACGAGTTACTTGATAGATGTCCTGAA
***** ** ***** *****.*****.

EhPTPLMWA CAATATAAACAAAAATATTCAAATGGTTGATTTTGTACTACTATTAACAACACTGAA
EhPTPLMWB CAATATAAACAAAAATATTCAAATGGTTGATTTTGTACTACTATTAACAACACTGAA
EdPTPLMW CAATACAAACAAAAATATTTAAATGGTTGATTTTGTACTACTATTAACAACACTGAA
***** ***** *****

EhPTPLMWA GTTCCTGACCCTTACTATGGTGGAGAAAAAGGTTTTCATCGAGTCATTGATATTCCTGAA
EhPTPLMWB GTTCCTGACCCTTACTATGGTGGAGAAAAAGGTTTTCATCGAGTCATTGATATTCCTGAA
EdPTPLMW GTTCCTGATCCTTACTATGGTGGAGAAATGGTTTTCATAGAGTCATTGATATTCCTGAA
***** *****:*****.*****

EhPTPLMWA GATGCTTGTGAGAAATTTAATCATTAAACTAGAAGAAGGAAAACCTTATTAATTAA
EhPTPLMWB GATGCTTGTGAGAAATTTAATCATTAAACTAGAAGAAGGAAAACCTTATTAATTAA
EdPTPLMW GATGCTTGTGAGAAATTTAATCATTAAACTACAGGAAGGAAAACCTACTAATTAA
***** * .***** *****

```

B

```

EhPTPLMWA MKLLFVCLGNICRSPAAEAVMKKVIQNHLTEKYICDSAGTCSYHEGQQADSRMRKVGKS
EhPTPLMWB MKLLFVCLGNICRSPAAEAVMKKVIQNHLTEKYICDSAGTCSYHEGQQADSRMRKVGKS
EdPTPLMW MKLLFVCLGNICRSPAAEAVMKKVIQNHLTEKYICDSAGTCSYHEGQQADSRMRKVGKS
*****

EhPTPLMWA RGYQVDSISRQVSSDFKFDYIFAMDNNDNYELLDRCPYKQKIFKMFDFCTTIKTE
EhPTPLMWB RGYQVDSISRQVSSDFKFDYIFVMDNDNYELLDRCPYKQKIFKMFDFCTTIKTE
EdPTPLMW RGYQVDSISRQVSSDFKFDYIFAMDNNDNYELLDRCPYKQKIFKMFDFCTTIKTE
*****

EhPTPLMWA VPDYGGGEGKGFHRVIDILEDACENLIKLEEGKLN
EhPTPLMWB VPDYGGGEGKGFHRVIDILEDACENLIKLEEGKLN
EdPTPLMW VPDYGGGEGKGFHRVIDILEDACENLIKLQEGKLTN
***** *****:**** *

```

Figura 14. Comparación de las secuencias de los genes (A) y proteínas (B) para las PTPLMWs de *E. histolytica* y *E. dispar*. Se señalan (rectángulos) el sitio de restricción [BsrD1](#) (TTGCAATG) y el aminoácido alanina diferenciales.

Con base en las comparaciones anteriores, se puede concluir que el único gene PTPLMW de *E. dispar* presenta mayor homología con el gene PTPLMWA de *E. histolytica*.

8.3 Expresión de los genes de EhPTPLMWA y EhPTPLMWB en trofozoítos de cultivo axénico y recuperados de absceso hepático amibiano.

Con el fin de determinar si los genes EhPTPLMWA y EhPTPLMWB se expresan en trofozoítos de *E. histolytica* en cultivo y en aquéllos que han estado en contacto con el huésped, se decidió analizar esta expresión por ensayos de RT-PCR utilizando RNA total de trofozoítos de 48 h y de trofozoítos recuperados de absceso hepático amibiano (AHA) de 7 días de desarrollo. En este ensayo también se incluyó RNA total de trofozoítos de *E. dispar* en cultivo. Los amplicones obtenidos en este ensayo se trataron con la enzima de restricción [BsrD1](#) para poder discernir entre ambos genes de *E. histolytica*, ya que esta enzima solamente digierá al gen EhPTPLMWA y no al gene EhPTPLMWB, además de que esta enzima también se espera que digiera al gene EdPTPLMW. Como control se analizó la expresión del gen de actina (gen housekeeping).

Los resultados de este ensayo muestran que en trofozoítos de *E. histolytica* en cultivo, se expresan ambos genes, ya que los amplicones digeridos con la enzima de restricción mostraron la aparición de los fragmentos esperados de 217 pb y 111 pb para el gene EhPTPLMWA y la no digestión del amplicón de 328 pb para el gene EhPTPLMWB (Figura 15-2). En trofozoítos recuperados de AHA disminuyó la expresión del gene EhPTPLMWA, ya que los fragmentos esperados de 217 pb y 111 pb no se detectan en forma apreciable (Figura 15-5), mientras que el gen EhPTPLMWB continúa su expresión en estas condiciones. Por otro lado, el gen EdPTPLMW se expresa en trofozoítos de *E. dispar* en cultivo (Figura 15-8).

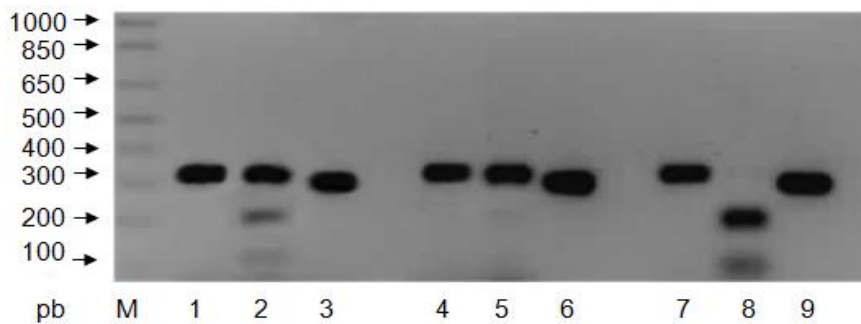


Figura 15. Expresión de los genes EhPTPLMWA y EhPTPLMWB en trofozoítos de *E. histolytica* en cultivo axénico y en trofozoítos recuperados de AHA, y expresión del gen EdPTPLMW en trofozoítos de *E. dispar* en cultivo. Los amplicones obtenidos por ensayos de RT-PCR se trataron (2, 5 y 8) o no se trataron (1, 4 y 7) con la enzima de restricción [BsrD1](#). Para cada ensayo se incluyó la expresión del gen de actina (3, 6 y 9). Se indican los marcadores de tamaño molecular (M: DNA 1 kb TrackIt 10488-085).

Este ensayo de expresión se realizó tres veces por separado, y al normalizar la expresión de las PTPLMWs con la expresión de actina por análisis densitométrico de cada una de las bandas, se observó que la expresión de EhPTPLMWA disminuyó de un 12.5 % en trofozoítos de cultivo hasta un 2.0 % en trofozoítos recuperados de AHA (Figura 16), mientras que la expresión de EhPTPLMWB presentó un ligero aumento en éstos últimos.

RT-PCR semi-cuantitativo de los genes EhPTPLMWA y EhPTPLMWB

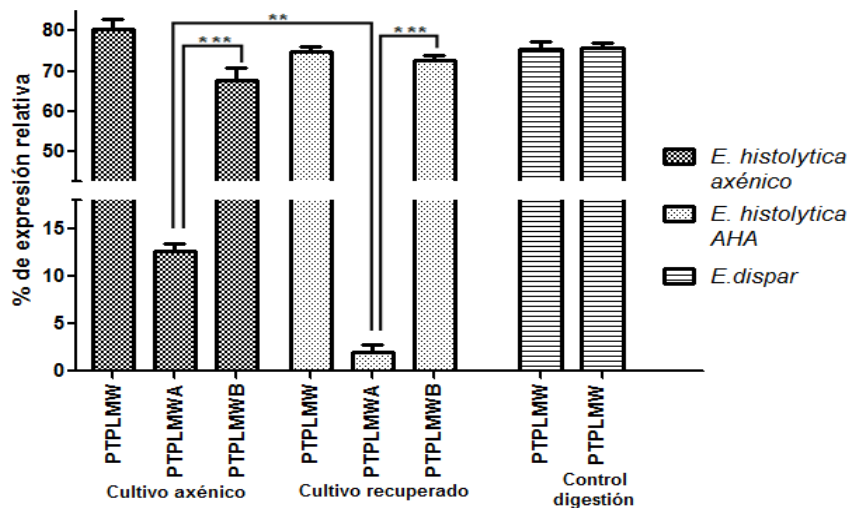


Figura 16. Expresión relativa de los genes EhPTPLMWA, EhPTPLMWB y EdPTPLMW. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad prism 5, y el análisis de varianza con Anova-una vía post-test múltiple comparación de Newman-Keuls. Las diferencias significativas corresponden a: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

8.4 Purificación de las proteínas recombinantes y obtención de anticuerpos anti-6His-rEhPTPLMWA.

Los plásmidos conteniendo los genes EhPTPLMWA y EhPTPLMWB se utilizaron para transformar bacterias *E. coli* cepa BL21 (DE3) pLysS para después inducir la síntesis de las proteínas recombinantes con 1 mM de IPTG durante 2.0-2.5 h a 37 °C. Posteriormente se realizó la purificación de las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad. Con el protocolo mencionado en material y métodos, las proteínas recombinantes se obtienen con una pureza mayor al 95% al analizarlas por SDS-PAGE y con un rendimiento de 120 mg/litro de cultivo. Cada proteína purificada migró como una banda única con un peso aproximado de 23 kDa y fueron reconocidas por el anticuerpo monoclonal anti-histidinas en ensayos de inmunotransferencia (Figura 17).

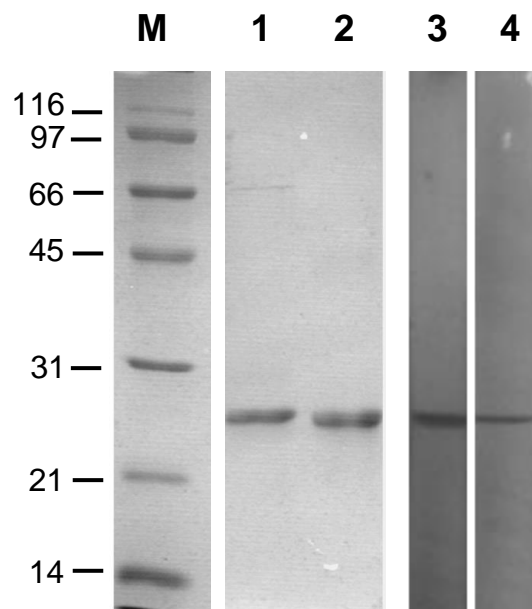


Figura 17. Purificación de las proteínas recombinantes. Análisis por gel de poliacrilamida al 12 % SDS-PAGE (1 y 2) y por inmunotransferencia con el anticuerpo monoclonal anti-histidinas (3 y 4) de las proteínas recombinantes 6HisrEhPTPLMWA (1 y 3) y 6HisrEhPTPLMWB (2 y 4). Las muestras no fueron hervidas.

Una vez confirmada la identidad de las proteínas recombinantes, se decidió utilizar a 6HisrEhPTPLMWA para la generación de anticuerpos policlonales. Para tal efecto, se utilizaron 10 µg de proteína por cada inmunización a un grupo de 4 ratones BALB/c hembra y de acuerdo a las fechas mostradas en el cuadro de la figura 18. De acuerdo a este esquema de inmunización, los anticuerpos anti-6HisrEhPTPLMWA comienzan a ser detectados por ensayos de inmunotransferencia al día 30 después de la primera inmunización, aumentando continuamente su título hasta el día 215.

Calendario de inmunización y sangría

Días en los que se inmunizó a ratones.	0	7	14	21	49	77	103	138	198
	ACF	AIF	AIF	AIF	AIF	AIF	AIF	AIF	AIF
Toma de suero Días	0	30	59	84	148	206	215	224	
Dilución/ Inmunotransferencia.		1:500	1:1000	1:2000	1:1500	1:3000	1:3000	1:3000	

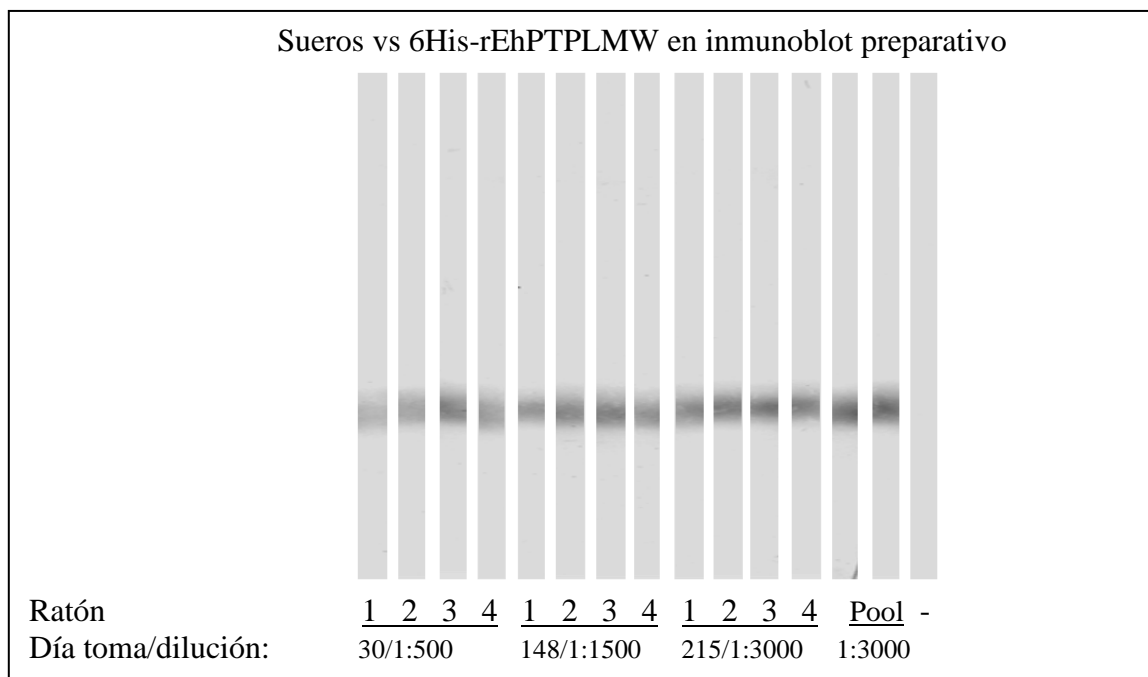


Figura 18. Obtención de anticuerpos anti-6HisrEhPTPLMWA. Ensayo de inmunotransferencia de la proteína recombinante 6HisrEhPTPLMWA con los sueros obtenidos de acuerdo al esquema de inmunización y a la dilución indicada. Se incluyó en el ensayo suero pre-inmune a dilución 1:500. Pool: mezcla de sueros del día 215.

Para conocer la presencia de la proteína nativa en el parásito, se realizaron ensayos con el pool de anticuerpos correspondiente al sangrado del día 215 por el método de ELISA a distintas diluciones desde 1:500 a 1:40000, donde se observó reconocimiento para todas estas diluciones hacia 100 µg de extracto total de trofozoítos en placas de ELISA de 96 pozos. Una vez observado esto se realizó inmuno-transferencias con extractos totales de trofozoítos de *E. histolytica* y *E. dispar*. Los resultados mostraron que cuando los extractos totales se analizaron en condiciones nativas, los anticuerpos anti-EhPTPLMWA reconocen una proteína de alrededor de 22 kDa y en condiciones desnaturalizantes una proteína que migra entre los marcadores de 21.5 y 14.4 kDa. El peso molecular de las proteínas lineales EhPTPLMWs se esperan sea de 18 kDa. Estos reconocimientos se presentaron para *E. histolytica* y *E. dispar* en ambas condiciones, pero además los anticuerpos reconocieron una proteína de alrededor de 65 kDa solamente en *E. dispar* y en condiciones desnaturalizante (Figura 19).

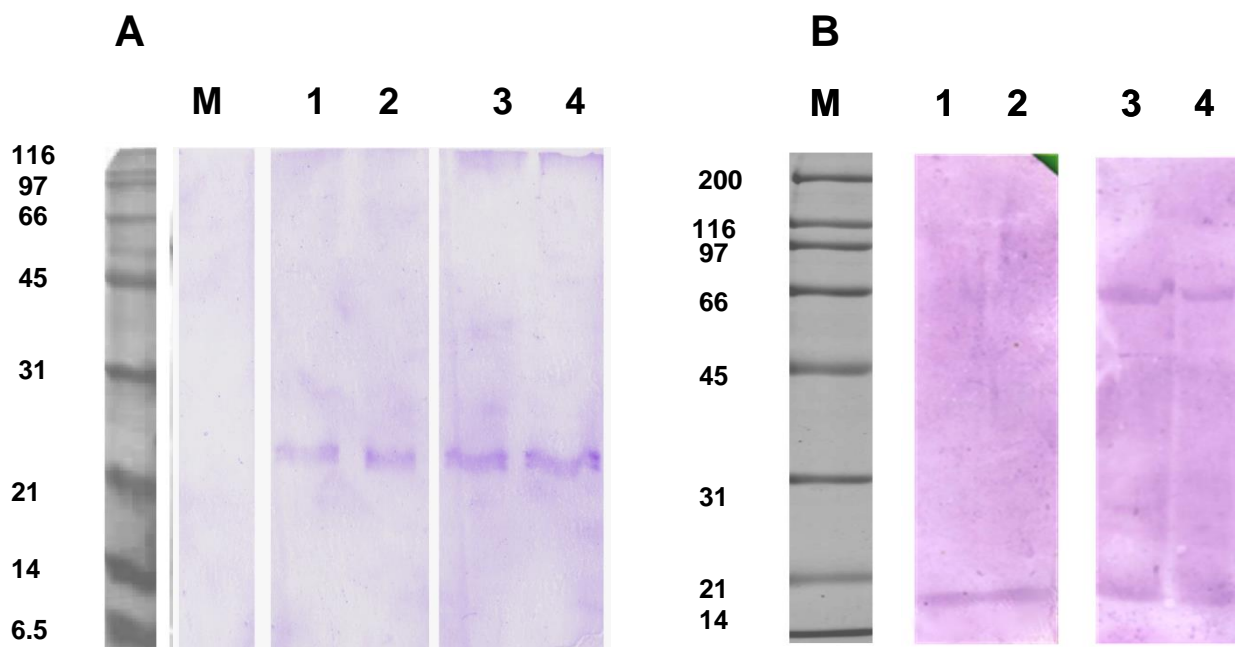


Figura 19. Detección de PTPLMWs nativas. Extractos totales de *E. histolytica* (1 y 2) y *E. dispar* (3 y 4) se corrieron en geles nativo (A) y desnaturalizantes (B) y se analizaron por inmuno-transferencia con anticuerpos anti-EhPTPLMWA (1:3000). Número de trofozoítos: (A), (1y 3) 2×10^4 , (2y 4) 3×10^4 ; (B), (1 y 3) 1.5×10^3 , (2 y 4) 1×10^4 . (P) suero preinmune y (M) marcadores de peso molecular.

8.5 Actividad de fosfatasa de la 6His-rEhPTPLMWA y 6His-rEhPTPLMWB

8.5.1 pH óptimo y Km

Con la finalidad de determinar el pH óptimo de la actividad enzimática de las EhPTPLMWs, en un primer ensayo se utilizaron 3 μg de cada proteína en las condiciones descritas en material y métodos, incubando la mezcla de reacción durante 60 min. En estas condiciones se encontró que el sustrato pNPP se degradaba completamente en el rango de pH de 4.5 a 9.0 para rEhPTPLMWA y de 4.5 a 8.0 para rEhPTPLMWB (Figuras 20a y 20b respectivamente). Con base en estos resultados, la mezcla de reacción se incubó solamente 30 min empleando igualmente 3 μg de cada proteína. Bajo estas condiciones se pudo determinar claramente el pH óptimo de actividad, el cual fue de 6 para ambas proteínas (Figuras 20c y 20d).

