

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

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular

“Identificación de los sustratos endógenos para las proteínas
tirosina fosfatasas *EhPTPA* y *EhPTPB* de *Entamoeba histolytica*”

Tesis que presenta

M. en C. Jorge Antonio Pérez Saldaña

para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias en
Infectómica y Patogénesis Molecular**

Director de Tesis:

Dr. José Luis Rosales Encina

ASESORES DE TESIS:

Dra. Teresa Mancilla Percino²

Dra. Patricia Talamás Rohana¹

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano¹

Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara³

1. Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular CINVESTAV-IPN.
2. Departamento de Química CINVESTAV-IPN.
3. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del IPN.

El presente trabajo, se realizó en el laboratorio 7 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, del CINVESTAV-IPN bajo la Dirección del Dr. José Luis Rosales Encina.

Durante la realización de este trabajo el estudiante Jorge Antonio Pérez Saldaña fue becario CONACYT, No. 203416, por lo que agradecemos todo el apoyo brindado por este organismo.

Dedicatorias:

Este trabajo está dedicado a una de las personas más importantes de mi vida, a mi esposa Judith Sánchez Sánchez, por haber sido paciente, por acompañarme y apoyarme durante este proceso, por haber aguantado mis ausencias por el trabajo y por darme una hermosa familia; pero sobre todo por su inmenso amor.

A mis hijas: Airy, Dana, Yuri y Eimy por ser mi mayor motivo de superación profesional y por brindarme su amor sincero, todas son un pedazo de mi corazón.

A mis padres y a mis hermanas por su amor y cariño.

A los padres y hermanas de mi esposa, por brindarnos su apoyo en los momentos difíciles, y por su cariño.

Agradecimientos:

He tenido la oportunidad de tener grandes mentores que me han guiado e inspirado durante mi formación en el posgrado. Primero que todo, quisiera agradecer a mi director de tesis, Dr. José Luis Rosales Encina, por aceptar que yo formara parte del grupo de trabajo del laboratorio que dirige; por darme este proyecto de las fosfatasas; y por compartir su experiencia en investigación, para resolver los contratiempos que se fueron presentando durante la realización del presente proyecto.

Me gustaría también agradecer inmensamente a la Dra. Teresa Mancilla Percino del Departamento de Química del CINVESTAV; por su gran disponibilidad para el trabajo interdisciplinario; pero principalmente por su amistad; y por compartir su experiencia para la identificación de compuestos por resonancia magnética nuclear. Trabajar en su laboratorio fue de las mejores experiencias durante la realización de este trabajo, estaré siempre

agradecido por todo el conocimiento adquirido y por las bonitas experiencias de trabajo y de convivencia con los integrantes de su laboratorio.

También agradezco a la Dra. Patricia Talamás Rohana, a la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano y al Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara, por haber sido participes durante mi formación académica, desde mi ingreso al departamento de Infectómica; por formar parte de mi comité de asesores y por sus importantes observaciones y aportaciones realizadas para la mejora del presente trabajo.

Habría sido difícil avanzar todos estos años sin la ayuda y amistad de mis compañeros de laboratorio lo cual agradezco fraternalmente. Quiero agradecer a nuestra auxiliar del laboratorio la Bióloga Lidia Baylón Pacheco, quien me brindo apoyo técnico durante toda mi estancia en el laboratorio, a la M. en C. Patricia Espíritu por el apoyo técnico, a la Dra. Verónica Ivonne Hernández Ramírez por su asistencia en la operación del microscopio confocal, a los Técnicos de laboratorio Asael de Luna y Enrique de Luna por proporcionarnos los materiales de uso rutinario para la realización de nuestro trabajo; a mis compañeros de laboratorio Berenice, Ana Lilia, Francisco, Cristina, Alejandro, Paty Pulido y Alondra por su apoyo y por su amistad.

Quiero agradecer especialmente a las secretarias del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Irma Miranda y Martha Aguilar, por todo el apoyo administrativo y porque siempre se mostraron amables y atentas a todas las solicitudes realizadas.

El ambiente cooperativo en el departamento fue esencial para la realización de mi investigación, así como el apoyo externo de muchas personas que permitieron que todo este trabajo fuera posible. Me gustaría agradecer a la auxiliar de investigación del Departamento de Química CINVESTAV, Cortez Picasso Ma. Teresa, encargada de operar el equipo (RMN-270) y a María Guadalupe Aguilar González del Departamento de Genética y Biología Molecular CINVESTAV por la secuenciación del DNA. Agradezco al Dr. José Correa Basurto de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la

Escuela Superior de Medicina del IPN, por su apoyo para la realización del análisis por docking. Finalmente agradezco al Dr. José Luis Gallegos Pérez (INMEGEN) por su apoyo en la realización del análisis por espectrometría de masas.

El presente trabajo comprende dos secciones, la **sección A** que trata la parte de la Identificación de los sustratos endógenos para las proteínas tirosina fosfatasas *EhPTPA* y *EhPTPB* de *Entamoeba histolytica*; y la **sección B** que comprende el efecto del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* sobre la actividad PTPasa de *EhPTPB* y análisis de interacción por docking.

Índice

SECCIÓN A	1
Identificación de los sustratos endógenos para las proteínas tirosina fosfatasas <i>EhPTPA</i> y <i>EhPTPB</i> de <i>Entamoeba histolytica</i>	1
Resumen	1
Abstract	2
I) Antecedentes	3
1. Amibiasis.	3
2. Epidemiología.	3
3. Ciclo de vida.....	4
4. Factores de virulencia de <i>Entamoeba Histolytica</i>	6
5. Proteínas tirosina fosfatasas.	9
5.1. PTPasas transmembranales, tipo receptor (RPTPasas).	10
5.2. PTPasas no transmembranales (NRPTPasas).	11
5.3. PTPasas específicas duales (DSPs).	13
5.4. PTPasas de bajo peso molecular (LMWPs).....	13
6. Mecanismo catalítico de las PTPs.....	14
7. Importancia biológica de las PTPs.	16
8. Mecanismo de regulación para las proteínas tirosina fosfatasas.....	17
8.1. Regulación por interacciones intra e intermoleculares.	18
8.2. Regulación oxidativa del sitio catalítico.....	19
8.3. Regulación por fosforilación.....	19
9. PTPasas y señalización.	21
10. PTPasas y microorganismos.	22
11. Fosfatasas y <i>Entamoeba histolytica</i>	23
12. Especificidad de las PTPs por su sustrato.....	25
13. Identificación de sustratos de las PTPasas.	26
II) Justificación.....	27
III) Hipótesis.....	28
IV) Objetivo general.....	28
V) Objetivos particulares.....	28
VI) Materiales y Métodos.....	28
1. Cultivos de <i>Entamoeba histolytica</i>	28
2. Obtención de mutantes de la proteína <i>EhPTPB</i> (D167A y C203S).....	29
3. Células competentes BL21(DE)pLysS.	29

4. Transformación de células BL21(DE)pLysS.....	30
5. Purificación de DNA plasmídico.....	30
6. Reacción de secuenciación.....	31
7. Purificación de las proteínas , GST:: <i>Eh</i> PTPA, GST:: <i>Eh</i> PTPB y proteínas mutantes.....	32
8. Geles de Poliacrilamida-SDS.....	32
9. Cuantificación de proteínas por el método de micro-Bradford.	33
10. Actividad enzimática.....	33
11. Producción de anticuerpos policlonales contra GST:: <i>Eh</i> PTPA, GST:: <i>Eh</i> PTPB y His:: <i>Eh</i> PTPB.....	33
12. Inmunotransferencia.....	34
13. Extracto de amibas tratadas con Ortovanadato de sodio Na ₃ VO ₄	34
14. Ensayos de Pulldown.	35
15. Material vegetal e hidrodestilación.....	36
16. Identificación de los compuestos esenciales de <i>C. ambrosioides</i>	36
17. Ensayos de inhibición de la actividad enzimática por el aceite completo y por las fracciones de <i>C. ambrosioides</i>	36
18. Ensayos de inhibición de actividad enzimática por los monoterpenos identificados en el aceite de <i>C. ambrosioides</i>	37
19. Construcción de ligandos y optimización.....	37
20. Dinámica molecular.	38
21. Modelado por el método de docking.....	38
22. Análisis Estadístico.....	39
VII) Resultados.....	39
VIII) Discusión	50
IX) Conclusión de la sección A.....	54
SECCIÓN B.....	55
Efecto del aceite esencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i> sobre la actividad de PTPasa de <i>Eh</i> PTPB y análisis de interacción por docking.....	55
Resumen.....	55
Abstract	56
I) Antecedentes	57
1. Aceites esenciales.	57
2. Compuestos presentes en el aceite esencial de <i>C. ambrosioides</i>	59
3. Inhibidores de PTPasas.....	61
4. Inhibidores de PTPasas obtenidos de fuentes naturales.	62
5. Análisis de los sitios de unión de inhibidores de la actividad enzimática de <i>Eh</i> PTPB por el método de docking.....	63
II) Justificación.....	65

III) Hipótesis.....	65
IV) Objetivo general.....	65
V) Objetivos particulares.....	65
VI) Resultados.....	66
VII) Discusión	77
VIII) Conclusión de la sección B.....	79
IX) Referencias.....	80
XI) Apéndice: Imágenes y Figuras	96

Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	5
Figura 2. Modelo para el daño al tejido por <i>Entamoeba histolytica</i> en la colitis amibiana.....	8
Figura 3. Clasificación de PTPs presentes en el genoma humano.....	10
Figura 4. Mecanismo catalítico sugerido para las proteínas tirosinas fosfatasas.	15
Figura 5. Purificación y análisis de los vectores mutantes de EhPTPA y EhPTPB.....	40
Figura 6. Análisis de las mutantes EhPTPBC203S, EhPTPBD167A, EhPTPAD177A y EhPTPAQ294A.	41
Figura 7. Purificación de las proteínas recombinantes mutantes.	42
Figura 8. Actividad enzimática de las proteínas nativas y mutantes de EhPTPA (A) y EhPTPB (B).....	44
Figura 9. Inmunoblot de las proteínas GST::EhPTPA e His::EhPTPB recombinantes.....	45
Figura 10. Formación de fibras de actina en trofozoítos incubados con Fibronectina (FN).....	46
Figura 11. Localización subcelular de las proteínas EhPTPA y EhPTPB.	47
Figura 12. Captura de sustratos con las proteínas mutantes de EhPTPA y EhPTPB.....	49
Figura 13. Espectro HETCOR en MeOD.....	68

Figura 14. Espectro de RMN de ^{13}C , Técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer).....	70
Figura 15. ^1H , ^{13}C -HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation).....	71
Figura 16. ^1H , ^{13}C -HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation).	71
Figura 17. Inhibición de la actividad de EhPTPB por aceite completo de <i>C. ambrosioides</i>	72
Figura 18. Inhibición de la actividad de EhPTPB por fracciones de <i>C. ambrosioides</i> obtenidas por destilación fraccionada.	73
Figura 19. Inhibición de la actividad de EhPTPB por α -Terpineno.	74
Figura 20. Preparación de EhPTPB para dinámica molecular.....	75
Figura 21. Interacción de α -Terpineno y fenilvinilsulfonato con el sitio catalítico de EhPTPB a través del docking.	76

Lista de Tablas.

Tabla I. Datos de espectrometría de masas de secuencias parciales de los sustratos potenciales de <i>EhPTPA</i> y <i>EhPTPB</i>	50
Tabla II. Porcentaje de los compuestos que componen el aceite esencial de <i>C. ambrosioides</i>	60

Lista de abreviaturas.

APs	Fosfatasas acidas
BLAST	Herramienta de Alineamiento Básico
BSA	Albumina Sérica Bovina
µg	Microgramos
µl	Microlitros
CP	Cisteina Proteasa
CRD	Dominio de Reconocimiento de Carbohidratos
CD45	Cumulo de Diferenciación
Cdc25A	Ciclo de división celular homólogo 25 A
cDNA	DNA complementario
DTT	Dithiotreitol
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization
dNTP	Deoxinucleósido trifosfato
EhPTPA	Proteína fosfatasa A de <i>Entamoeba Histolytica</i>
EhPTPB	Proteína fosfatasa B de <i>Entamoeba Histolytica</i>
E-P	Enzima-fosfato
ERKs	Cinasa Regulada por Señales Extracelulares
EGF	Factor de Crecimiento Epidermal
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
AF	Adhesión Focal
FAK	Cinasa de Adhesión Focal
Fas	Fosfatasas ácidas
FN	Fibronectina
Gal/GalNAc	Galactosa/N-Acetil-Galactosamina
GST	Glutación-S-Transferasa
H₂O₂	Peróxido de Hidrogeno
HETCOR	Correlación Heteronuclear por Transferência de Polarización
HMBC	Correlación de Unión Multiple Heteronuclear
IA	Iodo acetamida
JNK	Cinasa-c-Jun

Km	Constante de Michaelis-Menten
Kcat	Constante catalítica
LMW-PTP	PTPasa de Bajo Peso Molecular
LAR	Antígeno Relacionado a Leucocitos
MAP	Fosfatasa Ácida Unida a la Membrana
MAPK	Proteína Cinasa Activada por Mitógeno
MKP-3	Cinasa Fosfatasa Mitógeno Activada
MEC	Matriz Extracelular
Mg	Miligramos
Min	Minutos
M	Molar
mM	Milimolar
GTE	Glucosa, Tris, EDTA
Na₃VO₄	Ortovanadato de Sodio
NC	Nitrocelulosa
NEM	N-Etil Maleimida
NRPTPasas	PTPasas no Receptoras
PAC	Proteína Activadora de Procaspasas
PBS	Amortiguador Fosfato Salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
PKC	Proteína Cinasa C
PMSF	Fenil-Metano-Sulfonil Fluoruro
pNPP	para-Nitrofenolfosfato
PP	Proteínas fosfatasas
Prk	Proteína Serina Treonina Cinasa de Humano
PTK	Proteína Tirosina Cinasa
PTPasas	Proteína Tirosina Fosfatasas
PTP1B	Proteína Tirosina Fosfatasas
pTyr	Fosfo-Tirosina
PTN	Pleiotrofina
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RPTPasas	PTPasas Tipo Receptor

SAP	Fosfatasa Acida Secretada
SAPK	Proteína Cinasa Activada por Estres
SDS-PAGE	Electroforesis en Geles de Poliacrilamida
SDS	Dodecilsulfato de Sodio
SH2	Dominio de Homología a Src
SMART	Herramienta de Investigación de Arquitectura Modular Simple
TBST	Tris-Amortiguador Salino Tween
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TMS	Tetrametilsilano
TLCK	Tosyl-L-lisina-Chlorometano hidrocchlorido

SECCIÓN A

Identificación de los sustratos endógenos para las proteínas tirosina fosfatasas *EhPTPA* y *EhPTPB* de *Entamoeba* *histolytica*

Resumen

El genoma de *Entamoeba histolytica* el agente causal de la amibiasis, tienen dos genes que codifican para las proteínas tirosina fosfatasas clásicas *EhPTPA* y *EhTPB*, cuya función sigue siendo desconocida. Debido a esto, es importante identificar los sustratos para estas PTPasas, para entender el papel que estas proteínas juegan en la biología del parásito y en sus mecanismos de patogenicidad. Para cumplir este propósito, estas PTPasas fueron sometidas a mutagénesis sitio dirigida en los aminoácidos involucrados en su mecanismo catalítico. Las proteínas mutantes *EhPTPAD177A*, *EhPTPAQ294A*, *EhPTPBD167A* y *EhPTPBC203S* obtenidas, mostraron actividad enzimática disminuida o nula, en comparación a las proteínas nativas y, fueron capaces de capturar sustratos endógenos. Nosotros concluimos que el uso de mutantes de PTPasas de *Entamoeba histolytica*, constituyen una herramienta muy útil para la identificación de nuevos sustratos de otras PTPasas de *E. histolytica*.

Abstract

The genome of *Entamoeba histolytica*, the etiological agent of amoebiasis, presents two genes that codify for the classic protein tyrosine phosphatases *EhPTPA* and *EhPTPB* which functions are still unknown. In accordance to this, it is important to identify substrates for these PTPases to understand the role that these proteins play in parasite biology and pathogenicity mechanisms. For this purpose, these PTPases were subjected to directed mutagenesis of the amino acids involved in the catalytic mechanism. The obtained mutant proteins, *EhPTPAD177A*, *EhPTPAQ294A*, *EhPTPBD167A* and *EhPTPBC203S*, showed decreased or nule enzymatic activity compared to the native proteins and were able to capture endogenous substrates. We concluded that our mutant PTPases from *E. histolytica* will constitute a valuable tool for the identification of new substrates to other PTPases from *E. histolytica*.

I) Antecedentes

1. Amibiasis.

Entamoeba histolytica es un parásito protozoario entérico exclusivo de los humanos y agente causal de la amibiasis, la cual se caracteriza en su fase invasiva por la destrucción de células y matriz extracelular del huésped. El trofozoíto, la forma móvil e infectiva del parásito, puede residir en el intestino humano y ocasionalmente invadir la mucosa intestinal, penetrarla, y migrar a otros órganos, tales como el hígado, pulmones o cerebro.

Pocos patógenos son tan apropiadamente llamados como es el caso de *E. histolytica*, ya que la característica principal en esta la amibiasis es la capacidad del protozoario de lisar células, resultando en destrucción masiva del tejido, causando así los dos principales síndromes clínicos de la amibiasis: la colitis amibiana y el absceso hepático amibiano (Ravdin, 1995).

2. Epidemiología.

La amibiasis es la infección del tracto gastrointestinal causada por *E. histolytica*, ésta es la segunda causa de muerte por enfermedad parasitaria en el mundo superada solo por la malaria. Se estima que el 10% de la población mundial está infectada, y el 90% de estas personas son asintomáticas. Se presentan aproximadamente 50 millones de nuevos casos anuales que desarrollan amibiasis intestinal de los cuales 100,000 son fatales (Ravdin, 1995).

Se estima que el 10 % de individuos con colitis amibiana desarrolla absceso hepático amibiano. La amibiasis es de mayor prevalencia en países en desarrollo situados en los trópicos, sin embargo se ha observado un incremento en países desarrollados por personas que han viajado a los trópicos ("Amoebiasis and its control," 1985; Ravdin, 1995). *Entamoeba dispar*, una amiba morfológicamente similar a *E. histolytica* que también coloniza el intestino humano ha sido reconocida recientemente como una especie

diferente sin potencial invasivo, lo cual tiene grandes implicaciones en la epidemiología de la amibiasis, ya que la mayoría de las infecciones asintomáticas se atribuyen a esta amiba no invasiva (Clark, 1998; Espinosa-Cantellano and Martinez-Palomo, 2000).

México es considerado como un país endémico en cuanto a infecciones por amibas, en donde la infección por *E. histolytica* es un problema de salud pública serio. La incidencia para la amibiasis intestinal y el absceso hepático amibiano durante el año 2000 fue de 1,353.43 y 6.3 por 100,000 habitantes respectivamente, de acuerdo a reportes de la Secretaria de Salud del gobierno del Distrito Federal. (Ramos et al., 2005).

3. Ciclo de vida.

El ciclo de vida de *E. histolytica* incluye las formas de quiste y de trofozoíto. La forma invasiva de *E. histolytica*, el trofozoíto, tiene un tamaño de alrededor de 60 μm de diámetro, y dependiendo del microambiente intestinal, la movilidad y la formación de pseudópodos es rápida y unidireccional. Los trofozoítos viven en el lumen del intestino grueso donde se multiplican y se diferencian a quistes, la forma resistente para la transmisión de la infección, los cuales tienen alrededor de 8.5 a 19 μm de diámetro. Los quistes son excretados en las heces y pueden ser ingeridos por un nuevo hospedero vía alimentos o agua contaminada con estas formas infectantes.

Los quistes no pueden desarrollarse dentro de los tejidos, ya que el enquistamiento de los trofozoítos ocurre solamente en la luz del intestino grueso. Cada trofozoíto da lugar a un quiste con cuatro núcleos (como resultado de dos divisiones nucleares), los cuales pueden eliminarse por las heces que, a su vez, contaminan el agua o los alimentos y son ingeridos por otro huésped. Los trofozoítos tienen una vida corta fuera del cuerpo y no sobreviven durante el pasaje por el tracto intestinal, por lo cual no pueden transmitir la enfermedad. En contraste, los quistes pueden permanecer viables en un ambiente hostil y por lo tanto permanecer infectivos por varios días.

Los trofozoítos son comensales en el lumen del intestino, donde se multiplican por fisión celular y se diferencian a quistes, la forma resistente y

responsable de la transmisión de la infección. Una vez que los quistes son ingeridos por vía oral se desenquistan en el íleon terminal del intestino, donde dan lugar a ocho trofozoítos uninucleados potencialmente invasivos, los cuales pueden invadir la pared del intestino grueso y generar úlceras (amibiasis intestinal). La invasión puede extenderse a otros órganos como el hígado, pulmón y cerebro (amibiasis extra intestinal) (**Fig. 1**) (Bruckner, 1992; Espinosa-Cantellano and Martinez-Palomo, 2000).

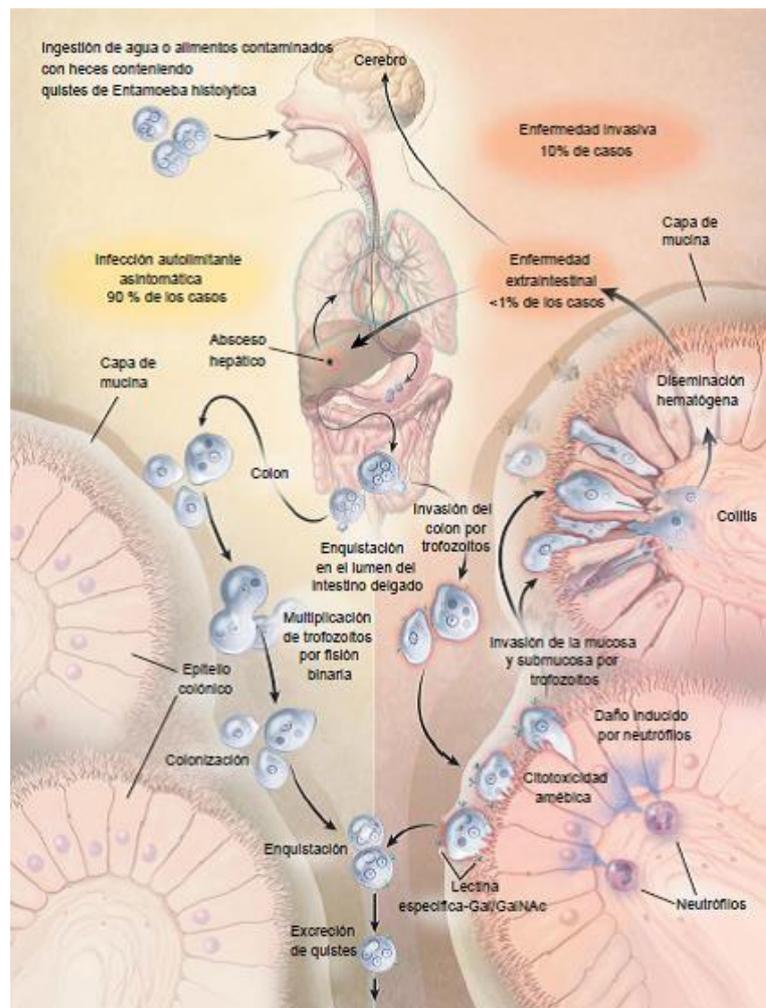


Figura 1. Ciclo de vida de *E. histolytica*. La infección normalmente inicia por la ingestión de alimentos o agua contaminados con materia fecal conteniendo los quistes de *E. histolytica*. El quiste la forma infectiva del parásito sobrevive el paso a través del estómago y del intestino delgado. El desenquistamiento ocurre en el lumen del intestino delgado, donde los trofozoítos la forma móvil y potencialmente invasiva son liberados. En la mayoría de las infecciones, los trofozoítos agregados en la capa de mucina del epitelio intestinal forman nuevos quistes, dando origen a una infección autolimitada y asintomática. En algunos otros casos, la adherencia y la lisis del epitelio del colon, mediado por la lectina específica de

galactosa y N-acetil-D-galactosamina, da origen a la invasión del colon por los trofozoítos. Los neutrófilos responden a la invasión contribuyendo al daño celular en el sitio de la invasión. Una vez que el epitelio es invadido, la invasión extraintestinal al peritoneo, hígado y otros puede estar acompañada. Otros factores que controlan la invasión, diferentes al enquistamiento, pueden incluir "quorum sensing" a través de la señal la lectina específica de Gal/GalNac las interacciones de la amiba con la flora bacteriana del intestino, y la respuesta inmune innata y adquirida del hospedero.

4. Factores de virulencia de *Entamoeba Histolytica*.

El primer paso en la invasión del intestino por *E. histolytica* es la unión de los trofozoítos a las células epiteliales del colón, en donde la principal molécula implicada en este proceso es una lectina específica de galactosa/N-acetilgalactosamina (**Fig. 2**). Por otra parte, se ha observado que el contacto entre los trofozoítos y proteínas de la matriz extracelular como es la fibronectina (FN), activa cascadas de señalización en donde intervienen la proteína cinasa C (PKC) y la proteína cinasa A (PKA) originando rearrreglos del citoesqueleto de actina lo que facilita la adhesión y la invasión (McLaughlin and Dixon, 1993).

E. histolytica tiene una gran capacidad citolítica pero las bases moleculares aún no se conocen por completo. Algunas moléculas efectoras importantes que confieren a *E. histolytica* su capacidad citolítica son los amebaporos, una familia de tres péptidos pequeños capaces de formar poros en las bicapas lipídicas de las células. Los amebaporos se encuentran dentro de gránulos citoplasmáticos y al haber contacto con la membrana de la célula blanco pueden exocitarse (Leippe et al., 1991).

Se ha observado en modelos animales de absceso hepático amibiano, que *E. histolytica* causa apoptosis de los hepatocitos, por lo que las células del epitelio humano también podría ocurrir este proceso. Se ha sugerido que las proteínas del amebaporo participen tanto en las vías líticas como apoptóticas (**Fig. 2**), ya que se ha observado que concentraciones sublíticas de las proteínas formadoras del amebaporo pueden inducir apoptosis en las células blanco (Berninghausen and Leippe, 1997; Huston et al., 2003).

Por otra parte, se ha observado que la interacción de los trofozoítos con células T origina alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular, la cual está asociada con la defosforilación de las proteínas de las uniones estrechas, como son ZO-2 y la pérdida de ZO-1. En la actualidad, se desconoce qué moléculas amibianas participan en este proceso, pero se ha observado que estos cambios son dependientes de contacto (Li et al., 1994; Samuel L. Stanley and Reed, 2001).

Las cisteína proteinasas liberadas por *E. histolytica* juegan un papel muy importante en la invasión e inflamación del intestino (**Fig. 2**), se han identificado 20 genes que codifican para cisteína proteasas, de los cuales de 6 a 8 se expresan en trofozoítos en cultivo (Bruchhaus et al., 2003). Estas proteasas son secretadas por los trofozoítos al medio, y *E. histolytica* a diferencia de *E. dispar* secreta de 10 a 1,000 veces más actividad de las cisteína proteasas (Reed et al., 1989). La mayoría de la actividad de estas proteasas se atribuye a: *EhCP1*, *EhCP2* y *EhCP5* (Bruchhaus et al., 1996). Estas cisteína proteasas pueden degradar componentes de la matriz extracelular e inducir cambios citopáticos en las células del huésped.

Las proteínas tirosina fosfatasa (PTPASas), juegan un papel importante en la virulencia de *E. histolytica*, ya que se les ha asociado con algunos procesos de relevancia en la colonización de la mucosa intestinal, llevando acabo la disrupción del citoesqueleto de actina de las células del hospedero y la desadherencia de las células HeLa en cultivo (Aguirre-García et al., 2003; Anaya-Ruiz et al., 2003).

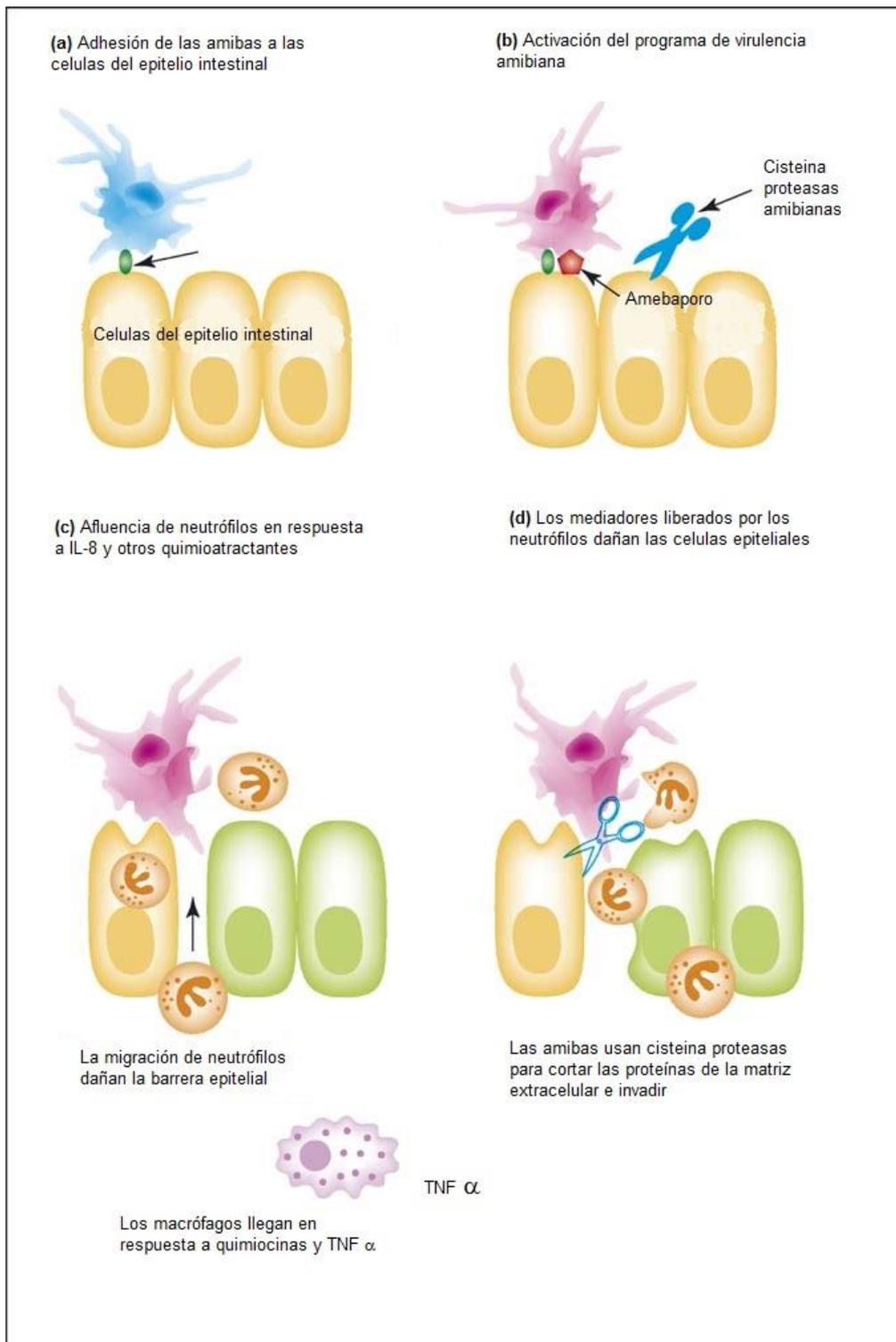


Figura 2. Modelo para el daño al tejido por *Entamoeba histolytica* en la colitis amibiana. (a) Los trofozoítos se adhieren a las células del epitelio intestinal y las lisan por citólisis mediada por contacto originando necrosis celular. Las células que mueren por necrosis lítica liberan IL-1 α . (b) Células del epitelio intestinal en contacto con trofozoítos podrían morir también por apoptosis, con liberación de IL-1 α . La IL-1 α puede activar células distales al sitio de infección a través del NF- κ B para producir más IL-1 α . Este proceso puede

ser facilitado por cisteína proteinasas (EhCPs), que pueden convertir precursores de IL-1 α a la IL-1 α madura. (c) Las citocinas y quimiocinas liberadas por las células epiteliales atraen macrófagos y neutrófilos al sitio de la infección. La trans migración de los neutrófilos a la superficie del lumen puede crear 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, causando la disrupción de las células epiteliales y la invasión de la submucosa. (d) Los mediadores liberados por lisis de neutrófilos causan más daño a las células del epitelio intestinal adyacente. Los macrófagos pueden liberar otros mediadores, como TNF- α , contribuyendo a la inflamación (Ackers and Mirelman, 2006).