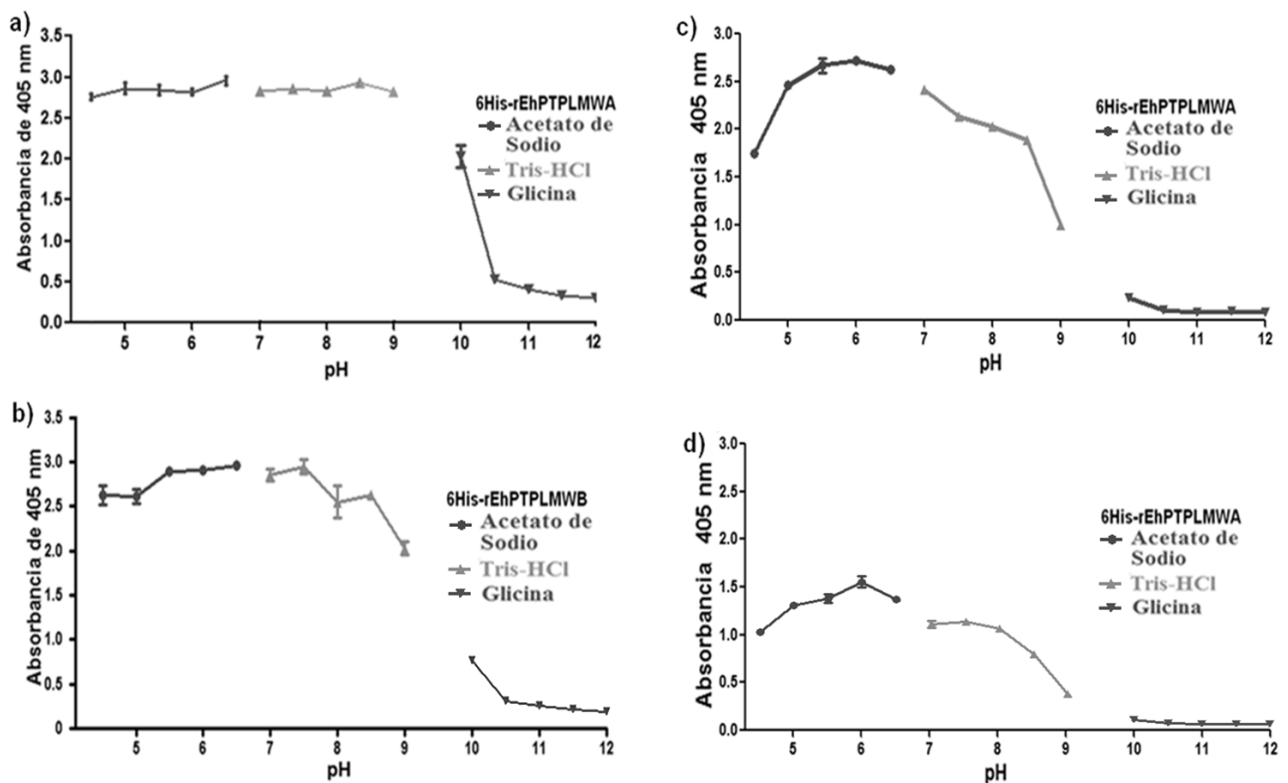


Figura 20. Determinación del pH óptimo de actividad de la 6His-rEhPTPLMWA y 6His-rEhPTPLMWB. Ensayo representativo por triplicado a 60 min (a y b) y 30 min (c y d), incubación a 37 °C. 6His-rEhPTPLMWA (a y c). 6His-rEhPTPLMWB (b y d). Los datos fueron analizados con GraphPad Prism5 Sum of two Gaussian.

Se encontró un resultado interesante cuando se comparó la máxima densidad óptica obtenida con cada una de las enzimas, ya que la proteína rEhPTPLMWA presentó mayor degradación del sustrato que rEhPTPLMWB a pH 6 (2.75 vs 1.50). Esta menor actividad puede verse reflejada en la K_m de las enzimas, por lo que se determinó este parámetro cinético para cada una de ellas utilizando la misma cantidad de proteína en los ensayos y diferentes concentraciones del sustrato pNPP. En este ensayo se midió la cantidad de p-nitrofenol (pNP) formado a 405 nm extrapolando a curvas de calibración de pNP de 0.0 a 0.4 y 0.4 a 0.8 mM respectivamente. Con los datos obtenidos se empleó el método de Lineweaver-Burk y se determinó una K_m de 0.69 mM para rEhPTPLMWA y de 1.267 mM para rEhPTPLMWB (Figura 21).

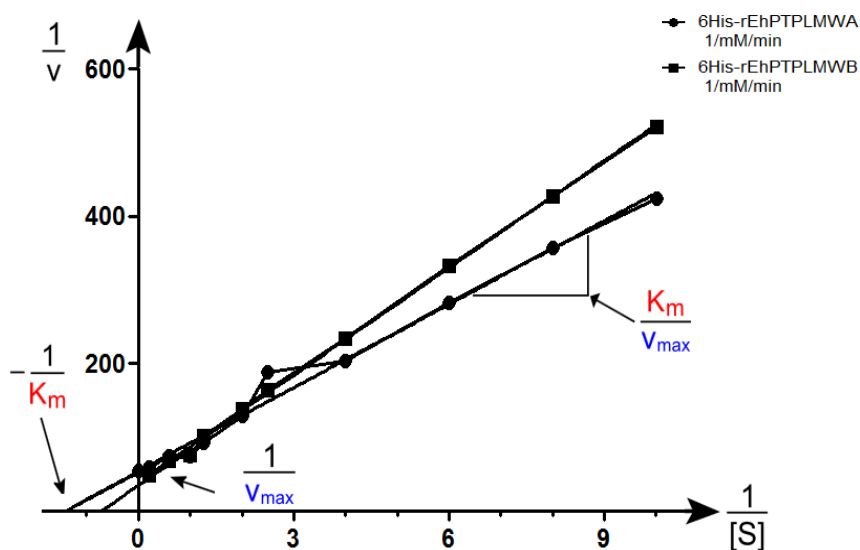


Figura 21. Diagrama de doble recíproco de Lineweaver Burk de la cinética enzimática de 6His-rEhPTPLMWA y 6His-rEhPTPLMWB. 6His-rEhPTPLMWA en cuadrados, $K_m = 0.69$ mM, $-1/k_m = -1/1.431$ con $1/V_{max} = 54.04$. 6His-rEhPTPLMWB en círculos, $K_m = 1.267$ mM, $-1/k_m = -1/0.7889$ con $1/V_{max} = 38.33$. Se utilizó 3 μ g de enzima por cada 100 μ l de reacción.

Estos resultados indican que la enzima rEhPTPLMWA tiene mayor afinidad por el sustrato pNPP que la enzima rEhPTPLMWB.

Los valores de las K_m 's para las EhPTPLMWs son comparables a las obtenidas para otras PTPLMWs de diferentes organismos utilizando el mismo sustrato (Tabla IV), ya que se encuentran en el mismo rango mM.

Tabla IV. Km de distintas PTPLMWs.

Organismo	PTP-LMW	Km (mM)	Vmax ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	Sustrato	Referencia
Bovine LM-PTP	BPTP	0.38	----	pNPP	Lescop et al, 2006
<i>Synechocystis sp.</i>	PCC 6803 SynPTP	0.6	3.2	pNPP	Mukhopadhyay et al, 2006
<i>S. coelicolor</i>	A3(2) PtpA	0.75	4.8	pNPP	Li and Strohl 1996
<i>E. histolytica</i>	PTPLMWA	0.69	--	pNPP	En este trabajo 2013
<i>E. histolytica</i>	PTPLMWB	1.26	--	pNPP	En este trabajo 2013
<i>S. aureus</i>	PtpA	1.2	33.6	pNPP	Soulat et al, 2002
<i>S. pombe</i>	Stp1	0.21	12.8	pNPP	Zhang et al, 1995
<i>S. cerevisiae</i>	Ltp1	0.017	3.2	pNPP	Ostanin et al, 1995
<i>A. johnsonii</i>	PTP	5.0	9.7	pNPP	Grangeasse et al, 1998
<i>E. Coli</i>	Wzb	1.0	4.6	pNPP	Lescop et al, 2006
<i>B. subtilis</i>	His-YfkJ	0.244	--	pNPP	Musumeci et al, 2005
<i>B. subtilis</i>	His-YwIE	0.024	--	pNPP	Musumeci et al, 2005
<i>Homo sapiens</i>	HPTP-A	0.12	--	pNPP	Zabell et al, 2006
<i>Homo sapiens</i>	HPTP-B	0.43	--	pNPP	Zabell et al, 2006

8.5.2. Temperatura y actividad enzimática.

Con la finalidad de obtener la temperatura óptima de actividad de las proteínas EhPTPLMWs, los ensayos de actividad se realizaron en el rango de temperatura de 24 °C a 85 °C. Los resultados obtenidos mostraron que a 10 min de incubación, rEhPTPLMWA mostró máxima actividad a 60 °C; y rEhPTPLMWB a 58 °C, siendo la actividad 2 a 3 veces mayor a la observada a 37 °C para ambas enzimas (Figura 22). Cuando se analizó la actividad relativa, tomando como 100 % la máxima actividad, a 37 °C rEhPTPLMWA presentó un 29.8 % \pm 1.49 % de actividad y rEhPTPLMWB un 27.6 % \pm 1.38 % de actividad (Figura 22b). Por otro lado, la estabilidad de las enzimas a 50 °C y a 60 °C se ensayó preincubando la mezcla de reacción sin el sustrato pNPP de 10 a 150 min, y al término de la preincubación se agregó el sustrato y la actividad se midió a los 10 min. Los resultados obtenidos muestran que ambas enzimas son estables a 50 °C (Figura 23a), mientras que a 60 °C la actividad decae en proporción directa al tiempo de preincubación (Figura 23b).

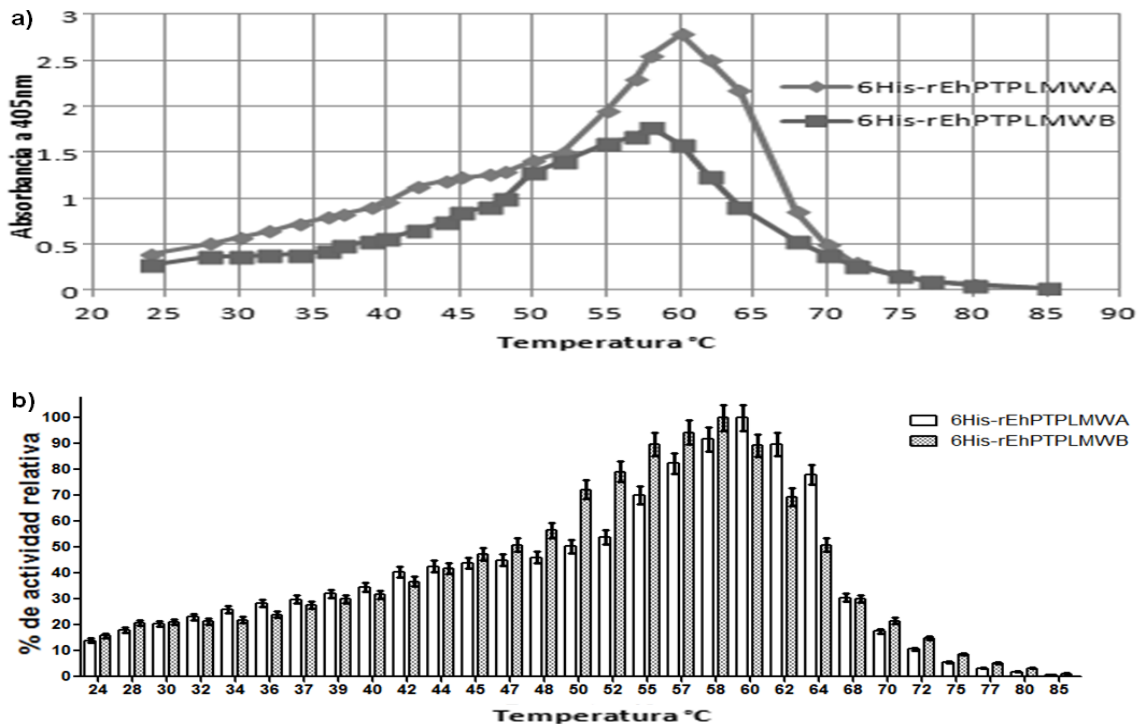


Figura 22. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática de 6His-rEhPTPLMWA y 6His-rEhPTPLMWB. Reacciones enzimáticas durante 10 min entre 24–85 °C en acetato de sodio 100 mM pH 6.0 con pNPP 10 mM. b) % de actividad relativa tomando como 100% a la media de mayor absorbencia de la figura 23a. 0.03 µg/µl de cada proteína recombinante. Los gráficos se obtuvieron con GraphPad prism 5.

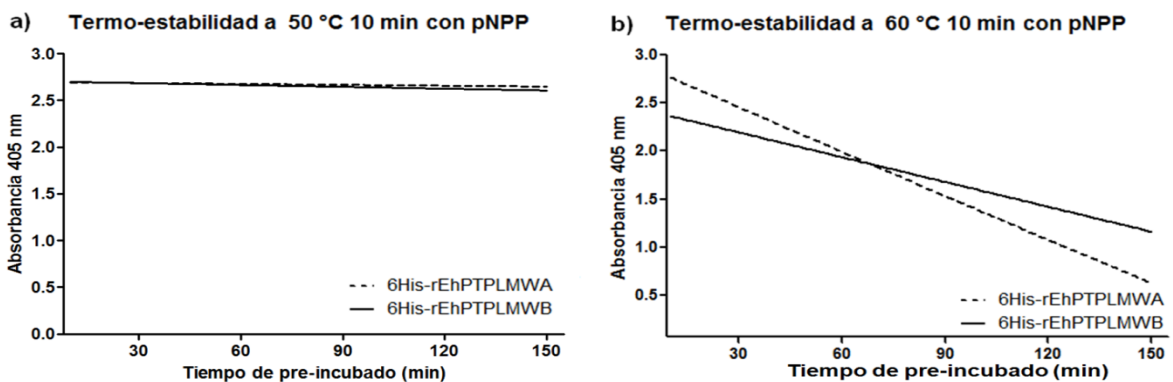


Figura 23. Efecto de la temperatura en la estabilidad de la actividad de 6His-rEhPTPLMWA y 6His-rEhPTPLMWB. Las proteínas se preincubaron de 10-150 min en acetato de sodio 100 mM pH 6.0 a 50 °C (a) o 60 °C (b), posteriormente se tomó lectura de la actividad enzimática después de 10 min de reacción con pNPP a 50 °C (a) o 60 °C (b).

8.5.3. Inhibidores y actividad enzimática.

Para estudiar el efecto de inhibidores en la actividad enzimática de las EhPTPLMWs, se ensayaron inhibidores de fosfatasa tales como orto-vanadato de sodio (OV), fluoruro de sodio (FS) y EDTA a 37 °C y 50 °C. En este ensayo ambas enzimas fueron inhibidas en un 97 % por el OV (inhibidor específico de las PTPasas), tanto a 37 °C como a 50 °C a una concentración de 1.0 mM (Figura 24). Por otro lado, el FS (inhibidor de las fosfoserina/fosfotirosina fosfatasas) a una concentración de 1.0 mM y a 50 °C inhibió 15 % y 20 % de la actividad de EhPTPLMWA y EhPTPLMWB respectivamente, mientras que a 37 °C aumentó esta inhibición hasta un 20 % y 30 %. Además, el FS a una concentración de 10 mM aumentó esta inhibición hasta un 80-90 % para ambas enzimas a 37 °C, mientras que a 50 °C la inhibición fue menor en un rango de 35-50 %, lo que indica que a altas temperatura el FS disminuye su efectividad, lo cual no es así para el OV. Por otro lado, el EDTA solamente se ensayó a 50 °C y no mostró efecto en las actividades enzimáticas.

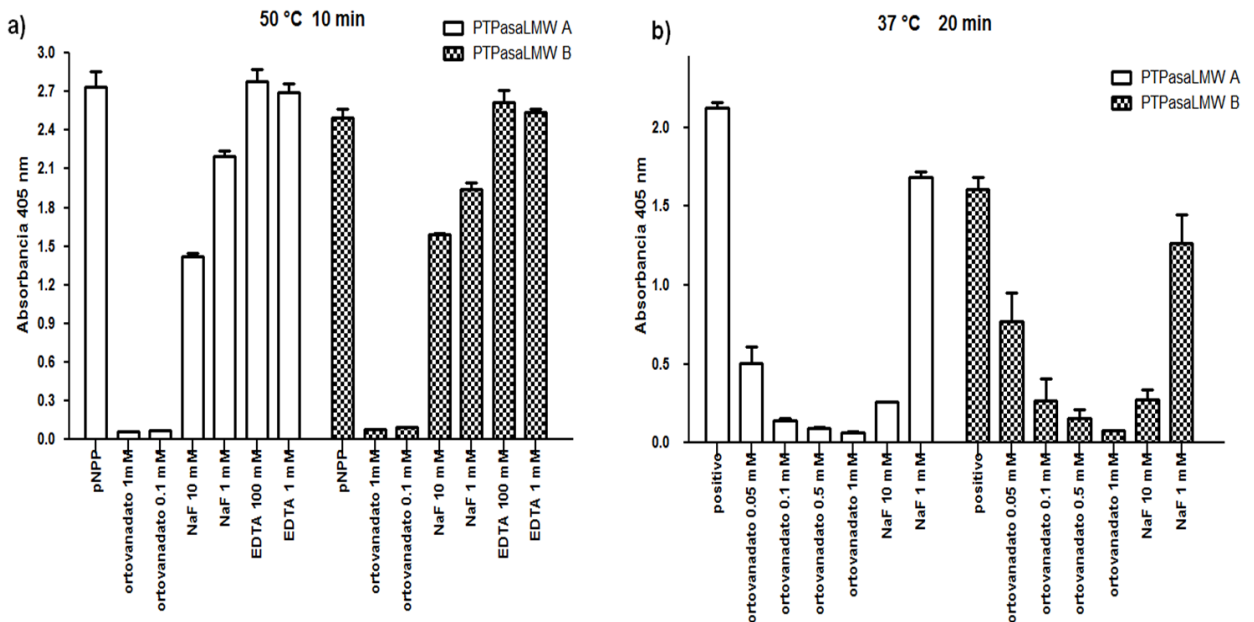


Figura 24. 6His-rEhPTPLMWA y 6His-rEhPTPLMWB vs inhibidores de fosfatasas. a) Ensayo realizado a 50 °C con los distintos inhibidores. b) Ensayo realizado a 37 °C con los distintos inhibidores. pNPP= control positivo de actividad. Los resultados se analizaron con GraphPad prism5. 0.03 µg/µl de proteína recombinante, orto-vanadato de sodio 0.05, 0.1, 0.5, 1 mM; NaF 10, 1 Mm; EDTA 100, 1 mM.

8.6 Detección de posibles sustratos para EhPTPLMWA y EhPTPLMWB

Con el fin de identificar otros posibles sustratos para las EhPTPLMWs, se modificó el método de cuantificación de fosfatos libres de Chen (Chen *et al*, 1956; Oltmans *et al*, 2004), como se describe en materiales y métodos. Los sustratos utilizados fueron fosfotirosina (FTy), fosfotreonina (FTh), fosfoserina (FSe) y 3-O-methylfluorescein 6-phosphate (OMFP). Los resultados obtenidos muestran que de los aminoácidos fosforilados, solamente la FTy es sustrato para ambas rEhPTPLMWs, ya que con FTh y FSe no se detectó liberación de fosfatos. Por otro lado, OMFP también fue sustrato para ambas enzimas presentando una mayor liberación de fosfato que el presentado para pNPP y FTy (Figura 25).

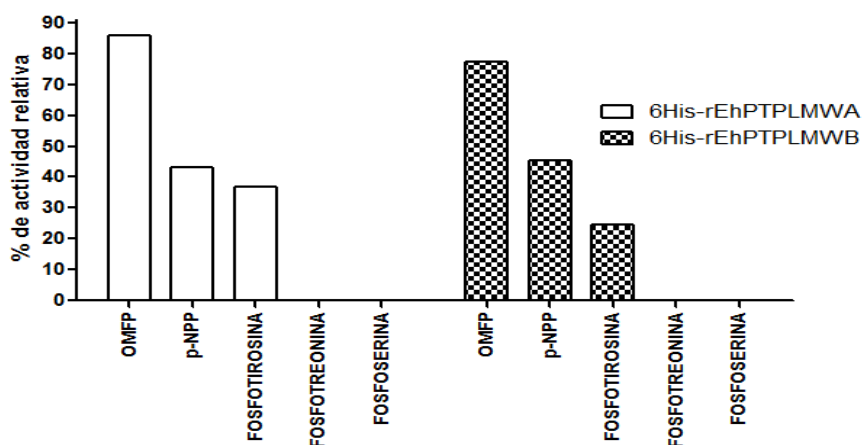


Figura 25. Actividad enzimática de las rEhPTPLMWs contra OMFP, pNPP, FTy, FTh y FSe. Se utilizó 2.5 mM de cada uno de los sustratos en amortiguador de acetatos pH 6.0. Los fosfatos liberados se cuantificaron después de incubar la mezcla de reacción a 37 °C por 60 min. Se tomó como 100 % de actividad relativa la absorbencia a 655 nm de 2.5 mM de K_2HPO_4 .

Debido a que se utilizó en el ensayo la misma concentración de sustratos, las dos enzimas desfosforilan a éstos en el siguiente orden de rapidez: OMFP>pNPP>fosfotirosina. Lo anterior sugiere que los átomos aledaños al sitio de desfosforilación de la molécula sustrato son importantes para un mejor reconocimiento de éste.

Con el fin de analizar la interacción de estos sustratos con las rEhPTPLMWs, primero se generaron las estructuras 3D de las proteínas y después se obtuvieron las estructuras 3D de los sustratos a analizar. Los archivos con las coordenadas para cada una de las enzimas y sustratos (extensión PDB) se cargaron en el

programa PyRx Docking de Vina como se describe en materiales y métodos. Con los resultados obtenidos de los ligandos en la hendidura catalítica, se revisaron las conformaciones y distancias para confirmar cuáles eran las adecuadas para que se llevara a cabo la función enzimática. Se analizaron los cinco sustratos utilizados experimentalmente, pero dos de ellos mostraron una conformación tridimensional no adecuada (fosfoserina y fosfotreonina), y tres mostraron una conformación 3D adecuada con distintas afinidades de unión de acuerdo al siguiente orden: OMFP>pNPP>fosfotirosina para las dos rEhPTPLMWs (Tabla V). Debido a que entre más negativa sea la energía de unión, mayor será la afinidad del sustrato por la enzima, se puede afirmar que OMFP es un mejor sustrato para las proteínas recombinantes rEhPTPLMWA y rEhPTPLMWB.