5. Proteínas tirosina fosfatasas.

Las proteínas tirosina fosfatasas (PTPasas) son críticas en la regulación de la transducción de señales, ya que 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 y regulación de la dinámica del citoesqueleto, por lo que la desregulación en el balance entre la acción de PTKs y PTPasas se ha relacionado en el desarrollo de enfermedades humanas como autoinmunidad, diabetes y cáncer (Blume-Jensen and Hunter, 2001; Denu and Dixon, 1995; Meza, 2000).

Las PTPasas en el genoma humano se clasifican en PTPs basadas en cisteína clase I que incluyen las PTPs receptoras y no receptoras y de especificidad dual y algunas PTPs atípicas que pueden tener como sustratos ácidos nucleicos; PTPs basadas en cisteína clase II, incluye las PTPs de bajo peso molecular y PTPs basadas en cisteína, y la clase III que incluye PTPs de actividad dual (**Fig. 3**) (Alonso et al., 2004).

Definidas por su motivo C(X)5R, las PTPasas pueden ser divididas en dos categorías principales: las PTPs clásicas específicas de tirosina que comparten el motivo "(I/V)HCSxGxGR(S/T)G" del sitio activo, donde x puede ser cualquier aminoácido y las fosfatasas específicas duales (DSPs), las cuales pueden llevar a cabo la desfosforilación de residuos de tirosina, serina y treonina, así como desfosforilar RNA y lípidos (Andersen et al., 2004). Los

experimentos en los que se muta o modifica químicamente el residuo de cisteína del sitio activo, indican que este residuo es esencial para la actividad enzimática de las PTPasas, lo que muestra que todas las PTPasas emplean un mecanismo catalítico común (Andersen et al., 2004; Zhang et al., 1994).

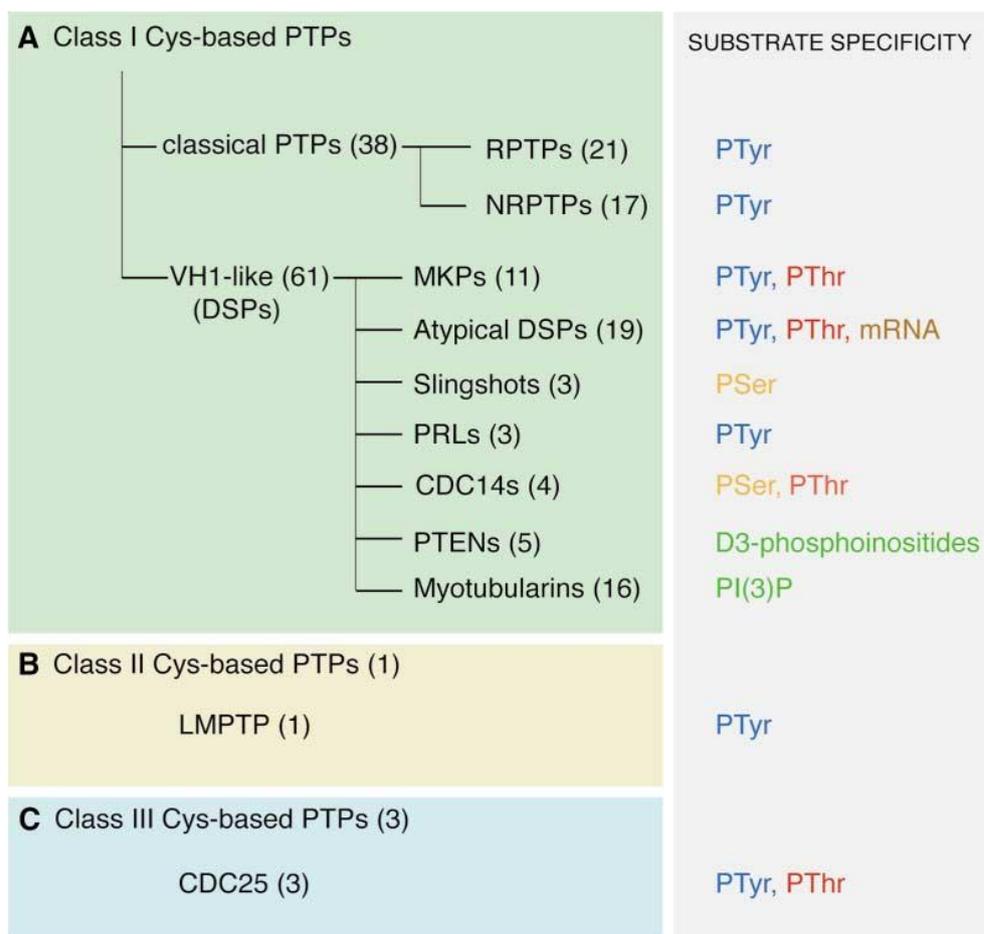


Figura 3. Clasificación de PTPs presentes en el genoma humano. Clasificación de PTPs basadas en cisteína clase I (verde), PTPs basadas en cisteína clase II (amarillo claro) y PTPs basadas en cisteína, clase III (azul pálido). La especificidad de sustrato de cada grupo o clase de PTPasas se muestra a la derecha. Tomado de la referencia (Alonso et al., 2004).

5.1. PTPasas transmembranales, tipo receptor (RPTPasas).

Las PTPasas tipo receptor (RPTPs) tienen un dominio extracelular, una única secuencia transmembranal y generalmente dos dominios PTPasa

citoplásmicos. Algunos miembros de esta familia incluyen CD45 y LAR. Este tipo de PTPasas muestra una gran divergencia en la estructura de su dominio extracelular N-terminal (Gebbink et al., 1993).

Los RPTPs son de particular interés debido a que algunos dominios extracelulares son similares a aquéllos de las moléculas de adhesión celular (CAMs), lo que sugiere que este tipo de PTPasas pueden tener funciones en el desarrollo similares a las CAMs. El dominio extracelular parecido al de las moléculas de adhesión incluye dominios de inmunoglobulinas, y repetidos de FN tipo III. Otro motivo del dominio extracelular es el parecido a la anhidrasa carbónica, y además poseen dominios altamente glicosilados. La presencia de distintos dominios extracelulares en los RPTPs implica la existencia de ligandos específicos para cada subfamilia de RPTPs (Ensslen-Craig and Brady-Kalnay, 2004).

5.2. PTPasas no transmembranales (NRPTPasas).

Las PTPasas no transmembranales (citoplásmicas) o intracelulares tienen un solo dominio catalítico, y la secuencia de aminoácidos fuera de éste dominio es muy divergente. Una de las funciones principales de las secuencias que flanquean al dominio catalítico parece estar implicado en la localización intracelular específica (Mauro and Dixon, 1994). Las PTPasas se han localizado en lugares específicos de las membranas en la célula (v.g. 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, y otras PTPasas tienen estructuras que sugieren que forman parte de la arquitectura del citoesqueleto celular (Bölin and Wolf-Watz, 1988).

Un ejemplo de cómo estas secuencias blanco gobiernan la localización, y probablemente también definen la especificidad de sustrato de las PTPasas, fue descrito por McLaughlin y Dixon en 1993. Existe una PTP de *Drosophila* que tiene dos distintas localizaciones intracelulares debido a que su gen es procesado por “splicing” alternativo (McLaughlin and Dixon, 1993);

específicamente en la región 3' del mensajero. Esto resulta en la producción de dos transcritos de RNA que codifican para proteínas con diferentes extremos carboxilos terminales. El extremo 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 una secuencia de 11 aminoácidos hidrofílicos con características de 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 orgánulos tipo mitocondrias, a diferencia de p61/62n localizada únicamente en el núcleo. El análisis cinético de las PTPasas asociadas a membranas o a núcleo no revela 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 subcelular. La PTPasa nuclear es particularmente interesante ya que podría funcionar regulando la transcripción de genes por la modulación de factores de transcripción fosforilados en tirosina, o también podría funcionar en la regulación del ciclo celular (David et al., 1993).

Un subtipo de PTPasas intracelulares identificadas en *C. elegans*, *Drosophila* y mamíferos contienen dominios SH2, los cuales se unen a proteínas de señalización fosforiladas en tirosina. Varias PTPasas como RPTP LAR (antígeno relacionado a leucocitos), la PTPasa citosólica SHP2 y PTP1B se han relacionado con la desfosforilación del receptor para insulina, en donde se ha comprobado que la PTP1B juega un papel importante en la regulación de la señalización de este receptor. Por otra parte, PTP1B activa a la proteína oncogénica c-Src por desfosforilación de su inhibidor, y en varias líneas celulares de cáncer de mama se ha identificado a PTP1B como la principal PTPasa capaz de desfosforilar y activar a c-Src indicando que la proteína PTP1B funciona en varias vías de señalación (Zhan et al., 2001).

5.3. PTPasas específicas duales (DSPs).

Las fosfatasas con actividad dual (DSPs) ejercen su actividad catalítica sobre residuos fosforilados de Y/S/T, RNA, o lípidos *in vitro*. El modelo de esta subfamilia es la proteína VH1 identificada en el virus vaccina, de tal manera que las PTPasas que contienen un dominio catalítico parecido a VH1 se han clasificado en este grupo, las PTPasas con esta actividad se han identificado en levaduras y mamíferos (Jackson and Denu, 2001; Zhan et al., 2001).

Las fosfatasas con actividad dual y las proteínas tirosina fosfatasas clásicas comparten la secuencia motivo del sitio catalítico HCXXGXXRS(T), sin embargo la similitud fuera de esta región es limitada. Algunas fosfatasas con actividad dual incluyen a PAC1 y MKP1, las cuales actúan sobre proteínas cinasas activadas por mitógenos (ERK-1 o MAPK) desfosforilando los residuos críticos T-183 y Y-185 respectivamente para que la célula entre en mitosis (Denu and Dixon, 1995).

5.4. PTPasas de bajo peso molecular (LMWPs).

Varias proteínas fosfatasas de bajo peso molecular (LMWPs) han sido aisladas y su estructura tridimensional incluyendo las de levaduras y humano ha sido resuelta (Andersen et al., 2004). Aunque su función no ha sido bien definida, se ha comprobado que defosforilan sustratos fosforilados en tirosina (Zhang, 1998), y se ha comprobado que la sobreexpresión de una LMWP en el hígado de bovinos en células normales y transformadas inhibe la proliferación celular (Jackson and Denu, 2001).

Con la excepción de la secuencia del sitio catalítico C(X)5R(S/T), las LMWPs no comparten homología con otras PTPasas. Inicialmente se creía que no habría similitud del sitio catalítico de las PTPasas con el de las LMWPs debido a que el motivo compartido por las PTPasas se encuentra en el extremo C-terminal, mientras que la secuencia CX5RS en las LMWPs se encuentra inmediatamente después del N-terminal. Al igual que las PTPs, las LMWPs contienen un residuo de aspartato conservado el cual se requiere para su actividad (Barford, 1995).

6. Mecanismo catalítico de las PTPs.

El mecanismo de catálisis de las PTPasas comprende dos pasos esenciales, el primero da origen a la formación de un intermediario enzima–fosfato y la liberación del producto vía ataque nucleofílico del anión tiolato de la cisteína catalítica, el segundo paso enzimático requiere la hidrólisis del intermediario enzima–fosfato para generar fosfato inorgánico y la enzima regenerada (Jackson and Denu, 2001; Zhan et al., 2001) (**Fig. 4**).

Se ha comprobado que los residuos conservados de cisteína son esenciales en todas las familias de PTPasas, el valor de pK_a de una cisteína típica en un péptido o proteína es aproximadamente 8.5, sin embargo el pK_a de la cisteína del sitio activo de las PTPasas tiene un pK_a muy bajo desde 4.7 reportada en la PTP de *Yersinia* a 5.5 en VHR. El valor bajo de pK_a de la cisteína del sitio catalítico asegura que ésta este desprotonada en condiciones fisiológicas a la forma tiolato (Guan and Dixon, 1991).

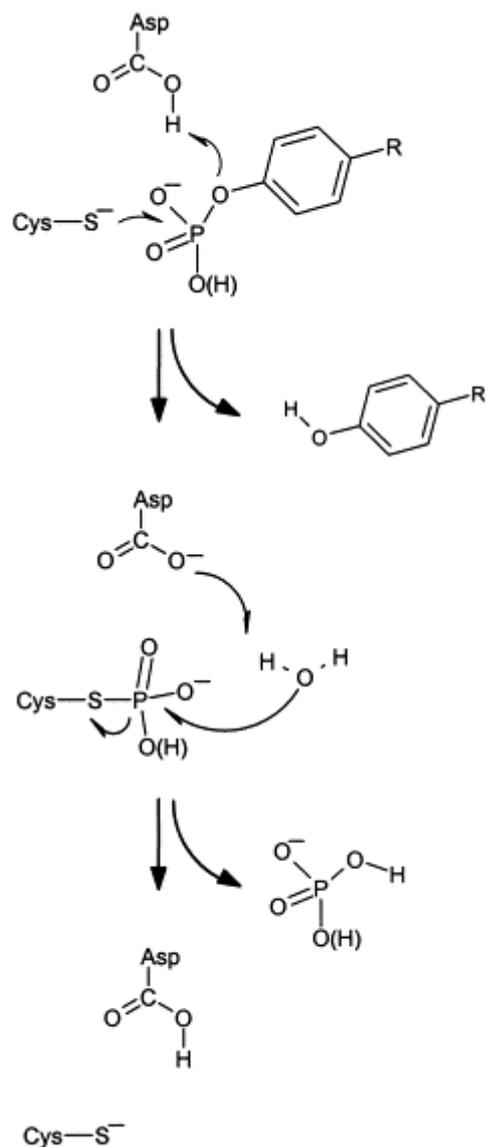


Figura 4. Mecanismo catalítico sugerido para las proteínas tirosinas fosfatasas. El primer paso en el mecanismo catalítico inicia por el ataque nucleofílico de la C del sitio activo sobre el átomo de fósforo del sustrato unido, al mismo tiempo el D que funciona como ácido general, dona su protón al grupo oxígeno saliente, el estado intermedio fosfoenzima es hidrolizado por una molécula de agua en una segunda reacción de desplazamiento, dándose lugar a la restructuración de la enzima y la liberación de fosfato inorgánico (Kolmodin and Åqvist, 2001).

En la unión al sustrato se forman varias interacciones iónicas entre los residuos fosfato y el sitio activo. El residuo de arginina conservado en el sitio activo interacciona con dos átomos de oxígeno del grupo fosforil; si este residuo de arginina es remplazado con lisina o alanina, estas interacciones no ocurren y la K_m se incrementa 30 veces y la K_{cat} disminuye aproximadamente 8,000 veces. Después de la unión del sustrato, la cisteína tiolato lleva a cabo un ataque nucleofílico sobre residuos de Y-P, S-P o T-P formando un intermediario tiol-fosfato y productos desfosforados. El residuo de cisteína conservado se localiza en la base del sitio activo y se posiciona exactamente debajo del grupo fosfato de los sustratos. Los sustratos se localizan de tal manera que el ataque nucleofílico por la cisteína tiolato está en línea con el enlace del grupo fosfato P-O, lo cual permite la oportuna expulsión del grupo saliente desde el sitio activo (Jackson and Denu, 2001).

7. Importancia biológica de las PTPs.

La fosforilación en tirosina de diversas proteínas es una modificación postraduccional común con lo cual se crean nuevos motivos de reconocimiento para interacciones proteína-proteína, localización celular, y control de la estabilidad de la proteína, entre otras funciones (Zhang, 2005). Comparado a la fosforilación en general, la que ocurre en tirosina es utilizada ampliamente en eucariontes multicelulares (Alonso et al., 2004). En el medio celular, los niveles de fosforilación de proteínas son controlados dinámicamente por las proteínas tirosina cinasas, las cuales catalizan la adición de grupos fosfatos a residuos de tirosina, y las proteínas tirosina fosfatasas las cuales catalizan la eliminación de grupos fosforil.

Bajo condiciones normales un balance apropiado de la actividad entre PTKs y PTPasas es responsable de diversos procesos fisiológicos como son crecimiento celular, diferenciación, metabolismo, progresión del ciclo celular, comunicación celular, transcripción de genes, actividad de canales iónicos, respuesta inmune y apoptosis (Hunter, 1998; Zhang, 2005). Por otro lado, la desregulación de la actividad de las PTPasas en eventos de diferenciación, crecimiento celular, movilidad y proliferación, puede llevar a una señalización aberrante que a su vez conduce al desarrollo de varias enfermedades en el

humano como cáncer, diabetes, inflamación, autoinmunidad, y enfermedades infecciosas. En consecuencia la modulación de la actividad de las PTPs influye directamente en las vías de señalización celular (Dubé and Tremblay, 2005).

El balance en los niveles de fosforilación en tirosina se afecta en células transformadas y en desórdenes metabólicos, debido a la actividad desregulada de las PTKs como son *src*, *lck*, y *neu* las cuales pueden funcionar como oncogenes. Se cree que por lo menos alguna PTPasa funciona como supresor de proteínas oncogénicas, como es el caso de la fosfatasa PTEN y MMAC1 que se han encontrado mutadas en varios tipos de cáncer como el de mama, de cerebro, y próstata. Mutaciones de los genes *PTEN/MMAC1* en líneas germinales se han relacionado a un síndrome de cáncer autosómico dominante, al síndrome de Cowden que está asociado con lesiones benignas de la piel, mama y tiroides (Cantley and Neel, 1999; Zhang, 1998).

El antígeno común de leucocitos CD45 es un receptor transmembranal (RPTP) que se expresa exclusivamente en células hematopoyéticas, y juega un papel positivo en la señalización de las células T y B. Se ha visto que ratones knockout en CD45 están severamente inmunocomprometidos, y presentan un desarrollo deficiente de timocitos y una respuesta reducida de células B. Esto resalta la importancia de CD45 en la regulación de la señalización de receptores de antígenos (Byth et al., 1996).

La diabetes tipo 2 es el desorden metabólico más común en el mundo. Un mecanismo importante en la regulación de la señalización por la insulina es mediado por las PTPs, ya sea actuando sobre los receptores de insulina o sobre sus sustratos (Dubé and Tremblay, 2005). De esta forma las PTPasas se han relacionado en la regulación negativa de la señalización por insulina, y se ha especulado que el incremento de la actividad de miembros de esta familia puede contribuir a la resistencia a la insulina. La fosfatasa PTP1B se ha relacionado directamente con esta enfermedad (Andersen et al., 2004).

8. Mecanismo de regulación para las proteínas tirosina fosfatasas.

En general, la actividad de PTP no es dependiente de las modificaciones post-traduccionales como acetilación, metilación, o fosforilación,

entre otras, porque la mayoría de las PTPs recombinantes expresadas y purificadas en bacterias conservan una alta eficiencia catalítica. La actividad fosfatasa de las PTPs depende de por lo menos tres mecanismos reguladores: la regulación por interacciones intramoleculares o intermoleculares, oxidación del residuo de cisteína en el sitio catalítico y la fosforilación de los residuos de tirosina en las fosfatasas (Jackson and Denu, 2001).

8.1. Regulación por interacciones intra e intermoleculares.

La proteína MKP-3 es una PTPasa de especificidad dual que muestra un alto grado de selectividad para ERKs sobre otros cinasas tales como cinasa c-jun NH2-terminal/proteína cinasa activada por estrés (JNK/SAPK) o la cinasa MAP p38. Se ha demostrado que MKP-3 puede ser activada por la unión a ERK2 a su dominio no catalítico. La estructura de cristalografía de rayos X del dominio catalítico de Pyst1 (MKP-3) reveló una estructura similar a la de VHR. Sorprendentemente, el motivo del ácido general fue volteado 20 Å fuera de la hendidura del sitio activo (Stewart et al., 1999).

Con base en la cristalografía de rayos X del dominio catalítico D1 de RPTP α se ha propuesto un mecanismo de regulación. RPTP α presenta en el motivo N-terminal un hélice-vuelta-hélice que puede ser insertada en el sitio activo D1, observación que llevó a Bilwes y cols a proponer que la dimerización del dominio catalítico D1 en RPTP α puede ser un método de regulación y también pudiera ser extrapolado a otras RPTPs (Bilwes et al., 1996). La importancia fisiológica de dimerización se ha apoyado en estudios con la RPTPasa CD45, la cual es requerida para la señalización de las células B y T. Una quimera que contiene la región intracelular de CD45 y el dominio extracelular del receptor EGF fue introducida en células que carecen de función CD45. La actividad de la enzima quimera EGF-CD45 expresada en una línea celular T fue inhibida por dimerización inducida por EGF resultando en la inhibición de la señalización de las células T (Majeti et al., 1998).

Aunque las interacción entre los dominios de D1/D2 de muchas RPTPs puede ayudar a regular la actividad de tirosina fosfatasa, el descubrimiento de pleiotropismo de PTN, como un ligando regulador *in vitro* e *in vivo* de RPTP β , ha complicado entender cómo son reguladas las RPTPs. PTN es una citocina

de unión a heparina de 18 kDa que señala una variedad de fenotipos diferentes en las células, que van desde diferenciación hasta crecimiento. A este respecto se demostró que la sobreunión de PTN a RPTP β reduce la actividad catalítica de fosfatasa resultando en el incremento de los niveles de proteína β -catenina fosforilada (Meng et al., 2000).

8.2. Regulación oxidativa del sitio catalítico.

Los agentes oxidantes juegan un papel importante en muchos procesos biológicos, incluyendo la regulación de las funciones de factores de crecimiento y vías de traducción dependiente de fosforilación, y se ha propuesto que algunos de estos efectos inducen la inhibición de PTPs, ya que evidencias confirman que las PTPs son reguladas oxidativamente *in vivo* (Suzuki et al., 1997).

Se ha demostrado que la sobreunión de receptores de superficie celular induce un aumento en las concentraciones intracelulares de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en células de mamíferos. A este respecto, se ha demostrado que el EGF induce la formación de H_2O_2 afectando la actividad de la PTP1B en células de carcinoma epidermal A431 (Bae et al., 1997). Otras evidencias que apoyan la propuesta de que las PTPs pueden ser reguladas a través de mecanismos redox fueron observadas usando LAR, PTP1 y VHR, encontrando que estas fosfatasas son sensibles a la inhibición por H_2O_2 , y que la actividad puede ser revertida por la adición de agentes reductores como el DTT (Denu and Tanner, 1998).

8.3. Regulación por fosforilación.

La regulación de procesos celulares es muy compleja y puede involucrar varios mecanismos. Uno de los más comunes, es a través de la fosforilación/desfosforilación de sus componentes. La mayoría de las PTPs actúan sobre enzimas reguladoras que controlan eventos celulares importantes. La defosforilación de ERK2 por MKP-3, por ejemplo, resulta en la pérdida de actividad de cinasa y de los eventos de señalización celular.

Paradójicamente, algunos de los PTPs son fosforiladas. Algunos reportes han identificado la fosforilación de la PTP CD45 en células T como un evento que puede regular su actividad (Wilson and Kaczmarek, 1993).

Uno de los mejores ejemplos en los que se ha estudiado la fosforilación de las PTPs es en las fosfatasa de especificidad dual como Cdc25A, Cdc25B y Cdc25C que participan en la regulación del ciclo celular. Se ha demostrado que la fosforilación de Cdc25A en la fase S del ciclo celular es dependiente de la actividad del complejo cinasa Cdk2/ciclina E, lo cual resulta en un aumento de 2 a 3 veces en la fosforilación de Cdc2A. La fosforilación de Cdc25C es requerida para la defosforilación y activación subsiguiente del complejo Cdc2/ciclina B dentro de la fase M del ciclo celular. Además, la fosforilación de Cdc25C por Cdc2/ciclina B resulta en un aumento 4-5 veces en la actividad de fosfatasa. Interesantemente Cdc25B también es fosforilada, pero no se observó un incremento en su actividad enzimática ni tampoco su participación con los complejos de Cdc2/ciclina como se observó con Cdc25A y Cdc25C. No está claro si la fosforilación permite una mayor estabilidad a la enzima o si la protege de la degradación de proteasas (Baldin et al., 1997).

La fosfatasa PTP-1B también requiere de fosforilación. La PTP-1B contiene tres sitios de fosforilación en serina (352, 378 y 386), que dependen de la actividad de diferentes cinasas (Shifrin et al., 1997), los cuales son fosforilados durante la transición de la fase G2 a M del ciclo celular (Flint et al., 1993). Otro sitio de fosforilación (S-50), que depende de las cinasas de especificidad dual CLK1 y CLK2, es importante para la actividad enzimática, ya que su fosforilación resulta en un aumento de 3-5 veces su actividad (Moeslein et al., 1999).

Se ha mostrado que PTP-1B desfosforila varias proteínas en respuesta a la insulina a través de la formación de un complejo con el receptor de la hormona. Esta interacción depende de la fosforilación de residuos de Y-66 y Y-152/153, ya que mutaciones en estos residuos reducen sustancialmente los niveles de PTP-1B fosforilada así como la interacción con el receptor (Liu and Chernoff, 1997).

9. PTPasas y señalización.

Uno de los mecanismos más comunes de regulación de procesos celulares es a través de fosforilación/desfosforilación, lo cual altera a las proteínas blanco por la inducción de cambios conformacionales, creando sitios de unión para otras proteínas y causando relocalización subcelular. La mayoría de las PTPs actúan sobre enzimas reguladoras que controlan eventos celulares importantes. La desfosforilación de ERK2 por MKP-3, por ejemplo, resulta en la pérdida de actividad de cinasa y terminación de los eventos de señalización celular. Algunas fosfatasas con actividad dual incluyen a PAC1 y MKP1, las cuales actúan sobre proteínas cinasas activadas por mitógenos (ERK-1 o MAPK) desfosforilando los residuos críticos T-183 y Y 185 respectivamente para que la célula entre en mitosis (Denu and Dixon, 1995).

PTP20, una PTPasa citoplásmica de células granulosas de ovario de rata, se une a proteínas como csk, c-Abl, y otras cinasas relacionadas a Src, que son proteínas que participan en la reorganización del citoesqueleto (Tatosyan and Mizenina, 2000; Van Etten, 1999); sin embargo, PTP20 induce la reorganización del citoesqueleto de actina por desfosforilación de p190 RhoGAP (Shiota et al., 2003).

Por otra parte, las interacciones entre las células y los componentes de la matriz extracelular son esenciales para el mantenimiento de la diferenciación celular, sobrevivencia y movilidad. Estas interacciones son gobernadas por las integrinas que son proteínas heterodiméricas transmembranales que pueden unir a múltiples moléculas extracelulares y pueden nuclear estructuras de adhesión conocidas como adhesiones focales (Parsons, 2003; Schwartz, 2001). La unión de las integrinas conduce a la autofosforilación de la cinasa de adhesión focal (FAK), la activación de la proteína tirosina cinasa (PTK) pp60^{src} conduciendo a una cascada de fosforilaciones en tirosina río abajo (Schaller et al., 1994). Para la desunión y migración celular, la fosforilación de los componentes de las adhesiones focales debe ser reversible (Schwarzbauer, 1997). Esta acción es realizada por las PTPs, por mencionar un ejemplo, fibroblastos deficientes en PTP-PEST presentan un incremento en el número de adhesiones focales, incrementándose la fosforilación de p130cas, paxilina, FAK y presentando defectos en la movilidad celular (Angers-Loustau et al.,

1999), por tanto PTP-PEST participa en la regulación de la formación de adhesiones focales.

10. PTPasas y microorganismos.

La interferencia en la maquinaria de señalización es una estrategia usada por diferentes organismos tales como *Yersinia*, *Leishmania* y *Mycobacterium* sp, como una forma de evadir o inhibir los mecanismos celulares de defensa del hospedero (Teixeira & Mann, 2002). Estos patógenos tienen en común la habilidad para modular eventos de fosforilación en tirosina por la secreción o activación de PTPasas (Bliska et al., 1991; Dixon, 1996).

Las PTPasas encontradas en bacterias pertenecen a dos familias de enzimas. La primera familia incluye PTPasas convencionales parecidas a las eucarióticas y fosfatasa con especificidad dual. La segunda familia comprende enzimas acídicas pequeñas denominadas PTPasas de bajo peso molecular las cuales se encuentran tanto en organismos eucarióticos como procarióticos (Cozzone et al., 2004).

Estudios recientes indican que las PTPs pueden estar relacionadas con la patogénesis de infecciones intracelulares, por ejemplo, la exposición de macrófagos a *Yersinia pseudotuberculosis*, provoca defosforilación de proteínas celulares interrumpiendo el proceso de fagocitosis por los macrófagos (Bliska et al., 1993). Este efecto se le ha atribuido a la PTPasa YopH de *Y. pseudotuberculosis* que inhibe la fagocitosis a través de la desestabilización de las fibras de actina.