Tabla V. Energía de unión entre rEhPTPLMWA ó rEhPTPLMWB y sus sustratos.

Macro molécula	Ligando	Afinidad de unión (Kcal/mol)
EhPTPLMWA	pNPP	-6.8
EhPTPLMWB	pNPP	-6.8
EhPTPLMWA	OMFP	-8.7
EhPTPLMWB	OMFP	-8.8
EhPTPLMWA	Fosfotirosina	-6.3
EhPTPLMWB	Fosfotirosina	-6.3

La energía de unión de pNPP y FTy respectivamente, fueron igual para ambas enzimas, pero para OMFP se presentó una ligera diferencia. Debido a lo anterior, además de las distintas km obtenidas con pNPP con las enzimas recombinantes de las EhPTPLMWs, se comparó el acomodo molecular de los distintos ligandos dentro de las hendiduras catalíticas. En la figura 26 se muestra el pNPP en la hendidura catalítica de ambas enzimas, en donde se detecta diferente rotación del sustrato al comparar rEhPTPLMWA vs rEhPTPLMWB. La diferencia principal en la conformación tridimensional se observa con los átomos flexibles enlazados a los oxígenos 3 y 4 del pNPP, las distancias entre átomos rígidos de relevancia se muestran en la tabla VI.

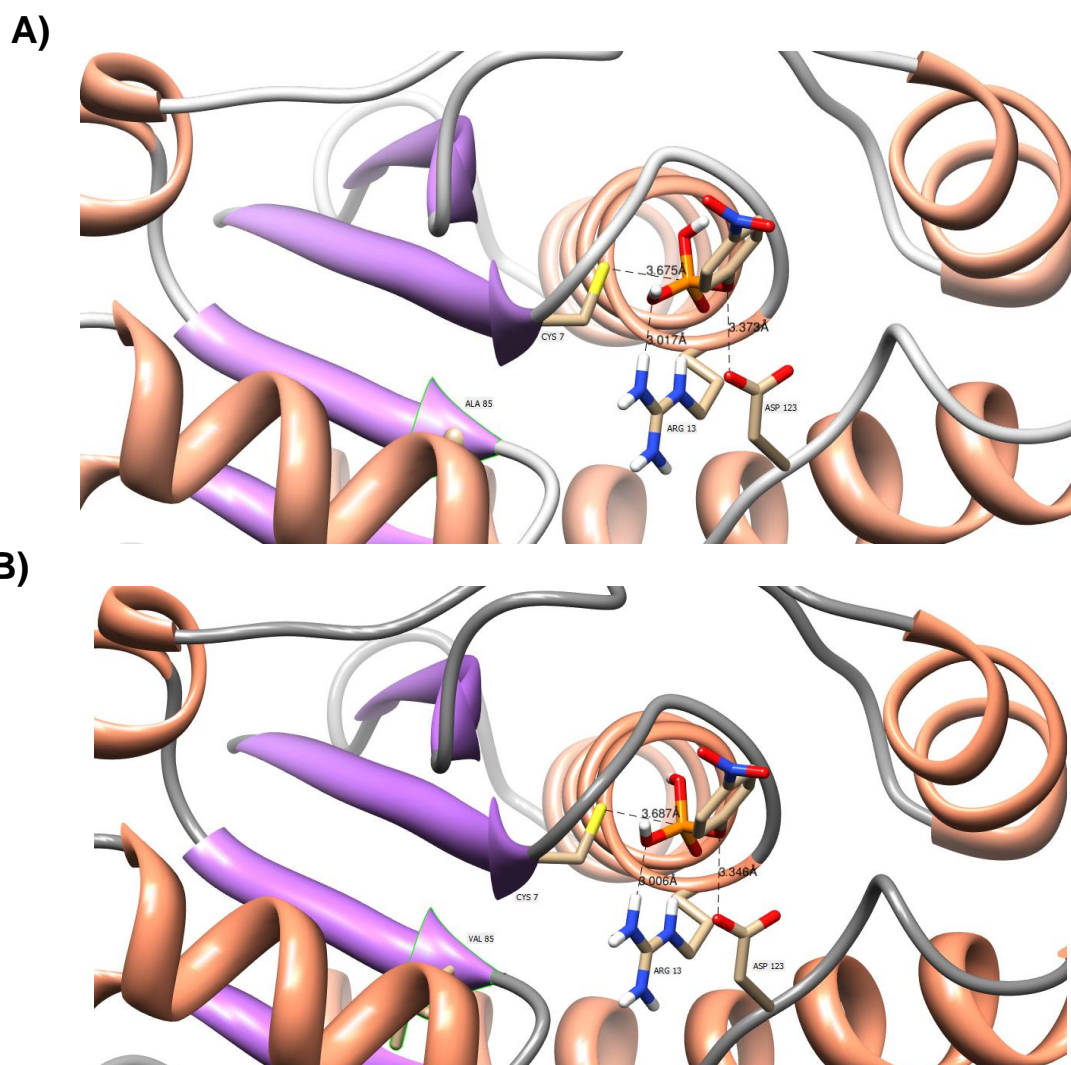


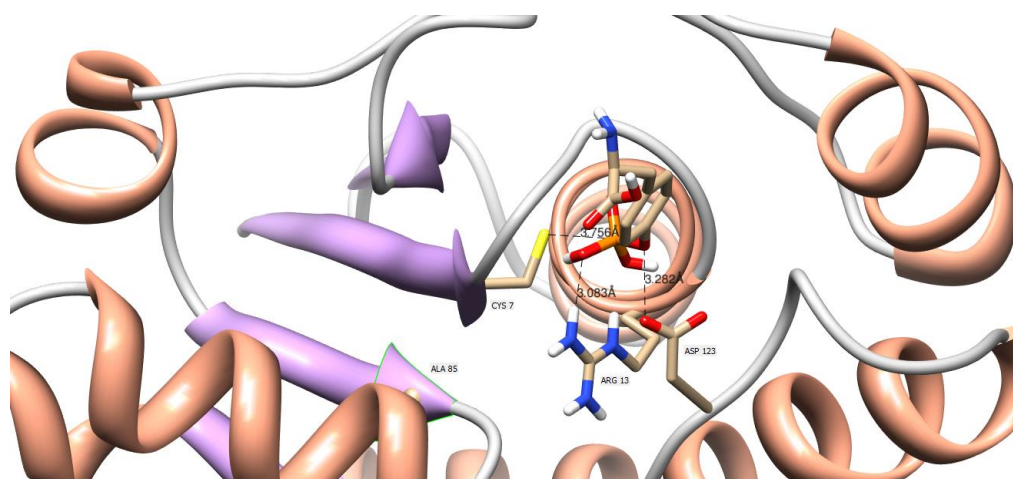
Figura 26. Representación 3D de las EhPTPLMWs con el ligando p-nitrofenol fosfato. A) EhPTPLMWA; B) EhPTPLMWB. Se señalan la distancias entre el átomo de azufre de la Cisteína 7 catalítica, Alanina 85 ó Valina 85, y ácido aspártico 123 que se presentan en la Tabla VI. Aminoácidos que pertenecen a alfa hélices en Beige, beta plegada en color morado claro, átomos de oxígeno en rojo, azufre en amarillo claro, nitrógeno en azul y fósforo en naranja. La interacción ligando macro-molécula se generó con PyRx Dock de Vina, las distancias se obtuvieron con UCSF Chimera.

Tabla VI. Distancias entre el ligando pNPP contra átomos del sitio catalítico de las EhPTPLMW.

----	pNPP	PTPLMWA	Angstrom	----	pNPP	PTPLMWB	Angstroms
	ATOMO 1	ATOMO 2	Distancia		ATOMO 1	ATOMO 2	Distancia
1	P1	Cys 7 S	3.675	1	P1	Cys 7 S	3.687
2	O4	Arg 13 NH2	3.017	2	O4	Arg 13 NH2	3.006
3	O1	Asp 123 O2	3.373	3	O1	Asp 123 O2	3.346

En la figura 27 se muestra la rotación sobre su eje de la FTy, en donde se aprecia que el sustrato se coloca de forma distinta dentro de la hendidura catalítica de las enzimas. En tabla VII se enlistan las distancias entre átomos relevantes de la FTy de las rEhPTPLMWs, resaltando que el oxígeno 2 del aspártico 123 de EhPTPLMWA se encuentra a 3.282 angstroms del oxígeno 1 de la FTy y en EhPTPLMWB se encuentra a 3.371 angstroms.

A)



B)

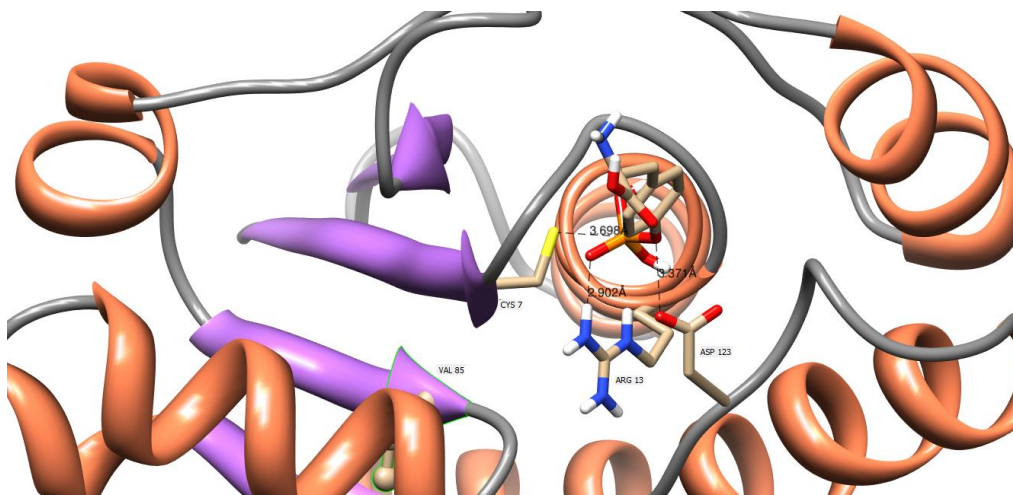


Figura 27. Representación 3D de las EhPTPLMW con el ligando fosfotirosina. A) EhPTPLMWA; B) EhPTPLMWB. Se señalan la distancias entre el átomo de azufre de la Cisteína7 catalítica, Alanina85 ó Valina85, Nitrógeno del grupo R de la Arginina 13, Oxígeno del grupo R del Aspártico 123 que se presentan en la Tabla VII. Los colores de las moléculas son las mismas descritas en la figura 26.

Tabla VII. Distancia entre átomos del ligando fosfotirosina contra átomos del sitio catalítico de las EhPTPLMWs.

---	fosfotirosina	PTPLMWA	Angstroms	----	pNPP	PTPLMWB	Angstroms
	ATOMO 1	ATOMO 2	Distancia		ATOMO 1	ATOMO 2	Distancia
1	P1	Cys 7 S	3.756	1	P1	Cys 7 S	3.698
2	O4	Arg 13 NH2	3.083	2	O4	Arg 13 NH2	2.902
3	O1	Asp 123 O2	3.282	3	O1	Asp 123 O2	3.371

Con la molécula OMFP, que es de mayor tamaño que pNPP ó FTy, se encontraron mayores diferencias en las distancias entre átomos relevantes (tabla VIII y figura 28). El modelaje molecular observado con el programa UCSF Chimera muestra la rotación del sustrato dentro de la hendidura catalítica o posicionamiento distinto notable comparando los átomos rígidos de OMFP en EhPTPLMWA vs EhPTPLMWB.

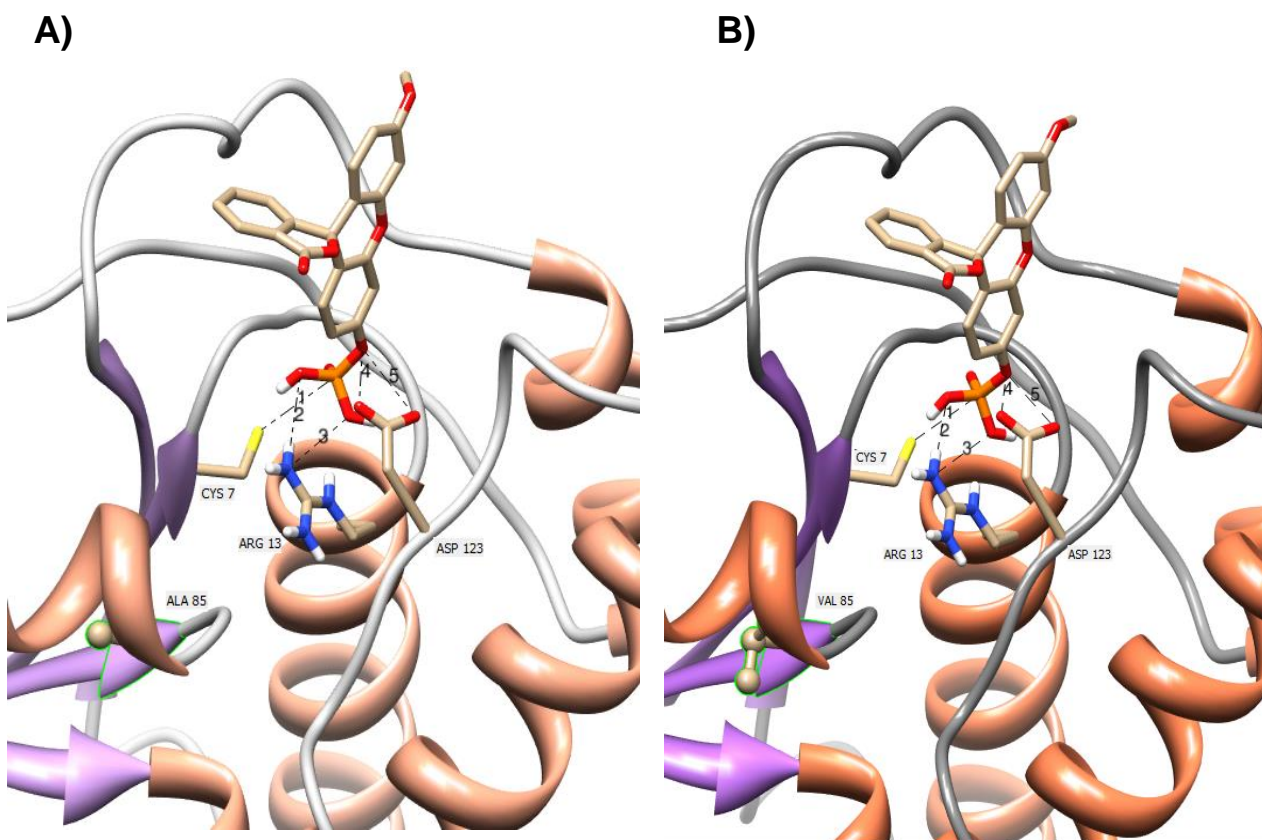


Figura 28. Representación 3D de las EhPTPLMW PDB con el ligando OMFP. A) EhPTPLMWA PDB; B) EhPTPLMWB. Se señalan la distancias entre el átomo de azufre de la Cisteína7 catalítica, Alanina85 ó Valina85, Nitrógeno del grupo R de la Arginina 13, Oxígeno del grupo R del Aspártico 123, Se presentan en la Tabla VIII. Los colores de las moléculas son los mismos descritos en la figura 27.

Tabla VIII. Distancias entre átomos del ligando OMFP contra átomos del sitio catalítico de las EhPTPLMW. Obtenido por Dock de Vina. Las distancias se obtuvieron en UCSF Chimera.

---	OMFP	PTPLMWA	Angstroms	----	OMFP	PTPLMWB	Angstroms
	ATOMO 1	ATOMO 2	Distancia		ATOMO 1	ATOMO 2	Distancia
1	P1	Cys 7 S	4.144	1	P1	Cys 7 S	3.871
2	O7	Arg 13 NH2	3.665	2	O7	Arg 13 NH2	3.261
3	O6	Arg 13 NH2	3.585	3	O6	Arg 13 NH2	3.831
4	O4	Asp 123 O2	4.013	4	O4	Asp 123 O2	3.809
5	O4	Asp 123 O1	3.955	5	O4	Asp 123 O1	3.776

Los datos anteriores obtenidos *in silico* sugieren que una alanina o valina en la posición 85 de la secuencia de aminoácidos de las EhPTPLMWs influye en el posicionamiento de la molécula sustrato

8.7. Análisis *in silico* de EhPTPLMWA y EhPTPLMWB

Debido a las diferencias observadas entre rEhPTPLMWA y rEhPTPLMWB, con respecto sus Km's, al efecto de la temperatura en su actividad enzimática, a su estabilidad térmica y a su unión con ligandos, se procedió a buscar diferencias estructurales *in silico*. Al analizar la superficie hidrofóbica cercana a sus hendiduras catalíticas, se observaron diferencias que se muestran en la figura 29.

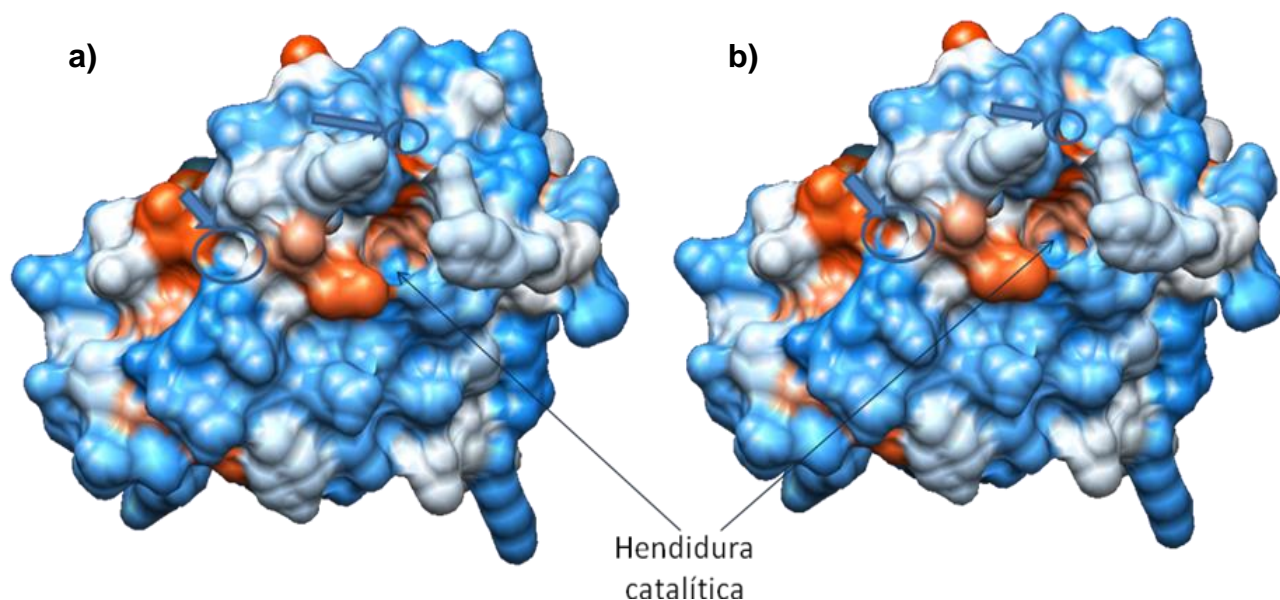


Figura 29. Representación de la superficie hidrofóbica de la EhPTPLMWA (a) y EhPTPLMWB (b). Se señalan con flechas de color azul las principales diferencias que se observan en la superficie. Aminoácidos más hidrofóbicos tienden al color rojo y aminoácidos hidrofílicos en azul. Los modelos 3D se obtuvieron con UCSF Chimera.

Por otro lado, se analizó la distancia entre diversos átomos en la región terminal de la tercera cadena β plegada cercana a la posición 85, la cual es distinta entre las dos EhPTPLMWs. La presencia de aminoácidos distintos en ésta posición modifica la distancia entre diversos átomos (Figura 30) (Tabla IX), indicando también un efecto de torsión distinto de los átomos que participan en la actividad fosfatasa.

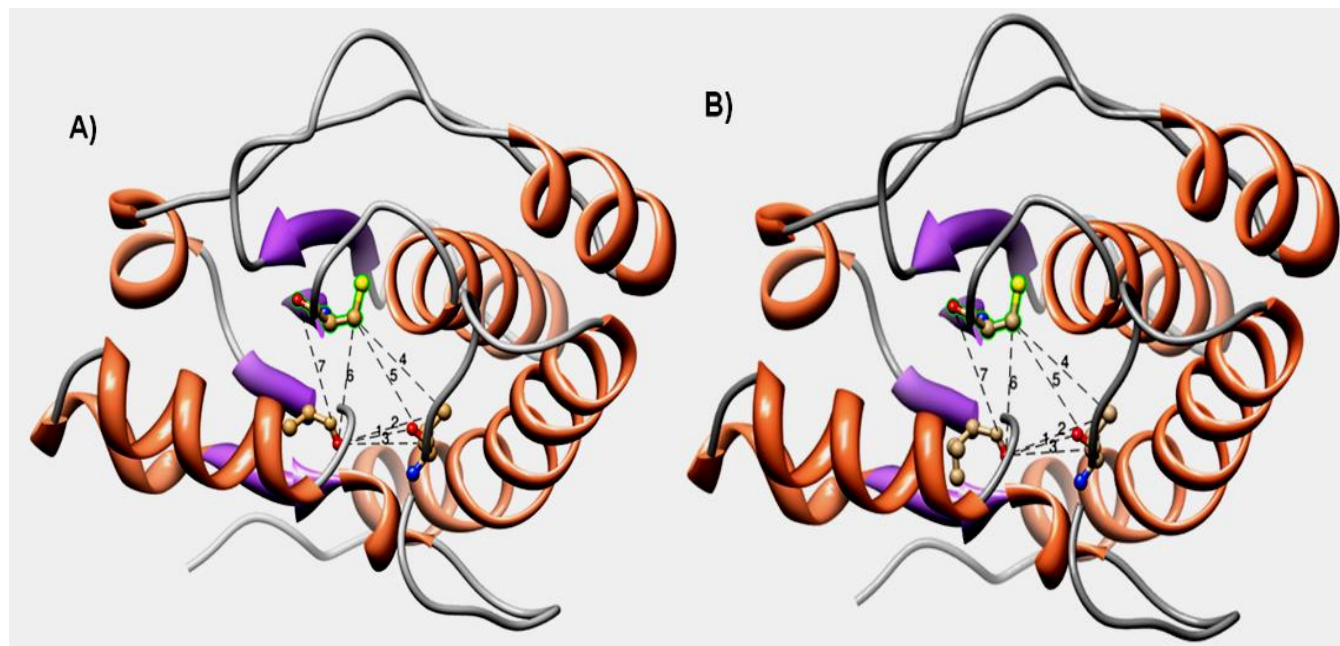


Figura 30. Distancias entre átomos cercanos a la cisteína de las EhPTPLMWs. Se indican las distancias analizadas (1-7) que se muestran en la tabla IX. A) PTPLMWA; B) PTPLMWB; átomos de la cisteína catalítica en color verde, cadenas alfa hélices en Beige y beta plegada en color morado, oxígeno en rojo, azufre en amarillo y nitrógeno en azul. Visualización en UCSF Chimera.

Tabla IX. Distancia entre átomos representativos cercanos al sitio catalítico de las EhPTPLMWs.

----	PTPLMWA			Angstroms	----	PTPLMWB			Angstroms
	ATOMO 1	ATOMO 2	Distancia			ATOMO 1	ATOMO 2	Distancia	
1	Ala 85 O	Val 121 O	7.3201		1	Val 85 O	Val 121 O	7.2867	
2	Ala 85 O	Val 121 Cy1	7.3246		2	Val 85 O	Val 121 Cy1	7.1803	
3	Ala 85 O	Val 121 Cy2	5.5457		3	Val 85 O	Val 121 Cy2	5.3826	
4	Cys 7 C β	Val 121 Cy1	7.3845		4	Cys 7 C β	Val 121 Cy1	7.3845	
5	Cys 7 C β	Val 121 Cy2	8.1349		5	Cys 7 C β	Val 121 Cy2	8.1349	
6	Ala 85 O	Cys 7 C β	7.5721		6	Val 85 O	CYS 7 C β	7.5567	
7	Ala 85 O	Cys 7 O	8.8759		7	Val 85 O	CYS 7 O	8.9419	

También se analizó el efecto de la sustitución de la valina por la alanina en la estructuración de las cadenas α -hélices y β -plegadas al comparar los modelos 3D de ambas enzimas. Se observó que esta sustitución, en la región correspondiente a la porción terminal de la tercera cadena β -plegada, tiene un efecto sobre las 4 β plegadas de las proteínas al variar su ubicación espacial (Figura 31).

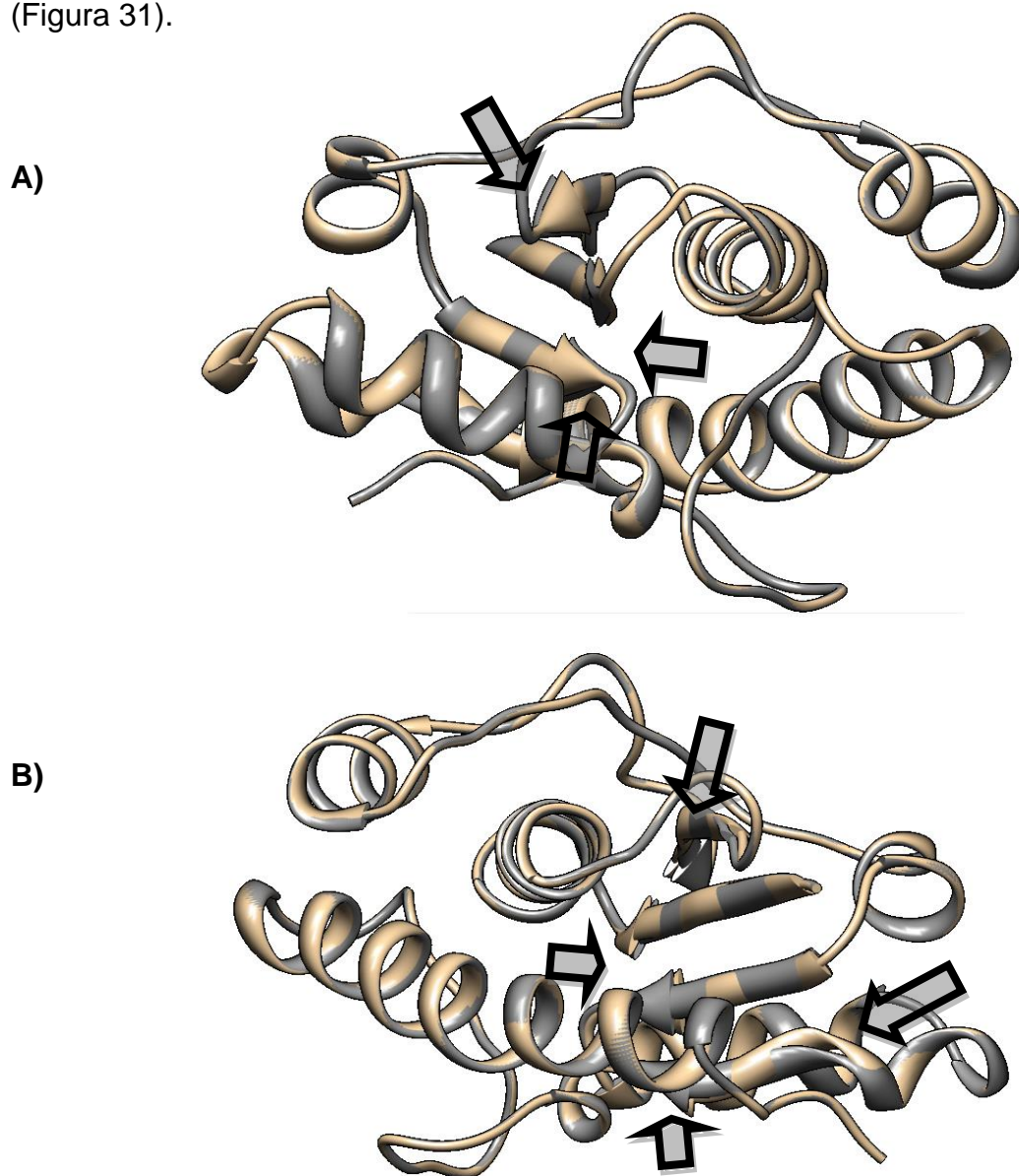


Figura 31. Diagrama comparativo de las estructuras 3D de EhPTPLMWA y EhPTPLMWB. A) Vista desde la cara en que se ubica la hendidura catalítica; B) cara opuesta a la hendidura catalítica. EhPTPLMWA de color café claro y EhPTPLMWB de color gris. Con las flechas se señalan las principales diferencias en cuanto a ubicación espacial de las cadenas alfa hélice y beta plegadas. Las estructuras se obtuvieron empleando UCSF Chimera.

Se ha reportado que el cambio de un amino ácido en la secuencia de otras PTPLMWs, principalmente en una zona posición estratégica de la molécula, puede modificar la Km aunque no se encuentre formando parte de la hendidura catalítica (Tabla X). Nuestros resultados muestran que el cambio en la posición 85 de las EhPTPLMWs también modifica la Km, a pesar de que este cambio no se encuentra en una posición estratégica.

Tabla X. En las PTPLMW la sustitución de un aminoácido puede afectar la Km.

Enzima	Especie		Km	Referencias
TPTP	<i>Trichomonas foetus</i>	Wt	0.2	Gustafson <i>et al</i> , 2005
		S37A	1.4	
		Q67A	0.51	
		Q67H	0.46	
MPtpAs	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Wt	2.86	Madhurantakam <i>et al</i> , 2008
		R17A	21.07	
		D126A	30.07	
HPTP-B	<i>Homo sapiens</i>	Wt	0.43	Zabell <i>et al</i> , 2006
		W49Y	0.22	
		R53N	0.65	
AcP2 IF2	<i>Rattus rattus</i>	Wt	0.19	Cirri <i>et al</i> , 1996
		R64K	0.54	
		K73I	0.23	

En cuanto al potencial electrostático de las EhPTPLMWs también se detectaron diferencias, principalmente un desplazamiento de cargas en la región cercana al ácido aspártico de la posición 123 (Figura 32). Este desplazamiento podría influir directamente en la interacción con los sustratos, ya que este amino ácido participa en la reacción catalítica.

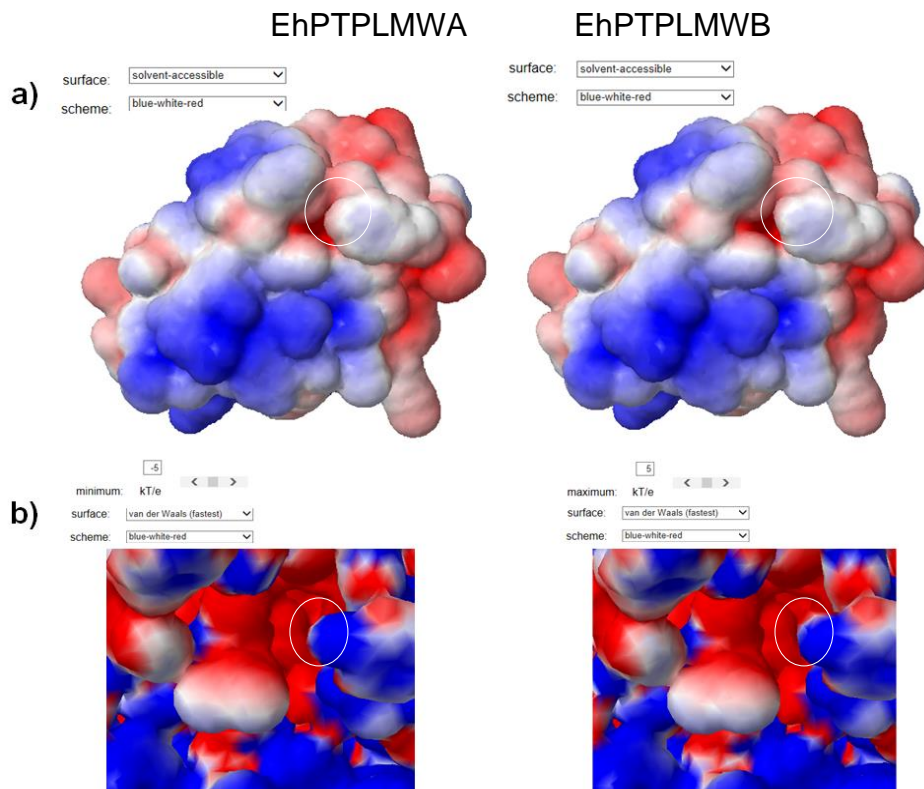


Figura 32. Visualización del potencial electrostático ± 5 kt/e de EhPTPLMWA y EhPTPLMWB mostrado en la superficie molecular. a) Accesibilidad del solvente. b) Fuerzas de Van der Waals. Se empleó el Software PDBPQR Versión 1.8 APBS.

8.8 Localización subcelular de las PTPLMWs de *E. histolytica*

Con la final de analizar la distribución subcelular de las EhPTPLMWs en el parásito, se realizaron inmunofluorescencias como se describe en materiales y métodos, usando los anticuerpos policlonales anti-6His-rEhPTPLMWA que detectan las proteínas nativas en el extracto total de amibas. Los resultados mostraron que los trofozoítos adheridos a vidrio presentaron marcaje de EhPTPLMWs tanto en membrana plasmática, así como un marcaje ampliamente distribuido en el citoplasma (Figura 33). Con microscopia confocal en cortes Z se logró confirmar estos resultados (Figura 34).

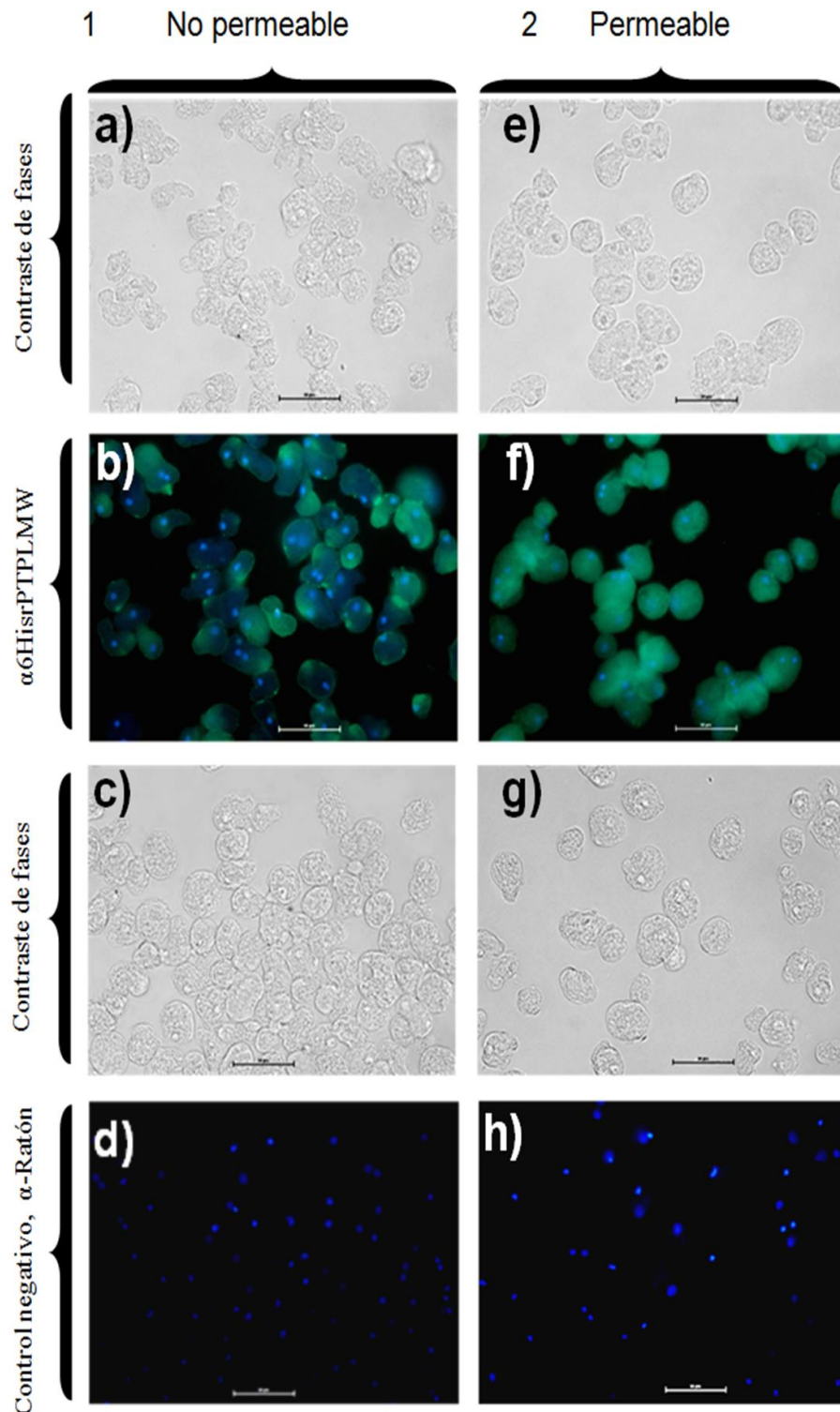


Figura 33. Localización subcelular de las EhPTPLMWs en trofozoítos adheridos a vidrio. Trofozoítos adheridos a vidrio durante 1 h fueron fijados y permeabilizados (a-b) o no permeabilizados (e-h) y tratados para inmuno-fluorescencia con el anticuerpo anti-rEhPTPLMW a la dilución 1:50 (b y f) o solamente el segundo anticuerpo IgG- FITC de chivo anti-IgG de ratón dilución 1:50 (d y h). Se muestran las imágenes de contraste de fase correspondientes (a, e, c y g). Se empleó Vectashield con DAPI. La escala = 50 μ m.

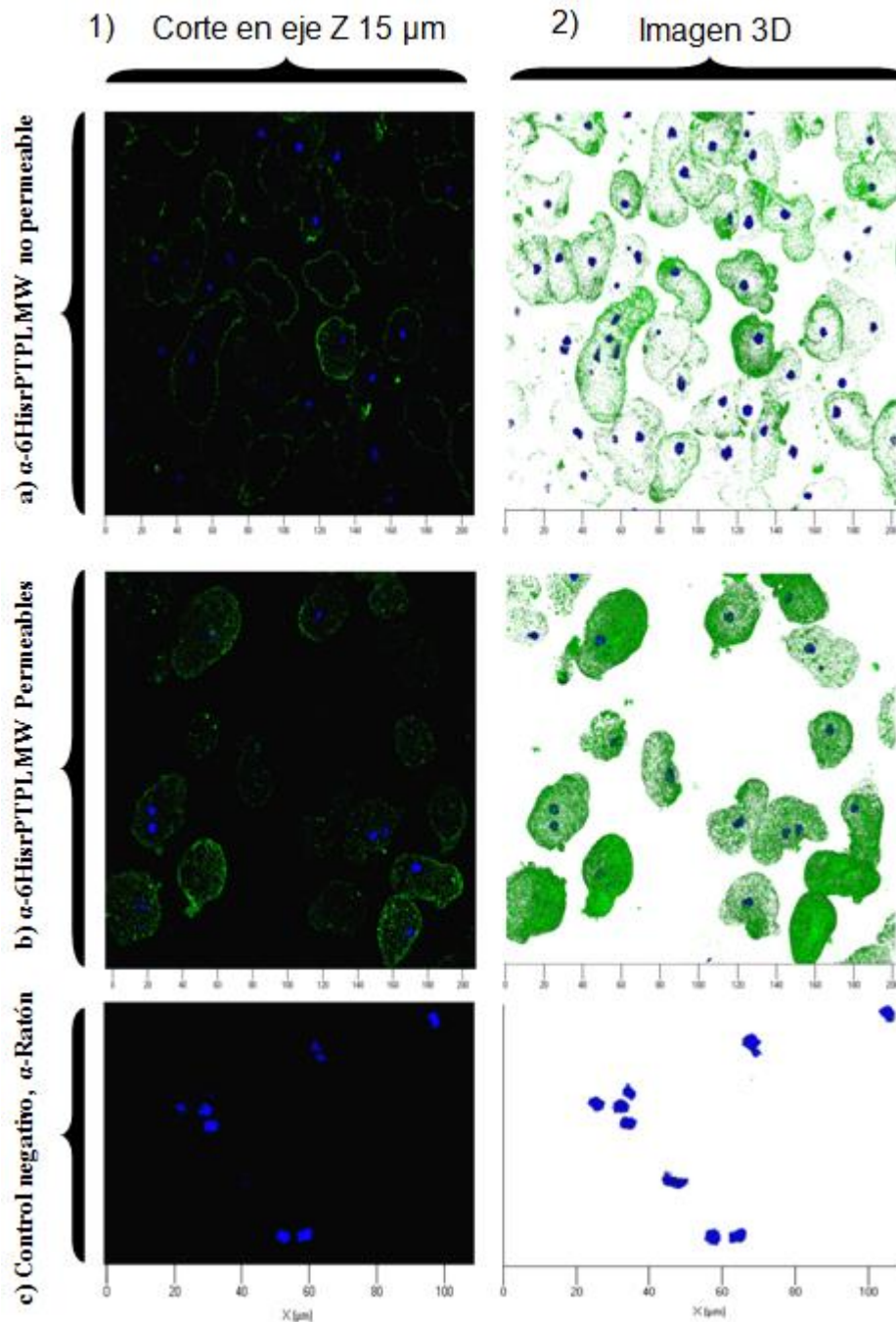


Figura 34. Localización subcelular de EhPTPLMWs mediante imágenes de microscopía confocal. Técnica de Inmunofluorescencia indirecta sobre trofozoítos adheridos a vidrio durante 1 h, se usó suero de ratón anti-rEhPTPLMW a la dilución 1:50. a) no permeabilizadas. b) permeabilizados. c) permeabilizados incubados sólo con el segundo anticuerpo IgG- FITC de chivo anti-IgG de ratón. Columna 1, se tomó en el corte Z a 15 μ m. Se ocuparon los equipos y programas ZEISS LSM 700, Zen 2011.

Con el fin de determinar el efecto de la interacción del parásito con fibronectina en la expresión y localización subcelular de las EhPTPLMWs, trofozoítos de 48 h de cultivo se sembraron durante 2 h en cubreobjetos recubiertos con fibronectina. Después de este tiempo, los parásitos fueron procesados para inmunofluorescencia indirecta utilizando los anticuerpos anti-rEhPTPLMWs. Los resultados mostraron que la interacción con la fibronectina induce la síntesis de una gran cantidad de EhPTPLMWs, detectadas tanto en el citoplasma (células permeabilizadas) como en la membrana citoplasmática (células no permeables) (Figuras 35 y 36). Se observan puntos o regiones focalizadas de inmunodetección de las EhPTPLMWs, las cuales mediante microscopía confocal en cortes Z se aprecia que tienen un marcaje muy denso (Figura 36), lo que sugiere que probablemente se está llevando a cabo reclutamiento, compartimentalización ó transporte vesicular hacia regiones específicas de la membrana plasmática de las EhPTPLMWs.