La PTPasa YopH de *Yersinia* fue identificada por investigación en la base de datos y se encontró que tiene un dominio similar al de las PTPasas de mamíferos (Guan and Dixon, 1990). Ya que no se han identificado proteínas fosforiladas en tirosina en un gran número de bacterias, es posible que la PTPasa de *Yersinia* (codificada por el gen *yopH*) esté involucrada en la virulencia de la bacteria, ya que el gen *yopH* es requerido para la patogénesis bacteriana (Bölin and Wolf-Watz, 1988). La proteína *yopH* se expresa en las tres especies del genero *Yersinia*: *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* y *Y. pestis*, el agente causante de la plaga bubónica, el cual tiene la PTPasa más reactiva descrita a la fecha, lo que sugiere que la PTPasa participa activamente

en el proceso de la enfermedad (Bölin and Wolf-Watz, 1988; Guan and Dixon, 1990). Esta observación ha sido apoyada por experimentos en los cuales mutaciones en el sitio activo donde se localiza la cisteína eliminan en la enzima toda la actividad catalítica. (Guan and Dixon, 1991), lo cual genera una cepa de *Y. pseudotuberculosis* no virulenta (Bliska et al., 1991). Estas observaciones demuestran que las bacterias patógenas tienen PTPasas y que las fosfatasas activas son determinantes para el efecto patogénico en la bacteria *Yersinia*.

Leishmania donovani tiene el potencial para influir en el estado de fosforilación de proteínas celulares, algunas de las cuales participan en los mecanismos de defensa del hospedero, lo que puede favorecer la sobrevivencia del parásito en el medio hostil del macrófago (Nandan and Reiner, 2005). La fosforilación de proteínas en células eucariotas se regula por las PTKs y las PTPasas, de manera que *Leishmania* y otros patógenos intracelulares pueden afectar el estado de fosforilación de proteínas celulares por influencia sobre la actividad o localización subcelular de las cinasas o fosfatasas celulares o ambas (Cozzone et al., 2004; Nandan and Reiner, 2005).

11. Fosfatasas y *Entamoeba histolytica*.

La modulación de las vías de señalización basadas en la fosforilación en tirosina representa un mecanismo importante por el cual los patógenos pueden interferir en los procesos biológicos de las células del hospedero. Se ha demostrado que *E. histolytica* induce la rápida desfosforilación de proteínas en células CHO y Jurkat (Teixeira and Mann, 2002). La defosforilación inducida por *E. histolytica* requiere de contacto entre la amiba y la célula huésped mediada por la lectina Gal/GalNAc y algunos otros receptores (Flores-Robles et al., 2003). El influjo de calcio intracelular después del contacto de la amiba con la célula blanco puede disparar la desfosforilación en la célula blanco (Teixeira and Mann, 2002).

En la actualidad algunos estudios se han enfocado en el papel que juegan las fosfatasas ácidas (APs) en la patogénesis, demostrando que las APs son esenciales para la sobrevivencia de parásitos como *Leishmania*

donovani y *Legionella micdadei*. Diferentes reportes en *Leishmania* sp describen dos tipos de APs, una que es secretada al medio de cultivo (SAP) y una que se encuentra unida a la membrana (MAP) ambas con diferencias en peso molecular y propiedades bioquímicas (Lovelace et al., 1986) (52). Por su parte *E. histolytica* posee actividades tanto de SAP como de MAP al igual que *E. dispar*, la cual posee la actividad pero es incapaz de secretarla. Esto sugiere que las APs pueden ser un factor importante del mecanismo patogénico de este parásito (Aguirre-García et al., 2000).

Otros estudios han demostrado que la fosfatasa ácida secretada (SAP) por *E. histolytica* posee actividad de PTPasa, la cual tiene un efecto de disrupción de las fibras de actina del citoesqueleto de células HeLa, indicando, que la PTP secretada puede tener un papel citotóxico durante la infección por *E. histolytica* (Anaya-Ruiz et al., 2003; Talamás-Rohana and Meza, 1988).

En el laboratorio se han clonado los genes para las PTPasas *EhPTPA* y *EhPTPB* las cuales carecen de alguna secuencia transmembranal. Tanto la *EhPTPA* como la *EhPTPB* ya han sido expresadas, y se ha comprobado su actividad de PTPasa *in vitro*, esta actividad fue inhibida por orto-vanadato (1-5 mM), inhibidor específico de las PTPasas, y por extractos de *Chenopodium ambrosioides*, una planta utilizada para el tratamiento de parásitos intestinales. Estos extractos también inhibieron el crecimiento de los trofozoítos. De acuerdo a los resultados encontrados, se ha propuesto que la *EhPTPA* puede ser un gene de respuesta a estrés o un gen temprano de respuesta adaptativa expresado por los trofozoítos de *E. histolytica* durante el desarrollo de absceso hepático amibiano (ALA) (Herrera-Rodríguez et al., 2006); también se encontró que tanto la *EhPTPA* como *EhPTPB* se localizan en la superficie y en el citoplasma del parásito, al parecer la *EhPTPA* no participa en la reestructuración del citoesqueleto de actina sin embargo la participación de *EhPTPB* aún no ha sido evaluada.

En el grupo de trabajo, por medio de la técnica de Far-western blot se identificaron posibles sustratos de *EhPTPA*, de pesos moleculares que van desde 164, 75, 52, 48, 44.5, 30, 28, 27.5, y 18 kDa. En este sentido y para entender mejor la participación de estas PTPasas en la biología de la amiba, es necesario el uso de técnicas que nos permitan aislar e identificar los sustratos

de estas PTPasas. Para lograr esto, se ha utilizado ampliamente la técnica de generación de mutantes de estas proteínas, en el sitio catalítico, lo cual ha sido una herramienta muy útil para entender la participación de estas enzimas en los procesos biológicos.

12. Especificidad de las PTPs por su sustrato.

Las PTPasas clásicas son específicas para proteínas que contienen p-Y, por lo que son incapaces de desfosforilar proteínas que contienen p-S y p-T. Los aminoácidos p-Y localizados hacia el N y C-terminal confieren afinidad adicional; por ejemplo PTP1B, muestra una preferencia por residuos ácidos hacia el extremo N-terminal que preceden el residuo p-Y y para el extremo C-terminal residuos hidrófobos (Barford et al., 1998). La base molecular para la especificidad de sustrato, es el resultado de las dimensiones de la hendidura del sitio catalítico, que mide aproximadamente 9 Å en la base, donde la C nucleofílica está colocada en la entrada de esta hendidura. Un componente estructural clave en la hendidura catalítica lo proporciona el “loop” de reconocimiento de p-Y, formado por una secuencia conservada KNR_Y (residuos 43-46 de PTP1B). El residuo Y de este motivo se empalma contra los anillos fenil de la p-Y del sustrato y es crítico en la definición de la profundidad de la hendidura de sitio catalítico (Tonks et al., 1988).

Otros residuos no polares presentes dentro del loop de reconocimiento p-Y, se encuentran en la secuencia WPD. Un residuo de D presente dentro del loop de reconocimiento forma puentes de hidrógeno con grupos amino de la cadena principal. Esto induce al residuo p-Y a adoptar una conformación helicoidal y entrar en la hendidura de sitio catalítico.

Los residuos ácidos presentes en NH₂-pTyr del sustrato interactúan con residuos básicos sobre la superficie de la PTPasa, aumentando la preferencia de esta enzima para péptidos con residuos ácidos en estas posiciones. La importancia de la profundidad en la hendidura del sitio catalítico como un determinante en la especificidad de sustrato fue demostrada para la PTPasa de *Yersinia* la cual es capaz de desfosforilar fosfatos alifáticos unidos a péptidos (Dunn et al., 1996).

13. Identificación de sustratos de las PTPasas.

Las proteínas tirosina fosfatasas son reguladores esenciales de la mayoría de los procesos de transducción de señales, por lo que la identificación de sustratos de proteínas tirosina fosfatasas (PTPs) es esencial para entender la función fisiológica de los miembros de esta familia.

Experimentalmente, las mutantes más utilizadas para atrapar sustratos, han sido aquéllas en las cuales la cisteína del sitio catalítico es cambiada por una serina (C/S) sin afectar la unión de la PTPasa mutante al sustrato fisiológico, pero bloqueando la catálisis del complejo formado y estabilizando la interacción E-S. (Xie et al., 2002), o aquellas mutantes en las cuales el ácido aspártico del loop WPD se cambia por alanina (D/A) (D187 en PTP1B) que la convierten en una enzima muy activa para atrapar sustratos.

Agazie y Hayman (2003) encontraron que la mutante SHP2-D/A (SHP2-D425A) permanece ligeramente activa siendo una mala mutante para atrapar sustratos. Por consiguiente desarrollaron una doble mutante para atrapar sustratos, combinando las mutaciones C/S y D/A en una misma proteína. La doble mutación aumentó la sensibilidad para atrapar sustratos, comparado con la mutación sencilla C/S. Sin embargo, la doble mutación en PTP1B-C/S-D/A resulta en una mala mutante para atrapar sustrato, ya que no se une a las proteínas fosforiladas comparada con la mutación sencilla de PTP1B-D/A (Xie et al., 2002).

Estos resultados sugieren que la doble mutante pudiera ser útil sólo para aumentar la capacidad para atrapar sustrato, y en el caso de las mutantes D/A, ésta no es mejor que la mutante C/S. Debido a lo anterior, las PTP doble mutantes (C/S-D/A) deben ser evaluadas para confirmar sus ventajas para atrapar sustrato (Kolli et al., 2004a).

Cuando el sustrato se encuentra en pequeñas cantidades, se debe mejorar la capacidad de atrapar sustratos. Para este propósito, se han diseñado mutantes dobles (D/A-Q/A). La glutamina altamente conservada en el sitio activo en PTP1B (Q262) participa en la catálisis a través de la estabilización de la molécula de agua (con el ácido aspártico del loop WPD) que ataca al intermediario C-PO₃, liberando fosfato libre y reactivando a la enzima. La mutación sencilla Q262A ha sido usada para obtener una estructura

de cristalografía del intermediario enzima-fosfato (Pannifer et al., 1998). Sin embargo, con esta mutante no se logró identificar algún sustrato, probablemente porque esta mutante todavía retiene su actividad en cierto grado. No obstante, la doble mutante (D181A/Q262A en PTP1B) mostró un aumento de seis a ocho veces en la capacidad para unirse al sustrato comparada con las mutaciones sencillas D/A y C/S, convirtiéndola en mejor mutante para atrapar sustrato. De esta forma, nuevos sustratos potenciales de PTP1B fueron detectados usando la doble mutante de PTP1B-D181A/Q262A. (Kolli et al., 2004a).

II) Justificación

En el ambiente celular, diversos procesos son regulados por enzimas tirosina cinasas y tirosina fosfatasas, por lo que, un desequilibrio en las actividades enzimáticas responsables de la fosforilación o la desfosforilación en tirosina trae como consecuencia la alteración de procesos como diferenciación, proliferación, migración, fagocitosis, desordenes metabólicos por mencionar algunos.

Se ha comprobado, que diversos organismos patógenos alteran el equilibrio de los niveles de fosforilación, principalmente de proteínas fosforiladas en tirosina como es el caso de *Yersinia pseudotuberculosis*, *Leishmania donovani*, *Mycobacterium* sp, *Legionella micdadei*, entre otros, esto hace importante el estudio de las PTPasas.

En *Entamoeba histolytica* se han identificado los genes *EhPTPA* y *EhPTPB*, que codifican para las proteínas con los mismos nombres, sin embargo, actualmente no se conoce su función. Por esta razón es de gran relevancia identificar los sustratos de estas PTPasas y con ello obtener información de las interacciones que se llevan a cabo con proteínas que participan en procesos biológicos de relevancia para la amiba.

III) Hipótesis

Las PTPasas *EhPTPA* y *EhPTPB* de *Entamoeba histolytica* interaccionan con proteínas involucradas en estos eventos como adhesión, migración, proliferación, tráfico vesicular entre otros, regulando de esta forma procesos de relevancia en la biología del parásito y en los mecanismos de patogenicidad.

IV) Objetivo general

Identificar los sustratos amibianos para las proteínas *EhPTPA* y *EhPTPB*

V) Objetivos particulares

1. Obtener las mutantes del sitio catalítico para *EhPTPA* y *EhPTPB* y determinar de su actividad enzimática.
2. Identificar los sustratos amibianos para *EhPTPA* y *EhPTPB* usando las mutantes generadas.

VI) Materiales y Métodos

1. Cultivos de *Entamoeba histolytica*.

Se utilizó la cepa HM-1:IMSS (ATCC 30459). Los trofozoítos se cultivaron en condiciones axénicas en medio TYI-S-33 (Diamond et al., 1978) y en fase logarítmica de crecimiento (48 h) se cosecharon colocando los cultivos en hielo por 10 min y por centrifugación a 1000 rpm por 5 min.

2. Obtención de mutantes de la proteína EhPTPB (D167A y C203S).

Las diferentes mutantes se obtuvieron por PCR a partir del gen *EhPTPB* clonado en el plásmido pGEX-3X-1, el cual fue usado como molde para llevar a cabo la mutagénesis utilizando el kit de mutagénesis dirigida (Stratagene). Las mutantes EhPTPBD167A y EhPTPBC203S se generaron por PCR con base en el procedimiento establecido (Ausubel et al., 1992) usando los siguientes pares de nucleótidos: EhPTPBD167A (Sentido, 5'-GGGATGGCCTGCCTTTGGAGTTCCATTAAATCC-3' y Antisentido, 5'-GGATTTAATGGAACTCCAAAGGCAGGCCATCCC-3'), y EhPTPBC203S (Sentido, 5'-CTAGTTTGTGTTTCATTCTTCTGCAGGTGTTGG-3' y Antisentido, 5'-CCAACACCTGCAGAAAGAATGAACACAACTAG-3'). Las reacciones de PCR se prepararon en tubos de PCR estériles a los que se adicionaron 2.5 µl del amortiguador de reacción, 25 ng del DNA molde (pGEX-3X-1-*EhPTPB*), 70 ng de cada oligonucleótido, 0.5 µl de la mezcla de dNTPs y se ajustó a un volumen de 25 µl con H₂O esterilizada, posteriormente se le agregó 0.5 µl de la DNA polimerasa *PfuTurbo*. Las condiciones para las reacciones de PCR fueron las siguientes: 1 ciclo inicial de calentamiento de 95 °C por 1 min, seguida de 25 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, en alineamiento se realizó un gradiente de temperatura para determinar la T_m adecuada para cada mutante, el amplificado se llevó a cabo a 68 °C por 5 min, seguido por 1 ciclo único de 72 °C por 10 min. Después de que terminó la reacción de amplificación se agregó 0.5 µl de la enzima de restricción *Dpn I* por 1 h a 37 °C. Posteriormente se transformaron células competentes BL21 DH5α.

3. Células competentes BL21(DE)pLysS.

La bacteria *E. coli* BL21(DE)pLysS se creció en 5 ml de medio LB (Luria Bertani: Triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5% y glucosa 0.2% con 35 µl de cloranfenicol) durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se inocularon las células en 10 ml de medio LB fresco, a 37 °C con aeración y agitación constante hasta una densidad óptica de 0.5 (600 nm). Las bacterias

se colectaron por centrifugación a 4,000 rpm por 10 min a 4 °C, y la pastilla se resuspendieron en 1 ml de CaCl₂ 50 mM en frío por un período de 30 min. Después las bacterias se colectaron por centrifugación durante 5 min a 3,000 rpm a 4 °C, se resuspendieron en 100 µl de CaCl₂ 50 mM y se incubaron a 0 °C por 20 min.

4. Transformación de células BL21(DE)pLysS.

A la suspensión de células competentes BL21(DE)pLysS se adicionaron 10-100 ng de DNA plásmido y se colocaron en hielo durante 30 min. Posteriormente, se sometieron a un choque térmico por 2 min a 42 °C ó a 37 °C por 5 min. Los tubos se colocaron nuevamente en hielo por 2 min y se les agregó 1 ml de medio LB sin antibiótico. Se mezclaron los tubos por inversión y se incubaron a 37 °C durante 35 a 40 min. Finalmente, los tubos se centrifugaron aproximadamente 3 min a 2,500 rpm, se descartó el sobrenadante y las bacterias se resuspendieron, se espatularon sobre placas de LB/Amp (100 µg/ml) y se incubaron a 37 °C toda la noche.

5. Purificación de DNA plasmídico.

Para llevar a cabo la purificación de plásmido se inoculo una colonia de bacterias en 25 ml de medio LB/ampicilina y se incubó toda la noche a 37 °C en agitación constante. Al día siguiente se centrifugaron 20 ml de la suspensión durante 10 min a 6 000 rpm, a 4 °C y se descartó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 1.5 ml de GTE o STE (solución I: Tris 25 mM pH 8.0 EDTA 10 mM pH 8.0 glucosa o sacarosa 50 mM) con vortex hasta que se homogenizó, se le agregó una pizca de lisozima se mezcló e incubó 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se colocó en hielo durante 5 min y se le agregó 3 ml de la solución II (NaOH 0.2N/SDS 1%) preparada al momento, el tubo se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 15 min. Después se agregaron 2.25 ml de acetato de potasio (3 M, pH 4.8), se mezcló por inversión

y se incubó en hielo 15 min, y posteriormente se centrifugó 30 min a 12 000 rpm para descartar el debris (DNA cromosomal). El sobrenadante se transfirió a un tubo corex de vidrio y se le adicionaron 3 ml de isopropanol, la mezcla se incubó a temperatura ambiente por 30 min y se centrifugó a 12 000 rpm durante 15 min a 4° C. La pastilla fue resuspendida en 300 µl de agua estéril, se adicionaron 10 µl de una solución que contiene RNAsa A (10 mg/ml) y RNAsa T (100 µg/ml), y la mezcla se incubó por 1 h a 37° C.

6. Reacción de secuenciación.

Para las reacciones de secuenciación, el DNA plasmídico se purificó utilizando columnas QIAGEN-20 como se describe brevemente. La columna se equilibró con 1 ml de amortiguador QBT, posteriormente se agregaron los 300 µl del plásmido purificado, se lavó 4 veces con 1 ml de amortiguador QC y el DNA fue eluído con 800 µl de amortiguador QF el cual se precipitó con 560 µl de isopropanol. La solución se centrifugó a 10,000 rpm por 30 min y la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70 %, y se resuspendió en amortiguador TE o agua esteril pH 8.0.

Para la reacción de secuenciación, en tubos de PCR estériles se colocaron 500 ng de DNA plasmídico, 8 µl amortiguador MIX, 10 pmoles del oligonucleótido correspondiente (PTPD1 ó R2), y agua estéril para completar un volumen de 20 µl. La reacción de secuenciación se realizó a 96 °C por 30 s, seguido de 30 ciclos de 96 °C por 20 s, 53 °C por 20 y 60 °C por 4 min. Posteriormente se hidrató una columna QIAGEN-20 por 2 h y se centrifugó a 3000 rpm por 2 min y en ella se colocaron los 20 µl de reacción de PCR. Posteriormente la columna se centrifugó a 3000 rpm por 2 min, la muestra se colectó en tubo eppendorf y secó 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 las reacciones de secuenciación se obtuvieron con el equipo Perkin Elmer/Applied Biosystems 377-18E In DNA Sequencer, del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-México.

7. Purificación de las proteínas , GST::*Eh*PTPA, GST::*Eh*PTPB y proteínas mutantes.

Las proteínas mutantes y silvestres se purificaron de acuerdo al método reportado por Freitas et al., (2004). Brevemente, se crecieron bacterias *E.coli* BL21(DE)pLysS transformadas con el plásmido respectivos en 20 ml de medio LB en presencia de 50 µg/ml de ampicilina toda la noche a 37 °C en agitación constante. Al día siguiente, las bacterias se crecieron en 500 ml de medio LB/Amp/Glu, hasta una O.D. 600 nm= 0.5. Posteriormente, se adicionó IPTG a una concentración final de 0.1 mM y las bacterias se incubaron 2.5 h a 25 °C en agitación constante. Transcurrido este tiempo, la suspensión se colocó en hielo por 5 min, y las bacterias se colectaron por centrifugación a 8,000 rpm a 4 °C por 10 min. Posteriormente, la pastilla se resuspendió en 1/10 volumen de PBS frío y Tritón X-100 a una concentración de 0.01%, se agregó una pizca de lizozima y se incubó a 37 °C por 15 min. Después de la incubación, la mezcla se sonicó de 1-5 veces por 1 min en intervalos de 2 min en hielo, y posteriormente se agregó DNasa (5 µg/ml), 1 mM PMSF y 5 mM EDTA y se incubó a 37 °C por 15 min. Después de este tiempo se agregó RNasa (10 µg/ml) y Tritón X-100 al 1 % y la mezcla se incubó en hielo por 15 min. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 12,000 rpm a 4 °C durante 25 min y se recuperó el sobrenadante. Este se mezcló con la resina glutatión agarosa y se mantuvo durante 30 min en agitación en hielo. Posteriormente la resina se centrifugó a 3,000 rpm, se lavó 4 veces con PBS/Tritón 1%, y las proteínas fueron eluidas con 1 ml de glutatión 10 mM/50 mM Tris-HCl pH 8.0.

8. Geles de Poliacrilamida-SDS.

Las proteínas se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 10 % y al 12 % conteniendo SDS al 0.1% en presencia de amortiguador de muestra (Glicerol 2 %, SDS 4 %, Tris-HCl 50 mM pH 6.8, β-

mercaptoetanol 200 mM, Azul de Bromofenol 0.2 %) y posteriormente fueron visualizadas por tinción con Azul de Coomassie (46).

9. Cuantificación de proteínas por el método de micro-Bradford.

Se realizó una curva de albúmina sérica bovina (BSA) a partir de una solución stock de 1 mg/ml. Las alícuotas analizadas fueron 2, 4, 6, 8 y 10 μ l del stock de BSA y se analizó por triplicado en placas de 96 pozos. Las muestras se llevaron a un volumen final de 160 μ l con PBS y posteriormente también se le agregó 40 μ l del reactivo de Bradford 5X. Adicionalmente, se preparó un blanco el cual contiene únicamente 160 μ l de PBS más 40 μ l de Reactivo Bradford 5X. La placa fue leída a 595 nm en un lector de ELISA (Labsystem MultiSkan MS).

10. Actividad enzimática.

La actividad de PTPasa se determinó mediante la hidrólisis del sustrato *p*-nitrofenol fosfato (*p*NPP) (Sigma) en amortiguador de acetatos (0.4 M de acetato de sodio pH 5.5, 100 mM NaCl y 4 mM dithiothreitol): La reacción se inició utilizando 0.03 μ g de proteína GST::*EhPTPB* o sus mutantes purificadas y una concentración de 30 mM de *p*NPP en un volumen final de 100 μ l. Como blanco se utilizó PBS en substitución de las proteínas. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C, y se detuvo a diferentes tiempos por la adición de 20 μ l de NaOH 2 M y posteriormente se determinó la absorbancia a 405 nm.

11. Producción de anticuerpos policlonales contra GST::*EhPTPA*, GST::*EhPTPB* y His::*EhPTPB*.

Para la producción de anticuerpo contra GST::*EhPTPA*, GST::*EhPTPB* y His::*EhPTPB* se inmunizaron grupos de ratones hembra de la cepa BALB/c de

2 a 4 semanas de edad, utilizando 10 µg de cada proteína en 100 µl de PBS, más 100 µl del adyuvante TiterMax por ratón para la primera inmunización; la inmunización se llevó a cabo por vía intraperitoneal. Posteriormente se realizó una segunda inmunización. Los animales fueron sangrados cada 15 días después de la última inmunización para monitorear la producción de anticuerpos.

12. Inmunotransferencia.

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (NC) (Renart et al., 1979). Las membranas con las proteínas transferidas fueron incubadas con TBST (NaCl 150 mM, Tween 20 0.05 %, leche descremada 2 %, y Tris-HCl 10 mM pH 7.4) durante 1 h a temperatura ambiente, y posteriormente lavadas 3X con TBST, las membranas se incubaron con los anticuerpos de interés diluidos en TBST. Después de la incubación durante 2 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C, las membranas se lavaron 3X con TBST. Los anticuerpos unidos a las proteínas transferidas se detectaron utilizando un segundo anticuerpo IgG de cabra anti-IgGs de ratón conjugado a fosfatasa alcalina (Pierce, Rockford, IL, USA) a una dilución de 1:5,000. Las membranas se lavaron con TBST, y los anticuerpos unidos se detectaron con BCIP (5-bromo-4cloro-3-indolfosfato) y NBT (Cloruro de nitro-azul de tetrazolio) en amortiguador AP (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 8).

13. Extracto de amibas tratadas con Ortovanadato de sodio Na₃VO₄.

A trofozoítos de 48 h de crecimiento se les retiró el medio y se les agregó medio completo fresco con Na₃VO₄ a una concentración de 1 mM, se incubaron a 37 °C durante 30 min, después de este tiempo se colocaron en hielo por 10 min y se colectaron por centrifugación a 1000 rpm por 5 min y se lavaron 3 veces con PBS 1X filtrado frío. Posteriormente los trofozoítos se

lisaron con amortiguador de lisis [acetato de sodio 200 mM pH 6.0, NaCl 100 mM, Triton X-100 al 1%, glicerol al 10%, cóctel de inhibidores de proteasas (NEM, PMSF, TLCK, I.A a una concentración de 3 mM y 1 µg/µl leupeptina)] e inhibidores de PTPasas (5 mM fluoruro de sodio y 1 mM ortovanadato de sodio) en un volumen de 300 µl por 30 min a 4 °C. Al término de la incubación el extracto se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min para eliminar el material insoluble y se agregó 10 mM DTT por 15 min y se guardaron a -80 °C (Herrera-Rodríguez., 2006).

14. Ensayos de Pulldown.

Los ensayos de pulldown se realizaron a partir del protocolo reportado (Buist et al., 2000; Garton et al., 1996) con ligeras modificaciones. Las proteínas GST, GST:: *EhPTP*, GST::*EhPTPB* o sus mutantes correspondientes, se absorbieron por separado en perlas de glutatión-Sepharose a 4 ° C durante 30 min en PBS 1X, que contenía DTT 1 mM en agitación suave. Posteriormente, las perlas se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 min y se lavaron con 10 ml de PBS. Posteriormente, los lisados clarificados de trofozoítos (previamente incubados con ortovanadato de sodio) fueron interaccionados con cada proteína conjugada a las perlas durante 30 min a 4 ° C. Una vez que terminó la interacción, se decantó el sobrenadante, las perlas se lavaron dos veces con 15 ml de PBS-Triton 1%, una vez más con PBS y los complejos enzima-sustrato finalmente fueron eluidos con glutatión reducido. Los eluidos se resuspendieron en tampón de muestra Laemmli y se analizaron por SDS-PAGE. La escisión de las bandas diferenciales, el desteñido, secado, digestión con tripsina y extracción de péptidos se llevaron de acuerdo a lo reportado por Perez-Riverol et al., (2011), y los péptidos se analizaron en un espectrómetro 4800 Plus MALDI TOF / TOF de masas (Applied Biosystems, Framingham, MA , EE.UU.) en las instalaciones de Proteómica del INMEGEN. El perfil peptídico de masas se analizó con las fuentes de proteínas potenciales utilizando la base de datos NCBI nr (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> / BLAST) a través de una búsqueda en mascot desarrollada por www.matrixscience.com.

15. Material vegetal e hidrodestilación.

Para la obtención del material vegetal se utilizó *C. ambrosioides* cultivado en el Valle de México, se utilizaron 150 g de hojas de la planta para cada hidrodestilación, las cuales se secaron por una semana a la sombra con aeración fluida, una vez secas se trituraron y se mezclaron con agua (1:5 peso/volumen), y se sometieron a hidrodestilación exhaustiva a 90°C por 3 horas (**Fig. ap. 4**). El aceite obtenido por hidrodestilación se separó cuidadosamente de la fase acuosa y se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min. El aceite se separó y usado directamente o se sometió a destilación fraccionada (**Fig. ap. 5**) en un sistema a baja presión (6 mm Hg) y 22°C para separar los compuestos presentes en el aceite. El aceite esencial extraído se almacenó a 4 °C hasta obtener el volumen necesario para los experimentos posteriores.

16. Identificación de los compuestos esenciales de *C. ambrosioides*.

La identificación de los compuestos presentes en *C. ambrosioides*, se llevó a cabo a través de la espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), en un equipo JeolEca 500 del Departamento de Química del Cinvestav. Todos los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C están reportados en relación al tetrametilsilano (TMS), se utilizó CD_3OD como disolvente. Las estructuras de los componentes del aceite completo y las fracciones obtenidas de la destilación fraccionada del mismo fueron identificadas del análisis de los espectros de RMN de ^1H (**Fig. ap. 6**), ^{13}C (**Fig. ap. 7**), la técnica $\text{DEP}90^\circ/135^\circ$ y por las técnicas bidimensionales HETCOR, y HMBC.

17. Ensayos de inhibición de la actividad enzimática por el aceite completo y por las fracciones de *C. ambrosioides*.

La actividad enzimática de *EhPTPB* se midió utilizando 15 mM de p-nitrofenolfosfato como sustrato. Brevemente, 0.01 μg de la proteína de fusión

GST::*Eh*PTPB se incubó en amortiguador de actividad pH 5.5 (100 mM de acetato de sodio, 1 mM DTT, 15 mM de NaCl) conteniendo 1 % v/v ya sea de la fracción completa o de las fracciones obtenidas de la destilación fraccionada del aceite; la reacción se llevó a cabo a 37°C por 5 min. En algunos casos se utilizó como control positivo el Na₃VO₄ [3 mM] un inhibidor de PTPasas. Para detener la reacción se añadió NaOH [2mM] y la densidad óptica se midió a 405 nm.

18. Ensayos de inhibición de actividad enzimática por los monoterpenos identificados en el aceite de *C. ambrosioides*.

La proteína GST::*Eh*PTPB (0.03 µg) se incubó en amortiguador de actividad (100 mM de acetato de sodio, pH 5.5, 1 mM DTT, 15 mM de NaCl) conteniendo 10 mM de alguno de los terpenos (α -Terpineno, Limoneno, *p*-Cimeno o Z-ascaridole), la reacción de interacción de los compuestos terpenoides y la enzima se llevó a cabo a 37°C por 5 min, transcurrido este tiempo se adicionó pNPP [15mM], a un volumen final de 100 µl seguido de la incubación a 37°C por 5 min; para detener la reacción se agregó NaOH [2mM] y se realizó la lectura de la absorbancia a 405 nm.

19. Construcción de ligandos y optimización.

Los ligantes utilizados para el modelado por docking se construyeron utilizando el programa GaussView2.1, una vez dibujados los ligantes las coordenadas de las geometrías mínimas se obtuvieron utilizando este mismo programa.

20. Dinámica molecular.

Se utilizó la secuencia del gen de *EhPTPB* que previamente se había clonado y secuenciado en el laboratorio (GenBank KM411450), y la secuencia de amino ácidos fue modelada utilizando el servidor I-Taser <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>. De los modelos generados se utilizó el modelo con el C-score más bajo para ser sometido a dinámica molecular, para ello se utilizó el programa NAMD2. Para la dinámica se creó un archivo de topología, la proteína se cubrió de disolvente formado por moléculas de agua, no se agregaron cofactores metálicos al sistema debido a que las PTPs no necesitan de cofactores metálicos para ser activas; el sistema se equilibró y se calentó de manera progresiva hasta 310° K.

21. Modelado por el método de docking.

Las simulaciones del docking se realizaron usando Autodock 4.0.1, los ligandos se prepararon adicionando todas las posibles uniones de giro, grados de torsión, cargas atómicas parciales empíricas e hidrógenos no polares superponibles, utilizando Autodock tools 1.5.4, que se incluye en el programa Autodock (Morris et al., 1998). Las cargas de Kollman para todos los átomos de la estructura de *EhPTPB* (obtenida a 6.5 ns de las simulaciones por dinámica molecular), se asignaron utilizando Autodock 1.5.4. Para el docking se utilizó una caja rectangular centrada en el sitio catalítico de *EhPTPB* (grid box) con 45 puntos en X 48 en Y 48 en Z (Å), con los puntos de la malla separados por 0.037 Å, aplicando el algoritmo genético Lamarckiano a una población inicial de 100 cuadros seleccionados al azar de 1×10^7 evaluaciones de energía. Los cálculos teóricos se llevaron a cabo en la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del IPN.

22. Análisis Estadístico.

Todos los resultados son presentados como la media \pm DE; la diferencia significativa se determinó con un valor de significancia de $P < 0.005$, usando una prueba *t* de Student no pareada de dos colas.

VII) Resultados

Generación de las mutantes atrapadoras de sustrato de EhPTPB.

Varios reportes han mostrado que las mutantes de PTPs atrapadoras de sustratos pueden ser obtenidas por mutaciones en las que el residuo D se sustituye a A en el loop conservado WPD (Flint et al., 1997), los residuos Q a A o el residuo de C del sitio catalítico, las cuales pueden ser usadas para capturar los sustratos endógenos. En este trabajo se realizaron mutaciones en el gen EhPTPB reemplazando al residuo D por una A para obtener la mutante D167A, y C a S obteniendo la mutante C203S. Para obtener estas mutantes llevamos a cabo mutagénesis sitio dirigida usando el plásmido pGEX-EhPTPB mencionado en la sección de métodos. El análisis con la enzima de restricción EcoRI de los vectores mutantes generados, muestra la liberación de dos fragmentos, uno de un 4900 pb que corresponde al plásmido digerido y un fragmento 1046 pb que corresponde al gen *EhPTPB*, en el carril 1 y 2 el fragmento de 1046 pb corresponde a las mutantes putativas D167A y C203S respectivamente (**Fig. 5A**). La digestión del vector pGEX-EhPTPA con la enzima de restricción EcoRI, genera dos fragmentos uno de 4900 pb (plásmido) y otro de 1060 pb que corresponde al gen EhPTPA mutante putativo putativoD177A carril 1 (**Fig. 5B**) y mutante Q294A carril 1 (**Fig. 5C**).

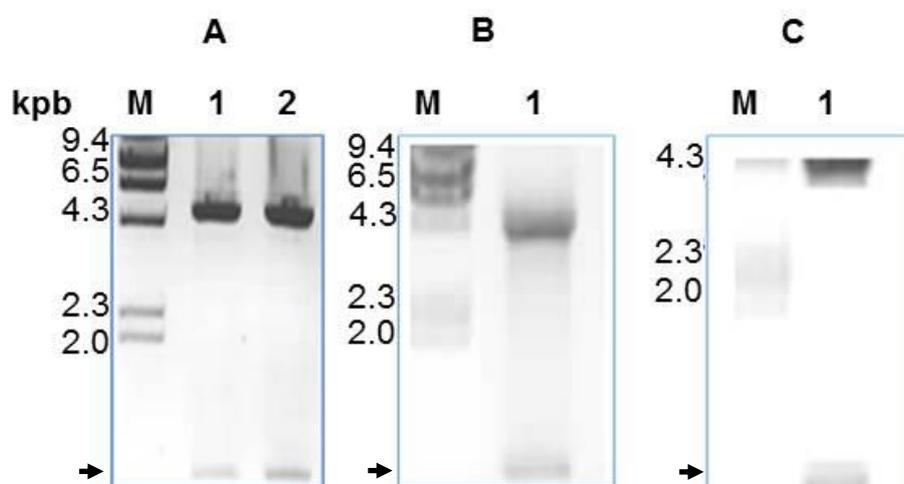


Figura 5. Purificación y análisis de los vectores mutantes de EhPTPA y EhPTPB. Análisis de restricción con la enzima EcoRI de los vectores generados por mutagénesis sitio dirigida. **A)** pGEX-EhPTPB/D167A (1), pGEX-EhPTPB/C203S (2), **B)** pGEX-EhPTPA/D177A (1) y **C)** pGEX-EhPTPA/Q294A (1). Se observa la liberación de un fragmento de alrededor de 1046 pb (flecha negra) que corresponde al tamaño esperado para el gen EhPTPB.

Para corroborar la generación de las mutaciones deseadas, los plásmidos obtenidos se sometieron a secuenciación, para las mutantes de EhPTPB D167A, se sustituyó de la secuencia original el codón GAT que codifica D a GCT que codifica para A (**Fig. 6A**), para la obtención de la mutante C203S, se sustituyó el codón TGC que codifica para C a TCT que codifica para S (**Fig. 6B**). Para obtener las mutantes de EhPTPA D177A, la secuencia GAT que codifica para D fue modificada a GCT que codifica para A, (**Fig. 6C**), para obtener la mutante Q294A se cambió de la secuencia original CAA que codifica para Q a GCA que codifica para A (**Fig. 6D**). Los resultados demostraron que se obtuvieron las mutaciones deseadas.

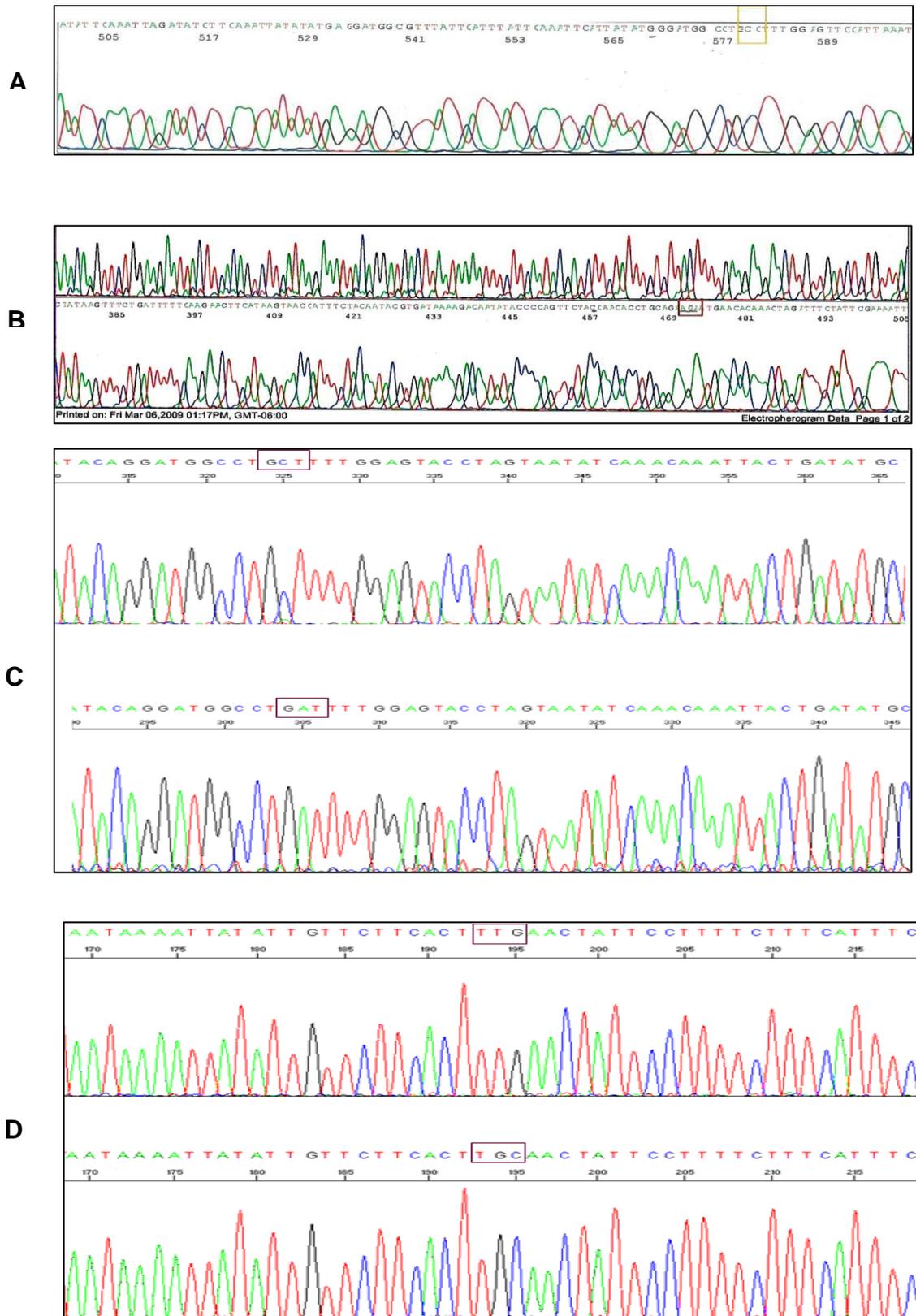


Figura 6. Análisis de las mutantes EhPTPBC203S, EhPTPBD167A, EhPTPAD177A y EhPTPAQ294A. En el electroferograma se observan las codones

sustituidos para obtener las mutantes D167A (A), C203S (B), para D177A el recuadro superior muestra el codón GCT de la secuencia original y el inferior muestra la posición de la mutación a GAT (C), la misma descripción para la mutante Q294A (D), la posición de las mutaciones generadas, se muestran en los recuadros. Se observa en el electroferograma la lectura de las secuencias antisentido en (B y D).

Purificación de las proteínas EhPTPA y EhPTPB silvestres, proteínas mutantes y ensayos de actividad enzimática.

Una vez corroboradas las mutaciones en la secuencia de cada una de las PTPs, los plasmidos se utilizaron para su expresión *in vitro*. Las proteínas recombinantes obtenidas denominadas GST:EhPTA y GST::EhPTPB y sus mutantes EhPTPAD177A, EhPTPAQ294A, EhPTPBC203S y EhPTPBD167A, se purificaron por cromatografía de afinidad, se analizaron por SDS-PAGE. Las proteínas tienen un peso molecular de 65-67 kDa aproximadamente como se esperaba (**Fig. 7**).

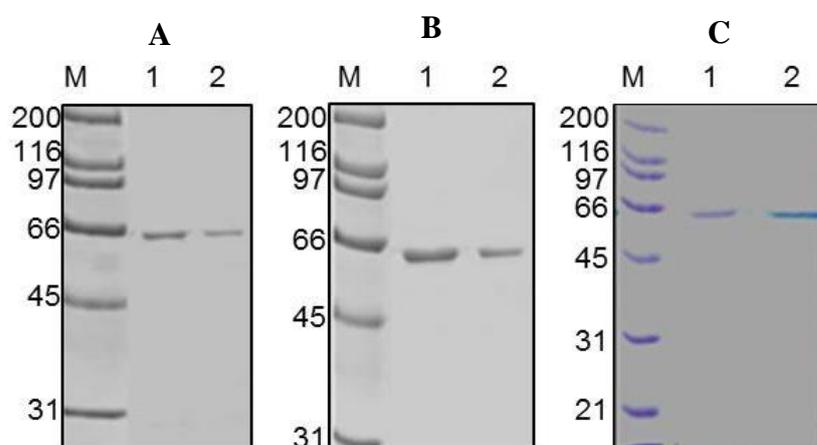


Figura 7. Purificación de las proteínas recombinantes mutantes. Las proteínas mutantes fueron purificadas y analizadas en geles SDS-PAGE al 10%. A) GST::EhPTPA/D177A (1,2), B) GST::EhPTPA/Q294A (1,2) y C) GST::EhPTPB/D167A (1) y GST::EhPTPB/C203S (2). Se observa la purificación de proteínas de un peso molecular de 67 y 65 kDa que corresponden a los pesos esperados para EhPTPA y EhPTPB respectivamente.

Con el fin de analizar si las proteínas nativas y las proteínas mutantes tenían actividad enzimática normal, disminuida o nula, se realizaron ensayos de

actividad enzimática usando como sustrato pNPP [15mM]. Los resultados muestran que las proteínas nativas *EhPTPA* y *EhPTPB* poseen actividad enzimática normal como fue reportado por Herrera y col., en el 2006 y en nuestro trabajo previo para *EhPTPB* (Pérez, J.A. 2008) Por otra parte, las mutantes de *EhPTPAD177A* y *EhPTPBC203S* no mostraron actividad enzimática alguna, y las mutantes *EhPTPAQ294A* y *EhPTPBD167A* mostraron actividad enzimática residual comparada a la actividad mostrada por las proteínas nativas (**Fig. 8**). Estos resultados sugieren que estas proteínas mutantes pueden ser utilizadas para realizar los ensayos de captura de sustratos.

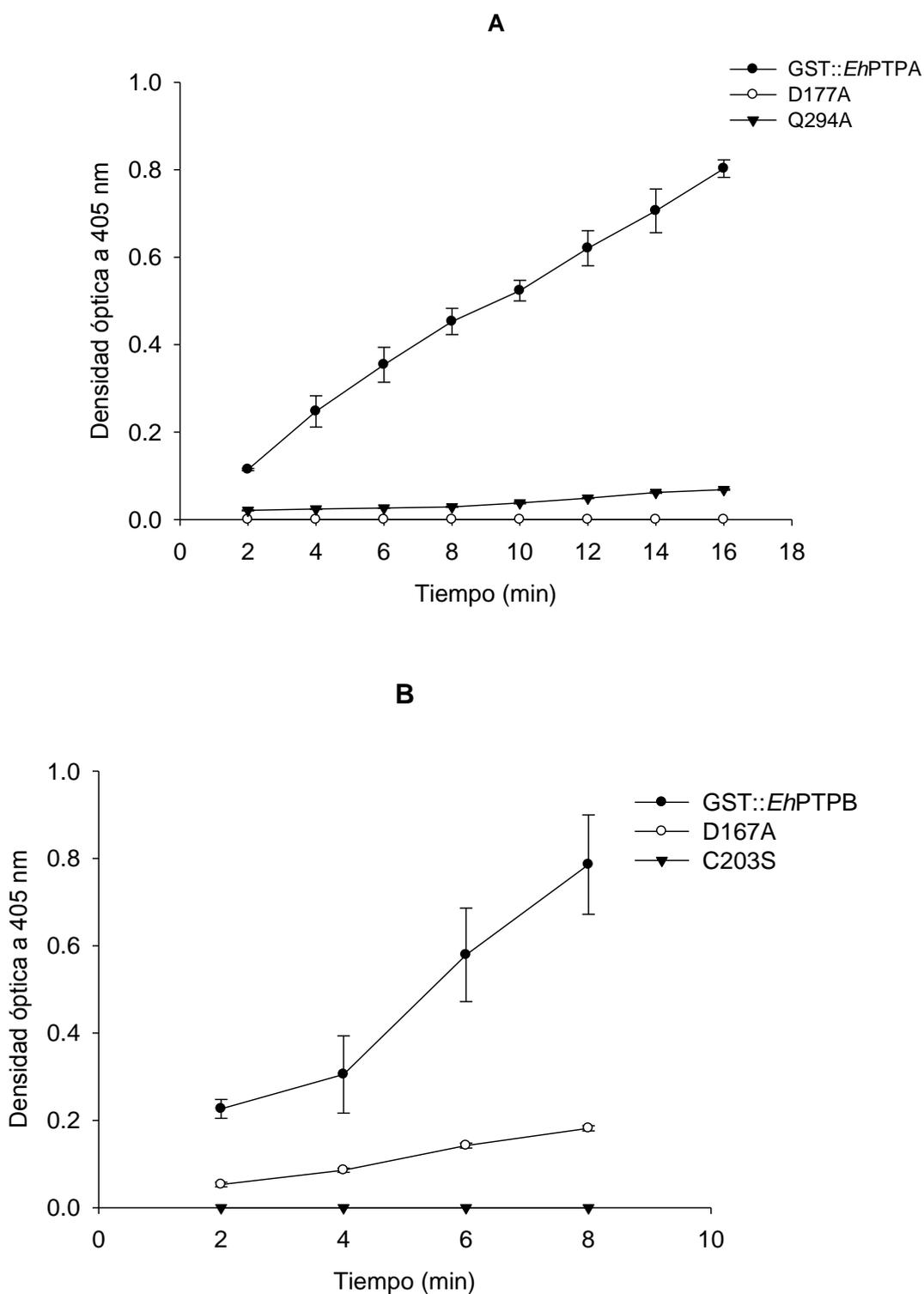


Figura 8. Actividad enzimática de las proteínas nativas y mutantes de EhPTPA (A) y EhPTPB (B). Las proteínas silvestres y mutantes fueron incubadas en presencia de 30 mM de pNPP y la producción de NPP fue analizada y monitoreada a 405 nm.

Inmunoblot y microscopía confocal

Las proteínas recombinantes GST::*EhPTPA* e His::*EhPTPB* o extractos totales de trofozoítos fueron transferidos electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa para analizar, los anticuerpos policlonales producidos en ratones contra estas proteínas (**Fig. 9**). Cuando se utilizaron los anticuerpos contra las proteínas recombinantes, se observó el reconocimiento de las proteínas de 67 y 45 kDa que corresponden a los pesos de las proteínas GST::*EhPTPA* (1) e His::*EhPTPB* (3) respectivamente. Por otro lado los sueros preinmunes no mostraron señal de reconocimiento contra las proteínas (4) mientras que el control anti-GST reconoció una proteína de 67 kDa que corresponde a la proteína GST::*EhPTPA* (2). Con base en estos resultados los anticuerpos obtenidos se utilizaron posteriormente en los ensayos de inmunolocalización.

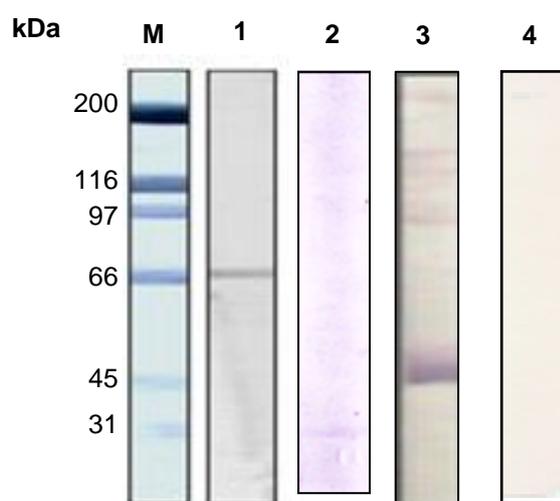


Figura 9. Inmunoblot de las proteínas GST::*EhPTPA* e His::*EhPTPB* recombinantes. Las anticuerpos policlonales generados en ratones BALB/c macho, anti GST::*EhPTPA* (1:5,000) y anti-His::*EhPTPB* (1:20,000) se probaron contra las proteínas recombinantes transferidas a membranas de nitrocelulosa. Se observa el reconocimiento de una proteína de 67 kDa que corresponde a *EhPTPA* (1) y una de 45 kDa que corresponde a *EhPTPB* (3). El control anti-GST (2), mientras que el suero preinmune no muestra señal positiva en ninguno de los casos (4).

En *E. histolytica* se han descrito algunas vías de señalización que participan en la reorganización del citoesqueleto de actina (Aguilar-Rojas et al., 2005; Meza, 2000). Dos cinasas, PKC y FAK125, se han involucrado en la regulación de varias cascadas de señalización, fosforilando proteínas asociadas a placas de adhesión y a la reorganización del citoesqueleto de actina (Franco et al., 2002; Robledo et al., 2005; Santiago et al., 1994). Por lo anterior se realizó el análisis de la posible asociación entre *EhPTPA* y *EhPTPB* con algunas estructuras de actina en trofozoítos unidos a fibronectina (FN). Los resultados muestran que después de 3 h de incubación con la FN, los trofozoítos desarrollan fibras de estrés, bocas fagocíticas, contactos focales y estructuras de placas de adhesión (**Fig. 10**).

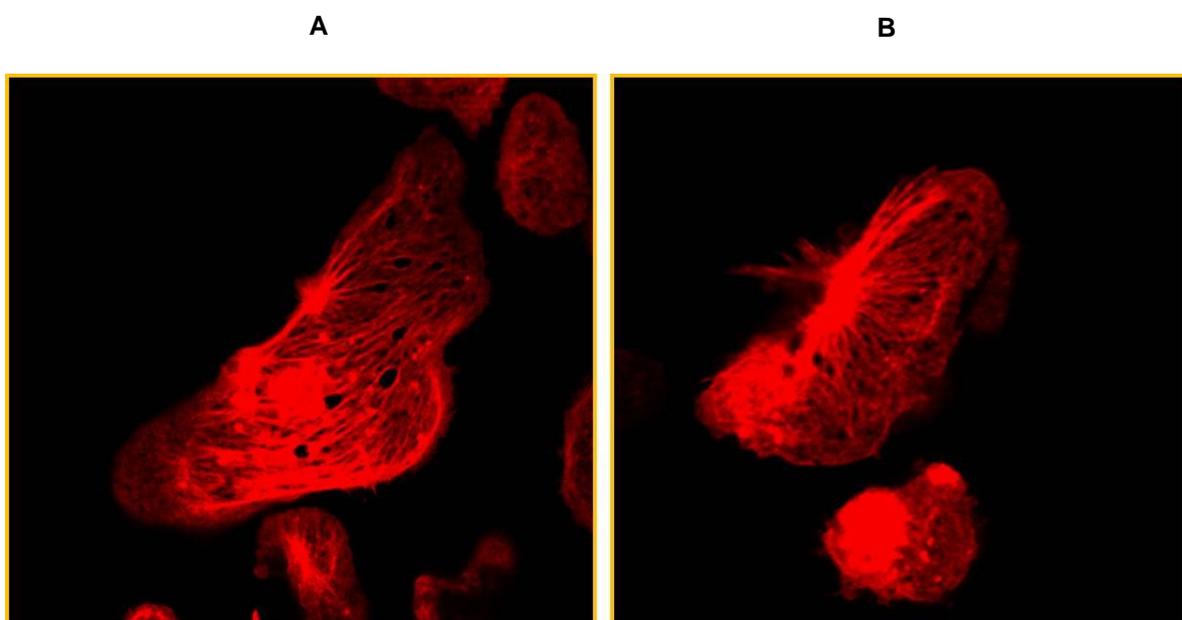


Figura 10. Formación de fibras de actina en trofozoítos incubados con Fibronectina (FN). Trofozoítos de *E. histolytica* se incubaron con FN por 3h y se tiñeron con faloidina-rodaminada. Se puede apreciar claramente la formación de fibras de estrés (A) y puntos de adhesión (B) a estos tiempos de incubación con FN.

Una vez que se confirmó que los trofozoítos interaccionados con FN presentan estructuración de actina, se realizaron experimentos para determinar la posible colocalización de *EhPTPA* y *EhPTPB* en estas estructuras. En trofozoítos no permeabilizados se observó que *EhPTPA* presenta una

distribución discreta alrededor de la membrana, mientras que *EhPTPB* tiene una distribución mayor comparada con *EhPTPA* (**Fig.11B y D**). Por otra parte en trofozoítos permeabilizados ambas proteínas se pueden ver decorando algunas estructuras en el citoplasma como son contactos focales y placas de adhesión (**Fig. 11C y E**), el suero preinmune no da señal positiva contra ninguna de las dos proteínas (**Fig. 11A**). Estos resultados sugieren que estas proteínas pueden estar participando en algunos eventos de desfosforilación de proteínas asociadas a estas estructuras. El empalme indica colocación de *EhPTPB* con algunas estructuras de actina como son fibras de estrés, placas de adhesión (flecha larga) y bocas fagocíticas (flecha corta).

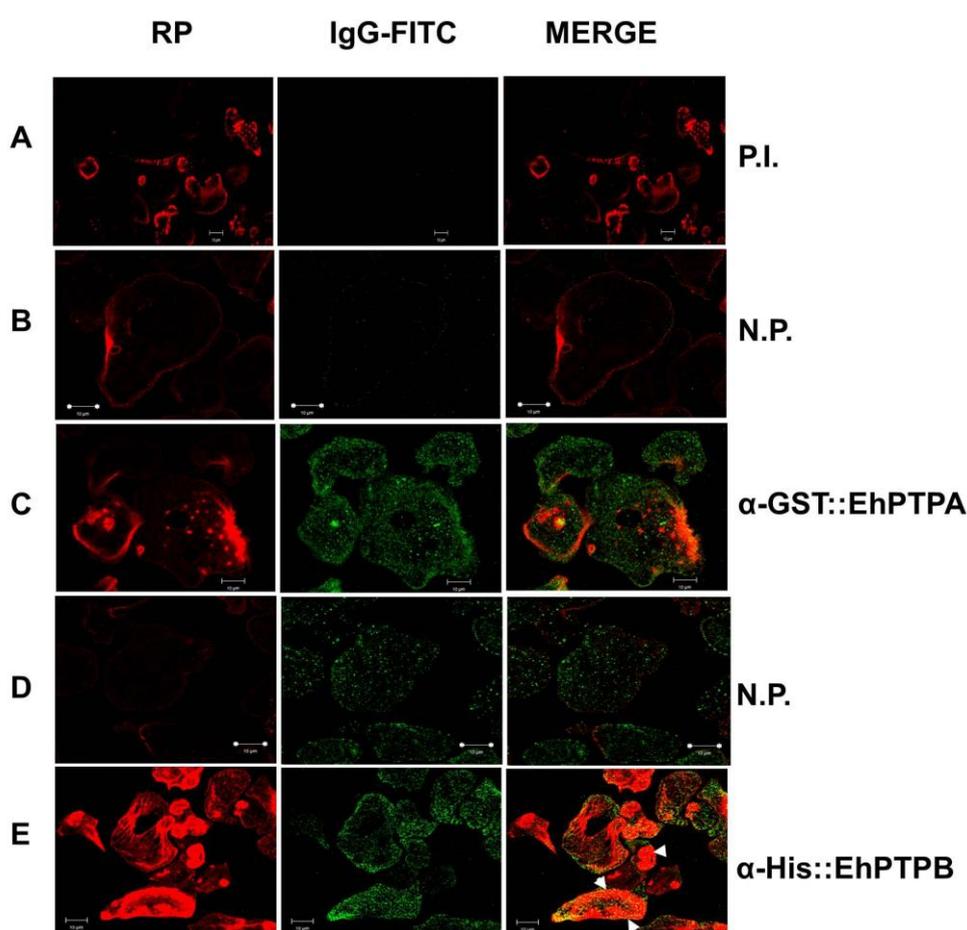


Figura 11. Localización subcelular de las proteínas *EhPTPA* y *EhPTPB*. Los trofozoítos se cultivaron sobre cubre objetos recubiertos con FN por 3h, posteriormente se fijaron, se permeabilizaron o no, y se incubaron con faloidina-rodaminada y con los anticuerpos generados contra las proteínas recombinantes. (A) Suero preinmune, (B y C) suero anti-*EhPTPA* y (B y D) suero anti-*EhPTPB* en condiciones de no permeabilizados, (C y E)

trofozoítos permeabilizados. FR (faloidina-rodaminada), IgG-FITC (anticuerpo secundario marcado con fluoresceína).

Ensayos de captura de sustratos

Varios estudios han demostrado que la mutación de los residuos involucrados en el mecanismo catalítico de las PTPs, cambiando los residuos conservados C o D, disminuyen su actividad enzimática sin alterar su capacidad de unirse a sus sustratos (Agazie and Hayman, 2003; Xie et al., 2002). Para evaluar si la actividad enzimática disminuida o nula, que presentan las mutantes obtenidas de *EhPTPA* y *EhPTPB*, permite la unión de los sustratos, se realizaron ensayos de captura. Para esto, se utilizaron las proteínas purificadas GST, *EhPTPA*, *EhPTPB*, *EhPTPAD177A*, *EhPTPBC203S*, *EhPTPAQ294A* y *EhPTPBD167A*. Estas proteínas se conjugaron en forma individual a perlas de glutatión-agarosa y posteriormente se incubaron con extractos de trofozoítos tratados con ortovanadato de sodio; posteriormente las proteínas que fueron capturadas por las proteínas conjugadas se eluyeron y se analizaron por electroforesis SDS-PAGE al 10%. Los resultados muestran varias proteínas diferenciales en los eluidos de las proteínas mutantes en comparación con las proteínas nativas, así como en el control GST. Se puede apreciar que las mutantes *EhPTPAQ294A* y *EhPTPBC203S*, las cuales no presentaron actividad enzimática, capturan sustratos más eficientemente que las mutantes *EhPTPAD177A* y *EhPTPBD167A*, las cuales mostraron actividad enzimática disminuida (**Fig. 12**).

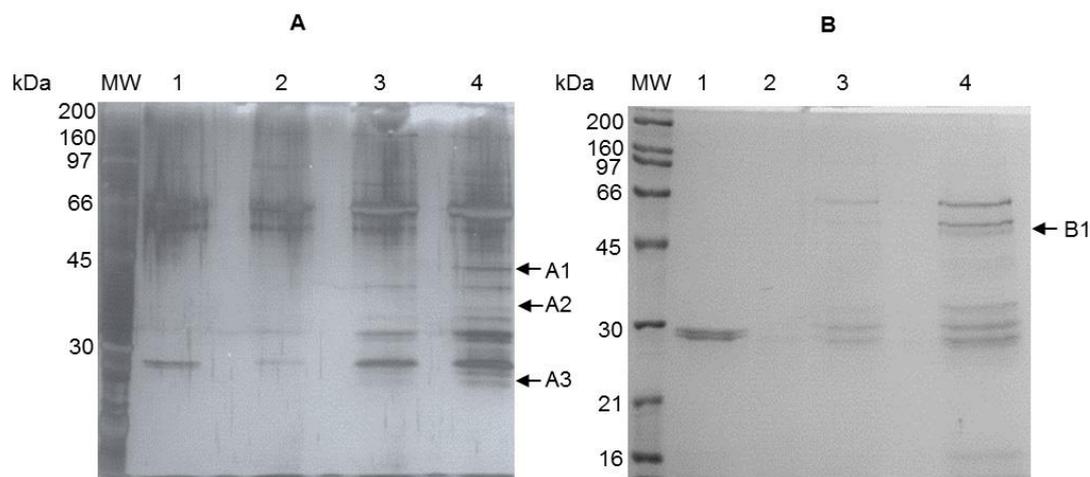


Figura 12. Captura de sustratos con las proteínas mutantes de EhPTPA y EhPTPB. A) Ensayos de captura realizados con GST (1), GST::EhPTPA (2), EhPTPAD177A (3) y EhPTPAQ294A (4). B) Ensayos de captura realizados con GST (1), GST::EhPTPB (2), EhPTPB D167A (3) y EhPTPB C203S (4).