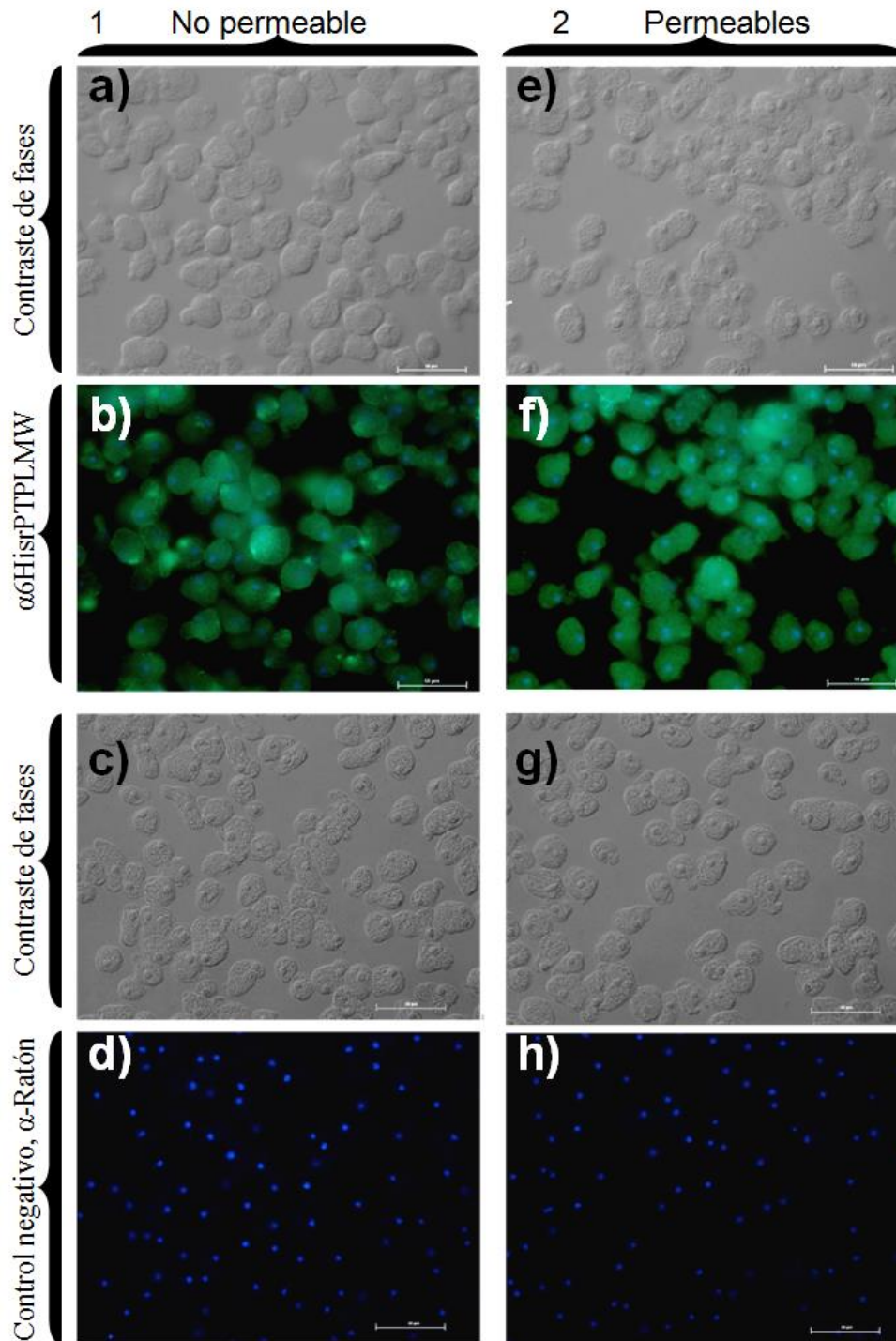


Figura 35. Localización subcelular de las EhPTPLMWs en trofozoítos adheridos a fibronectina. Trofozoítos adheridos a fibronectina durante 2 h fueron fijados y permeabilizados (a-d) o no permeabilizados (e-h) y tratados para inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-rEhPTPLMW dilución 1:50 (b y f) o solamente con el segundo anticuerpo IgG-FITC de chivo anti-IgG de ratón dilución 1:50 (d y h). Se muestran las imágenes de contraste de fase correspondientes (a, e, c y g).

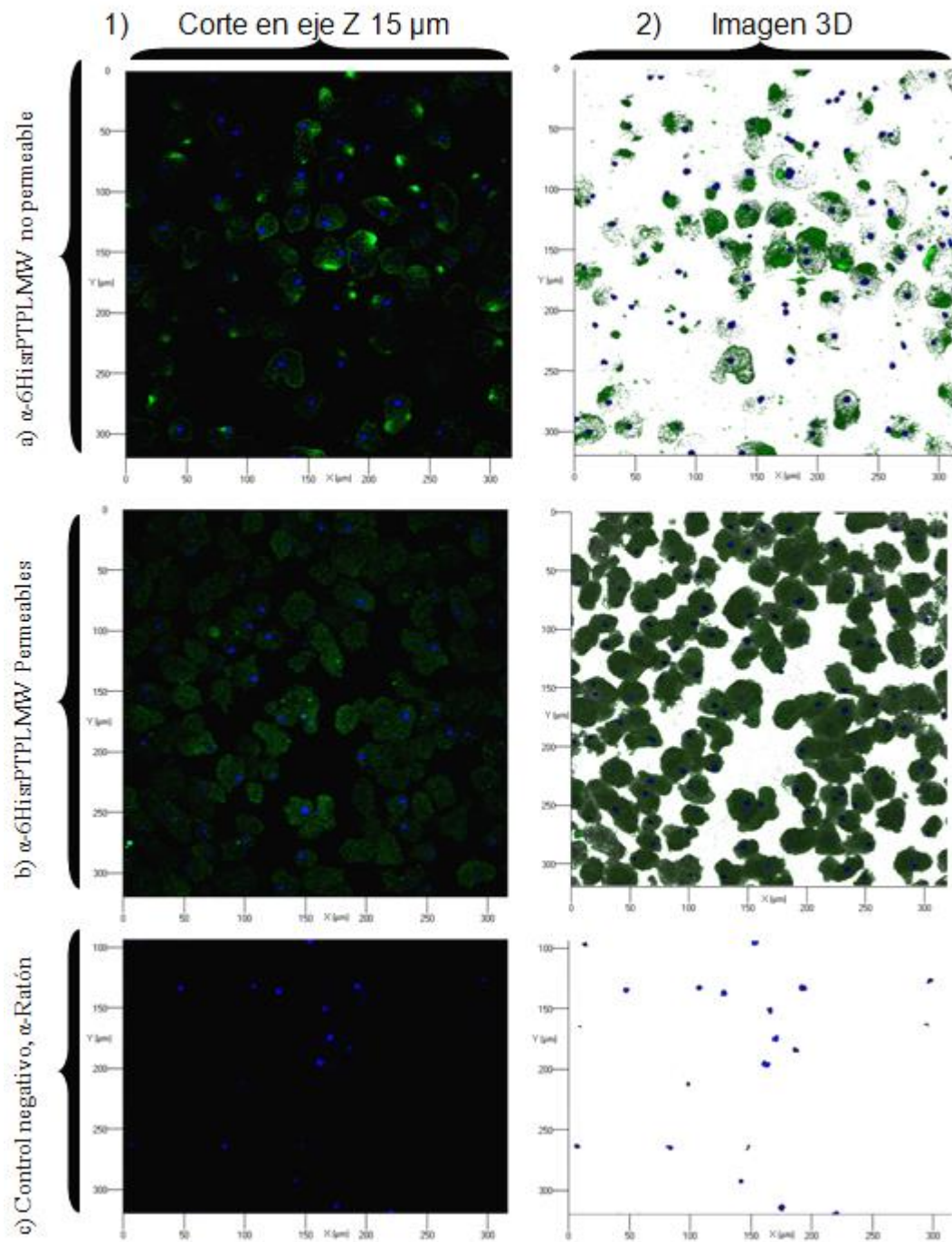


Figura 36. Localización subcelular de EhPTPLMWs mediante imágenes de microscopía confocal. Técnica de Inmunofluorescencia indirecta sobre trofozoítos adheridos a fibronectina durante 2 h, se usó suero de ratón anti-rEhPTPLMW a dilución 1:50. a) no permeabilizadas. b) permeabilizados. c) permeabilizados incubados sólo con el segundo anticuerpo IgG- FITC de chivo anti-IgG de ratón a dilución 1:50. Columna 1 se tomó en el corte Z a 15 μm . Se ocuparon los equipos y programas ZEISS LSM 700, Zen 2011.

Para visualizar y analizar la formación de sitios focalizados o de reclutamiento de las EhPTPLMWs, así como la posible colocalización con filamentos de actina, se decidió como una primera aproximación, realizar ensayos a distintos tiempos de interacción de los trofozoítos con fibronectina (10 a 150 min). Los resultados mostraron una localización de las EhPTPLMWs en membrana plasmática que se puede considerar “normal” a los 10 min y 30 min (Figura 37). A los 50 min se puede detectar más marca del anticuerpo anti-rEhPTPLMW en la membrana plasmática que en los tiempos anteriores, y se empieza a detectar pequeños puntos de reclutamiento. A los 60 min y 90 min se intensifica la presencia de las enzimas sobre la superficie del parásito con la presencia de más sitios de reclutamiento (puntos), y finalmente a los 120 min la mayoría de la marca detectada a los 90 min se concentra en un polo de los trofozoítos. Con respecto a la actina, ésta se empieza a estructurarse desde los 10 min de interacción de los trofozoítos con la fibronectina, observándose en algunos trofozoítos bocas fagocíticas a los 50 min. A los 60 min y 90 min se observa más actina estructurada, y a los 120 min se puede observar menos actina estructurada la cual se encuentra concentrada en un extremo en la mayoría de los trofozoítos (figura 37).

Con el fin de establecer una posible colocalización de las EhPTPLMWs y la actina polimerizada en regiones de membrana extracelular, se realizaron experimentos similares al anterior, sin permeabilizar las células, los cuales se analizaron por microscopía confocal (Figura 38). De las muestras analizadas se seleccionó el corte Z a 3 μm de distancia de la zona de contacto de los trofozoítos con el sustrato (FN), para poder observar filamentos de actina, posibles placas de adhesión y bocas fagocíticas. Solamente se observó colocalización en los trofozoítos no permeabilizados a tiempos tempranos, como lo son 10 y 30 min (Figura 38), además de resaltar el aparente avance de las EhPTPLMWs en membrana hacia sitios focalizados del trofozoíto desde los 10 min hasta los 120 min. En los distintos tiempos analizados, se llegó a observar localización de las EhPTPLMW en vesículas, mejor apreciado a los 90 min.

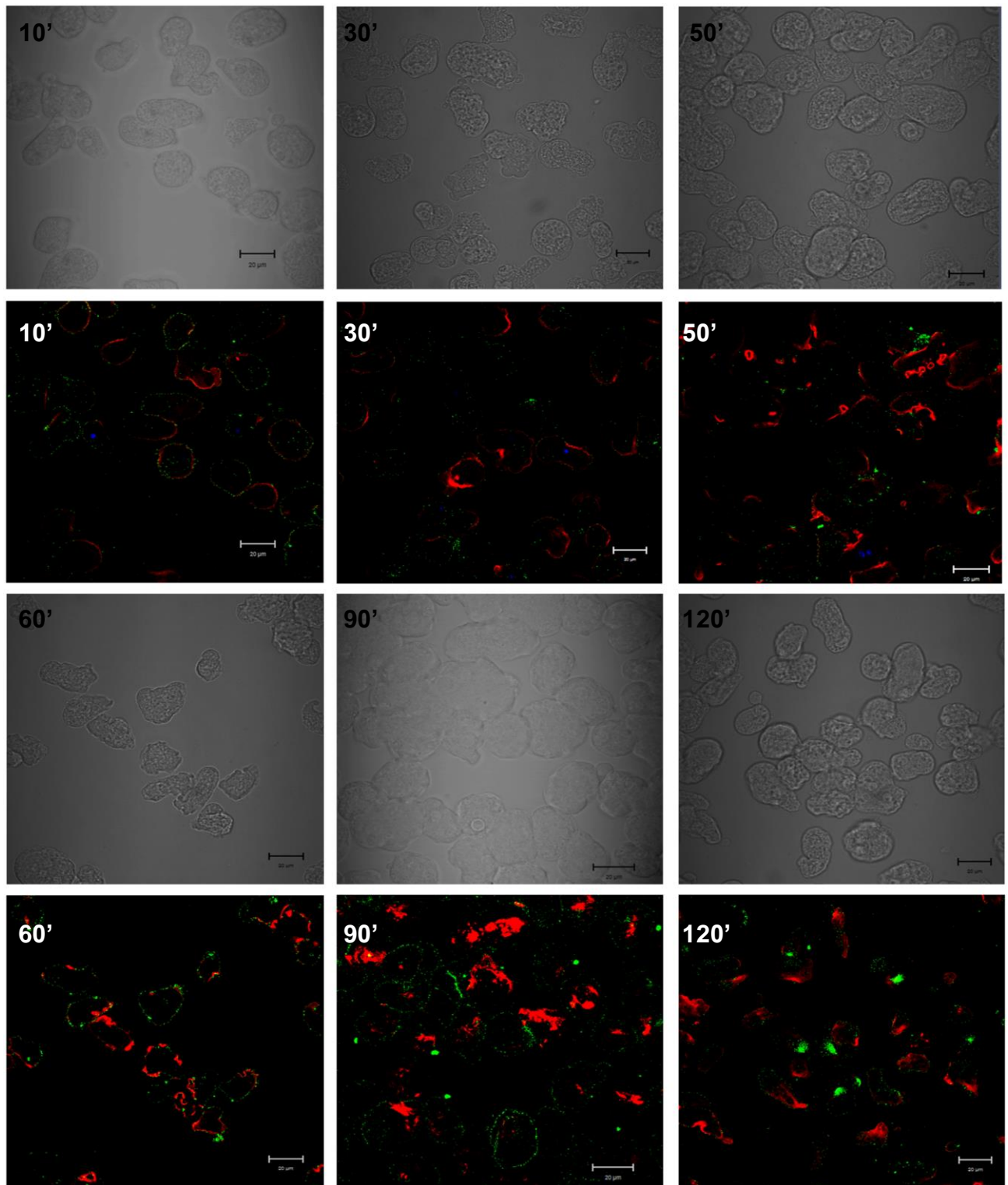


Figura 37. Expresión de las EhPTPLMWs en trofozoítos adheridos a fibronectina. Inmunofluorescencia indirecta de trofozoítos adheridos a fibronectina a distintos tiempos (10-120 min). Las EhPTPLMWs se detectaron utilizando el anticuerpo anti-rEhPTPLMW a dilución 1:50 (verde) y la actina polimerizada con Faloidina rodaminada a dilución 1:50 (rojo). Las escalas representan 20 μm de longitud.

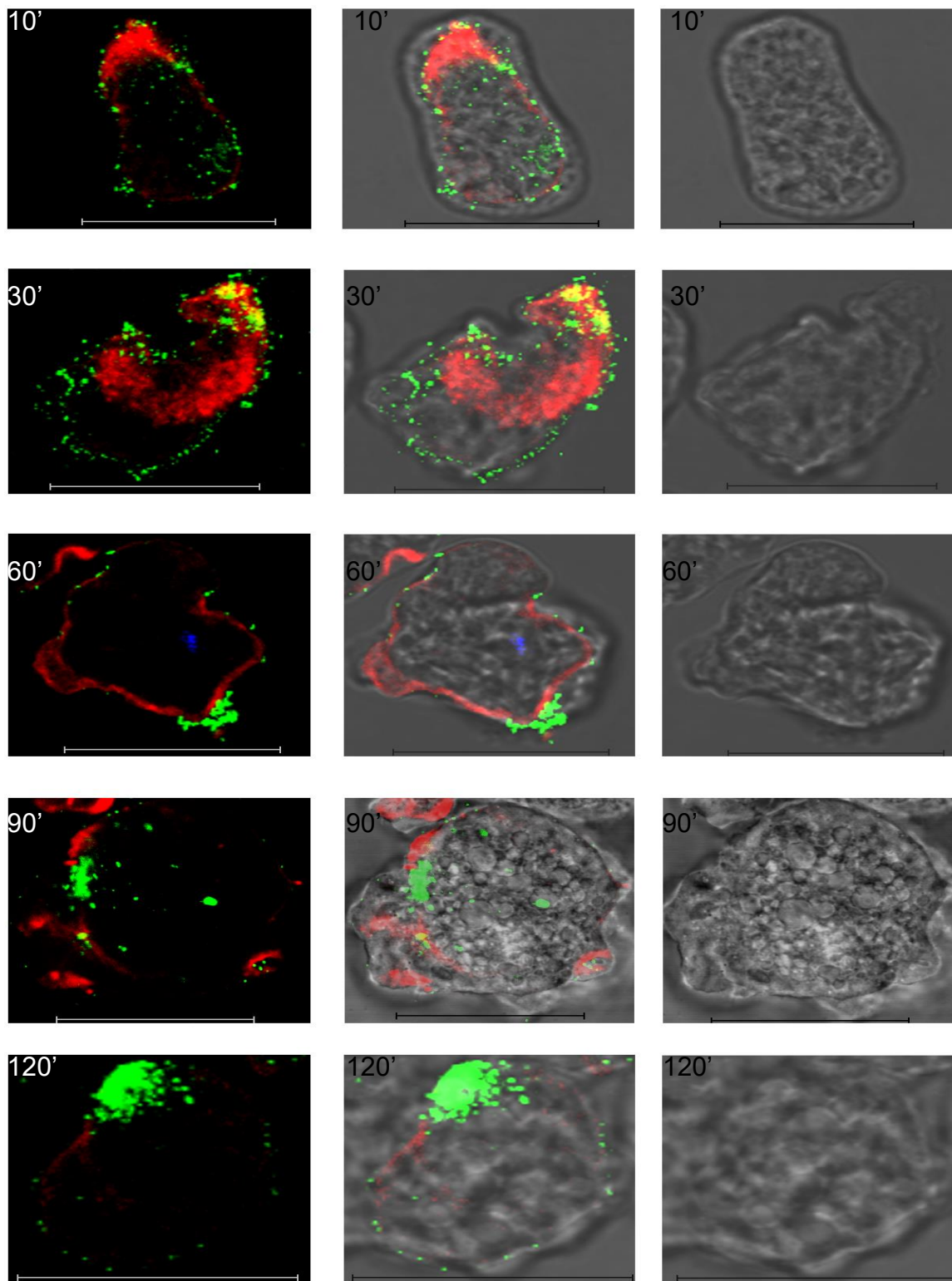


Figura 38. Distribución de actina y EhPTPLMWs en trofozoítos adheridos a fibronectina. Microscopía confocal (corte Z a 3 μm del sustrato) de trofozoítos adheridos a fibronectina a diferentes tiempos (10-120 min). Las EhPTPLMWs se detectaron utilizando el anticuerpo anti-rEhPTPLMW a dilución 1:50 (verde) y la actina polimerizada con Faloidina rodaminada a dilución 1:50 (rojo). Las escalas representan 20 μm de longitud.

La cuantificación de la marca del anticuerpo anti-rEhPTPLMWs en trofozoítos no permeabilizados interaccionados con FN durante 2 h y que tenían solo un sitio de mayor intensidad, mostró que en la mayoría de las EhPTPLMWs se encuentran localizadas principalmente en la zona de adhesión al sustrato (62% del marcaje) (Figura 39 columnas 1-3), lo que sugiere que probablemente éstas están participando en eventos de adhesión y/o señalización para que el trofozoíto permanezca unido a su sustrato.

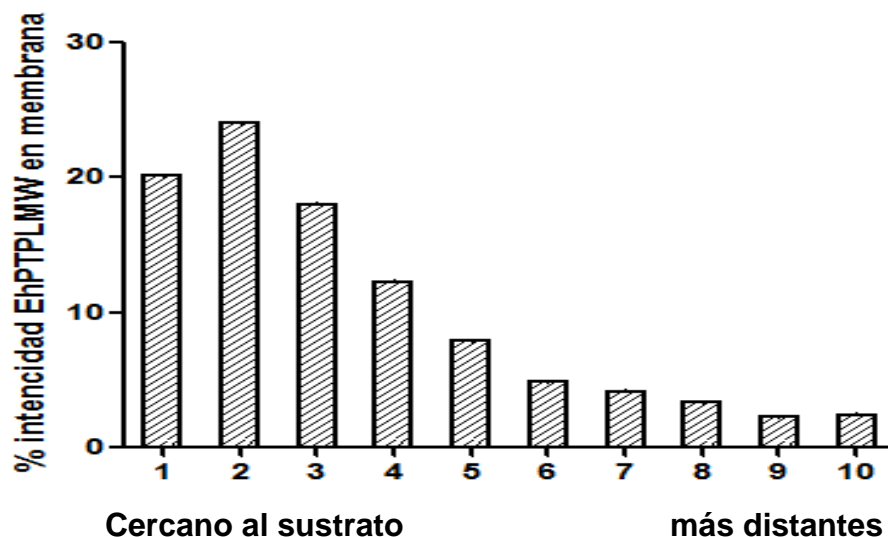
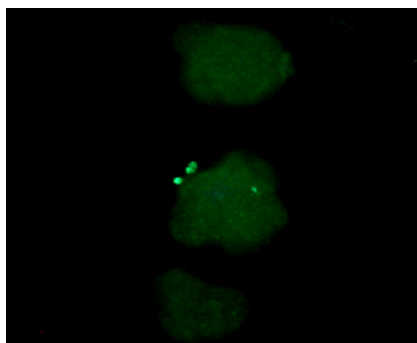


Figura 39. Distribución subcelular de las EhPTPLMWs en trofozoítos adheridos a fibronectina humana. Densitometría representativa de la distribución de EhPTPLMW en membrana tras la interacción con fibronectina 2 h (solamente trofozoítos que presentaron un solo punto focalizado de intensa inmuno-detección de EhPTPLMW). 1, 2 y 3: cortes cercanos a vidrio. 4-10: cortes más alejados del vidrio, tomando a 10 como la región más distante. Densitometría representativa de 20 trofozoítos analizados con el software ImageJ y datos analizados con GraphPad 5.