Estos resultados sugieren que la captura de sustratos por estas proteínas mutantes se asocia con la actividad enzimática nula o disminuida de las mismas. Las bandas diferenciales fueron escindidas para su posterior análisis por espectrometría de masas.

Espectrometría de masas

Para la identificación de los sustratos endógenos de *EhPTPA* y *EhPTPB*, se analizó el perfil de masas de los péptidos utilizando la base de datos del NCBI nr (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) a través de Mascot desarrollado por www.matrixscience.com. Tres proteínas se identificaron como sustratos de *EhPTPA* por espectrometría de masas: proteína temprana EHI 009480, XP_001913604, peso molecular (MW) 33.2 kDa, proteína con dominio RhoGEF y ArfGAP EHI 137680, XP_654037.1, peso molecular de 67 kDa y una proteína con un dominio de cinasa EHI 185270, XP_648670.2 con un peso molecular hipotético de 273.2 kDa. Con respecto a *EhPTPB*, se identificó una proteína que contiene un dominio cinasa, la EHI 118810, XP_654114.1, MW 122 kDa. Los resultados de la espectrometría de masas se resumen en la **Tabla. I**.

Tabla I. Datos de espectrometría de masas de secuencias parciales de los sustratos potenciales de *EhPTPA* y *EhPTPB*.

Proteína	Masa Proteína identificada (kDa)	Secuencias de péptidos identificados	Score iones individuales ^a
<i>EhPTPA</i> Proteína inmediatamente temprana	33.2	DVVHMQIDSNIHK	104
Proteína con dominios RhoGEF y ArfGAP	126.8	KEIELDSQK	68
Proteína con dominio dedicador de la citocinesis	273.2	EDIDCPKDVISLFDTEK	132
<i>EhPTPB</i> Proteína con un dominio cinasa	122.2	ADEEPNGVSVR	99

La identificación de proteínas se llevó a cabo usando el algoritmo de búsqueda Mascot desde www.matrixscience.com. Los scores de los iones individuales > 58 indican identidad o alta homología.

VIII) Discusión

Varias vías de señalización y procesos celulares involucran la reorganización del citoesqueleto de actina, en el cual, las proteínas tirosina cinasas y tirosina fosfatasa desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento del equilibrio en los niveles de fosforilación de residuos de tirosina de las proteínas. Algunas PTPasas de microorganismos patógenos han sido asociados a la virulencia y en la interrupción de la transducción de señales (Nandan and Reiner, 2005). *E. histolytica* expresa varias proteínas con actividad fosfatasa que tienen efecto sobre el citoesqueleto de actina de células

Hela y otras células del huésped (Aguirre-García et al., 2003; Anaya-Ruiz et al., 2003). Sin embargo, poco se sabe hoy en día, sobre el nivel de participación de las fosfatasa en las vías de señalización o los mecanismos de virulencia de la amiba. Por esta razón y con la finalidad de conocer y entender la posible función de estas PTPasas, en el grupo de trabajo nos enfocamos en la clonación y expresión del gen que codifica para la proteína completa *EhPTPB* de (39 kDa). Nuestros resultados (no mostrados) mostraron que la proteína de fusión GST::*EhPTPB* posee una actividad enzimática óptima a un pH de 5.5, esto la ubica en el rango de las fosfatasa acidas (PAS) (Reilly et al., 1996). La actividad enzimática, se puede atribuir a la presencia del Motivo 10 que no había sido obtenido previamente (Herrera-Rodríguez et al., 2006). En este Motivo se encuentra el residuo Q que participa en la hidrólisis del grupo fosfato (Andersen et al., 2001).

El peso molecular de las PAS, dentro de las cuales se encuentra *EhPTPB*, varía dependiendo del tejido en el que se localicen, y pueden ser categorizadas en tres grupos de acuerdo a su masa relativa como se describe a continuación: mayores de 200 kDa, entre 100 kDa y 35 kDa o menos de 35 kDa, por lo que la proteína *EhPTPB* de 39 kDa tiene una masa relativa dentro de estos rangos (Zhang and Van Etten, 1990). Todos los miembros de la familia de las PTPasas comparten un motivo común que contiene un residuo cisteína altamente conservado implicado en el mecanismo catalítico (Denu and Dixon, 1998). PTP1B, un miembro muy estudiado de la familia de las PTPasas, tiene un motivo característico en el sitio de unión a fosfato, que se encuentra en la base de hendidura, que al mismo tiempo, está formado por tres motivos: el bucle Q que contiene a Q-262, el bucle WDP que contiene el residuo invariante D (D-181), y el bucle Y que incluye la Y-46 conservada. En general, estos residuos son muy importantes para que se lleve a cabo el mecanismo catalítico, por lo que varios estudios han centrado su atención en el desarrollo de mutantes para identificar y estudiar los sustratos endógenos de PTPs. Estos estudios se han realizado mediante la modificación de estos residuos invariantes en el dominio catalítico. Los mutantes de algunos miembros de esta familia en la que la C del sitio catalítico se ha mutado a S o A, D a A (Kolli et al., 2004b; Zabolotny et al., 2002) y Q a A son inactivos pero conservan la capacidad de unión a sustratos in vitro (Kolli et al., 2004b; Kontaridis et al.,

2004). En el presente trabajo, hemos encontrado que las mutantes de *EhPTPA* y *EhPTPB* presentan una reducida (*EhPTPAQ294A* y *EhPTPB D167A*) o nula actividad enzimática (*EhPTPAD177A* y *EhPTPBC203S*). Estas mutantes fueron capaces de capturar sustratos *in vitro*, lo que permitió su aislamiento e identificación.

Aunque, las proteínas mutantes de *EhPTPA* o de *EhPTPB* atrapan el mismo perfil de proteínas, se puede observar que las mutantes *EhPTPAD177A* y *EhPTPBD167A* son menos eficientes en comparación con las mutantes *EhPTPAQ294A* y *EhPTPBC203S*. Este comportamiento se relaciona directamente con los niveles de actividad enzimática que poseen las mutantes generadas, lo que nos indica al menos para las mutantes obtenidas, que a menor actividad poseen mayor capacidad para capturar los sustratos. Otros estudios basados en la generación de mutantes de PTP-PEST (D199A y C231S) y PTP1B (D181A y C215S) mostraron, en cambio, que las mutantes D199A y D181A capturan los sustratos de manera más eficiente (Flint et al., 1997; Garton et al., 1996). Es importante mencionar que no todas las mutantes de PTPs conservan la capacidad para capturar sus sustratos endógenos: por ejemplo: Buist et al. (2000) reportaron que cuando células COS se transfectan con plásmidos que codifican el tipo silvestre o formas mutantes de PTP-PEST (D199A o C231S), sólo las transfectadas con PTP-PESTC231S fueron capaces de atrapar a p130Cas como sustrato en un contexto intracelular, ya que ni la proteína nativa ni la mutante PTP-PESTD199A fueron capaces de una interacción estable con p130Cas.

En este trabajo, mediante el uso de las mutantes *EhPTPAQ294A* y *EhPTPAD177A* pudimos aislar e identificar algunos sustratos endógenos de *EhPTPA* como es: una proteína de expresión temprana, una proteína con dominios RhoGEF y ArfGAP, y una proteína con un dominio involucrado en la citocinesis (ver Tabla II). En células eucariotas, las proteínas tempranas son sintetizadas después del arresto celular y son estimulados por señales externas o por estrés (Bébien et al., 2003). Las vías ERK, MAPK y JNK regulan positivamente genes tempranos que participan en procesos como la proliferación celular y la diferenciación (Fambrough et al., 1999). En *E. histolytica* la activación de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK)

ha sido descrita (Pérez et al., 1996), por lo que la vía MAPK podría estar implicada en la expresión del gen de la proteína inmediatamente temprana.

Por otra parte, las proteínas RhoGEF catalizan la activación de las proteínas Rho a través de la liberación de GDP y la posterior unión de GTP (Hart et al., 1991). En el genoma de *E. histolytica*, una gran familia de proteínas Rho está presente, expresando al menos 19 de sus miembros (Bosch et al., 2011). Estas proteínas se han asociado con la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina y en procesos patógenos, en el que, por ejemplo, la activación de Rho-GEF1 de *E. histolytica* juega un papel crítico (Aguilar-Rojas et al., 2005). En cuanto a la proteína Dock (dedicador de la citocinesis), se activa ya sea vía Rac o Cdc42 para controlar la migración celular, la morfogénesis y la fagocitosis *in vitro* (Wu and Horvitz, 1998), por lo que la proteína identificada que contiene este dominio podría tener un papel similar en trofozoítos de *E. histolytica*.

Con respecto a *EhPTPB*, fue posible capturar un único sustrato diferencial con la mutante *EhPTPBC203S*, identificando una proteína que contiene un dominio cinasa (ver Tabla I). El programa bioinformático SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) sugiere una posible cinasa de especificidad dual (S/T/Y cinasa). En *E. histolytica*, la presencia de actividad de la cinasa llevada a cabo por la proteína cinasa C (PKC) ya se ha descrito y se sabe que regula la adhesión a fibronectina y la interacción con las proteínas del citoesqueleto que están involucradas en el ensamble de actina en las adhesiones focales (Santiago et al., 1994). También se ha descrito la presencia de actividad de proteína tirosina cinasa (PTK) participando durante la interacción de trofozoítos con FN a través de la fosforilación de la molécula parecida a β 1-integrina (Flores-Robles et al., 2003). La estimulación de los trofozoítos con Concanavalina A es capaz de inducir la formación de estructuras tipo cap, además de inducir la fosforilación en tirosina de dos proteínas de 50 y 70 kDa en la estructura del cap (Espinosa-Cantellano and Martínez-Palomo, 1994; Hernández-Ramírez et al., 2000), lo que sugiere que varias proteínas son fosforiladas en tirosina como consecuencia de la interacción de los trofozoítos con diferentes estímulos. En este sentido, la proteína *EhPTPB* pudiera estar participando en el proceso de desfosforilación de las vías de señalización activadas por la interacción de los trofozoítos con

fibronectina. El análisis *in silico* realizado para predecir posibles sitios de fosforilación utilizando el servidor NetPhos 2,0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) de todos los sustratos identificados ya sea para EhPTPA o EhPTPB, indica que todos ellos tienen posibles sitios de fosforilación en tirosina (Datos no mostrados).

En resumen, los datos obtenidos ponen de manifiesto que las mutantes atrapadoras de sustrato de EhPTPA y EhPTPB descritas en este trabajo poseen la capacidad de atrapar sustratos endógenos de estas PTPasas.

IX) Conclusión de la sección A

La identificación de los sustratos de las PTPasas de este estudio, representa un paso importante para comprender la función de esta familia de proteínas en *E. histolytica*, al proporcionarnos información de su posible papel *in vivo*. Por otro lado, dadas las limitaciones de los anticuerpos disponibles en la actualidad contra los sustratos identificados, será necesario llevar a cabo estudios adicionales usando otro tipo de métodos, como son: aislamiento de proteínas, clonación de cDNA, secuenciación de nucleótidos o proteómica, por mencionar algunos, todo esto, con el fin de lograr su caracterización funcional. Por lo tanto, de acuerdo a lo obtenido en este trabajo, la generación de mutantes de PTPasas que están alteradas en los residuos que participan en el mecanismo catalítico constituye una herramienta valiosa para la identificación de nuevos sustratos de otras PTPasas de *E. histolytica*.

SECCIÓN B

Efecto del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* sobre la actividad de PTPasa de *EhPTPB* y análisis de interacción por docking

Resumen

In vitro e *in vivo* el aceite esencial de *C. ambrosioides* posee actividad contra diversos parásitos protozoarios y ha sido ampliamente utilizado en el tratamiento de diversas parasitosis. En el aceite esencial de *C. ambrosioides*, se han identificado diversos compuestos, la mayoría de ellos de naturaleza monoterpénica. En el presente trabajo, por medio de destilación fraccionada del aceite esencial de *C. ambrosioides* y por técnicas de Resonancia Magnética Nuclear encontramos cuatro principales compuestos, todos ellos de naturaleza monoterpénica. Los cuales fueron utilizados para inhibir la actividad enzimática de la proteína tirosina fosfatasa *EhPTPB* de *E. histolytica*. Nuestros resultados mostraron que el α -Terpineno, uno de los compuestos identificados, es un inhibidor de la actividad de *EhPTPB*. El análisis del posible mecanismo de inhibición, de la actividad enzimática de α -Terpineno sobre *EhPTPB* abordado por docking, sugiere que este método es de utilidad para analizar la interacción proteína-ligante, este método nos aportó datos de los sitios de interacción entre *EhPTPB* y α -Terpineno. Sin embargo son necesarios algunos otros estudios para entender completamente el mecanismo a través del cual α -Terpineno lleva a cabo la inhibición de esta PTPasa de *E. histolytica*, así como sus futuras aplicaciones, como inhibidor o como alternativa en el tratamiento terapéutico en enfermedades asociadas a PTPs.

Abstract

In vitro and *in vivo* the essential oil of *C. ambrosioides* possesses activity against various parasitic protozoa and has been widely used in the treatment of various parasitic diseases. The essential oil of *C. ambrosioides* contains several compounds most of them of monoterpene nature. In this work, using fractional distillation of the essential oil of *C. ambrosioides* and Nuclear Magnetic Resonance techniques, we found four major compounds, all of monoterpene nature. These monoterpenes were used to inhibit the enzymatic activity of the protein tyrosine phosphatase *EhPTPB* of *E. histolytica*. Our results showed that the α -terpinene, one of the identified compounds, is an inhibitor of *EhPTPB* activity. The analysis of the potential mechanism of inhibition of the enzymatic activity of α -Terpinene on *EhPTPB* addressed by docking, suggests that this method is useful to analyzing protein-ligand interaction, providing data about interaction sites between *EhPTPB* and α -Terpinene. However it is necessary achieve other studies to fully understand the mechanism by which α -Terpinene inhibits the activity of this PTPase of *E. histolytica*, as well as future applications, or alternatively use this terpinene as an inhibitor, in the therapeutic treatment against diseases associated to PTPases.

I) Antecedentes

1. Aceites esenciales.

La naturaleza es rica en fuentes de diversidad biológica y química, se sabe que muchos compuestos presentes en plantas poseen cualidades benéficas para el tratamiento de diferentes enfermedades de diversa naturaleza, sin embargo muchos de ellos son difíciles de obtener por síntesis química. En los últimos años el interés en el estudio de las plantas con propiedades medicinales ha incrementado, sobre todo para el tratamiento de algunas enfermedades de gran relevancia como es el cáncer (Heinrich and Gibbons, 2001; Loizzo et al., 2007). En este sentido, los aceites esenciales (AE) obtenidos de fuentes naturales han mostrado ser efectivos para el tratamiento de infecciones en animales, en la preservación de alimentos o para incrementar su sabor (Newbold et al., 2004; Shelef, 1984; Wallace et al., 2010). Se ha reportado la presencia de 20 a 60 compuestos en AE principalmente terpenos, terpinenos y algunos otros constituyentes alifáticos y aromáticos de bajo peso molecular de alrededor de 150 unidades de masa atómica (u) (Bakkali et al., 2008).

Chenopodium ambrosioides es una planta aromática que crece en América Central y Sur América, y actualmente está distribuida a través de las regiones tropicales del mundo. *C. ambrosioides* L. familia Chenopodiace (sino.: *C. antheminticum*, *Botrys ambrosioides* L., *Blitum ambrosioides* L.), es conocida en México como epazote o hierba del zorrillo; paico, bitia, *caa-ne*, en Argentina y Perú; hierva de Santa María, mastruz, en Brazil; 'worm grass', 'Mexican tea', 'fit weed', en EUA; aritasou, en Japón; *simé kontwá*, patois en Dominica (Simpson, 1962). *Chenopodium* proviene del griego χήν (*cheén*), ganso y ποῦς (*poús*), pie, lo cual nos describe en cierto modo la forma que tienen las hojas ya que tienen 3 lóbulos. *Ambrosioides* proviene del griego Ἀμβροσία, α (*a*), prefijo de negación y βρότος (*brótos*), mortal. Epazote proviene del Náhuatl *epatl*, hierba fétida, y *tzotl*, dulce, lo cual se refiere al olor tan fuerte que tiene esta hierba y que para muchos es desagradable. Las infusiones y decocciones de

las hojas, raíces e inflorescencias de *C. ambrosioides* se han utilizado por siglos de manera tradicional por varias poblaciones nativas de América Latina y el Caribe como condimento y en medicina étnica. Además, durante las primeras décadas del siglo XX.

El aceite esencial de *C. ambrosioides* era uno de los antihelmínticos de mayor distribución en humanos, perros, gatos, caballos y cerdos. Su uso decayó en la década de los 40 al descubrirse antihelmínticos menos tóxicos (Quinlan et al., 2002)., A este respecto, Se ha reportado su actividad antiprotozoaria, contra *Trypanosoma cruzi* (Kiuchi et al., 2002), *Plasmodium falciparum* (Pollack et al., 1990) y *Leishmania amazonensis* (Patrício et al., 2008).

In vitro el aceite esencial de *C. ambrosioides* posee actividad contra promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. amazonensis*, y es eficaz *in vivo* en la leishmaniasis cutánea causada por esta misma especie de *Leishmania*, a dosis de 30 mg/kg diaria del aceite esencial, en ratones (Monzote et al., 2006). Un estudio posterior evaluó la eficacia, toxicidad y resistencia del parásito tras la administración intraperitoneal, oral e intralesional en ratones del aceite esencial, siendo la administración intraperitoneal, la más efectiva en controlar la enfermedad (Monzote et al., 2007). De manera independiente, Nascimento y colaboradores mostraron la actividad *in vitro* de *C. ambrosioides* contra *L. amazonensis* (Bezerra et al., 2006) e *in vivo* en ratones que presentaban leishmaniasis cutánea y que fueron tratados de manera oral e intraperitoneal (Patrício et al., 2008).

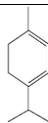
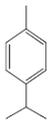
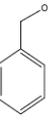
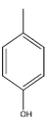
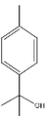
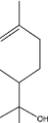
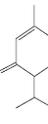
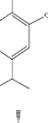
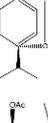
Se ha reportado que el ascaridol es el principal compuesto presente en el aceite esencial de *C. ambrosioides*, además de que es el compuesto al que se le han atribuido todas las propiedades antiparasitarias de esta planta (Monzote et al., 2011). El ascaridol es un endoperóxido monoterpénico, [(1-metil-4-(1-metiletil-2,3-dioxa-biciclo [2.2.2] oct-5-eno); 1,4-epidioxi-*p*-mentano ó 1,4-peróxido-*p*-ment-2-eno, de fórmula molecular C₁₀H₁₆O₂ (CAS N° 512-85-6), el cual se ha comprobado que es altamente efectivo contra nemátodos, produciendo un efecto paralizante sobre los parásitos intestinales, propiciando que se desprendan del tejido intestinal al que se encuentran adheridos, sin

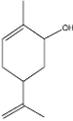
embargo es altamente tóxico por lo que su uso farmacéutico ha sido muy limitado (MacDonald et al., 2004).

2. Compuestos presentes en el aceite esencial de *C. ambrosioides*.

Los compuestos más característicos de la familia *Chenopodiaceae* son los flavonoides y terpenos (Al-Qura'n, 2005), El género *Chenopodium* incluye más de 200 especies nativas de Europa, Asia, India, Norte y América del Sur (Smith, 2006), y la composición del aceite esencial de *C. ambrosioides* puede variar cuantitativa y cualitativamente en cada aislado, y no hay una correlación con la distribución geográfica. Se han reportado alrededor de 28 compuestos presentes en el aceite de *C. ambrosioides* (Dembitsky et al., 2008). La mayoría de ellos de naturaleza monoterpénica los cuales han sido obtenidos por métodos como hidrodestilación y extracciones mediante disolventes orgánicos como metanol, etanol y éter etílico entre otros (**Tabla II**). La abundancia de estos compuestos puede variar dependiendo de la época del año, región y método utilizado para la extracción, sin embargo además del ascaridol como principal compuesto, se ha reportado la presencia de otros compuestos de naturaleza monoterpénica (Chu et al., 2011; Jardim et al., 2008) entre los que destacan por su abundancia, Ascaridol (55.38%), *p*-Cimeno (16.2%), α -Terpineno (9.7%) Isoascaridol (4.3%) y Limoneno (3.8) (Cavalli et al., 2004). Se ha observado que el ascaridol se encuentra en altas concentraciones en las semilla de la planta, por lo que la concentración del que es considerado el principal componente activo de *C. ambrosioides* depende en gran medida de la parte de la planta que se utilice para la extracción (Sagrero-Nieves and Bartley, 1995).

Tabla II. Porcentaje de los compuestos que componen el aceite esencial de *C. ambrosioides*.

	Índice de retención de Kováts	Molécula	Estructura	%
1	1018	α -Terpineno		0.9
2	1026	<i>p</i> -Cimeno		2.0
3	1033	Alcohol bencílico		0.3
4	1075	<i>p</i> -Cresol		0.3
5	1113	<i>p</i> -Menta-1,3,8-trieno		0.2
6	1191	<i>p</i> -cimen-8-ol		0.6
7	1197	α -Terpineol		0.5
8	1248	Z-Ascaridol		61.4
9	1260	Piperitona		0.9
10	1297	Carvacrol		3.9
11	1307	E-Ascaridol		18.6
12	1342	E-Piperitol Acetato		0.5

13	1363	Z-Carbil acetato		0.2
		Otros compuestos no identificados		10.6

Identificaciones tentativas de los compuestos basados en los índices de retención de Kováts y cromatografía de gases-masas. Se puede apreciar que el compuesto más abundante es el Z-Ascaridol 61.4 % (Jardim et al., 2008).

3. Inhibidores de PTPasas.

Los inhibidores de las PTPasas incluyen los obtenidos de productos naturales y compuestos sintéticos. Sin embargo la disponibilidad de estos es muy limitada tanto en número como en diversidad, y a diferencia de los inhibidores de PTKasas, los inhibidores de PTPasas no han comenzado a utilizarse ampliamente en estudios clínicos (Umezawa et al., 2003). Los compuestos que contienen vanadio como es el vanadato y pervanadato, son dos de los primeros inhibidores de PTPasas que fueron identificados, los cuales son comúnmente utilizados en la investigación para el estudio de la inhibición de PTPasas celulares (Huyer et al., 1997).

Las PTPasas se han convertido en un blanco terapéutico atractivo, debido a que junto con las proteínas tirosina cinasas regulan la fosforilación en tirosina de diversas proteínas. De esta manera, las PTPasas regulan diversos procesos biológicos que van desde movilidad hasta proliferación y muerte celular por mencionar solo algunos, Además, algunas PTPasas pueden participar en diversos procesos metabólicos como es la PTP1B, la cual participa en diabetes tipo II y obesidad; y algunas como son SHP2 en cáncer y PTPN22 en procesos autoinmunes (Bower et al., 2014; Gu et al., 2014; Zheng et al., 2014). Debido a lo anterior, la búsqueda de inhibidores específicos para PTPasas es de gran relevancia, tanto para la investigación en el laboratorio como en la medicina. Sin embargo el desarrollo selectivo de compuestos que además sean permeables en las células resulta ser todo un reto. El avance en la síntesis de inhibidores de PTPasas ha sido lento comparado con los inhibidores de PTKs que actualmente se encuentran en uso clínico (Burke and Zhang, 1998; Goldman and Melo, 2001). Algunos problemas adicionales en la

síntesis de nuevos inhibidores de PTPAsas, como se menciona anteriormente, es su permeabilidad, ya que la naturaleza altamente hidrofóbica del sitio activo de las PTPAsas clásicas tiene como consecuencia que muchos compuestos no crucen la membrana celular; *la selectividad* es otra de las razones que hacen difícil la síntesis de inhibidores, esto se debe a que el sitio activo de la familia de las PTPs es altamente conservado, y la mayoría de las PTPAsas de interés médico tienen estrecha homología, por lo que la inhibición de alguna PTPasa podría traer efectos adversos, por ejemplo: la pobre selectividad de compuestos que contienen vanadio se debe a que estos compuestos solo se unen al sitio activo altamente conservado de las PTPAsas pero no inhiben a las S/T fosfatasas debido a las diferencias en el mecanismo catalítico (Tsiani and Fantus, 1997). Algunos otros inhibidores de PTPAsas utilizados comúnmente son los análogos de fosfotirosina como es el caso de difluorofosfometil fenilalanina (Burke et al., 1994) y el 3-carboxil-4-O-carboxilmetiltirosina (Burke and Zhang, 1998), aunque la eficiencia de inhibición está en el orden de nanomolares, una desventaja de este tipo de inhibidores es la carga -2 que poseen a pH fisiológico, lo cual disminuye su capacidad para penetrar membranas celulares (Kole et al., 1995)

4. Inhibidores de PTPAsas obtenidos de fuentes naturales.

Las PTPAsas juegan un papel importante en varios tipos de enfermedades humanas y condiciones fisiopatológicas, por lo que resulta relevante entender cómo la estructura y la función de las PTPAsas están relacionadas a una función normal o anormal de estas proteínas (Kang et al., 2009; Konishi et al., 2003). Este conocimiento permite el diseño o descubrimiento de nuevos inhibidores, en ocasiones obtenidos de fuentes naturales, como es el caso de inhibidores de PTPAsas obtenidos de plantas. La defosfatina fue el primer inhibidor de PTPAsas obtenida de fuentes naturales, el cual fue aislada de cultivos de la cepa *Streptomyces*, encontrándose que inhibía efectivamente a CDC45 con una IC_{50} de 7.7 μ M (Imoto et al., 1993). Otro inhibidor fue obtenido a partir de extractos con diclorometano de la raíz de *Ratanhiae radix*, el cual ha sido tradicionalmente utilizado en contra de

desórdenes inflamatorios; su actividad anti-PTPasa ha sido atribuida al compuesto ratanhiaphenol III, el cual inhibe la actividad de PTP1B de manera dosis-dependiente incrementando la fosforilación del receptor de la insulina (Heiss et al., 2012) . El peróxido de hidrógeno producido en respuesta a la activación del receptor del factor de crecimiento epidermal conduce a la inhibición de PTPasas (Sullivan et al., 1994). Al respecto, *Chenopodium ambrosioides* contiene dos endoperóxidos como el Z-ascaridol y el E-ascaridol a los cuales se les han atribuido las actividades antiparasitarias, y también posee varios compuestos de naturaleza monoterpénica como se observa en la tabla II.

Algunos de los monoterpenos presentes en *C. ambrosioides*, fueron el objeto de estudio de este trabajo, en el cual se analizó su efecto sobre la actividad enzimática de las PTPasas clásicas *EhPTPA* y *EhPTPB* de *E. histolytica*.

5. Análisis de los sitios de unión de inhibidores de la actividad enzimática de *EhPTPB* por el método de docking.

Los inhibidores de PTPasas como el vanadato, pervanadato y fenilvinilsulfonato, inhiben la actividad enzimática de las PTPasas por interacción directa con los residuos de aminoácidos que participan en el mecanismo catalítico de esta familia de proteínas. Estos inhibidores interaccionan, en el caso particular del fenilvinilsulfonato, con la C403 del sitio catalítico de YopH formando un aducto covalente, además, mediante interacciones polares interactúa con R356, Q446 y Q450 en la cadena principal; estas interacciones también se han observado en otros complejos PTPs/inhibidor (Alexandrine M. Bilwes et al., 1996; Liu et al., 2008). En el caso del Vanadato, éste se une a la C catalítica de la PTP de Yersinia formando una unión tiol-vanadil; mientras que el pervanadato se une a PTP1B por un mecanismo que involucra la oxidación de la C del sitio catalítico (Denu et al., 1996; Huyer et al., 1997).

La búsqueda de blancos para nuevas drogas necesita de la obtención de datos experimentales contundentes, en este sentido, el docking es una

herramienta computacional que puede proporcionar información importante acerca de la interacción proteína-ligante, permitiendo no solo el diseño de medicamentos o compuestos con actividad biológica, sino también analizar una gran cantidad de estos, seleccionar el número de candidatos, con el propósito de optimizar tiempos antes de realizar pruebas experimentales (Alam, 2014; Patel and Patel, 2014). El estudio por docking de la interacción proteína-ligante requiere de la estructura cristalográfica de ambos elementos, de no contar con esto, se debe generar la estructura 3D a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés utilizando programas informáticos de alta confiabilidad (Attwood, T. K. y Parry-Smith. D. J., 2002).

La unión proteína-ligante se aborda mediante modelado por homología, docking molecular y dinámica molecular, métodos que son ampliamente utilizados para evaluar blancos terapéuticos potenciales (Kumalo et al., 2015; Lu et al., 2014). La dinámica molecular es un método de gran utilidad cuando no se dispone de la estructura cristalográfica de una proteína. Este método simula la evolución del sistema en el tiempo utilizando las ecuaciones de movimiento de Newton:

$$\mathbf{F}_i = m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i(t)}{dt^2}$$

En donde $\mathbf{r}_i(\mathbf{t}) = (x_i(t), y_i(t), z_i(t))$ es el vector de posición de la *i*-ésima partícula y F_i es la fuerza que actúa sobre la *i*-ésima partícula al tiempo *t* y m_i es la masa de la partícula. La integración de esta ecuación da como resultado la posición de los diferentes átomos en el tiempo y una trayectoria del sistema a lo largo de este tiempo (Petrenko and Meller, 2010)

En el presente trabajo utilizando modelado por homología, dinámica molecular y docking abordamos el análisis del posible mecanismo de inhibición de compuestos presentes en *C. ambrosioides* contra la actividad enzimática de EhPTPB.

II) Justificación

La inhibición de la actividad de las PTPasas es considerada una estrategia para el tratamiento de diferentes procesos patológicos. En este sentido, hay una importante tendencia en el uso de plantas como fuentes para la obtención de compuestos con actividad biológica, que puedan ser usados para el tratamiento de enfermedades de origen diverso (microbianas, metabólicas, etc.). Por lo que esta parte del trabajo se enfoca en la identificación de compuestos que inhiban la actividad enzimática de *EhPTPB*, presentes en extractos de *Chenopodium ambrosioides*. El análisis de los sitios de interacción de los posibles inhibidores de la actividad PTPasa presentes en *C. ambrosioides* proporcionará datos importantes sobre el posible mecanismo de inhibición de la actividad.

III) Hipótesis

Debido a la naturaleza endoperóxida de algunos compuestos presentes en extractos de *Chenopodium ambrosioides*, éstos inhibirán la actividad enzimática de *EhPTPB* a través de la unión con residuos relevantes para el mecanismo catalítico.

IV) Objetivo general

Identificar el (los) compuesto(s) que inhiben la actividad enzimática de *EhPTPB* presentes en el aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides*, así como el posible mecanismo de inhibición.

V) Objetivos particulares

1. Separar e identificar los compuestos presentes en el aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides*.

2. Analizar el efecto del aceite completo y compuestos de *C. ambrosioides* sobre la actividad enzimática de *EhPTPB*.
3. Estudiar por docking los posibles inhibidores de la actividad enzimática de *EhPTPB* presentes en *C. ambrosioides*.

VI) Resultados

Identificación de los compuestos presentes en C. ambrosioides por RMN.

El espectro de RMN se registró en un espectrómetro JeolEca 500. Todos los desplazamientos químicos fueron reportados usando de referencia a TMS, utilizando CD₃OD como disolvente. A partir del aceite esencial extraído de *C. ambrosioides* obtenido por hidrodestilación, se obtuvieron cuatro compuestos principales: α -Terpineno (**1**), Limoneno (**2**), *p*-Cimeno (**3**) y Z-Ascaridol (**4**) en una proporción 42:29:19:10 respectivamente, los desplazamientos químicos se muestran en una sección posterior. Todos los desplazamientos químicos de ¹H y ¹³C se encuentran descritos en [ppm] y relativos al TMS, las técnicas 2D HETCOR (Correlation by Polarization Transfer) y HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), además de DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) 90°/135° se utilizaron para asignar cada una de las señales de las estructuras químicas de los compuestos presentes en el aceite.

Los compuestos α -Terpineno, Limoneno y *p*-Cimeno se obtuvieron en la fracción del aceite, la cual se denominó M2, los datos de RMN de ¹H y ¹³C se muestran a continuación.

α -Terpineno (1): ¹H NMR (MeOD, 500 MHz) δ 1.0 (6H, d, *J* = 6.87 Hz, H-8), 1.72 (3H, s, H-9), 2.04 (2H, m, H-5), 2.06 (2H, m, H-6), 2.23 (1H, m, H-7), 5.51 (1H, m, H-2) and 5.54 (1H, m, H-3). ¹³C NMR (MeOD, 125 MHz) δ 142.14 (C-1), 116.77 (C-2), 119.70 (C-3), 132.81(C-4), 28.92 (C-5), 25.18 (C-6), 34.64 (C-7), 20.60 (C-8) and 21.95 (C-9).

Limoneno (2): ^1H NMR (MeOD, 500 MHz) δ 1.46 (2H, m, H-5), 1.61 (3H, b, H-7), 1.88 (3H, m, H-3), 1.70 (3H, bt, H-10), 1.95 (2H, m, H-6), 2.06 (1H, m, H-4), 4.67 (2H, bt, H-9) and 5.36 (2H, b, H-2). ^{13}C NMR (MeOD, 125 MHz) δ 133.52 (C-1), 120.57 (C-2), 30.86 (C-3), 41.47 (C-4), 28.13 (C-5), 30.48 (C-6), 22.61 (C-7), 150.00 (C-8), 107.94 (C-9) and 19.93 (C-10).

***p*-Cimeno (3):** ^1H NMR (MeOD, 500 MHz) δ 1.19 (3H, d, $J = 6.87$, H-7), 2.24 (3H,s,H-5), 2.81 (1H, m, H-6), 7.05 (2H, d, $J = 8.0$, H-2) and 7.06(2H, d, $J = 8.0$, H-3). ^{13}C NMR (MeOD, 125 MHz) δ 134.50 (C-1), 128.84 (C-2), 126.14 (C-3), 146.50 (C-4), 20.00 (C-5), 33.93 (C-6) and 23.51 (C-7).

Por otra parte, al residuo del matraz de destilación fraccionada del aceite esencial de *C. ambrosioides* se le denominó M1, se logró la identificación del Z-Ascaridol como compuesto principal, los datos de RMN de ^1H y ^{13}C son los siguientes:

Z-Ascaridol (4): ^1H NMR (MeOD, 500 MHz) δ 0.96 (3H, d, $J = 6.8$, H-10), 0.97 (3H, d, $J = 6.8$, H-10), 1.3 (1H, s, H-12), 1.52 (2H, d, $J = 9.45$, H_{endo}-7,8), 1.84 (1H, m, H-9), 1.93 (2H, d, $J = 9.45$, H_{exo}-7,8), 6.41 (1H, d, $J = 8.6$, H-5), and 6.51(1H, d, $J = 8.6$, H-6). ^{13}C NMR (MeOD, 125 MHz) δ 136.21 (C-5), 132.76 (C-6), 79.80(C-1), 74.35 (C-4), 32.09 (C-9), 29.11 (C-8), 25.17 (C-7), 20.23 (C-12), 16.18 (C-10) and 16.07 (C-10).

La técnica de HETCOR se utilizó para determinar la unión de los hidrógenos a cada uno de los carbonos, cuya correlación es a un enlace. La figura 13 muestra el espectro de HETCOR de M2 en la región de los carbonos secundarios de la mezcla de α -Terpineno, Limoneno y *p*-Cimeno.

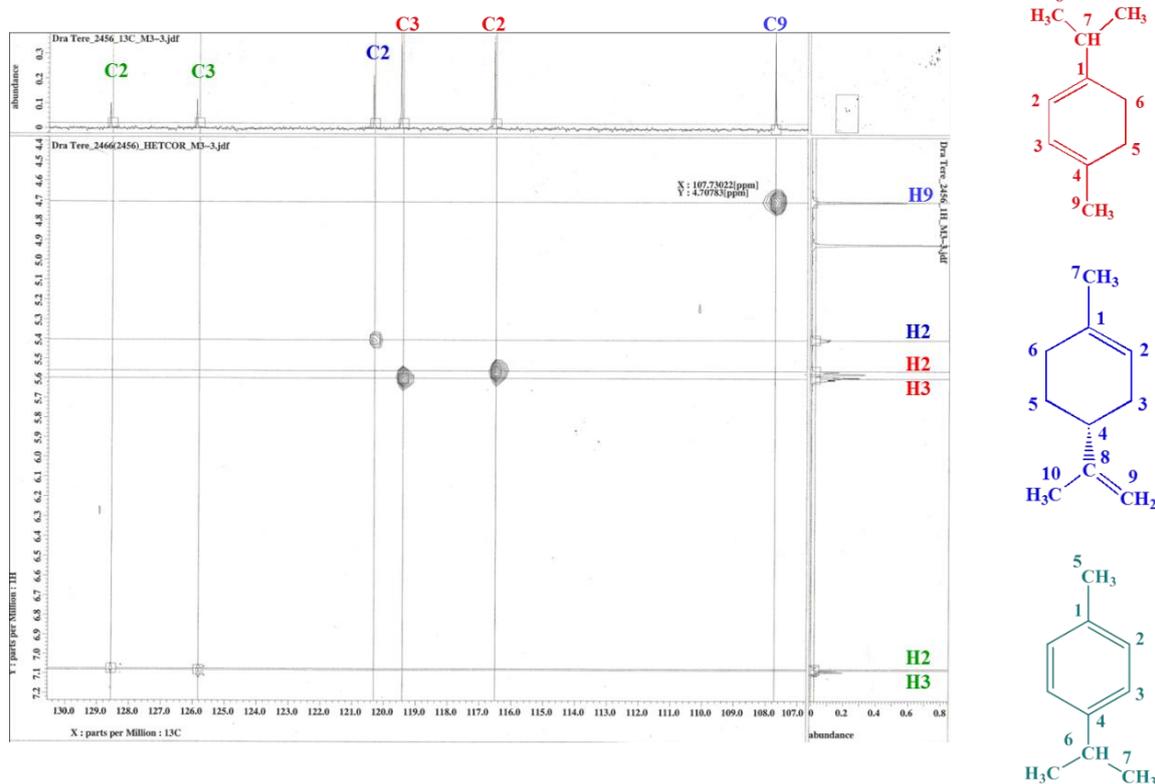


Figura 13. Espectro HETCOR en MeOD. Se observa la correlación de los protones con sus respectivos carbonos, del lado derecho se muestran los compuestos α -Terpineno, Limoneno y *p*-Cimeno de arriba hacia abajo respectivamente.

La identificación de los carbonos primarios, secundarios, terciario o cuaternario de las moléculas se llevó a cabo por la técnica de RMN DEPT $90^\circ/135^\circ$, en el espectro DEPT con pulso de 90° solo las señales de los CH (carbonos terciarios) son visibles, mientras que en el DEPT con pulsos de 135° las señales provenientes de CH₂ (carbonos secundarios) se encuentra hacia debajo de la línea base, mientras que las señales de CH (carbonos terciarios) y CH₃ (carbonos primarios) aparecen hacia arriba de la línea base del espectro de RMN de ^{13}C , (**Fig. 14**).

A

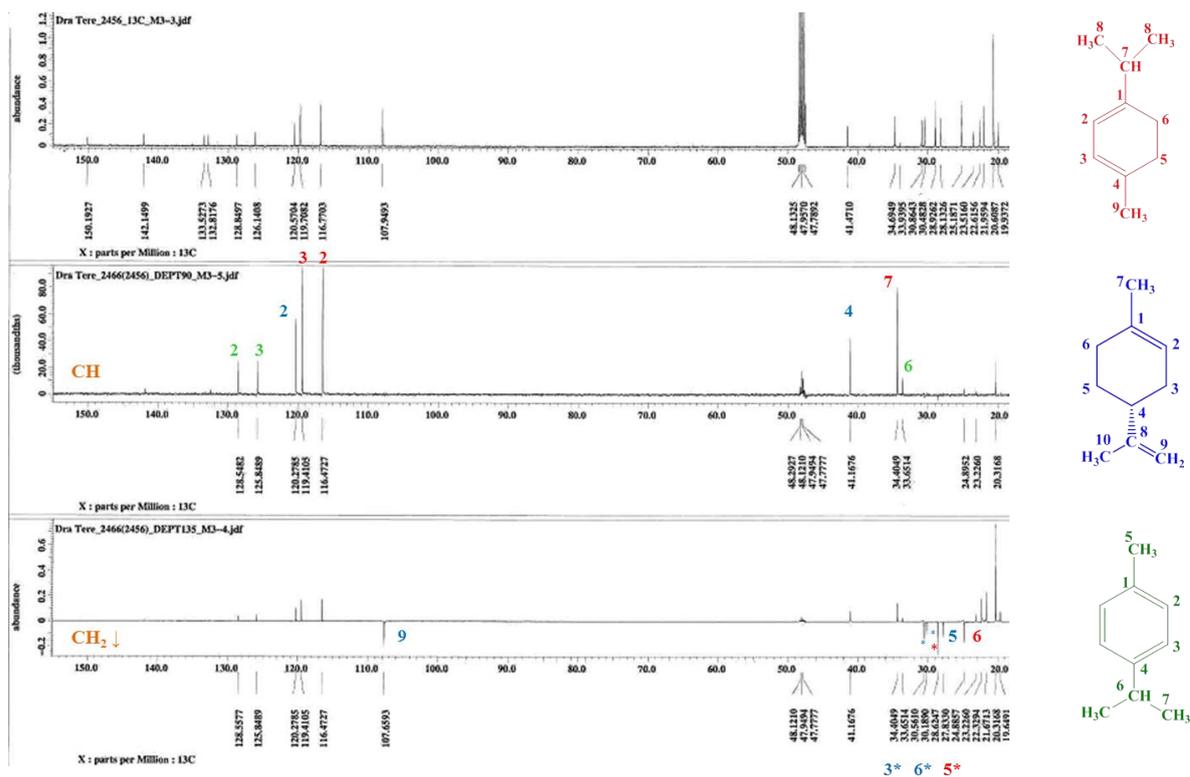


Figura 14. Ver pie de figura en la siguiente sección.

B

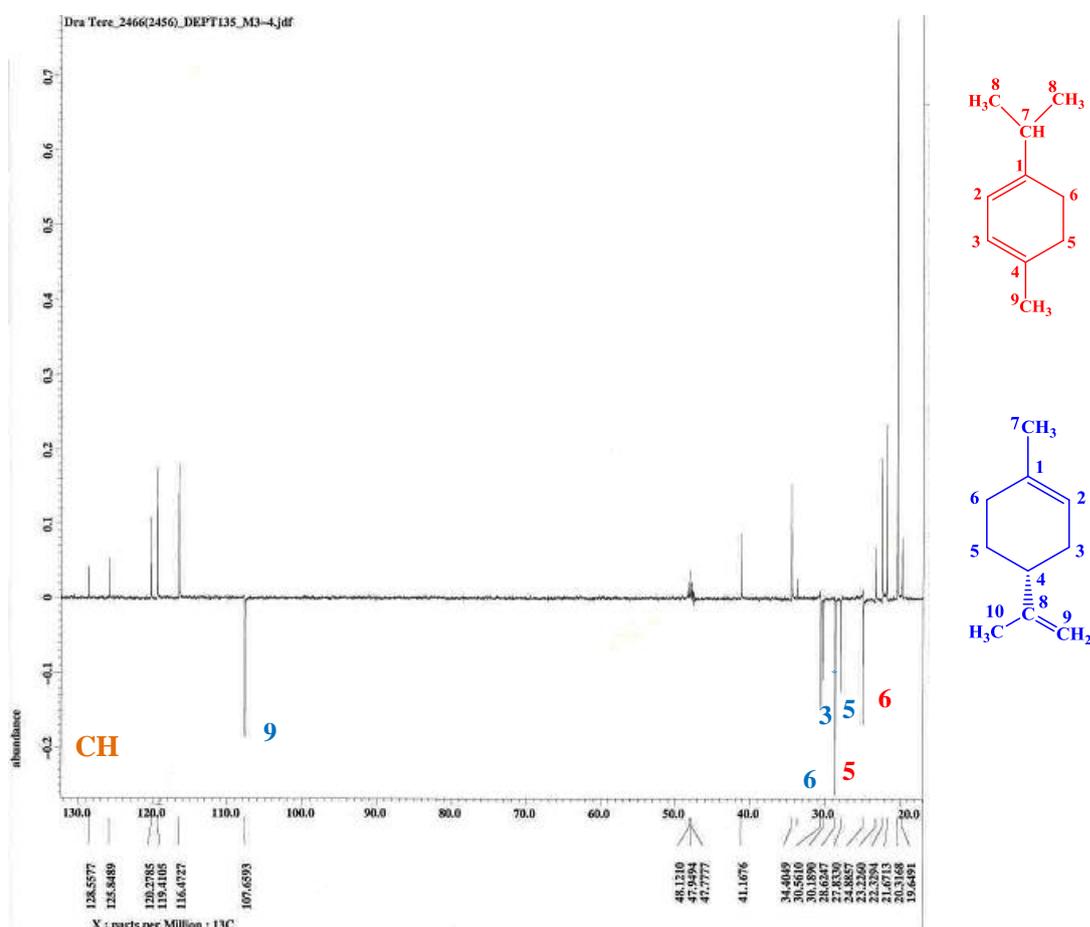


Figura 14. Espectro de RMN de ^{13}C , Técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer). En (A) se aprecia los espectros que corresponden, sin pulsos y con pulsos de DEPT 90° y 135° , mientras que en (B) solo los que corresponden a 135° .

Finalmente la técnica fundamental de RMN para cada una de las señales de los compuestos presentes en *C. ambrosioides* fué HMBC, la cual correlaciona los H con los C a dos o tres enlaces. Las figuras 15 y 16 muestran los espectros HMBC de M2 y M1, respectivamente.

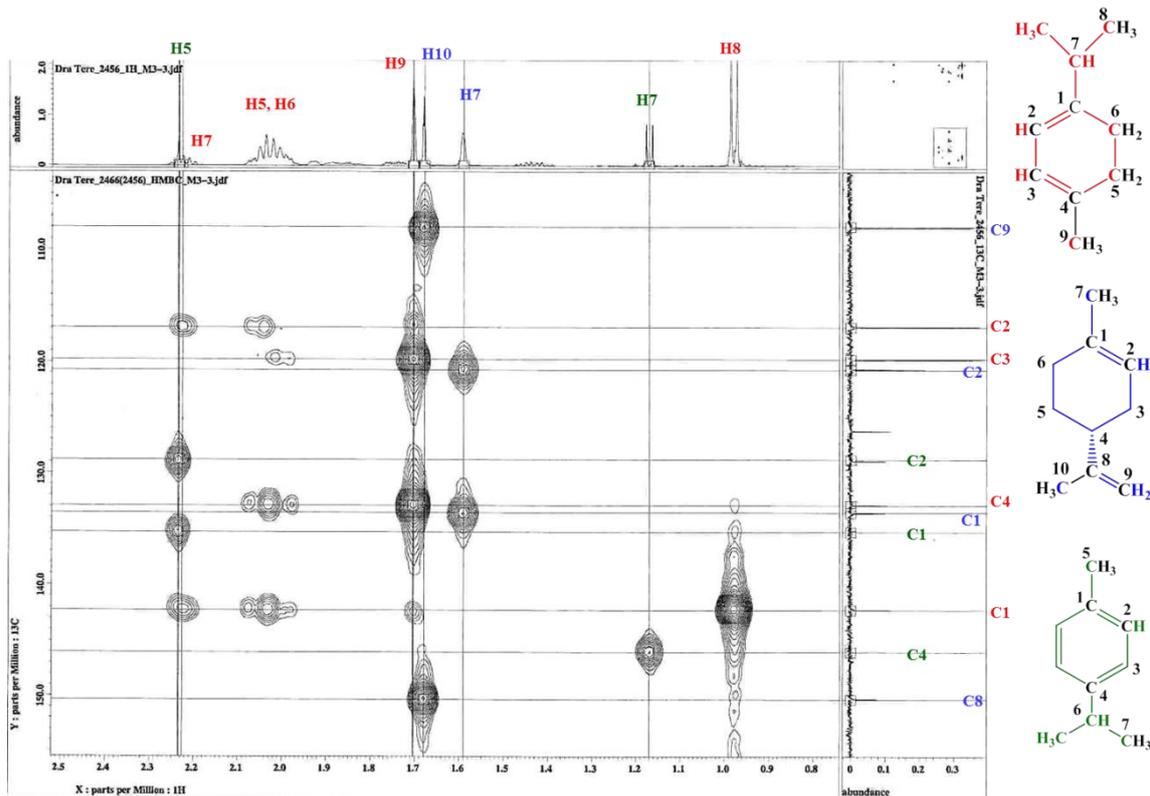


Figura 15. ^1H , ^{13}C -HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation). Se muestran las correlaciones de los hidrógenos a los carbonos a dos y tres enlaces de M2 que está compuesta de α -Terpineno, Limoneno y *p*-Cimeno.

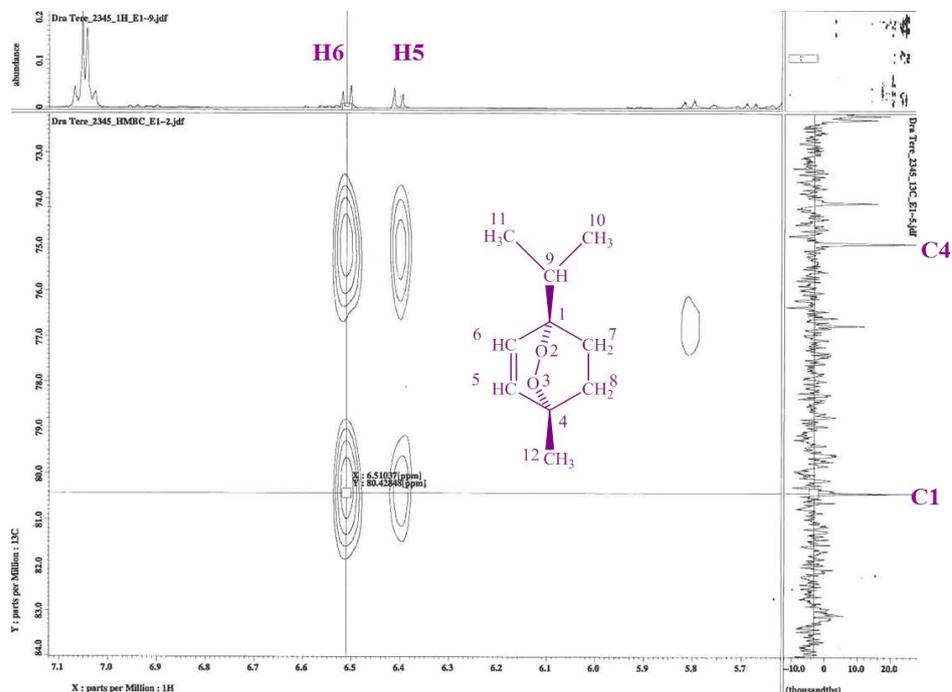


Figura 16. ^1H , ^{13}C -HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation). Se muestra solo la región de la correlación de los H5, H6 con C1 y C4 a dos y tres enlaces de M1 en MeOD.

Efecto del aceite completo o de las fracciones sobre la actividad de EhPTPB.

Se llevaron a cabo ensayos de actividad enzimática usando el aceite completo a una concentración del 1 % v/v y pNPP [15 mM] como sustrato. Los resultados muestran una inhibición del 92% en la actividad de EhPTPB, mientras que utilizando Na₃VO₄ [3 mM] un inhibidor conocido de PTPasas, la actividad disminuyó en un 31% (Fig. 17).

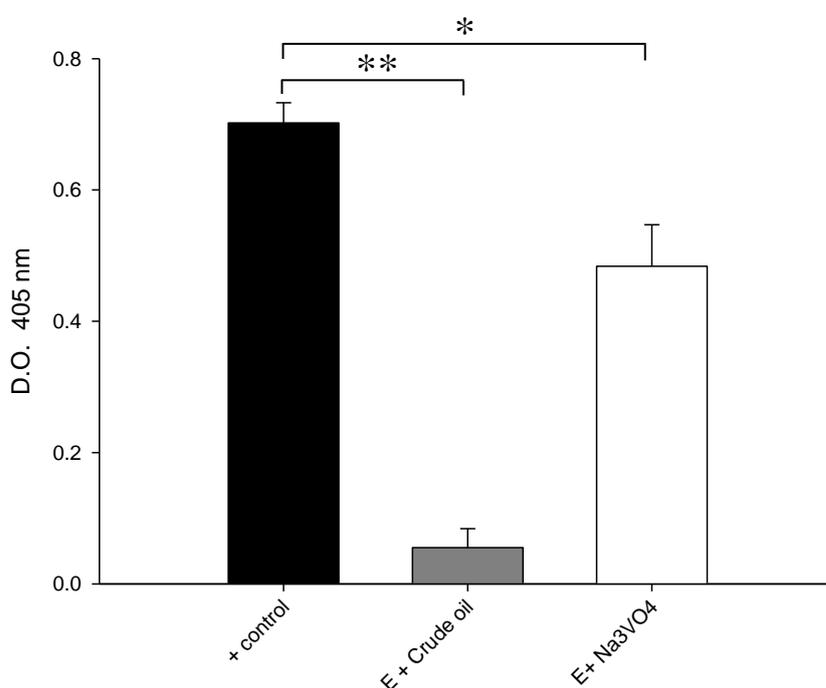


Figura 17. Inhibición de la actividad de EhPTPB por aceite completo de *C. ambrosioides*. Actividad enzimática de EhPTPB en presencia del aceite completo de *C. ambrosioides* (E + crude oil), ó en presencia de Na₃VO₄ (E+ Na₃VO₄), ó sin ninguna adición (+ control). Se utilizó como sustrato el p-nitrofenol fosfato (pNPP).. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes, cada uno por triplicado. Los símbolos indican diferencias significativas comparadas con el control **P* < 0.01, ***P* < 0.001.

Para llevar a cabo la separación de los compuestos, el aceite completo se sometió a destilación fraccionada; la fracción asignada como M2 mostró la presencia de α -Terpineno, Limoneno y *p*-Cimeno en una proporción 71.1:19.0:9.9, respectivamente. El ascaridol permaneció en el matraz de destilación como el producto principal (M1). Con el propósito de identificar la

fracción más efectiva para inhibir la actividad enzimática de *EhPTPB*, se llevaron a cabo ensayos de inhibición de la actividad enzimática con las fracciones obtenidas. Los resultados obtenidos muestran que la fracción que contiene α -Terpineno, Limoneno y *p*-Cimeno inhibieron la actividad enzimática en un 95% a una concentración de 1% v/v, mientras que la fracción que contiene *z*-Ascaridol no tuvo algún efecto evidente sobre la actividad enzimática (**Fig. 18**).

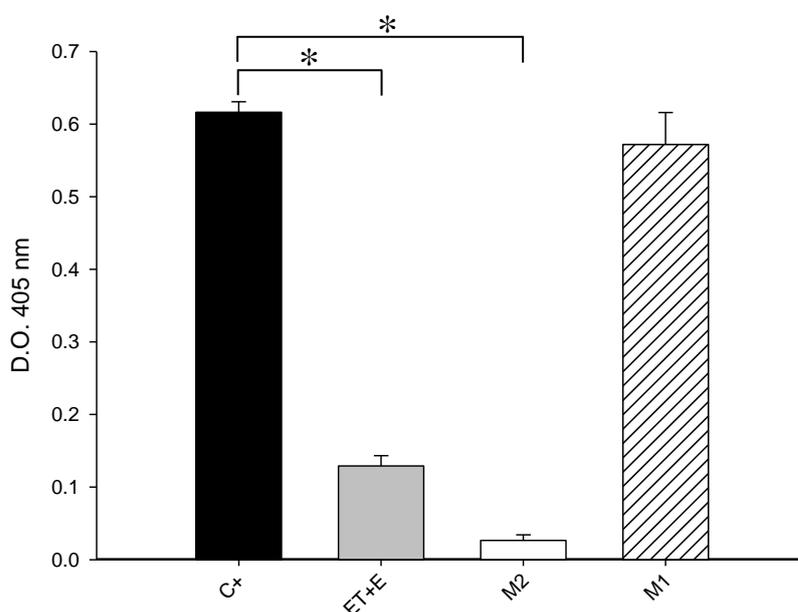


Figura 18. Inhibición de la actividad de *EhPTPB* por fracciones de *C. ambrosioides* obtenidas por destilación fraccionada. Los ensayos se llevaron a cabo usando *p*NPP [15 mM] como sustrato, el aceite y las fracciones se usaron al 1% v/v y 0.03 μ g de proteína. Control positivo *EhPTPB* (barra negra), *EhPTPB* + aceite completo (ET+E, barra gris), *EhPTPB* + fracción conteniendo *p*-Cimeno, Limoneno y α -Terpineno (M2, barra blanca) y *EhPTPB* + fracción conteniendo (*z*)-Ascaridol (M1, barra con líneas). **P* < 0.001 comparada con el control.

Inhibición de la actividad enzimática por los monoterpenos presentes en C. ambrosioides.

Para determinar cuál de los tres terpinenos presentes en el aceite esencial de *C. ambrosioides* poseía la habilidad para inhibir la actividad de *EhPTPB*, se llevaron a cabo ensayos de inhibición de la actividad enzimática

utilizando de manera individual cada componente: α -Terpineno, Limoneno, *p*-Cimeno y (Z)-ascaridol. Los resultados muestran que solo el α -Terpineno fue capaz de inhibir la actividad enzimática de manera significativa, mientras que el *p*-Cimeno, el Limoneno y el (Z)-ascaridol no tuvieron efecto sobre la actividad de *EhPTPB* (Fig. 19).

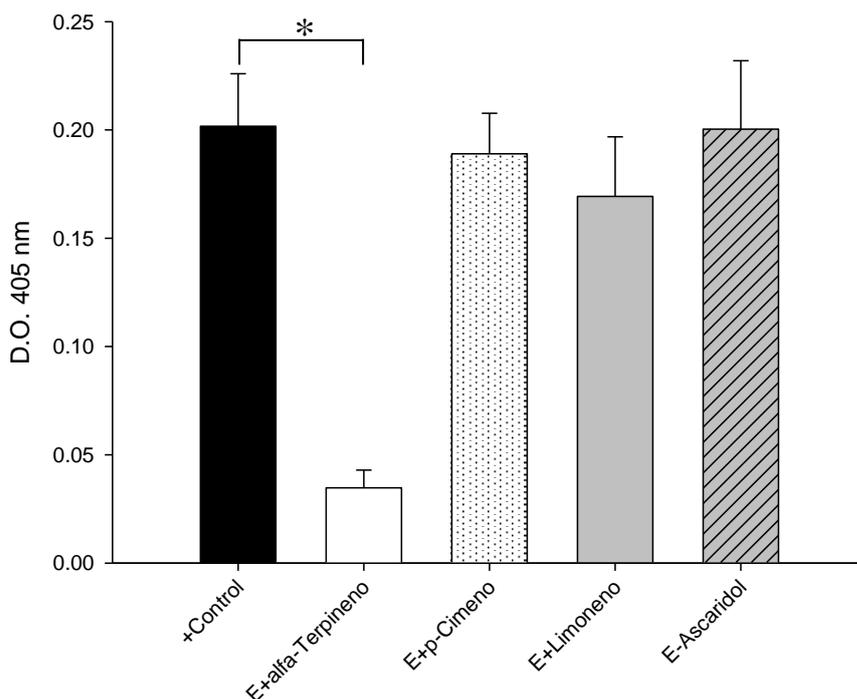


Figura 19. Inhibición de la actividad de *EhPTPB* por α -Terpineno. Los ensayos se realizaron usando 0.03 mg de la proteína *EhPTPB*, *p*NPP 15 mM como sustrato y los diferentes terpinenos a una concentración de 10 mM en cada caso, la reacción de inhibición de la actividad de *EhPTPB* para cada compuesto se llevó a cabo durante 5 min. *EhPTPB* sin terpinénos (+control), *EhPTPB* + α -Terpineno (E+ α -Terpinene), *EhPTPB* + *p*-Cimeno (E+ *p*-Cymene), *EhPTPB* + Limoneno (E+Lymonene), *EhPTPB* + (Z)-Ascaridol (E+Ascaridole). La diferencia de la actividad enzimática entre α -Terpineno y el control positivo fue estadísticamente significativa, *P <0.003.