Experimentos realizados en nuestro laboratorio mostraban que los trofozoítos interaccionados con fibronectina durante 2 h, al ser permeabilizados con una solución de SDS al 0.4 % en PBS + Tritón X-100 0.2 % perdían las regiones focalizadas muy intensas de inmunodetección de las EhPTPLMWs (Figura 36). Por ello se implementó un método para la separación de estos puntos o regiones focalizados de gran cantidad de EhPTPLMW en trofozoítos fijados interaccionados con fibronectina a 2 h. En este método se trataron los trofozoítos con SDS 0.13% y

Tritón X-100 al 0.08 % en PBS por 7 min a 25-28 °C, y después éstos se lavaron cuidadosamente con PBS. De esta forma se logró separar los complejos en donde se encuentran las EhPTPLMWs del resto del cuerpo de los trofozoítos (Figura 40). Estos complejos es posible que se encuentren dentro de micelas compuestas por el SDS/Tritón x-100/Membrana plasmática.

A



B

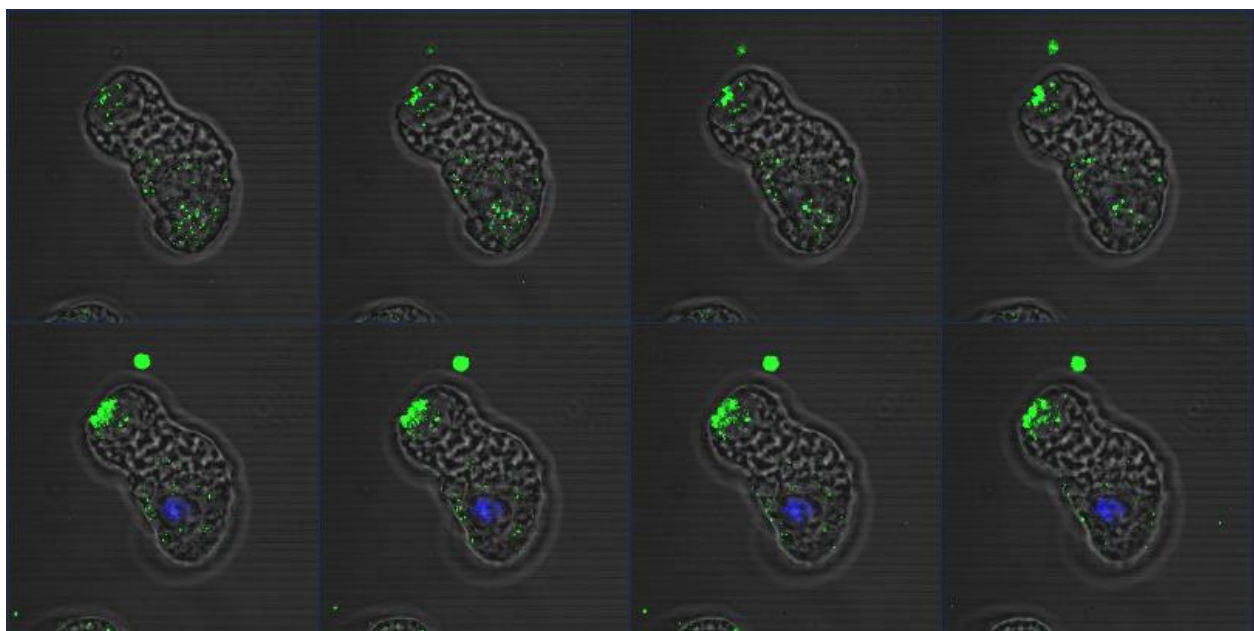


Figura 40. Separación del complejo reconocido por los anticuerpos anti-rEhPTPLMW. a) Reconocimiento del complejo con EhPTPLMWs en trofozoíto de *E. histolytica* previo su separación. b) Complejo separado de trofozoíto interaccionado con fibronectina a 2 h observado por microscopia confocal.

9 Discusión

En distintas especies de parásitos, microorganismos, aves, mamíferos, también en seres humanos entre otros, las proteínas tirosina fosfatasa se han relacionado con diversos eventos tanto intracelulares como extracelulares (Andreeva y Kutuzov, 2008; Liang *et al*, 2007; Johnson y Lapadat, 2002; Alonso *et al*, 2004; Taddei *et al*, 2000). A miembros de la subfamilia de las PTPLMW se les ha involucrado en procesos tales como crecimiento, diferenciación, ciclo celular, metabolismo, regulación de la dinámica del citoesqueleto, adhesión, migración, y la progresión de células tumorales (Raugei *et al*, 2002; Cirri *et al*, 1998; Malentacchi *et al*, 2005; Saito y Streuli, 1991).

Las PTPLMWs son proteínas constituidas por alrededor de 150-170 aminoácidos y un peso molecular cercano a los 18 kDa, los miembros de esta clase de PTPasas además de la secuencia conservada CXXXXXR de las PTPs, poseen otra secuencia DPY conservada (aquí se encuentra el ácido aspártico catalítico) separada por alrededor 105-120 aminoácidos de la cisteína catalítica conservada (Labandera 2011; Mukhopadhyay 2006; Madhurantakam *et al*, 2008). A este respecto, las EhPTPLMWs poseen estas secuencias conservadas a pesar de la baja homología en secuencia primaria con otras PTPLMWs (Labandera, 2011).

Al consultar la bases de datos en NCBI se encontraron dos genes de *E. histolytica* que codifican para PTPLMW denominadas en este trabajo EhPTPLMWA (clave de la proteína es XP_656359 y del gene es XM_651267.1) y EhPTPLMWB (clave de la proteína es XP_653357 y del gene es XM_648265.1). Comparando las secuencias de nucleótidos se encontró un nucleótido distinto en la posición 254, siendo C254T para EhPTPLMWA y EhPTPLMWB respectivamente (Figura 8), nucleótidos que determinan la presencia de un aminoácido A85V respectivamente (Figura 10).

El análisis de las secuencias de las EhPTPLMWs contra otras PTPLMW de otros organismos mostró que las PTPLMWs de *E. histolytica* son más similares a la de *E. dispar* con 98.1 % de similitud (más del 96 % identidad), lo que esperábamos ya que son especies cercanas filogenéticamente, posteriormente a *Dysgonomonas gadei* con 78.2 % de similitud (más del 48 % de identidad). Comparando las EhPTPLMW contra la HPTPLMW de humano, se encontró que tienen 66.7 % de similitud (34.7 % de

identidad) (Tabla III). En el alineamiento de secuencias, el grado de similitud entre los aminoácidos que ocupan una posición concreta en la secuencia, indica una medida aproximada de conservación de una región particular (posible secuencia motivo), y además que esta zona posee importancia funcional o estructural (Martínez Ferrandis, 2011). En este trabajo se ha podido comprobar que las estructuras 3D de varias de estas enzimas están conservadas (Figura 12), y presentan homología estructural en cuanto a la distribución espacial de las cadenas β plegadas y alfa hélices con las EhPTPLMWs, a pesar de que las PTPLMWs procedan de especies muy alejadas en la evolución (Figura 13) y presenten baja homología en sus secuencias primarias.

El cambio de aminoácido en la posición 85 de las EhPTPLMWs trae como consecuencia que la rEhPTPLMWB presente actividad enzimática más baja y una K_m más alta que rEhPTPLMWA utilizando como sustrato el pNPP. Mutaciones experimentales en diversos aminoácidos, tanto de la hendidura catalítica así como de otras regiones de las proteínas PTPLMWs de diversos organismos, afectan sus K_m 's, por ejemplo TPTP de *T. foetus* cuya enzima Wt posee $K_m = 0.2$ mM y la mutante TPTP S37A tiene $K_m = 1.4$ mM, otros ejemplos se encuentran en la tabla XII (Gustafson *et al*, 2005; Madhurantakam *et al*, 2008; Zabell *et al*, 2006; Cirri *et al*, 1996). En base a nuestros resultados, se aprecia que el aminoácido 85 correspondiente a la región terminal de la tercera cadena β plegada de las EhPTPLMWs, influye en la actividad catalítica de la enzima, ya que en las EhPTPLMWs este aminoácido corresponde al único aminoácido distinto que poseen (Figura 10), y se obtuvieron distintas K_m (Figura 21) y efecto de la temperatura sobre las recombinantes rEhPTPLMWs (Figura 24).

Las proteínas recombinantes rEhPTPLMWA y rEhPTPLMWB mostraron actividad de fosfatasa contra FTy y no contra FSe y FTh, lo que indica que estas enzimas son PTPasas típicas y no duales, además de que éstas fueron inhibidas por el OV (Figura 24), inhibidor general de las PTPasas. También, ambas enzimas mostraron actividad de fosfatasa contra los sustratos artificiales pNPP y OMFP (Figura 25), mostrando mayor actividad contra OMFP, después contra pNPP y finalmente contra FTy. Este orden de preferencia se vio reflejado al analizar *in silico* la energía de unión de estos sustratos con las EhPTPLMWs. Estos resultados nos permitirán analizar más

moléculas fosforiladas como posibles sustratos, ya que existe una correlación en los estudios *in vitro* e *in silico*, y posteriormente diseñar inhibidores específicos.

Nuestros resultados mostraron que los trofozoítos en cultivo expresan EhPTPLMWB en mayor proporción (85 %) que EhPTPLMWA (15 %), en cambio los trofozoítos procedentes de absceso hepático amibiano en hámster expresan principalmente EhPTPLMWB (más del 96 %). La sobre-regulación de genes que codifican para PTPasas ha sido reportada en la literatura. Por ejemplo, cuando *Arabidopsis thaliana* se creció a altas concentraciones de sal, se detectó un incremento en los niveles de mRNA de AtPTP1, mientras que en condiciones de baja temperatura se elimina el transcrito de AtPTP1 (Xu *et al*, 1998). Sasson y cols. (Sasson *et al*, 2003) reportan que la PTPasa FSH es sobre-regulada por la hormona estimulante del folículo en células granulosas inmortalizadas (rFSH-17). Una PTPasa nuclear (PRL-1) es inducida en células estimuladas por mitógeno, y es expresada durante la regeneración hepática. La expresión de PRL-1 es elevada en varias líneas celulares tumorales, y células normales transfectadas muestran una morfología alterada, un crecimiento celular alterado y un fenotipo transformado (Diamond *et al*, 1994). Una PTPasa altamente inducible en células de piel, es sobre-regulada por estrés oxidativo y choque térmico, sugiriendo que esta PTPasa es importante para responder al estrés del medio ambiente (Keyse y Emslie, 1992). Los trofozoítos de *E. histolytica* en condiciones de cultivo *in vitro* han sido comparados con los que han sobrevivido a un medio ambiente diferente cuando han estado dentro del huésped, particularmente en el hígado (Chávez-Munguía *et al*, 2004). Comparado con condiciones *in vitro*, los trofozoítos tienen que sobrevivir en un ambiente diferente cuando se encuentran dentro del huésped, particularmente en el hígado. En este “nuevo” ambiente los trofozoítos presentan incremento en la expresión de EhPTPA (Herrera-Rodríguez *et al*, 2006), al igual que el observado para EhPTPLMWB en este trabajo. Debido a que la función biológica de la enzima EhPTPLMWB no se conoce, la regulación de su expresión podría ser estudiada en términos de respuesta a mediadores liberados por células inflamatorias, respuesta a la interacción con componentes del tejido del huésped, y/o respuesta a condiciones de estrés. De acuerdo con los resultados del presente trabajo, se sugiere que el gene EhPTPLMWB es un gene de respuesta a estrés o un gene de respuesta adaptativa temprana expresado por los trofozoítos de *E. histolytica*

durante el desarrollo del absceso hepático amibiano, como se ha demostrado para otros genes que se expresan diferencialmente (Bruchhaus *et al*, 2002).

Nuestros resultados con las cepas de amibas utilizadas indican que la enzima BsrD1 puede ser utilizada para diferenciar a *E. histolytica* de *E. dispar*, ya que en el genoma del parásito *Entamoeba dispar* cepa SAW760 (GenBank acces: PRJNA12914) solo se reporta un gene PTPLMW, el cual presenta dentro de su secuencia nucleotídica en sitio de restricción para dicha enzima de restricción, al igual que en el gene EhPTPLMWA pero no en el gene EhPTPLMWB. Actualmente existen en el comercio “kits” para la diferenciación de las especies *E. histolytica* y *E. dispar*, algunas basadas en anticuerpos monoclonales como por ejemplo, los específicos a la adhesina de *E. histolytica* (casa comercial Techlab, Inc., Blacksburg, Virginia) (Haque *et al*, 1997; Pillai *et al*, 1999; Guzmán *et al*, 2001). Sin embargo, las técnicas de análisis del DNA y mRNA, como la RT-PCR, han mejorado el diagnóstico de la amebiasis, ya que presentan una elevada sensibilidad y especificidad (Gutiérrez Cisneros, 2008). Con el método de RT-PCR con los “primers” que empleamos y la enzima BsrD1, nuestros resultados indican que es posible diferenciar a *E. histolytica* HMI:IMSS y *E. dispar* SAW760 con la expresión de mRNA de PTPLMWs.

Mediante análisis *in silico* también observamos que hay una serie de diferencias importantes que indican que las EhPTPLMWs de *E. histolytica* y PTPLMW de organismos multicelulares (artrópodos, peces, anfibios, aves y mamíferos) tienen diferentes características, y por lo tanto diferentes especificidades de sustrato. Por ejemplo, el residuo de glicina en la posición 40 se conserva en las especies que analizamos pertenecientes a plantas angiospermas, eubacteria, bacterias termófilas, bacteroidetes, actinobacterias, cianobacterias, protozoarios, pero no en los organismos artrópodos hasta mamíferos analizados. Otro ejemplo es la histidina de la posición 45, pero en este caso no la encontramos en las especies analizadas pertenecientes a peces, anfibios, aves, mamíferos, y si en bacterias hasta los artrópodos analizados (Figura 11). Además de estos datos, las mismas EhPTPLMWA vs EhPTPLMWB mostraron diferencias entre ellas, en cuanto a la distribución de las cargas en la hendidura catalítica (Figura 32), variación en las distancias entre algunos átomos que influyen en la hendidura catalítica (Figuras 30, 31), así como distinto

acomodo molecular de los ligandos fosforilados (figura 26-28). Todos estos aspectos pueden ser factores cruciales en la determinación de la especificidad del ligando, como se observó en la desfosforilación de sustratos (Figura 25) y las afinidades de unión, que mostraron hasta el momento como mejor sustrato al OMFP (Tabla V), lo que a su vez, también nos muestra la importancia de los átomos aledaños y estructura cercana al grupo fosfato que será hidrolizado, debido a que fue OMFP ($C_{21}H_{15}O_8P$) mejor sustrato que fosfotirosina ($C_9H_{12}NO_6P$) que es más pequeño, lo que sugiere que la interacción de las regiones aledañas al sitio de fosforilación entre la PTPLMW y el sustrato, influye directamente en la especificidad de sustrato así como la afinidad a este mismo. El análisis *in silico* con software que emplean el modelaje molecular 3D se ha utilizado para predecir la función de una enzima que posee características conservadas de proteínas conocidas, así como de proteínas de actividad desconocida. Un ejemplo de predicción de sustratos es Tm0936 de *Thermotoga marítima*, por acoplamiento de formas intermedias de alta energía eligiendo de entre miles de metabolitos a los posibles sustratos, se le reconoció como una posible amidohidrolasa (Hermann *et al*, 2007). La identificación de la función de las proteínas sobre la base de la bioinformática es un área de investigación intensa, realizando la búsqueda de posibles ligandos, sustratos, antagonistas, etc. (Keiser *et al*, 2007). Selección de alto rendimiento (HTS) en bibliotecas de compuestos se utiliza para descubrir nuevos compuestos potenciales para el desarrollo de fármacos, proyecto para descubrir nuevos inhibidores como por ejemplo para la proteína tirosina fosfatasa-1B (PTP1B), una tirosina fosfatasa que ha sido catalogada como un objetivo clave para la diabetes de tipo II, mediante docking han logrado encontrar posibles inhibidores y varios de estos se han comprobado de forma experimental (Doman *et al*, 2002).

El efecto de la temperatura sobre las proteínas recombinantes de las EhPTPLMWs resulto peculiar, ya que se observó que la actividad enzimática de ambas es altamente estable a la temperatura de 50 °C, el valor máximo de actividad para rEhPTPLMWA fue de 60 °C y para rEhPTPLMWB de 58 °C; en cambio, a 37 °C se obtuvieron actividades relativas para EhPTPLMWA de alrededor del 29.8 % y para EhPTPLMWB alrededor del 27.6 %. Algunos autores han reportado PTPLMWs de algunas especies con actividad enzimática resistente a altas temperaturas, entre ellas tenemos a la Wzb de *Lactobacillus rhamnosus* en donde se aprecian buenas actividades por encima de

60 °C y óptima a 75 °C (LaPointe *et al*, 2008), siendo que las temperaturas de crecimiento de *L. rhamnosus* se encuentra entre 15 °C y 45 °C. Ya que la forma de quiste de *E. histolytica* es altamente resistente a un amplio rango de temperaturas (Gómez *et al*, 2007; Ximénez *et al*, 2010), es posible que las EhPTPLMWs se encuentren presentes en el quiste ya que no se desnaturalizarán a temperaturas a las cuales éste es resistente.

La localización subcelular de las EhPTPs, muestra que éstas se encuentran tanto en citoplasma (algunas asociadas a vesículas) como en membrana plasmática. Esta localización está de acuerdo con la ubicación general de LMW-PTP en otros organismos (Raugei *et al*, 2002; Caselli *et al*, 2007). La interacción de los trofozoítos con fibronectina induce la síntesis de estas EhPTPLMWs, e incrementa su localización en membrana. En los ensayos a diversos tiempos de interacción con FN se aprecia la aparente formación de un sitio de alto contenido de EhPTPLMWs, el cual se logró separar de la membrana plasmática del parásito. Se tiene conocimiento de que tras la inducción de fibroblastos con fibronectina, proteínas como PTP-PEST se translocan a la periferia de la membrana plasmática, desempeñando un doble papel en la organización del citoesqueleto celular, mediante la promoción de adhesiones focales requeridos para la migración celular (Angers-Loustau *et al*, 1999).

La relación de actina polimerizada con las EhPTPLMWs mostró que existe una mayor colocalización en tiempos tempranos de la interacción de los trofozoítos con la FN (p.j. 30 min), pero conforme avanza el tiempo de interacción, esta colocalización disminuye, perdiéndose en los sitios donde se encuentra las mayores cantidades de EhPTPLMWs en membrana. Existen PTPasas como SSH1 que regulan la dinámica de los filamentos de actina, mediante desfosforilación de cofilina, activándola a la vez, cofilina se encarga de despolimerizar a la actina. SSH1 co-localiza en ciertos eventos con actina (Slingshot DUSP), en ocasiones durante la activación primero de la PTPasas (Kurita *et al*, 2007). La ubicación y la co-localización de EhPTPLMWs observadas en las inmunofluorescencias, sugieren la participación de éstas en la dinámica de actina.

10 Resumen de resultados

El gene EhPTPLMWA presenta solamente un nucleótido distinto en la posición 254 (posee una citosina) con respecto al gene EhPTPLMWB que tiene una timina en la posición 254, lo que genera un cambio de una Alanina por una Valina.

La enzima de restricción BsrDI (TTGCAATG) permite diferenciar entre los dos genes.

Trofozoítos de *E. histolytica* recuperados de absceso hepático amibiano expresan principalmente el gen EhPTPLMWB.

Trofozoítos de *Entamoeba dispar* expresan solamente el gen EdPTPLMWA.

Las proteínas recombinantes presentan actividad enzimática óptima a pH 6.0.

Las Km con pNPP para rEhPTPLMWA es de 0.69 mM y para rEhPTPLMWB es de 1.26 mM.

La temperatura óptima de actividad enzimática de las proteínas recombinantes fue 60 °C para rEhPTPLMWA y 58 °C para rEhPTPLMWB. Sin embargo, la actividad enzimática de las proteínas recombinantes es más estable a 50 °C que a 60 °C.

O-vanadato de sodio es un potente inhibidor de la actividad enzimática de ambas proteínas recombinantes.

OMFP>pNPP>fosfotirosina es el orden de preferencia de los ligandos, según los datos *in silico* obtenidos, el orden coincide con la confirmación de los sustratos con el método modificado de Chen.