Análisis por docking del posible mecanismo de inhibición de la actividad de EhPTPB.

Para determinar el posible mecanismo a través del cual α -Terpineno inhibe la actividad enzimática de *EhPTPB*, se realizó el análisis *in silico*,

utilizando al α -Terpineno y fenilvinilsulfonato, este último, un inhibidor ya probado contra PTPasas (Liu et al., 2008) el cual se utilizó como control positivo. La estructura 3D de la proteína *EhPTPB*, se obtuvo a partir de la secuencia de aminoácidos (aa) de la proteína derivada del gen clonado y secuenciado en el grupo de trabajo. Esta secuencia de a.a se sometió a modelado por homología empleando el programa I-Tasser, mediante el cual se obtuvo el modelo 3D de *EhPTPB* (**Fig. ap. 1**), una vez obtenida la estructura, el siguiente paso consistió en relajar las tensiones dentro de la estructura utilizando la plataforma NAMD 2, a su vez se dibujó la estructura y se realizó la minimización de la energía del ligante usando el programa GaussView 2.1 (**Fig. ap. 2**) y posteriormente la preparación de la proteína *EhPTPB* para dinámica molecular en presencia de agua (**Fig. 20**).

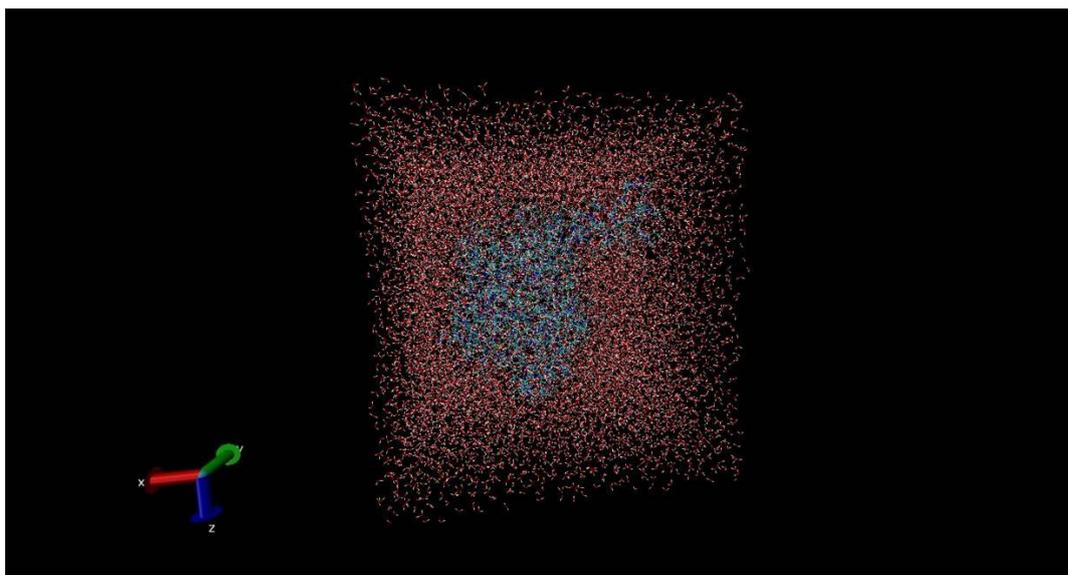


Figura 20. Preparación de *EhPTPB* para dinámica molecular. En la figura se observa a la proteína en presencia de agua, con la finalidad de crear las condiciones lo más parecido a las condiciones reales.

Para el análisis de docking, α -Terpineno y fenilvinilsulfonato se probaron contra el sitio catalítico de *EhPTPB*, y a través de este análisis se determinó que α -Terpineno interactúa con C203 y D167, los cuales son aminoácidos esenciales en el mecanismo catalítico de la familia de las PTPasas (**Fig. 21**),

además se observa que α -Terpineno, se sitúa exactamente dentro de la cavidad del sitio catalítico de la enzima (**Fig. ap. 3**).

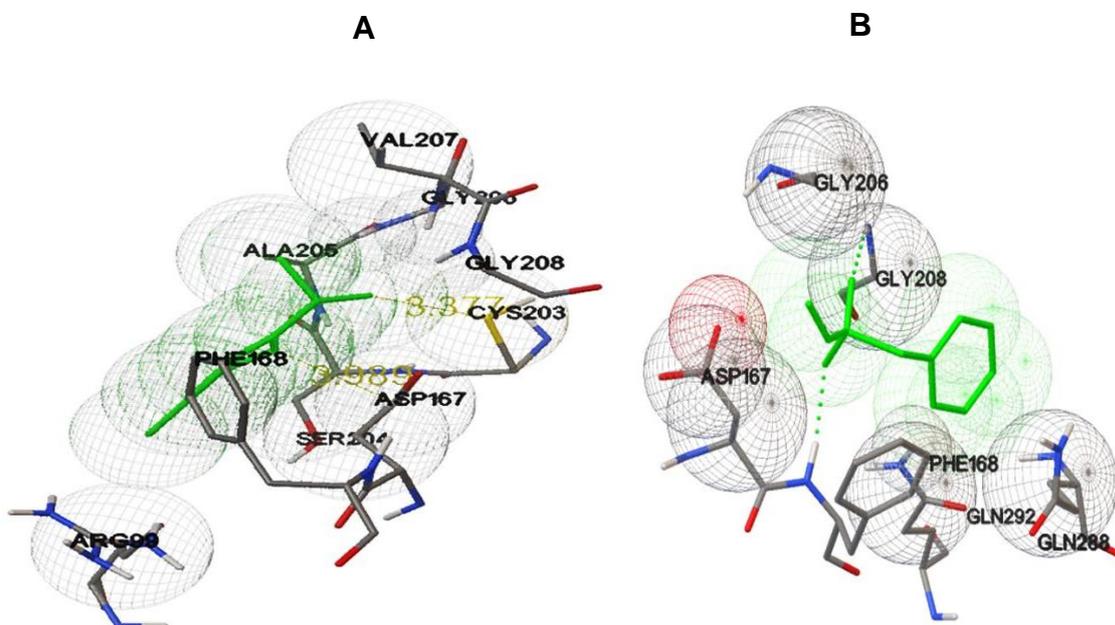


Figura 21. Interacción de α -Terpineno y fenilvinilsulfonato con el sitio catalítico de *EhPTPB* a través del docking. El análisis *in silico* de la interacción proteína-ligante por el método de docking, se realizó usando el programa Autodock 4.0.1, para determinar los sitios de interacción de α -Terpineno y el inhibidor de PTPasas fenilvinilsulfonato sobre el sitio catalítico *EhPTPB*. Los resultados muestran la interacción de α -Terpineno (molécula en verde) con la C203 y D167 en el sitio catalítico de *EhPTPB*, las distancias menores a 4.0 Angstroms entre los residuos del sitio catalítico de *EhPTPB* y α -Terpineno sugieren interacción (A). El inhibidor fenilvinilsulfonato (molecula verde) fue usado como control en este análisis mostrando que éste interactúa con A167 y Q288 (B), estos residuos son importantes en el mecanismo catalítico de las PTPasas (Liu et al., 2008).

VII) Discusión

El aceite de *C. ambrosioides* ha sido estudiado ampliamente y usado en el tratamiento de parásitos intestinales por diferentes culturas alrededor del mundo, sus propiedades antiparasitarias han sido atribuidas al endoperóxido ascaridol, el cual constituye el compuesto más abundante en esta planta (Cavalli et al., 2004; Nascimento et al., 2006; Okuyama et al., 1993). Otros compuestos, principalmente monoterpenos, se han identificado en extractos de *C. ambrosioides* (Cavalli et al., 2004), y varios estudios han mostrado que el aceite esencial de *C. ambrosioides* es efectivo contra *Plasmodium falciparum*, *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi* y contra otros parásitos de relevancia médica (França et al., 1996; Kiuchi et al., 2002; Patrício et al., 2008; Pollack et al., 1990). En este estudio en nuestro grupo de trabajo identificamos cuatro compuestos principales presentes en el aceite esencial de *C. ambrosioides*: α -Terpineno (42%), Limoneno (29%), *p*-Cimeno (19%) and Z-Ascaridol (10%), otros estudios han reportado la identificación de estos y otros compuestos en *C. ambrosioides* (Jardim et al., 2008). En otros reportes el ascaridol parece ser el compuesto más abundante (Chu et al., 2011; Jardim et al., 2008), sin embargo en el presente trabajo encontramos que el principal compuesto fue α -Terpineno. La composición química del aceite de *C. ambrosioides* muestra variabilidad en los compuestos que pueden estar presentes, esto dependerá del origen de la planta, clima, quimiotipo de la especie, método de extracción del aceite y método realizado para el análisis de los elementos (Adeleke A. Kasali, 2006; Cavalli et al., 2004; Jorge A. Pino, 2003). De esta forma la concentración de estos compuestos puede ser diferente del *C. ambrosioides* obtenido del Valle de México con respecto del *C. ambrosioides* de otras partes del mundo.

El aceite obtenido de *C. ambrosioides* utilizado para los ensayos de inhibición de la actividad enzimática, mostró una inhibición de la actividad enzimática de *EhPTPB* del 92% en los ensayos *in vitro*, sin embargo no se sabía si este efecto se debía a la presencia de algún endoperóxido en el aceite obtenido, el cual podría oxidar la C del sitio catalítico disminuyendo la actividad de *EhPTPB*, como sucede con el peróxido de hidrógeno (Rao et al., 2000). Por

lo que fue necesario analizar que compuesto o compuestos tenían esta propiedad. Para abordar este aspecto, se analizaron las fracciones obtenidas por destilación fraccionada, encontrando que la fracción que contiene el endoperóxido ascaridol (M1), no tuvo ningún efecto sobre la actividad enzimática de *EhPTPB* como lo hubiéramos esperado; sin embargo la fracción que contenía los terpinenos (M2) fue capaz de disminuir la actividad enzimática de *EhPTPB*. Lo siguiente fue evaluar cuál de los terpinenos presentes en esta fracción tenía esta propiedad, para lograr esto, realizamos ensayos de inhibición de la actividad enzimática usando cada terpineno por separado. Nuestros resultados proveen por primera vez evidencias de que α -Terpineno reduce significativamente la actividad enzimática de *EhPTPB in vitro*, mientras que *p*-Cimeno, Limoneno o Z-ascaridol no tuvieron ningún efecto sobre la actividad enzimática. En este sentido, algunos estudios han sido llevado a cabo para probar algunos triterpenoides para inhibir la actividad de proteína tirosina fosfatasa de PTP1B (Choi et al., 2012; Scott et al., 2011) encontrando resultados positivos. En estudios más recientes 300 inhibidores de PTP1B aislados de diferentes fuentes naturales fueron analizados a detalle, reportando que algunos diterpenos, triterpenos y algunos de sus derivados inhiben la actividad de PTP1B; sin embargo los mecanismos de inhibición llevados a cabo por estas moléculas para inhibir la actividad PTPasa no está bien definidos hasta ahora (Jiang et al., 2012). A pesar de los estudios previos para encontrar nuevos inhibidores de PTPasas obtenidos de fuentes naturales, este es el primer reporte que muestra que el monoterpeneo α -Terpineno es un inhibidor de la actividad PTPasa de *EhPTPB*. Para tratar de abordar el posible mecanismo a través del cual α -Terpineno inhibe la actividad enzimática de *EhPTPB*, llevamos a cabo análisis *in silico* mediante docking de α -Terpineno contra el sitio catalítico de *EhPTPB*. Los resultados indican que C203 y D167 localizados en la hendidura catalítica, interactúan con α -terpineno a través de uniones tipo Van der Waals. Estas interacciones resultarían de relevancia en el mecanismo de inhibición, debido a que estos residuos están involucrados en el mecanismo catalítico de la familia de las PTPasas (Cho et al., 1992; Denu and Dixon, 1995; Zhang, 2002), el 83 % de los sitios activos están en el pocket de la enzima, por lo que el hecho de que α -Terpineno se situó en el pocket catalítico resulta

bastante viable (Laskowski et al., 1996). El control positivo de inhibición de actividad enzimática fue el fenilvinilsulfonato un inhibidor de PTPasas ya reportado, los resultados del análisis indican que teóricamente este inhibidor interactúa con la D167 and Q288, los cuales se han reportado interactúan con este inhibidor (Liu et al., 2008), de esta manera estos resultados nos aportan evidencias teóricas sobre el posible mecanismo a través del cual α -Terpineno inhibe la actividad de *EhPTPB* por interacción directa con estos residuos.

VIII) Conclusión de la sección B

En el presente trabajo, encontramos cuatro principales compuestos por destilación fraccionada del aceite esencial de *C. ambrosioides*, todos ellos de naturaleza monoterpénica. Nuestro hallazgo de que el α -Terpineno es un inhibidor de la actividad de *EhPTPB*, es realmente interesante, debido a que este es el primer reporte, sobre el potencial efecto inhibitorio que tiene este monoterpeno sobre la actividad PTPasa en el caso particular de *EhPTPB*.

El análisis del posible mecanismo de inhibición, de la actividad enzimática de α -Terpineno sobre *EhPTPB* abordado por docking, sugiere que este método es de utilidad para analizar la interacción proteína-ligante, este método nos aportó datos de los sitios de interacción entre *EhPTPB* y α -Terpineno. Sin embargo son necesarios algunos otros estudios para entender completamente el mecanismo a través del cual este componente lleva a cabo la inhibición de esta PTPasa de *E. histolytica*, así como sus futuras aplicaciones, como inhibidor o como alternativa en el tratamiento terapéutico en enfermedades asociadas a PTPs.

IX) Referencias

- Ackers, J.P., Mirelman, D., 2006. Progress in research on *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 367–373. doi:10.1016/j.mib.2006.06.014
- Adeleke A. Kasali, O.E., 2006. 1,2:3,4-Diepoxy-p-menthane and 1,4-Epoxy-p-menth-2-ene: Rare Monoterpenoids from the Essential Oil of *Chenopodium ambrosioides* L. var *ambrosioides* Leaves. *J. Essent. Oil Res. - J ESSENT OIL RES* 18, 13–15. doi:10.1080/10412905.2006.9699372
- Agazie, Y.M., Hayman, M.J., 2003. Development of an efficient “substrate-trapping” mutant of Src homology phosphotyrosine phosphatase 2 and identification of the epidermal growth factor receptor, Gab1, and three other proteins as target substrates. *J. Biol. Chem.* 278, 13952–13958. doi:10.1074/jbc.M210670200
- Aguilar-Rojas, A., Almaraz-Barrera, M. de J., Krzeminski, M., Robles-Flores, M., Hernández-Rivas, R., Guillén, N., Maroun, R.C., Vargas, M., 2005. *Entamoeba histolytica*: inhibition of cellular functions by overexpression of EhGEF1, a novel Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor. *Exp. Parasitol.* 109, 150–162. doi:10.1016/j.exppara.2004.12.013
- Aguirre-García, M.M., Anaya-Ruiz, M., Talamás-Rohana, P., 2003. Membrane-bound acid phosphatase (MAP) from *Entamoeba histolytica* has phosphotyrosine phosphatase activity and disrupts the actin cytoskeleton of host cells. *Parasitology* 126, 195–202.
- Aguirre-García, M.M., Cerbón, J., Talamás-Rohana, P., 2000. Purification and properties of an acid phosphatase from *Entamoeba histolytica* HM-1:IMSS. *Int. J. Parasitol.* 30, 585–591.
- Al-Qura'n, S., 2005. Ethnobotanical survey of folk toxic plants in southern part of Jordan. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* 46, 119–129. doi:10.1016/j.toxicon.2005.04.010
- Alam, A., 2014. Bioinformatic Identification of Peptidomimetic-Based Inhibitors against *Plasmodium falciparum* Antigen AMA1. *Malar. Res. Treat.* 2014, 642391. doi:10.1155/2014/642391
- 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. doi:10.1016/j.cell.2004.05.018

- Amoebiasis and its control, 1985. . Bull. World Health Organ. 63, 417–426.
- Anaya-Ruiz, M., Pérez-Santos, J.L.M., 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.
- Andersen, J.N., Jansen, P.G., Echwald, S.M., Mortensen, O.H., Fukada, T., Del Vecchio, R., Tonks, N.K., Møller, N.P.H., 2004. A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 18, 8–30. doi:10.1096/fj.02-1212rev
- Andersen, J.N., Mortensen, O.H., Peters, G.H., Drake, P.G., Iversen, L.F., Olsen, O.H., Jansen, P.G., Andersen, H.S., Tonks, N.K., Møller, N.P., 2001. Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol. Cell. Biol.* 21, 7117–7136. doi:10.1128/MCB.21.21.7117-7136.2001
- Angers-Loustau, A., Côté, J.F., Charest, A., Dowbenko, D., Spencer, S., Lasky, L.A., Tremblay, M.L., 1999. Protein tyrosine phosphatase-PEST regulates focal adhesion disassembly, migration, and cytokinesis in fibroblasts. *J. Cell Biol.* 144, 1019–1031.
- Attwood, T. K. y Parry-Smith. D. J., 2002. *Introducción a la Bioinformática*. Pearson Education, S.A., Madrid España.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., 1992. *Short Protocols in Molecular Biology*, Edición: 2nd Revised edition. ed. John Wiley & Sons Inc, Brooklyn, NY : New York, NY.
- Bae, Y.S., Kang, S.W., Seo, M.S., Baines, I.C., Tekle, E., Chock, P.B., Rhee, S.G., 1997. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 272, 217–221.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106
- 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.
- Barford, D., 1995. Protein phosphatases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 728–734.

- Barford, D., Das, A.K., Egloff, M.P., 1998. The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27, 133–164. doi:10.1146/annurev.biophys.27.1.133
- Bébien, M., Salinas, S., Becamel, C., Richard, V., Linares, L., Hipkind, R.A., 2003. Immediate-early gene induction by the stresses anisomycin and arsenite in human osteosarcoma cells involves MAPK cascade signaling to Elk-1, CREB and SRF. *Oncogene* 22, 1836–1847. doi:10.1038/sj.onc.1206334
- Berninghausen, O., Leippe, M., 1997. Necrosis versus apoptosis as the mechanism of target cell death induced by *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* 65, 3615–3621.
- Bezerra, J.L., Costa, G.C., Lopes, T.C., Carvalho, I.C.D.S., Patrício, F.J., Sousa, S.M., Amaral, F.M.M., Rebelo, J.M.M., Guerra, R.N.M., Ribeiro, M.N.S., Nascimento, F.R.F., 2006. Avaliação da atividade leishmanicida in vitro de plantas medicinais. *Rev. Bras. Farmacogn.* 16, 631–637. doi:10.1590/S0102-695X2006000500008
- Bilwes, A.M., den Hertog, J., Hunter, T., Noel, J.P., 1996. Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase- α by dimerization. *Nature* 382, 555–559. doi:10.1038/382555a0
- Bilwes, A.M., den Hertog, J., Hunter, T., Noel, J.P., 1996. Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase- α by dimerization. *Nature* 382, 555–559. doi:10.1038/382555a0
- Bliska, J.B., Galán, J.E., Falkow, S., 1993. Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. *Cell* 73, 903–920.
- Bliska, J.B., Guan, K.L., Dixon, J.E., Falkow, S., 1991. Tyrosine phosphate hydrolysis of host proteins by an essential *Yersinia* virulence determinant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 1187–1191.
- Blume-Jensen, P., Hunter, T., 2001. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411, 355–365. doi:10.1038/35077225
- Bölin, I., Wolf-Watz, H., 1988. The plasmid-encoded Yop2b protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is a virulence determinant regulated by calcium and temperature at the level of transcription. *Mol. Microbiol.* 2, 237–245.
- Bosch, D.E., Wittchen, E.S., Qiu, C., Burrige, K., Siderovski, D.P., 2011. Unique structural and nucleotide exchange features of the Rho1 GTPase of *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 286, 39236–39246. doi:10.1074/jbc.M111.253898

- Bower, A.M., Real Hernandez, L.M., Berhow, M.A., de Mejia, E.G., 2014. Bioactive Compounds from Culinary Herbs Inhibit a Molecular Target for Type 2 Diabetes Management, Dipeptidyl Peptidase IV. *J. Agric. Food Chem.* doi:10.1021/jf500639f
- Bruchhaus, I., Jacobs, T., Leippe, M., Tannich, E., 1996. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes. *Mol. Microbiol.* 22, 255–263.
- Bruchhaus, I., Loftus, B.J., Hall, N., Tannich, E., 2003. The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukaryot. Cell* 2, 501–509.
- Bruckner, D.A., 1992. Amebiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 5, 356–369.
- Buist, A., Blanchetot, C., Tertoolen, L.G., den Hertog, J., 2000. Identification of p130cas as an in vivo substrate of receptor protein-tyrosine phosphatase alpha. *J. Biol. Chem.* 275, 20754–20761. doi:10.1074/jbc.M001626200
- Burke, T.R., Kole, H.K., Roller, P.P., 1994. Potent inhibition of insulin receptor dephosphorylation by a hexamer peptide containing the phosphotyrosyl mimetic F2Pmp. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204, 129–134. doi:10.1006/bbrc.1994.2435
- Burke, T.R., Zhang, Z.Y., 1998. Protein-tyrosine phosphatases: structure, mechanism, and inhibitor discovery. *Biopolymers* 47, 225–241. doi:10.1002/(SICI)1097-0282(1998)47:3<225::AID-BIP3>3.0.CO;2-O
- Byth, K.F., Conroy, L.A., Howlett, S., Smith, A.J., May, J., Alexander, D.R., Holmes, N., 1996. CD45-null transgenic mice reveal a positive regulatory role for CD45 in early thymocyte development, in the selection of CD4+CD8+ thymocytes, and B cell maturation. *J. Exp. Med.* 183, 1707–1718.
- Cantley, L.C., Neel, B.G., 1999. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 4240–4245.
- Cavalli, J.-F., Tomi, F., Bernardini, A.-F., Casanova, J., 2004. Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and ¹³C-NMR spectroscopy: quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound. *Phytochem. Anal. PCA* 15, 275–279. doi:10.1002/pca.761

- Cho, H., Krishnaraj, R., Kitas, E., Bannwarth, W., Walsh, C.T., Anderson, K.S., 1992. Isolation and structural elucidation of a novel phosphocysteine intermediate in the LAR protein tyrosine phosphatase enzymic pathway. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 7296–7298. doi:10.1021/ja00044a052
- Choi, Y.H., Zhou, W., Oh, J., Choe, S., Kim, D.W., Lee, S.H., Na, M., 2012. Rhododendric acid A, a new ursane-type PTP1B inhibitor from the endangered plant *Rhododendron brachycarpum* G. Don. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 6116–6119. doi:10.1016/j.bmcl.2012.08.029
- Chu, S.S., Feng Hu, J., Liu, Z.L., 2011. Composition of essential oil of Chinese *Chenopodium ambrosioides* and insecticidal activity against maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Pest Manag. Sci.* 67, 714–718. doi:10.1002/ps.2112
- Clark, C.G., 1998. *Entamoeba dispar*, an organism reborn. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92, 361–364. doi:10.1016/S0035-9203(98)91049-5
- Cozzone, A.J., Grangeasse, C., Doublet, P., Duclos, B., 2004. Protein phosphorylation on tyrosine in bacteria. *Arch. Microbiol.* 181, 171–181. doi:10.1007/s00203-003-0640-6
- David, M., Romero, G., Zhang, Z.Y., Dixon, J.E., Larner, A.C., 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.
- Dembitsky, V., Shkrob, I., Hanus, L.O., 2008. Ascaridole and related peroxides from the genus *Chenopodium*. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacký Olomouc Czechoslov.* 152, 209–215.
- Denu, J.M., Dixon, J.E., 1998. Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 633–641.
- Denu, J.M., Dixon, J.E., 1995. A catalytic mechanism for the dual-specific phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 5910–5914.
- Denu, J.M., Lohse, D.L., Vijayalakshmi, J., Saper, M.A., Dixon, J.E., 1996. Visualization of intermediate and transition-state structures in protein-tyrosine phosphatase catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 2493–2498.
- Denu, J.M., Tanner, K.G., 1998. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry (Mosc.)* 37, 5633–5642. doi:10.1021/bi973035t

- Diamond, L.S., Harlow, D.R., Cunnick, C.C., 1978. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72, 431–432.
- Dixon, J.E., 1996. Protein tyrosine phosphatases: their roles in signal transduction. *Recent Prog. Horm. Res.* 51, 405–414; discussion 415.
- Dubé, N., Tremblay, M.L., 2005. Involvement of the small protein tyrosine phosphatases TC-PTP and PTP1B in signal transduction and diseases: from diabetes, obesity to cell cycle, and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1754, 108–117. doi:10.1016/j.bbapap.2005.07.030
- Dunn, D., Chen, L., Lawrence, D.S., Zhang, Z.Y., 1996. The active site specificity of the *Yersinia* protein-tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem.* 271, 168–173.
- Ensslen-Craig, S.E., Brady-Kalnay, S.M., 2004. Receptor protein tyrosine phosphatases regulate neural development and axon guidance. *Dev. Biol.* 275, 12–22. doi:10.1016/j.ydbio.2004.08.009
- Espinosa-Cantellano, M., Martínez-Palomo, A., 2000. Pathogenesis of Intestinal Amebiasis: From Molecules to Disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 318–331.
- Espinosa-Cantellano, M., Martínez-Palomo, A., 1994. *Entamoeba histolytica*: mechanism of surface receptor capping. *Exp. Parasitol.* 79, 424–435.
- Fambrough, D., McClure, K., Kazlauskas, A., Lander, E.S., 1999. Diverse signaling pathways activated by growth factor receptors induce broadly overlapping, rather than independent, sets of genes. *Cell* 97, 727–741.
- Flint, A.J., Gebbink, M.F., Franza, B.R., Jr, Hill, D.E., Tonks, N.K., 1993. Multi-site phosphorylation of the protein tyrosine phosphatase, PTP1B: identification of cell cycle regulated and phorbol ester stimulated sites of phosphorylation. *EMBO J.* 12, 1937–1946.
- Flint, A.J., Tiganis, T., Barford, D., Tonks, N.K., 1997. Development of “substrate-trapping” mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 1680–1685.
- Flores-Robles, D., Rosales, C., Rosales-Encina, J.L., Talamás-Rohana, P., 2003. *Entamoeba histolytica*: a beta 1 integrin-like fibronectin receptor assembles a signaling complex similar to those of mammalian cells. *Exp. Parasitol.* 103, 8–15.