Anticuerpos anti-EhPTPLMW reconocen a EhPTPLMW y EdPTPLMW, tanto nativas como desnaturalizadas por inmuno-transferencia de extractos totales de amibas.

Los átomos aledaños o cercanos al sitio fosforilado del sustrato influyen en la entrada de éste a la hendidura catalítica.

El potencial electrostático muestra desplazamiento en regiones del sitio catalítico lo que está ligado a las variaciones en el acomodo de los ligandos. Existen algunas regiones de superficie hidrofóbica distintas entre las dos EhPTPLMWs.

Se presentan efectos de torsión distintos en torno a átomos de la valina 121 y cisteína 7 contra alanina 85 ó valina 85 respectivamente, lo que conlleva a que se encuentre más abierta la hendidura catalítica de EhPTPLMWA.

La proteína EhPTPLMWs se encuentran tanto en membrana plasmática como en citoplasma. Los trofozoítos adheridos a FN durante 2 horas, se expresa una mayor cantidad de EhPTPLMW. Trofozoítos adheridos a FN muestran una polarización o focalización de EhPTPLMW, mostrando contener más del 60 % del marcaje en membrana. Se logró separar el complejo donde se encuentra el mayor marcaje de EhPTPLMW.

11 Conclusiones

Se comprobó que las proteínas recombinantes de EhPTPLMWA y EhPTPLMWB se comportan como proteínas tirosina fosfatasa de bajo peso molecular, además de estar presentes tanto en citoplasma como membrana de *E. histolytica* de manera similar a como se ha descrito en otros organismos. La interacción de trofozoítos con FN lleva a la expresión de una mayor cantidad de EhLMWPTPs detectada tanto en citoplasma como en membrana plasmática, originando sitios de gran concentración observada de forma cualitativa mediante inmunofluorescencias. Existe expresión diferencial de los genes para EhPTPLMWs, observado en trofozoítos de cultivo axénico y recuperados de absceso hepático amibiano.

Se observó que las proteínas recombinantes mostraron actividad enzimática con sustratos sintéticos (con OMFP y pNPP). Las Km's son específicas para cada proteína recombinante. Además se apreció que tienen mayor actividad a temperaturas superiores a 37 °C. Los anticuerpos anti-EhPTPLMW reconocieron a las proteínas nativas de extracto total de *E. histolytica* y *E. dispar*.

12 Bibliografía.

- Ackers J. & Mirelman D. 2006.** Progress in research on *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *Cur. Opin. Microbiol.* 9: 367-373.
- Agnew BJ, Minamide LS, Bamberg JR. 1995.** Reactivation of phosphorylated actin depolymerizing factor and identification of the regulatory site. *J. Biol. Chem.* 270: 17582-17587.
- Aguirre-Garcia MM, Cerbon J, Talamás-Rohana P. 2000.** Purification and properties of an acid phosphatase from *Entamoeba histolytica* HM-1:IMSS. *Int. J. Parasitol.* 30: 585-591.
- Aguirre-Garcia M, Rosales-Encina JL, Talamás-Rohana P. 1997.** Secreted *Entamoeba histolytica* acid phosphatase (SAP). *Arch. Med. Res.* 28: 184-185.
- Albert C. y Childress M. 1956.** Pleuropulmonary Amebiasis. *Calif. Med.* December; 85: 6: 369-375.
- Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, Hunter T, Dixon J, Mustelin T. 2004.** Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell.* 117: 699-711.
- Anaya-Ruiz M, Rosales-Encina JL, Talamás-Rohana P. 1997.** Membrane acid phosphatase (MAP) from *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* 28: 182-183.
- Anaya-Ruiz M, Pérez-Santos JL, Talamás-Rohana P. 2003.** An ecto-protein tyrosine phosphatase of *Entamoeba histolytica* induces cellular detachment by disruption of actin filaments in HeLa cells. *Int. J. Parasitol.* 33: 663-670.
- Angers-Loustau A, Coté J, Charest A, Dowbenko D, Spencer S, Lasky L, Tremblay M. 1999.** Protein tyrosine phosphatase-PEST regulates focal adhesion disassembly migration, and cytokinesis in fibroblast. *J. Cell Biol.* 144: 5: 1019-1031.
- Andersen JN, Mortensen OH, Peters GH, Drake PG, Iversen LF, Olsen OH, et al. 2001.** Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol. Cell. Biol.* 21: 7117-7136.
- Andreeva A y Kutuzov M. 2008.** Protozoan protein tyrosine phosphatases. *Int. J. Parasitol.* 38: 1279-1295.
- Bakker-Grunwald T. 1993.** *Entamoeba histolytica* as a model for the primitive eukaryotic cell. *Parasitol Today.* 9: 1: 27-31.
- Baldin V, Cans C, Knibiehler M, Ducommun B. 1997.** Phosphorylation of human CDC25B phosphatase by CDK1-cyclin A triggers its proteasome-dependent degradation. *J. Biol. Chem.* 272: 32731-32734.
- Balla T. 2005.** Inositol-lipid binding motifs: signal integrators through protein-lipid and protein-protein interactions. *J. Cell. Sci.* 118: 2093-2104.
- Bamberg JR. 1999.** Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev. Cell. Dev. Biol.* 15: 185-230.
- Bardelli A, Saha S, Sager JA, Romans KE, Xin B, Markowitz SD, Lengauer C, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B. 2003.** PRL-3 expression in metastatic cancers. *Clin. Cancer. Res.* 9: 5607-5615.
- Bottini G y Bottini E. 2013.** Cytosolic low molecular weight protein tyrosine phosphatase activity and clinical manifestations of diabetes. *Am. J. Med. Sci.* 27.

- Berger P**, Bonneick S, Willi S, Wymann M, Suter U. **2001**. Loss of phosphatase activity in myotubularin-related protein 2 is associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 4B1. *Hum. Mol. Genet.* 11: 1569–1579.
- Brady-Kalnay SM**, Flint AJ, Tonks NK. **1993**. Homophilic binding of PTP mu, a receptor-type protein tyrosine phosphatase, can mediate cell-cell aggregation. *J. Cell. Biol.* 122: 961-972.
- Briedis K**. **2008**. Protein kinase and phosphatase families in the three superkingdoms of life. *ProQuest*. Page 48.
- Bruchhaus I**, Roeder T, Lotter H, Schwerdfeger M, Tannich E. **2002**. Differential gene expression in *Entamoeba histolytica* isolated from amoebic liver abscess. *Mol. Microbiol.* 44: 1063-1072
- Brump E**. **1925**. Etude sommaire de l' *Entamoeba dispar* n. sp. Amibe á kystes quadrinucléés, parasite de l'homme. *Bull. Acad. Med.* 94: 943-952.
- Carlton JG**, Cullen PJ. **2005**. Coincidence detection in phosphoinositide signaling. *Trends. Cell. Biol.* 15: 540–547.
- Caselli A**, Taddei M, Bini C, Paoli P, Camici G, Manao G, Cirri P, Ramponi G. **2007**. Low molecular weight protein tyrosine phosphatase and caveoline-1: interaction and isoenzyme-dependent regulation. *Biochemistry*. May. 29: 46: 21: 6383-6392.
- Charbonneau H**, Tonks NK, Walsh KA, Fischer EH. **1988**. The leukocyte common antigen (CD45): a putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase. *PNAS. USA.* 85: 7182–7186.
- Chávez-Munguía B**, Hernández-Ramírez V, Ángel A, Ríos A, Talamás-Rohana P, González-Robles A, González-Lázaro M, Martínez-Palomo A. **2004**. *Entamoeba histolytica*: Ultrastructure of trophozoites recovered from experimental liver lesions. *Exp. Parasitol.* 107: 1-2: 39-46.
- Chen R**, Amoui M, Zhang Z, Mardon G. **1997**. Dachshund and eyes absent proteins form a complex and function synergistically to induce ectopic eye development in *Drosophila*. *Cell.* 91: 893–903.
- Chen P**, Toribara T, Warner H. **1956**. Microdeterminations of phosphorus. *Anal. Chem.* 28: 1756-1758.
- Cirri P**, Chiarugi P, Taddei L, Raugei G, Camici G, Manao G, Ramponi G. **1998**. Low molecular weight protein-tyrosine phosphatase tyrosine phosphorylation by c-Src during platelet-derived growth factor-induced mitogenesis correlates with its subcellular targeting. *J. Biol. Chem.* 273: 32522-32527.
- Cirri P**, Fiaschi T, Chiarugi P, Camici G, Manao G, Raugei G, Ramponi G. **1996**. The molecular basis of the differing kinetics behavior of the two low molecular mass phosphotyrosine protein phosphatase isoform. *J. Biol. Chem.* 271: 2604-2607.
- Clifford DM**, Chen CT, Roberts RH, Feoktistova A, Wolfe BA, Chen JS, McCollum D, Gould KL. **2008**. The role of Cdc14 phosphatase in the control of cell division. *Biochem. Soc. Trans.* 36: 438-438.
- David M**, Romero G, Zhang Z-Y, Dixon JE, Larner AC. **1993**. *In vitro* activation of the transcription factor ISGF3 by interferon alpha involves a membrane-associated tyrosine phosphatase and tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 268: 6593-6599.

- Davis RJ. 1993.** The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* 268: 14553–14556.
- Denu, J. M. and Dixon, J. E. 1995.** A catalytic mechanism for the dual-specific phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 5910–5914.
- Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC. 1978.** A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2: 4: 431-2
- Diamond RH, Cressman DE, Laz TM, Abrams CS, Taub R. 1994.** PRL-1, a unique nuclear protein tyrosine phosphatase, affects cell growth. *Mol. Cell. Biol.* 14: 3752–3762.
- Dixon JE. 1996.** Protein tyrosine phosphatases: their roles in signal transduction. *Recent. Prog. Horm. Res.* 51: 405-414.
- Dolabella S, Serrano-Luna J, Navarro-García F, Cerritos R, Ximénez C, Galván-Moroyoqui J, Silva EF, Tsutsumi V, Shibayama M. 2012.** Amoebic liver abscess production by *Entamoeba dispar*. *Ann. Hepatol.* Jan-Feb; 11: 1: 107-117.
- Doman T, McGovern S, Witherbee B, Kasten T, Kurumbail R, Stallings W, Connolly D, Shoichet B. 2002.** Molecular docking and high-throughput screening for novel inhibitors of protein tyrosine phosphatase-1B. *J. Med. Chem.* 45: 11: 2213-21.
- Dong C, Davis RJ, Flavell RA. 2002.** MAP kinases in the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 55–72.
- Ducret A, Lazo JS. 2003.** Regulation of Cdc25A half-life in interphase by cyclindependent kinase 2 activity. *J. Biol. Chem.* 278: 31838–42.
- Ducret A, Vogt A, Wipf P, Lazo JS. 2005.** Dual specificity protein phosphatases: Therapeutic targets for cancer and Alzheimer’s disease. *Ann. Rev. Med.* 45: 725-750.
- Dumitru C, Ceci J, Tsatsanis C, Kontoyiannis D, Stamatakis K, Lin J, Patriotis C, Jenkins N, Copeland N, Kollias G, Tschlis P. 2000.** TNF- α induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERKdependent pathway. *Cell.* 103: 1071–1083.
- Edgard RC. 2004.** MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nuc. Ac. Res.* 32.5 1792-1797.
- Engelman J, Luo J, Cantley L. 2006.** The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.* 7: 606-619.
- Espinosa-Cantellano M, Gonzáles-Robles A, Chávez B, Castañón G, Argüello C, Lázaro-Haller A, Martínez-Palomo A. 1998.** *Entamoeba dispar*: ultrastructure, surface properties and cytopathic effect. *J. Eukaryot. Microbiol.* May-Jun; 45: 3: 265-72.
- Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A. 2000.** Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 318-31.
- Ferreira P, Ruela-de-Sousa R, Queiroz K, Sousa A, Milani R, Aloise P, Peppelenbosch M, Hertog J, Ferreira C. 2012.** Knocking down low molecular weight protein tyrosine phosphatase (LMW-PTP) Reverts Chemoresistance through Inactivation of Src and Bcr-Abl Proteins. *PloS ONE.* 7: 9.
- Forghieri M, Laggner C, Paoli P, Langer T, Manao G, Camici G, Bondoli L, Prati F, Costantino L. 2009.** Synthesis, activity and molecular modeling of a new series of chromones as low molecular weight protein tyrosine phosphatase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 17: 2658-2672.

- Forrest A**, McCormack A, DeSouza C, Sinnamon J, Tonks I, Hayward N, Ellem K, Gabrielli B. **1999**. Multiple splicing variants of *cdc25B* regulate G2/M progression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260: 510–15.
- Freitas M**, Vianna E, Martins A, Silva J. **2004**. A single step duplex PCR to distinguish *Entamoeba histolytica* from *Entamoeba dispar*. *Parasitology.* 128: 625-628.
- Fruman D**, Meyers R, Cantley L. **1998**. Phosphoinositide kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 67:481-507.
- Furukawa K**, Funakoshi Y, Autero M, Horejsi V, Kobata A, Gahmberg CG. **1998**. Structural study of the O-linked sugar chains of human leukocyte tyrosine phosphatase CD45. *Eur. J. Biochem.* 251: 288-294.
- Gallagher S**, Winston S, Fuller S, Hurrell J. **2008**. Unit 10.8 immunoblotting and immunodetection. *Current Protocols in Molecular Biology.* 1 julio.
- García Hernández R.** **2008**. Análisis global de las proteínas fosfatasas de tipo eucariota en *Myxococcus xanthus*. Universidad de Granada. Tesis Doctoral. España.
- Gebbink MF**, Zondag GC, Wubbolts RW, Beijersbergen RL, Van Etten I, Moolenaar WH. **1993**. Cell-cell adhesion mediated by a receptor-like protein tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem.* 268: 16101-16104.
- Ghosh M**, Song X, Mouneimne G, Sidani M, Lawrence DS, Condeelis JS. **2004**. Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. *Sci.* 304: 743-746.
- Gómez JC**, Cortés JA, Cuervo SI, Consuelo LM. **2007**. Amebiasis intestinal. *Infectio.* 11: 1: 36-45.
- González A and Wrigth S.** **1998**. Disparate amoebae. *Lancet.* 351: 1672-1673.
- Grangeasse C**, Doublet P, Vincent C, Vaganay E, Riberty M, Duclos B, Cozzone A. **1998**. “Functional characterization of the low-molecular mass phosphotyrosine-protein phosphatase of *Acinetobacter johnsonii*.” *J. Mol. Biol.* 278: 339-347.
- Gustafson C**, Stauffacher C, Hallenga K, Etten R. **2005**. Solution structure of the low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase from *Trichomonas foetus* reveals a flexible phosphate binding loop. *Protein. Sci.* 14: 2515–2525.
- Gutiérrez Cisneros M.** **2008**. Amebiasis en España: diagnóstico molecular y estudio epidemiológico de una parasitosis emergente. Memoria de grado de doctor. Universidad Complutense de Madrid. España.
- Guzmán E**, López C, Reyes P, Gómez E, Corredor A, Agudelo C. **2001**. Diferenciación de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* en muestras de materia fecal por detección de adhesina de *E. histolytica* mediante ELISA. *Bioméd.* 21: 167-171.
- Haque R**, Faruque ASG, Hahn P. **1997**. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in children in Bangladesh. *J. Infect. Dis.* 175: 734-736.
- Hazzalin C and Mahadevan L.** **2002**. MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch?. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 3: 30–40.
- Hermann J**, Marti-Arbona R, Fedorov A, Fedorov E, Almo S, Shoichet B, Raushel F. **2007**. Structure-based activity prediction for an enzyme of unknown function. *448: 7155: 775-779*

- Herrera-Rodríguez S**, Baylón-Pacheco L, Talamás-Rohana P, Rosales-Encina JL. **2006**. Cloning and partial characterization of *Entamoeba histolytica* PTPases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342: 1014–1021.
- Hoffmann I**, Clarke PR, Marcote MJ, Karsenti E, Draetta G. **1993**. Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2–cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *EMBO. J.* 12: 53–63.
- Hoffmann I**, Draetta G, Karsenti E. **1994**. Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition. *EMBO. J.* 13: 4302–4310.
- Homan K**, Balasubramaniam D, Zabell A, Wiest O, Helquist P, Stauffacher C. **2010**. Identification of novel inhibitors for a low molecular weight protein tyrosine phosphatase via virtual screening. *Bioorg. Med. Chem.* 18: 5449-5456.
- Honda R**, Ohba Y, Yasuda H. **1992**. The cell cycle regulator, human p50weel, is a tyrosine kinase and not a serine/tyrosine kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186: 1333–1338.
- Huang T**, DerMardirossian C, Bokoch G. **2006**. Cofilin phosphatase and regulation of actin dynamics. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 18: 26-31.
- Hunter T**. **2000**. Signalling-2000 and beyond. *Cell.* 100: 113–127.
- Ikebe C**, Ohashi K, Fujimori T, Bernard O, Noda T, Robertson EJ, Mizuno K. **1997**. Mouse LIM-kinase 2 gene: cDNA cloning, genomic organization, and tissue-specific expression of two alternatively initiated transcripts. *Genomics.* 46: 504-508.
- Johnson G and Lapadat R**. **2002**. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Sci.* 298: 1911–1912.
- Kaji N**, Ohashi K, Shuin M, Niwa R, Uemura T, Mizuno K. **2003**. Cell cycle-associated changes in Slingshot phosphatase activity and roles in cytokinesis in animal cells. *J. Biol. Chem.* 278: 33450-33455.
- Kapuscinski J**. **1995**. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem. Sep:* 70: 5: 220-233.
- Keiser M**, Roth B, Armbruster B, Ernsberger P, Irwin J, Shoichet B. **2007**. Relating protein pharmacology by ligand chemistry. *Nature Biotech.* 25: 2: 197-206.
- Keyse S y Emslie E**. **1992**. Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein-tyrosine phosphatase. *Nature.* 359: 644-647.
- Keyse S**. **2000**. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 12: 186–192.
- Kikawa K**, Vidale DR, Van Etten RL, Kinch MS. **2002**. Regulation of the EphA2 kinase by the low molecular weight tyrosine phosphatase induces transformation. *J. Biol. Chem.* 277(42): 39274-39279.
- Kotlyarov A**. **1999**. MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF- α biosynthesis. *Nature Cell Biol.* 1: 94–97.
- Kuiyi X, Ashraf R, Löfgren S, Rohan F, Ye-Shih H, Marjorie F**. **2007**. Low molecular weight protein tyrosine phosphatase (LMW-PTP) and its possible physiological functions of redox signaling in the eye lens. *Biochim. Biophys. Acta.* 1774: 5: 545-555.

- Kurita S**, Gunji E, Ohashi K, Mizuno K. **2007**. Actin filaments-stabilizing and bundling activities of cofilin-phosphatase Slingshot-1. *Genes Cells*. 12: 5: 663-676.
- Labandera AM**. **2011**. Estudio de las únicas fosfatasa de proteínas en tirosina de *Mycobacterium tuberculosis*. Sensibilidad de PtpB frente a diferentes agentes oxidantes y caracterización de la interacción entre el mutante PtpA D126A con extractos proteicos de macrófagos. Tesis de licenciatura. Universidad de la Republica Uruguay.
- Laemmli U**. **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- LaPointe G**, Atlan D, Gilbert C. **2008**. Characterization and site-directed mutagenesis of Wzb, an O-phosphatase from *Lactobacillus rhamnosus*. *BMC Biochemistry*. 9: 10.
- Leever S**, Vanhaesebroeck B, Waterfield M. **1999**. Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11: 219-225.
- Lescop E**, Hu Y, Xu H, Hu W, Chen J, Xia B, Jin C. **2006**. The solution structure of *Escherichia coli* wzb reveals a novel substrate recognition mechanism of prokaryotic low molecular weight protein-tyrosine phosphatases. *J. Biol. Chem.* 281: 19570-19577.
- Li D and Sun H**. **1998**. PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *PNAS USA*. 95: 15406-15411.
- Li E**, Becker A, Stanley SL. **1989**. Chinese hamster ovary cells deficient in N-acetylglycosaminyltransferase I activity are resistant to *Entamoeba histolytica* mediated cytotoxicity. *Infect. Immun.* 57: 8-12.
- Li J**, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliaresis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. **1997**. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Sci.* 275: 1943-1947.
- Li Y, and Strohl W**. **1996**. "Cloning, purification and properties of a phosphotyrosine protein tyrosine phosphatase from *Streptomyces coelicolor* A3(2)". *J. Bacteriol.* 178: 136-142.
- Li X**, Oghi KA, Zhang J, Krones A, Bush KT, Glass CK, Nigam SK, Aggarwal AK, Maas R, Rose DW, Rosenfeld MG. **2003**. EyA protein phosphatase activity regulates Six1–Dach–Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis. *Nature*. 426: 247–254.
- Liang F**, Liang J, Wang W-Q, Sun J-P, Udho E, Zhang Z-Y. **2007**. PRL3 promotes cell invasion and proliferation by down-regulation of Csk leading to Src activation. *J. Biol. Chem.* 282:5413-5419.
- Liu F**, Stanton JJ, Wu Z, Piwnicka-Worms H. **1997**. The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Mol. Cell. Biol.* 17: 571–583.
- Liu Y**, Shephard EG, Nelin LD. **2007**. MAPK phosphatases-regulating the immune response. *Nature Rev. Immunol.* 7: 202-212.
- Loulergue P and Mir O**. **2009**. Pleural empyema secondary to amebic liver abscess. *Int. J. Infect. Dis.* May. 13: 3: 135-136
- Maccari R, Ottanà R**. **2012**. Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatases as emerging targets for the design of novel therapeutic agents. *J. Med. Chem.* 55: 2-22.

- Madhurantakam C**, Murthy C, Kumar D. **2008**. Analyzing the catalytic mechanism of MPtpA: A low molecular weight protein tyrosine phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* through site-directed mutagenesis. *Proteins*. 1: 71: 2: 706-714.
- Maehama T**, Taylor GS, Dixon JE. **2001**. PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 247-279.
- Maehama T**. **2007**. PTEN: Its deregulation and tumorigenesis. *Biol. Pharm. Bull.* 30: 1624-1627.
- Mailand N**, Podtelejnikov AV, Groth A, Mann M, Bartek J, Lukas J. **2002**. Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability. *EMBO J.* 21: 5911–5920.
- Malentacchi F**, Marzocchini R, Gelmini S, Orlando C, Serio M, Ramponi G, Raugei G. **2005**. Up-regulated expression of low molecular weight protein tyrosine phosphatases in different human cancers. *Biochem Biophys Res. Commun.* 334 (3): 875-883.
- Maniatis T**, Fritsch E y Sambrook J. **1989**. Molecular cloning. A laboratory manual. 2a edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. U. S. A.
- Marinets A**, Zhang T, Guillen N, Gounon P, Bohle B, Vollmann U, Scheiner O, Wiedermann G, Stanley S, Duchene M. **1997**. Protection against invasive amebiasis by a single monoclonal antibody direct against a lipophosphoglycan antigen localized on the surface of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 186: 1557-1565.
- Martínez-Palomo A**. **1982**. The biology of *Entamoeba histolytica*. John Wiley y Sons. Chichester. England. pp. 161.
- Martínez Ferrandis A**. **2011**. Estudio preliminar del desarrollo de un sistema de información para el diagnóstico genético. Universidad Politécnica de Valencia. PROS. Centro de investigación en Métodos de Producción de Software.
- Marzocchini R**, Malentacchi F, Biagini M, Cirelli D, Luceri C, Caderni G, Raugei G. **2008**. The expression of low molecular weight protein tyrosine phosphatase is up-regulated on 1,2-dimethylhydrazine-induced Colon Tumors. *Int. J. Cancer.* 122: 1675-1678.
- Matsuguchi T**, Musikachoen T, Johnson TR, Kraft AS, Yoshikai Y. **2001**. A novel mitogen-activated protein kinase phosphatase is an important negative regulator of lipopolysaccharide-mediated c-Jun N-terminal kinase activation in mouse macrophage cell lines. *Mol. Cell. Biol.* 21: 6999–7009.
- Mauro L and Dixon J**. **1994**. 'Zip codes' direct intracellular protein tyrosine phosphatases to the correct cellular 'address'. *Trends Biochem. Sci.* 19: 151-155.
- McLaughlin S and Dixon J**. **1993**. Alternative splicing gives rise to a nuclear protein tyrosine phosphatase in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 268: 6839-6842.
- Meza I**, Carbajal E, Manning-Cela R, Piña A. **1996**. Señales celulares en *Entamoeba histolytica*. El papel del Ca²⁺. *Gaceta Méd. de Méx.* 132: 5.
- Meza I**. **2000**. Extracellular matrix-induced signaling in *Entamoeba histolytica*: its roles in invasiveness. *Parasitol Today.* 16: 23-28.
- Meza I**, Talamás-Rohana P, Vargas MA. **2006**. The cytoskeleton of *Entamoeba histolytica*: structure, function, and regulation by signaling pathways. *Arch. Med. Res.* 37: 2: 234-243.

- Miao M**, Li D, Mukherjee A, Guo H, Petty A, Cutter J, Basilion JP, Sedor J, Wu J, Danielpour D, Sloan AE, Cohen ML, Wang B. **2009**. EphA2 mediates ligand-dependent inhibition and ligand-independent promotion of cell migration and invasion via a reciprocal regulatory loop with Akt. *Cancer Cell*. 16: 9-20.
- Millar J and Russell P**. **1992**. The cdc25 Mphase inducer: an unconventional protein phosphatase. *Cell*. 68: 407–10.
- Miranda M**, Okamoto A, Ferreira C, Silva T, Granjeiro J, Aoyama H. **2006**. Differential effect of flavonoids on bovine kidney low molecular mass protein tyrosine phosphatase. *J. Enz. Inhib. Med. Chem*. 21: 419-425.
- Mizuno K**, Okano I, Ohashi K, Nunoue K, Kuma K, Miyata T, Nakamura T. **1994**. Identification of a human cDNA encoding a novel protein kinase with two repeats of the LIM/double zinc finger motif. *Oncogene*. 9: 1605-1612.
- Mukhopadhyay A**. **2006**. Identification of a low molecular weight protein tyrosine phosphatase and its potential physiological substrates in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Tesis doctoral USA. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg.
- Muñoz Moreno M**. **2009**. Colagenasas y *Entamoeba histolytica*. Avance y Perspectiva. Enero-marzo.
- Musumeci L**, Bongiorno C, Tautz L, Edwards R, Osterman A, Perego M, Mustelin T, Bottini. **2005**. Low-Molecular-Weight Protein Tyrosine Phosphatases of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*. 187: 14: 4945–4956.
- Myers M**, Stolarov J, Eng C, Li J, Wang S, Wigler M, Parsons R, Tonks N. **1997**. P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. *PNAS USA*. 94: 9052-9057.
- Neel B and Tonks N**. **1997**. Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr. Opin. Cell. Biol*. 9: 193–204.
- Nei M y Kumar S**. **2000**. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Olivos-García A**, Saavedra E, Ramos-Martínez E, Nequiz M, Pérez-Tamayo R. **2009**. Molecular nature of virulence in *Entamoeba histolytica*. *Infect. Genet. Evol.* Dec. 9: 6: 1033-1037.
- Oltmans S**, Fehr W, Welke G, Cianzio S. **2004**. Inheritance of Low-Phytate phosphorus in Soybean. *Crop Science*. 44: 2.
- Ostanin K**, Polasky C, Wang S, Etten R. **1995**. “Cloning and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding the low molecular weight protein tyrosine phosphatase” *J. Biol. Chem*. 270: 31: 18491- 18499.
- Pagarigan K**, Bunn B, Goodchild J, Rahe T, Wes J, Saucedo L. **2013**. *Drosophila* PRL-1 is a growth inhibitor that counteracts the function of the Src Oncogene. *Plos One*.
- Parker B**, Argani P, Cook B, Han L, Chartrand S, Zhang M, Saha S, Bardelli A, Jiang Y, St. Martin T, Nacht M, Teicher B, Klinger K, Sukumar S, Madden S. **2004**. Alterations in vascular gene expression in invasive breast carcinoma. *Cancer Res*. 64: 7857–7866.
- Patterson K**, Brummer T, O’Briem P, Daly R. **2009**. Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *Biochem. J*. 418: 475–489.

- Pérez Saldaña J. 2008.** Caracterización bioquímica de la proteína tirosina fosfatasa B de *Entamoeba histolytica*. Tesis de Maestría. Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular. CINVESTAV. México.
- Pérez-Tamayo.** Capítulo 36 Amibiasis. En Flisser A y Pérez T. 2006. Aprendizaje de la Parasitología basado en problemas. Edit. de Textos Mexicanos. México. pp. 9-17.
- Pilla D, Keystone J, Sheppard D, Maclean D, Macpherson D, Kain K. 1999.** *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: epidemiology and comparison of diagnostic methods in a setting of nonendemicity. Clin. Infect. Dis. 29: 1315-1318.
- Plaxton W and McManus M. 2006.** Control of primary metabolism in plants. Annual Plant Reviews. Edit Wiley-Blackwell. 22: page 131.
- Polato F, Codegoni A, Fruscio R, Perego P, Mangioni C, Saha S, Bardelli A, Brogгинi M. 2005.** PRL-3 phosphatase is implicated in ovarian cancer growth. Clin. Cancer Res. 11: 6835–6839.
- Pollard T and Borisy G. 2003.** Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. Cell. 112: 453-465.
- Pritt B y Graham C. 2011.** *Entamoeba y Entamoeba histolytica*. Un eLS. John Wiley y Sons, Ltd: Chichester, UK. Octubre.
- Raftopoulou M, Etienne-Manneville S, Self A, Nicholls S, Hall A. 2004.** Regulation of cell migration by the C2 domain of the tumor suppressor PTEN. Sci. 303: 1179-1181.
- Ralston K and Petri Jr W. 2011.** Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. Rev. Trends Parasitol. 27: 6: 254-263.
- Ramos F, Moran P, González E, García G, Ramiro M, Gómez A, DE León MC, Melendro EI, Valdez A, Ximénez C. 2005.** High prevalence rate of *Entamoeba histolytica* asymptomatic infection in a rural Mexican community. Am. J. Trop. Med. Hyg. 73: 87-91.
- Ramos F, Valdez E, Moran P, González E, Padilla G, Gómez A, Ramiro M, Melendro EI, Muñoz O, Clark CG, Ximénez C. 2000.** Prevalence of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in a highly endemic rural population. Arch. Med. Res. 31: S34-S35.
- Ramponi G, Manao G, Camici G, Cappugi G, Ruggiero M, Bottaro DP. 1989.** The 18 kDa cytosolic acid phosphatase from bovine liver has phosphotyrosine phosphatase activity on the autophosphorylated epidermal growth factor receptor. FEBS Lett. 250: 469–473.
- Ramponi G., Stefani M. 1997.** Structural, catalytic, and functional properties of low M(r) phosphotyrosine protein phosphatases. Evidence of a long evolutionary history. Int. J. Biochem. Cell Biol. 29: 279–292.
- Raugei G, Ramponi G, Chiarugi P. 2002.** Low molecular weight protein tyrosine phosphatases: small, but smart. Cellular and Molecular Life Sciences. 59: 941-949.
- Rayapureddi J, Kattamuri C, Steinmetz B, Frankfort B, Ostrin E, Mardon G, Hegde R. 2003.** Eyes absent represents a class of protein tyrosine phosphatases. Nature. 426: 295–298.
- Riquelme C. 2004.** Determinación de anticuerpos anti-*Entamoeba histolytica* mediante inmunofluorescencia indirecta en pacientes con pruebas hepáticas alteradas. Tesis doctoral. Universidad de Talca, Chile.
- Roberts C, Walker W, Alexander J. 2001.** “Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites”. Clin. Microbiol. Rev. 14: 476-488.

- Robinson F y Dixon J. 2006.** Myotubularins phosphatases: policing 3-phosphoinositides. *Trends Cell Biol.* 16: 403-412.
- Rzhetsky y Nei. 1992.** A simple method for estimating and testing minimum evolution trees. *Mol. Biol. and Evolution* 9: 945-967.
- Saha S, Bardelli A, Buckhaults P, Velculescu V, Rago C, St. Croix B, Romans K, Choti M, Lengauer C, Kinzler K, Vogelstein B. 2001.** A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer. *Sci.* 294: 1343-1346.
- Saito H y Streuli M. 1991.** Molecular characterization of protein tyrosine phosphatases. *Cell Growth Differ.* 2: 59-65.
- Saitou N y Nei M. 1987.** The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. and Evolution.* 4: 406-425
- Santos García A. 2006.** Expresión de E-cadherina, laminina y colágeno IV en la evolución de displasia a carcinoma epidermoide oral. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal.* 11: 2.
- Sargeant P, Williams J, Bhojnani R, Kumate J, Jimenez E. 1982.** “A review of isoenzyme characterization of *Entamoeba histolytica* with particular reference to pathogenic and non-pathogenic stocks isolated in México”. *Arch. Rev. Res. Med. México.* 13: 3: 89-94.
- Sasson R, Dantes A, Tajima K, Amsterdam A. 2003.** Novel genes modulated by FSH in normal and immortalized FSH-responsive cells: new insights into the mechanism of FSH action. *The FASEB Journal.* 17: 10: 1256-1266.
- Schwering I, Brauninger A, Distler V, Jesdinsky J, Diehl V, Hansmann M, Rajewsky K, Kuppers R. 2003.** Profiling of Hodgkin's lymphoma cell line L126 and germinal center B cells: identification of Hodgkin's lymphoma-specific genes. *Mol. Med.* 9: 85-95.
- Secretaria de Salud. 2001.** “Epidemiología. Información epidemiológica de morbilidad 2000. Secretaria de Salud, México D.F. pp. 15-32.
- Sengupta K, Hernández-Ramírez VI, Rosales-Encina JL, Mondragón R, Garibay-Cerdenares OL, Flores-Robles D, Javier-Reyna R, Pertuz S, Talamás-Rohana P. 2009.** Physical, structural and functional properties of the beta 1 integrin-like fibronectina receptor (beta 1EhFNR) in *Entamoeba histolytica*. *Infec. Genet. Evol. Sep.* 9:5: 962-970
- Silvera Arenas L y Barrios de Zurbar C. 2002.** La matriz extracelular: El ecosistema de la célula. *Salud Uninorte. Barranquilla Colombia.* 16: 9-18.
- Sierra López F. 2011.** Análisis de las diferencias inmunoquímicas en la Lipopéptidofosfoglicana (LPPG) de *Entamoeba histolytica* obtenida por el método fenol-agua y el método fenol-agua modificado. Tesis de Licenciatura. UNAM. FESZ.
- Soulat D, Vaganay E, Duclos B, Genestier A, Cozzone A. 2002.** “*Staphylococcus aureus* contains two low molecular mass phosphotyrosine phosphatases”. *J. Bacteriol.* 184: 5194-5199.
- Souza A, Azoubel S, Queiroz K, Peppelenbosch M, Ferreira C. 2009.** From immune response to cancer: a spot on the low molecular weight protein tyrosine phosphatase. *Cell. Mol. Life Sci.* 66: 1140-1153.
- Stanley S Jr. 2003.** “Amoebiasis”. *Lancet.* 361: 1025-1034.
- Stegmeier F and Amon A. 2004.** Closing mitosis: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation. *Ann. Rev. Genet.* 38: 203-232.

- Stein E**, Lane AA, Cerretti DP, Schoecklmann HO, Schroff AD, Van Etten RL, Daniel TO. **1998**. Eph receptors discriminate specific ligand oligomers to determine alternative signaling complexes, attachment, and assembly responses. *Genes Dev.* 12: 667–678.
- Stephens B**, Han H, Gokhale V, Von Hoff D. **2005**. PRL phosphatases as potential molecular targets in cancer. *Mol. Cancer Ther.* 4: 1653–1661.
- Stossel T**, Condeelis J, Cooley L, Hartwig JH, Noegel A, Schleicher M, Shapiro SS. **2001**. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2: 138–145.
- Sun H**, Charles CH, Lau LF, Tonks NK. **1993**. MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase *in vivo*. *Cell.* 75: 487–493.
- Taddei M**, Chiarugi P, Cirri P, Talini D, Camici G, Manao G, Raugei G, Ramponi G. **2000**. LMW-PTP exerts a differential regulation on PDGF- and insulin-mediated signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270: 564–569.
- Taddei M**, Chiarugi P, Cirri P, Buricchi F, Giannoni E, Talini D, Cozzi G, Formigli L, Raugei G, Ramponi G. **2002**. β -Catenin interacts with low molecular weight protein tyrosine phosphatase leading to cadherin-mediated cell-cell adhesion increase. *Cancer Res.* 15: 6462: 6489.
- Talamás-Rohana P**, Aguirre-Garcia M, Anaya-Ruiz M, Rosales-Encina JL. **1999**. *Entamoeba dispar* contains but does not secrete acid phosphatase as does *Entamoeba histolytica*. *Exp. Parasitol.* 92: 219–222.
- Tamura M**, Gu J, Takino T, Yamada K. **1999**. Tumor suppressor PTEN inhibition of cell invasion, migration, and growth: differential involvement of focal adhesion kinase and p130Cas. *Cancer Res.* 59: 442–449.
- Tamura K**, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. **2011**. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. and Evolution* 28: 2731–2739.
- Tanizaki M**, Bittencourt H, Chaimovich H. **1977**. Activation of low molecular weight acid phosphatase from bovine brain by purines and glycerol. *Bioch. et Biophys. Acta.* 485: 116–123.
- Taylor G**, Maehama T, Dixon J. **2000**. Myotubularin, a protein tyrosine phosphatase mutated in myotubular myopathy, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3-phosphate. *PNAS. USA.* 97: 8910–8915.
- Thomas C**, McKinnon E, Granger B, Harms E, Etten R. **2002**. Kinetic and spectroscopic studies of *Tritrichomonas foetus* low-molecular weight phosphotyrosyl phosphatase. Hydrogen bond networks and electrostatic effects. *Biochem.* 41: 15601–15609.
- Tonks N**, Diltz C, Fischer E. **1988**. Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J. Biol. Chem.* 263: 6731–6737.
- Tonks N and Neel B.** **2001**. Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 182–195.
- Tonks N.** **2006**. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 833–846.

- Tonks N. 2013.** Protein tyrosine phosphatases – from housekeeping enzymes to master regulators of signal transduction. 280: 346-378.
- Tootle T, Silver S, Davies E, Newman V, Latek R, Mills I, Selengut J, Parlikar B, Rebay I. 2003.** The transcription factor Eyes absent is a protein tyrosine phosphatase. *Nature*. 426: 299–302.
- Trejos-Suárez y Castaño-Osorio. 2009.** Factores de virulencia del patógeno intestinal *Entamoeba histolytica*. *Revista infectio*. 13: 2.
- Trautmann S and McCollum D. 2002.** Cell cycle: new functions for Cdc14 family phosphatases. *Curr. Biol*. 12: R733–R735.
- Trott O y Olson A. 2010.** AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J. of Comput. Chem*. 31: 455-461.
- Tsujita K, Itoh T, Ijuin T, Yamamoto A, Shisheva A, Laporte J, Takenawa T. 2004.** Myotubularin regulates the function of the late endosome through the gram domain-phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate interaction. *J. Biol. Chem*. 279: 13817–13824.
- Van Hal SJ, Fotedar R, Marriott D, Ellis JT, Harkness JL. 2007.** “Amoebiasis: current status in Australia”. *Med. J. Aust*. 186: 412-416.
- Vidal J, Canizales-Román A, Gutiérrez-Jiménez J, Navarro-García F. 2007.** Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud pública, México*. 49: 5: 376-385.
- Vigilancia Epidemiológica semana 12. 2009.** Casos por entidad federativa de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Aparato Digestivo hasta la semana epidemiológica 12 del 2009. SSA de México.
- Vigilancia Epidemiológica semana 23. 2013.** Boletín epidemiológico. Dirección general de epidemiología.SSA de México. http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/boletin/intd_boletin.html.
- Wegener S, Hampe W, Herrmann D, Schaller H. 2000.** Alternative splicing in the regulatory region of the human phosphatases CDC25A and CDC25C. *Eur. J. Cell Biol*. 79: 810–15.
- World Health Organization. 1997.** “WHO/Pan American Health Organization/ UNESCO report of a consultation of experts on Amoebiasis”. *Weekly Epidemiol. rec. WHO*. 72: 97-99.
- Wu X, Zeng H, Zhang X, Zhao Y, Sha H, Ge X, Zhang M, Gao X, Xu Q. 2004.** Phosphatase of regenerating liver-3 promotes motility and metastasis of mouse melanoma cells. *Am. J. Pathol*. 164: 2039–2054.
- Ximénez C, Cerritos R, Rojas L, Dolabella S, Morán P, Shibayama M, González E, Valadez A, Hernández E, Valenzuela O, Limón A, Partida O, Silva EF. 2010.** Human amebiasis: Breaking the paradigm? *Int. J. Environ. Res. Public. Health*, mar. 7: 3: 1105-1120.
- Ximénez C. 2006.** “Epidemiology of amebiasis in México: a molecular approach”. *Arch. Med. Res*. 37: 263-265.
- Xu Q, Fu H, Gupta R, Luan S. 1998.** Molecular characterization of a tyrosine-specific protein phosphatase encoded by a stress-responsive gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 10: 5: 849-857.
- Zabell A., Schroff A., Bain B., Etten R., Wiest O., Stauffacher C. 2006.** Crystal structure of the Human B-form low molecular weight phosphotyrosyl phosphatase at 1.6-Å resolution. *J. Biol. Chem*. 281: 6520-6527.

- Zerial M and McBride H. 2001.** Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 107–117.
- Zhang E, Harms RL, Van Etten. 1994.** Asp129 of low molecular weight protein tyrosine phosphatase is involved in leaving group protonation *J. Biol. Chem.* 269: 25947–25950.
- Zhang Z, Zhou G, Denu J, Wu L, Tang X, Mondesert O, Russel P, Butch E, Guan K. 1995.** “Purification and characterization of the low molecular weight protein tyrosine phosphatase Stp1, from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*”. *Biochem.* 34: 10560-10568
- Zhao R, Qi Y, Chen J, Zhao ZJ. 2001.** FYVE-DSP2, a FYVE domain-containing dual specificity protein phosphatase that dephosphorylates phosphatidylinositol 3-phosphate. *Exp. Cell Res.* 265: 329–338.
- Zhou M and Etten V. 1999.** Structural basis of the tight binding of pyridoxal 5 ϵ -phosphate to a low molecular weight protein tyrosine phosphatase. *Biochem.* 38: 2636-2646.
- Zuckermandl y Pauling L. 1965.** Evolutionary divergence and convergence in proteins. Edited in *Evolving Genes and Proteins* by V. Bryson and H.J. Vogel. Academic. Press. New York. pp. 97-166.