- França, F., Lago, E.L., Marsden, P.D., 1996. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in an endemic area of Bahia, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 29, 229–232.
- Franco, E., Manning-Cela, R., Meza, I., 2002. Signal transduction in *Entamoeba histolytica* induced by interaction with fibronectin: presence and activation of phosphokinase A and its possible relation to invasiveness. *Arch. Med. Res.* 33, 389–397.
- Garton, A.J., Flint, A.J., Tonks, N.K., 1996. Identification of p130(cas) as a substrate for the cytosolic protein tyrosine phosphatase PTP-PEST. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6408–6418.
- Gebbink, M.F., Zondag, G.C., Wubbolts, R.W., Beijersbergen, R.L., Etten, I. van, Moolenaar, W.H., 1993. Cell-cell adhesion mediated by a receptor-like protein tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem.* 268, 16101–16104.
- Goldman, J.M., Melo, J.V., 2001. Targeting the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 344, 1084–1086. doi:10.1056/NEJM200104053441409
- Gu, J., Han, T., Ma, R.-H., Zhu, Y.-L., Jia, Y.-N., Du, J.-J., Chen, Y., Jiang, X.-J., Xie, X.-D., Guo, X., 2014. SHP2 promotes laryngeal cancer growth through the Ras/Raf/Mek/Erk pathway and serves as a prognostic indicator for laryngeal cancer. *Int. J. Oncol.* 44, 481–490. doi:10.3892/ijo.2013.2191
- Guan, K.L., Dixon, J.E., 1991. Evidence for protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphate intermediate. *J. Biol. Chem.* 266, 17026–17030.
- Guan, K.L., Dixon, J.E., 1990. Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. *Science* 249, 553–556.
- Hart, M.J., Eva, A., Evans, T., Aaronson, S.A., Cerione, R.A., 1991. Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the *dbl* oncogene product. *Nature* 354, 311–314. doi:10.1038/354311a0
- Heinrich, M., Gibbons, S., 2001. Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. *J. Pharm. Pharmacol.* 53, 425–432.
- Heiss, E.H., Baumgartner, L., Schwaiger, S., Heredia, R.J., Atanasov, A.G., Rollinger, J.M., Stuppner, H., Dirsch, V.M., 2012. Ratanhiaphenol III from *Ratanhia Radix* is a PTP1B Inhibitor. *Planta Med.* 78, 678–681. doi:10.1055/s-0031-1298242

- Hernández-Ramírez, V.I., Anaya-Ruiz, M., Rios, A., Talamás-Rohana, P., 2000. *Entamoeba histolytica*: tyrosine kinase activity induced by fibronectin through the beta1-integrin-like molecule. *Exp. Parasitol.* 95, 85–95. doi:10.1006/expr.2000.4522
- Herrera-Rodríguez, S.E., Baylón-Pacheco, L., Talamás-Rohana, P., Rosales-Encina, J.L., 2006. Cloning and partial characterization of *Entamoeba histolytica* PTPases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 1014–1021. doi:10.1016/j.bbrc.2006.02.055
- Hunter, T., 1998. The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 353, 583–605.
- Huston, C.D., Boettner, D.R., Miller-Sims, V., William A. Petri, J., 2003. Apoptotic Killing and Phagocytosis of Host Cells by the Parasite *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* 71, 964–972. doi:10.1128/IAI.71.2.964-972.2003
- Huyer, G., Liu, S., Kelly, J., Moffat, J., Payette, P., Kennedy, B., Tsaprailis, G., Gresser, M.J., Ramachandran, C., 1997. Mechanism of Inhibition of Protein-tyrosine Phosphatases by Vanadate and Pervanadate. *J. Biol. Chem.* 272, 843–851. doi:10.1074/jbc.272.2.843
- Imoto, M., Kakeya, H., Sawa, T., Hayashi, C., Hamada, M., Takeuchi, T., Umezawa, K., 1993. Dephostatin, a novel protein tyrosine phosphatase inhibitor produced by *Streptomyces*. I. Taxonomy, isolation, and characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)* 46, 1342–1346.
- Jackson, M.D., Denu, J.M., 2001. Molecular reactions of protein phosphatases--insights from structure and chemistry. *Chem. Rev.* 101, 2313–2340.
- Jardim, C.M., Jham, G.N., Dhingra, O.D., Freire, M.M., 2008. Composition and antifungal activity of the essential oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. *J. Chem. Ecol.* 34, 1213–1218. doi:10.1007/s10886-008-9526-z
- Jiang, C., Liang, L., Guo, Y., 2012. Natural products possessing protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitory activity found in the last decades. *Acta Pharmacol. Sin.* 33, 1217–1245. doi:10.1038/aps.2012.90
- Jorge A. Pino, R.M., 2003. Essential Oil of *Chenopodium ambrosioides* L. from Cuba. *J. Essent. Oil Res.* 15, 213–214. doi:10.1080/10412905.2003.9712118

- Kang, K.H., Lemke, G., Kim, J.W., 2009. The PI3K–PTEN tug-of-war, oxidative stress and retinal degeneration. *Trends Mol. Med.* 15, 191–198. doi:10.1016/j.molmed.2009.03.005
- Kiuchi, F., Itano, Y., Uchiyama, N., Honda, G., Tsubouchi, A., Nakajima-Shimada, J., Aoki, T., 2002. Monoterpene Hydroperoxides with Trypanocidal Activity from *Chenopodium ambrosioides*. *J. Nat. Prod.* 65, 509–512. doi:10.1021/np010445g
- Kole, H.K., Smyth, M.S., Russ, P.L., Burke, T.R., 1995. Phosphonate inhibitors of protein-tyrosine and serine/threonine phosphatases. *Biochem. J.* 311 (Pt 3), 1025–1031.
- Kolli, S., Zito, C.I., Mossink, M.H., Wiemer, E.A.C., Bennett, A.M., 2004a. The major vault protein is a novel substrate for the tyrosine phosphatase SHP-2 and scaffold protein in epidermal growth factor signaling. *J. Biol. Chem.* 279, 29374–29385. doi:10.1074/jbc.M313955200
- Kolli, S., Zito, C.I., Mossink, M.H., Wiemer, E.A.C., Bennett, A.M., 2004b. The major vault protein is a novel substrate for the tyrosine phosphatase SHP-2 and scaffold protein in epidermal growth factor signaling. *J. Biol. Chem.* 279, 29374–29385. doi:10.1074/jbc.M313955200
- Kolmodin, K., Åqvist, J., 2001. The catalytic mechanism of protein tyrosine phosphatases revisited. *FEBS Lett., Lisbon Special Issue* 498, 208–213. doi:10.1016/S0014-5793(01)02479-6
- Konishi, N., Tsujikawa, K., Yamamoto, H., Ishida, E., Nakamura, M., Shimada, K., Yane, K., Yamashita, H., Noguchi, S., 2003. Overexpression of leucocyte common antigen (LAR) P-subunit in thyroid carcinomas. *Br. J. Cancer* 88, 1223–1228. doi:10.1038/sj.bjc.6600876
- Kontaridis, M.I., Eminaga, S., Fornaro, M., Zito, C.I., Sordella, R., Settleman, J., Bennett, A.M., 2004. SHP-2 positively regulates myogenesis by coupling to the Rho GTPase signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 24, 5340–5352. doi:10.1128/MCB.24.12.5340-5352.2004
- Kumalo, H.M., Bhakat, S., Soliman, M.E.S., 2015. Theory and Applications of Covalent Docking in Drug Discovery: Merits and Pitfalls. *Mol. Basel Switz.* 20, 1984–2000. doi:10.3390/molecules20021984
- Laskowski, R.A., Luscombe, N.M., Swindells, M.B., Thornton, J.M., 1996. Protein clefts in molecular recognition and function. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 5, 2438–2452. doi:10.1002/pro.5560051206

- Leippe, M., Ebel, S., Schoenberger, O.L., Horstmann, R.D., Müller-Eberhard, H.J., 1991. Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 7659–7663.
- Li, E., Stenson, W.F., Kunz-Jenkins, C., Swanson, P.E., Duncan, R., Stanley, S.L., Jr, 1994. *Entamoeba histolytica* interactions with polarized human intestinal Caco-2 epithelial cells. *Infect. Immun.* 62, 5112–5119.
- Liu, F., Chernoff, J., 1997. Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with and is tyrosine phosphorylated by the epidermal growth factor receptor. *Biochem. J.* 327 (Pt 1), 139–145.
- Liu, S., Zhou, B., Yang, H., He, Y., Jiang, Z.-X., Kumar, S., Wu, L., Zhang, Z.-Y., 2008. Aryl vinyl sulfonates and sulfones as active site-directed and mechanism-based probes for protein tyrosine phosphatases. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 8251–8260. doi:10.1021/ja711125p
- Loizzo, M.R., Tundis, R., Menichini, F., Saab, A.M., Statti, G.A., Menichini, F., 2007. Cytotoxic activity of essential oils from labiatae and lauraceae families against in vitro human tumor models. *Anticancer Res.* 27, 3293–3299.
- Lovelace, J.K., Dwyer, D.M., Gottlieb, M., 1986. Purification and characterization of the extracellular acid phosphatase of *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20, 243–251.
- Lu, X.-G., Wang, Z., Cui, Y., Jin, Z., 2014. Computational thermodynamics, computational kinetics, and materials design. *Chin. Sci. Bull.* 59, 1662–1671. doi:10.1007/s11434-014-0219-4
- MacDonald, D., VanCrey, K., Harrison, P., Rangachari, P.K., Rosenfeld, J., Warren, C., Sorger, G., 2004. Ascaridole-less infusions of *Chenopodium ambrosioides* contain a nematocide(s) that is(are) not toxic to mammalian smooth muscle. *J. Ethnopharmacol.* 92, 215–221. doi:10.1016/j.jep.2004.02.018
- Majeti, R., Bilwes, A.M., Noel, J.P., Hunter, T., Weiss, A., 1998. Dimerization-Induced Inhibition of Receptor Protein Tyrosine Phosphatase Function Through an Inhibitory Wedge. *Science* 279, 88–91. doi:10.1126/science.279.5347.88
- Mauro, L.J., Dixon, J.E., 1994. “Zip codes” direct intracellular protein tyrosine phosphatases to the correct cellular “address”. *Trends Biochem. Sci.* 19, 151–155.
- McLaughlin, S., Dixon, J.E., 1993. Alternative splicing gives rise to a nuclear protein tyrosine phosphatase in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 268, 6839–6842.

- Meng, K., Rodríguez-Peña, A., Dimitrov, T., Chen, W., Yamin, M., Noda, M., Deuel, T.F., 2000. Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of β -catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase β/ζ . *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 2603–2608. doi:10.1073/pnas.020487997
- Meza, I., 2000. Extracellular Matrix-induced Signaling in *Entamoeba histolytica*: Its Role in Invasiveness. *Parasitol. Today* 16, 23–28. doi:10.1016/S0169-4758(99)01586-0
- Moeslein, F.M., Myers, M.P., Landreth, G.E., 1999. The CLK family kinases, CLK1 and CLK2, phosphorylate and activate the tyrosine phosphatase, PTP-1B. *J. Biol. Chem.* 274, 26697–26704.
- Monzote, L., Montalvo, A.M., Almanonni, S., Scull, R., Miranda, M., Abreu, J., 2006. Activity of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* grown in Cuba against *Leishmania amazonensis*. *Chemotherapy* 52, 130–136. doi:10.1159/000092858
- Monzote, L., Montalvo, A.M., Scull, R., Miranda, M., Abreu, J., 2007. Activity, toxicity and analysis of resistance of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* after intraperitoneal, oral and intralesional administration in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*: a preliminary study. *Biomed. Pharmacother. Bioméd. Pharmacothérapie* 61, 148–153. doi:10.1016/j.biopha.2006.12.001
- Monzote, L., Nance, M.R., García, M., Scull, R., Setzer, W.N., 2011. Comparative chemical, cytotoxicity and antileishmanial properties of essential oils from *Chenopodium ambrosioides*. *Nat. Prod. Commun.* 6, 281–286.
- Morris, G.M., Goodsell, D.S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K., Olson, A.J., 1998. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* 19, 1639–1662. doi:10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B
- Nandan, D., Reiner, N.E., 2005. *Leishmania donovani* engages in regulatory interference by targeting macrophage protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 114, 266–277. doi:10.1016/j.clim.2004.07.017
- Nascimento, F.R.F., Cruz, G.V.B., Pereira, P.V.S., Maciel, M.C.G., Silva, L.A., Azevedo, A.P.S., Barroqueiro, E.S.B., Guerra, R.N.M., 2006. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. *Life Sci.* 78, 2650–2653. doi:10.1016/j.lfs.2005.10.006

- Newbold, C.J., McIntosh, F.M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R.J., 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 114, 105–112. doi:10.1016/j.anifeedsci.2003.12.006
- Okuyama, E., Umeyama, K., Saito, Y., Yamazaki, M., Satake, M., 1993. Ascaridole as a pharmacologically active principle of “Paico,” a medicinal Peruvian plant. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 41, 1309–1311.
- Pannifer, A.D., Flint, A.J., Tonks, N.K., Barford, D., 1998. Visualization of the cysteinyl-phosphate intermediate of a protein-tyrosine phosphatase by x-ray crystallography. *J. Biol. Chem.* 273, 10454–10462.
- Parsons, J.T., 2003. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J. Cell Sci.* 116, 1409–1416.
- Patel, M.M., Patel, L.J., 2014. Design, Synthesis, Molecular Docking, and Antibacterial Evaluation of Some Novel Flouroquinolone Derivatives as Potent Antibacterial Agent. *Sci. World J.* 2014. doi:10.1155/2014/897187
- Patrício, F.J., Costa, G.C., Pereira, P.V.S., Aragão-Filho, W.C., Sousa, S.M., Frazão, J.B., Pereira, W.S., Maciel, M.C.G., Silva, L.A., Amaral, F.M.M., Rebêlo, J.M.M., Guerra, R.N.M., Ribeiro, M.N.S., Nascimento, F.R.F., 2008. Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis*. *J. Ethnopharmacol.* 115, 313–319. doi:10.1016/j.jep.2007.10.009
- Pérez, E., Muñoz, M.L., Ortega, A., 1996. Entamoeba histolytica: involvement of pp125FAK in collagen-induced signal transduction. *Exp. Parasitol.* 82, 164–170.
- Pérez, J.A. 2008. Caracterización bioquímica de la proteína tirosina fosfatasa B de *Entamoeba histolytica*. (Tesis de maestría inédita). Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular. CINVESTAV-IPN.
- Petrenko, R., Meller, J., 2010. Molecular Dynamics, in: John Wiley & Sons, Ltd (Ed.), *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Pollack, Y., Segal, R., Golenser, J., 1990. The effect of ascaridole on the in vitro development of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Res.* 76, 570–572.
- Quinlan, M.B., Quinlan, R.J., Nolan, J.M., 2002. Ethnophysiology and herbal treatments of intestinal worms in Dominica, West Indies. *J. Ethnopharmacol.* 80, 75–83.
- Ramos, F., Morán, P., González, E., García, G., Ramiro, M., Gómez, A., DE León, M.D.C.G., Melendro, E.I., Valadez, 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.
- Rao, R.K., Li, L., Baker, R.D., Baker, S.S., Gupta, A., 2000. Glutathione oxidation and PTPase inhibition by hydrogen peroxide in Caco-2 cell monolayer. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279, G332–340.
- Ravdin, J.I., 1995. Amebiasis. *Clin. Infect. Dis.* 20, 1453–1466. doi:10.1093/clinids/20.6.1453
- Reed, S.L., Keene, W.E., McKerrow, J.H., 1989. Thiol proteinase expression and pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Microbiol.* 27, 2772–2777.
- Reilly, T.J., Baron, G.S., Nano, F.E., Kuhlenschmidt, M.S., 1996. Characterization and sequencing of a respiratory burst-inhibiting acid phosphatase from *Francisella tularensis*. *J. Biol. Chem.* 271, 10973–10983.
- Renart, J., Reiser, J., Stark, G.R., 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 3116–3120.
- Robledo, T., Cruz-Vera, J., Reyes, M., de la Garza, M., Ortega, A., Pérez Salazar, E., 2005. *Entamoeba histolytica*: focal adhesion kinase and Erk phosphorylation are altered in the cytoskeleton mutant BG-3. *Parasitol. Res.* 95, 231–235. doi:10.1007/s00436-004-1290-6
- Sagrero-Nieves, L., Bartley, J.P., 1995. Volatile Constituents from the Leaves of *Chenopodium ambrosioides* L. *J. Essent. Oil Res.* 7, 221–223. doi:10.1080/10412905.1995.9698506
- Samuel L. Stanley, J., Reed, S.L., 2001. VI. *Entamoeba histolytica*: parasite-host interactions. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 280, G1049–G1054.
- Santiago, A., Carbajal, M.E., Benítez-King, G., Meza, I., 1994. *Entamoeba histolytica*: PKC transduction pathway activation in the trophozoite-fibronectin interaction. *Exp. Parasitol.* 79, 436–444.
- Schaller, M.D., Hildebrand, J.D., Shannon, J.D., Fox, J.W., Vines, R.R., Parsons, J.T., 1994. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol. Cell. Biol.* 14, 1680–1688.
- Schwartz, M.A., 2001. Integrin signaling revisited. *Trends Cell Biol.* 11, 466–470.
- Schwarzbauer, J.E., 1997. Cell migration: May the force be with you. *Curr. Biol.* 7, R292–R294. doi:10.1016/S0960-9822(06)00140-0

- Scott, L.M., Chen, L., Daniel, K.G., Brooks, W.H., Guida, W.C., Lawrence, H.R., Sebt, S.M., Lawrence, N.J., Wu, J., 2011. Shp2 protein tyrosine phosphatase inhibitor activity of estramustine phosphate and its triterpenoid analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 730–733. doi:10.1016/j.bmcl.2010.11.117
- Shelef, L.A., 1984. Antimicrobial Effects of Spices¹. *J. Food Saf.* 6, 29–44. doi:10.1111/j.1745-4565.1984.tb00477.x
- Shifrin, V.I., Davis, R.J., Neel, B.G., 1997. Phosphorylation of Protein-tyrosine Phosphatase PTP-1B on Identical Sites Suggests Activation of a Common Signaling Pathway during Mitosis and Stress Response in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* 272, 2957–2962.
- Shiota, M., Tanihiro, T., Nakagawa, Y., Aoki, N., Ishida, N., Miyazaki, K., Ullrich, A., Miyazaki, H., 2003. Protein tyrosine phosphatase PTP20 induces actin cytoskeleton reorganization by dephosphorylating p190 RhoGAP in rat ovarian granulosa cells stimulated with follicle-stimulating hormone. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 17, 534–549. doi:10.1210/me.2002-0187
- Simpson, G.E., 1962. Folk Medicine in Trinidad. *J. Am. Folk.* 75, 326. doi:10.2307/538368
- Smith, B.D., 2006. Eastern North America as an independent center of plant domestication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 12223–12228. doi:10.1073/pnas.0604335103
- Stewart, A.E., Dowd, S., Keyse, S.M., McDonald, N.Q., 1999. Crystal structure of the MAPK phosphatase Pyst1 catalytic domain and implications for regulated activation. *Nat. Struct. Biol.* 6, 174–181. doi:10.1038/5861
- Sullivan, S.G., Chiu, D.T., Errasfa, M., Wang, J.M., Qi, J.S., Stern, A., 1994. Effects of H₂O₂ on protein tyrosine phosphatase activity in HER14 cells. *Free Radic. Biol. Med.* 16, 399–403.
- Suzuki, Y.J., Forman, H.J., Sevanian, A., 1997. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 269–285.
- Talamás-Rohana, P., Meza, I., 1988. Interaction between pathogenic amebas and fibronectin: substrate degradation and changes in cytoskeleton organization. *J. Cell Biol.* 106, 1787–1794.
- Tatosyan, A.G., Mizenina, O.A., 2000. Kinases of the Src family: structure and functions. *Biochem. Biokhimiia* 65, 49–58.

- Teixeira, J.E., Mann, B.J., 2002. Entamoeba histolytica-induced dephosphorylation in host cells. *Infect. Immun.* 70, 1816–1823.
- Tonks, N.K., Diltz, C.D., Fischer, E.H., 1988. Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J. Biol. Chem.* 263, 6722–6730.
- Tsiani, E., Fantus, I.G., 1997. Vanadium Compounds. *Trends Endocrinol. Metab.* 8, 51–58. doi:10.1016/S1043-2760(96)00262-7
- Umezawa, K., Kawakami, M., Watanabe, T., 2003. Molecular design and biological activities of protein-tyrosine phosphatase inhibitors. *Pharmacol. Ther.* 99, 15–24.
- Van Etten, R.A., 1999. Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends Cell Biol.* 9, 179–186.
- Wallace, R.J., Oleszek, W., Franz, C., Hahn, I., Baser, K.H.C., Mathe, A., Teichmann, K., 2010. Dietary plant bioactives for poultry health and productivity. *Br. Poult. Sci.* 51, 461–487. doi:10.1080/00071668.2010.506908
- Wilson, G.F., Kaczmarek, L.K., 1993. Mode-switching of a voltage-gated cation channel is mediated by a protein kinase A-regulated tyrosine phosphatase. *Nature* 366, 433–438. doi:10.1038/366433a0
- Wu, Y.C., Horvitz, H.R., 1998. *C. elegans* phagocytosis and cell-migration protein CED-5 is similar to human DOCK180. *Nature* 392, 501–504. doi:10.1038/33163
- Xie, L., Zhang, Y.-L., Zhang, Z.-Y., 2002. Design and characterization of an improved protein tyrosine phosphatase substrate-trapping mutant. *Biochemistry (Mosc.)* 41, 4032–4039.
- Zabolotny, J.M., Bence-Hanulec, K.K., Stricker-Krongrad, A., Haj, F., Wang, Y., Minokoshi, Y., Kim, Y.-B., Elmquist, J.K., Tartaglia, L.A., Kahn, B.B., Neel, B.G., 2002. PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev. Cell* 2, 489–495.
- Zhan, X.-L., Wishart, M.J., Guan, K.-L., 2001. Nonreceptor Tyrosine Phosphatases in Cellular Signaling: Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinases. *Chem. Rev.* 101, 2477–2496. doi:10.1021/cr000245u
- Zhang, Z.Y., 1998. Protein-tyrosine phosphatases: biological function, structural characteristics, and mechanism of catalysis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 33, 1–52. doi:10.1080/10409239891204161
- Zhang, Z.-Y., 2005. Functional studies of protein tyrosine phosphatases with chemical approaches. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics, Inhibitors of*

- Protein Kinases (4th International Conference, Inhibitors of Protein Kinases) and Associated Workshop: Modelling of Specific Molecular Recognition Processes (Warsaw, Poland, June 25-29, 2005) 1754, 100–107. doi:10.1016/j.bbapap.2005.09.005
- Zhang, Z.-Y., 2002. Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42, 209–234. doi:10.1146/annurev.pharmtox.42.083001.144616
- Zhang, Z.-Y., Van Etten, R.L., 1990. Purification and characterization of a low-molecular-weight acid phosphatase—A phosphotyrosyl-protein phosphatase from bovine heart. *Arch. Biochem. Biophys.* 282, 39–49. doi:10.1016/0003-9861(90)90084-C
- Zhang, Z.Y., Wang, Y., Dixon, J.E., 1994. Dissecting the catalytic mechanism of protein-tyrosine phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 1624–1627.
- Zheng, J., Petersen, F., Yu, X., 2014. The role of PTPN22 in autoimmunity: learning from mice. *Autoimmun. Rev.* 13, 266–271. doi:10.1016/j.autrev.2013.10.011

XI) Apéndice: Imágenes y Figuras

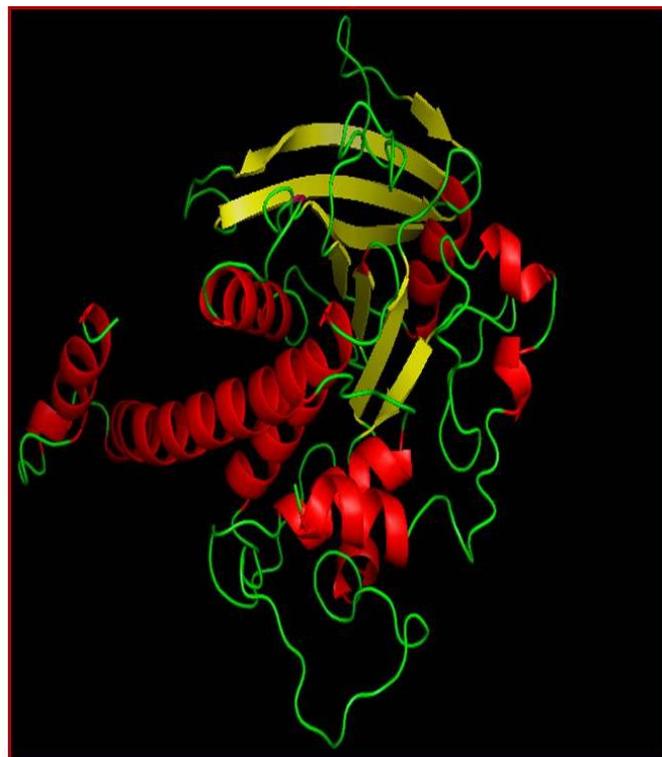


Figura A1. Estructura 3D generada por el programa I-Tasser.

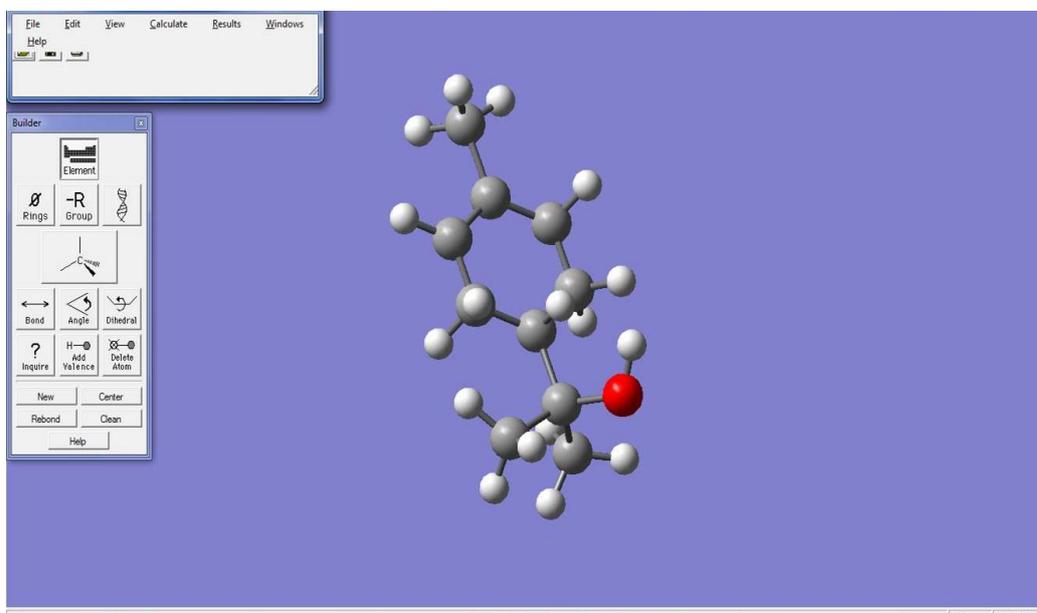


Figura A2. Dibujo y minimización de la energía de los ligandos con el programa GaussView 2.1.

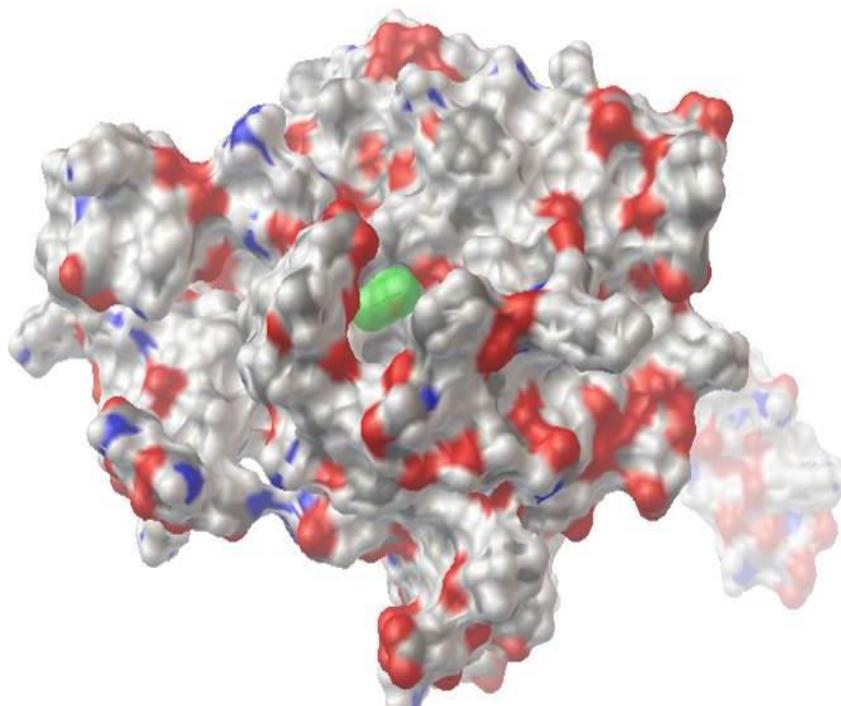


Figura A3. α -Terpineno (molécula verde) se sitúa exactamente dentro de la cavidad del sitio catalítico de la enzima.



Figura A4. Sistema de hidrodestilación para obtener el aceite esencial de *C. ambrosioides*.

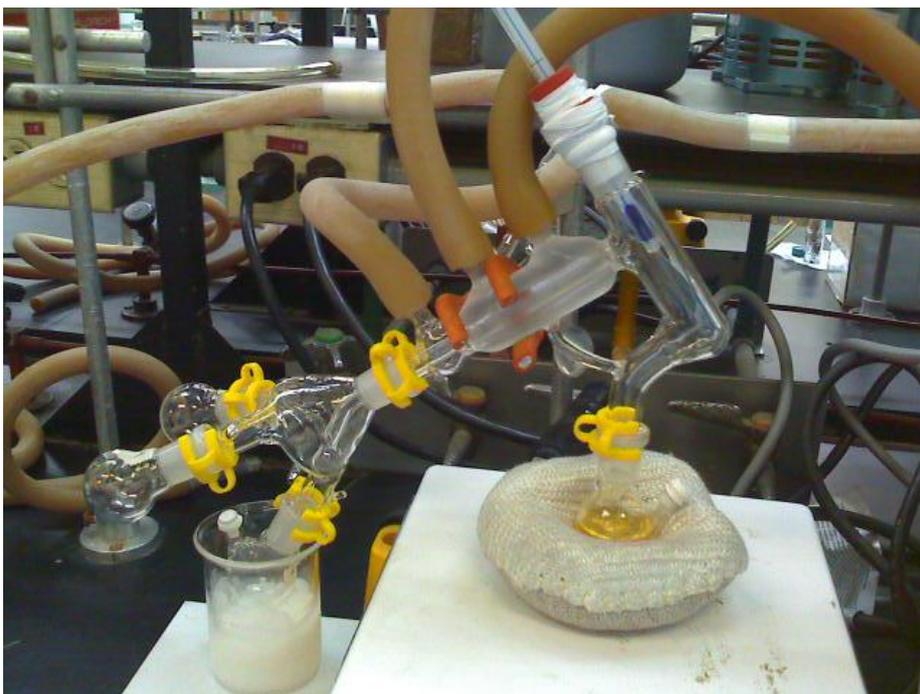


Figura A5. Destilación Fraccionada del Aceite esencial de *C. ambrosioides*.

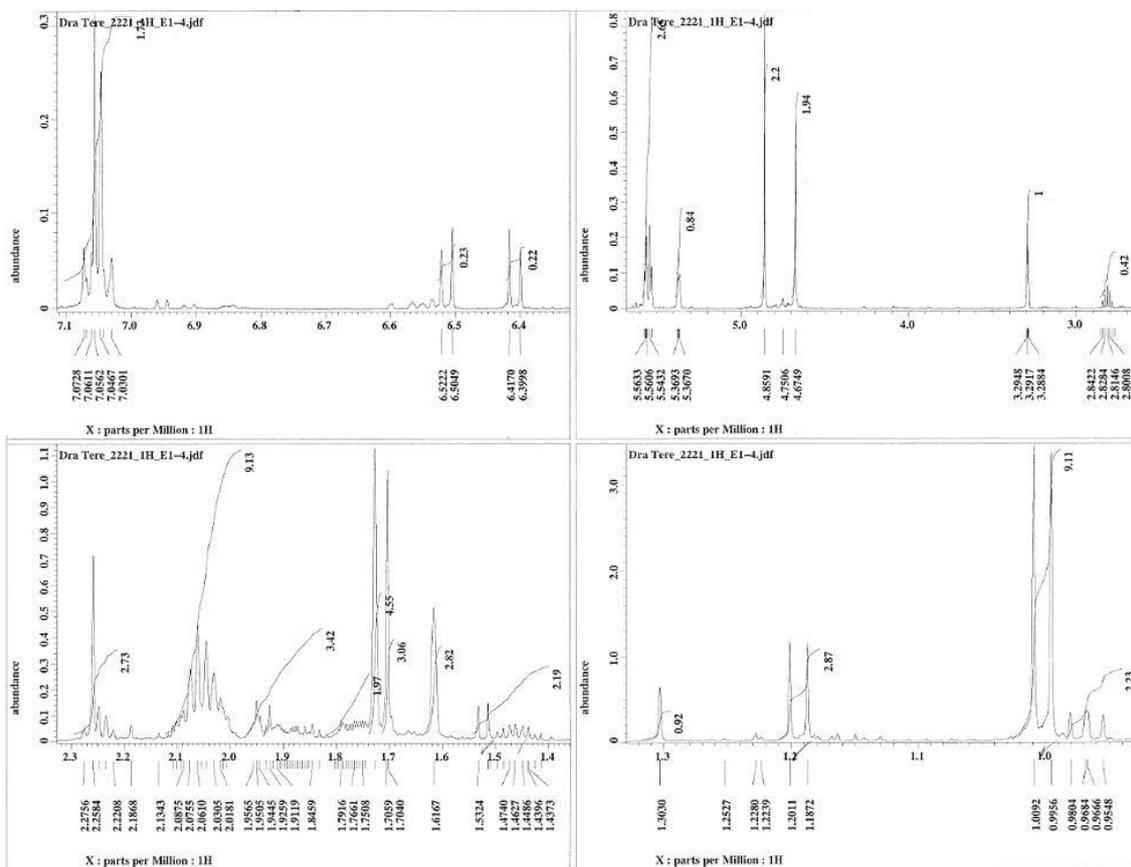


Figura A6. Espectro completo ampliado de H1, del aceite completo de *C. ambrosioides*.

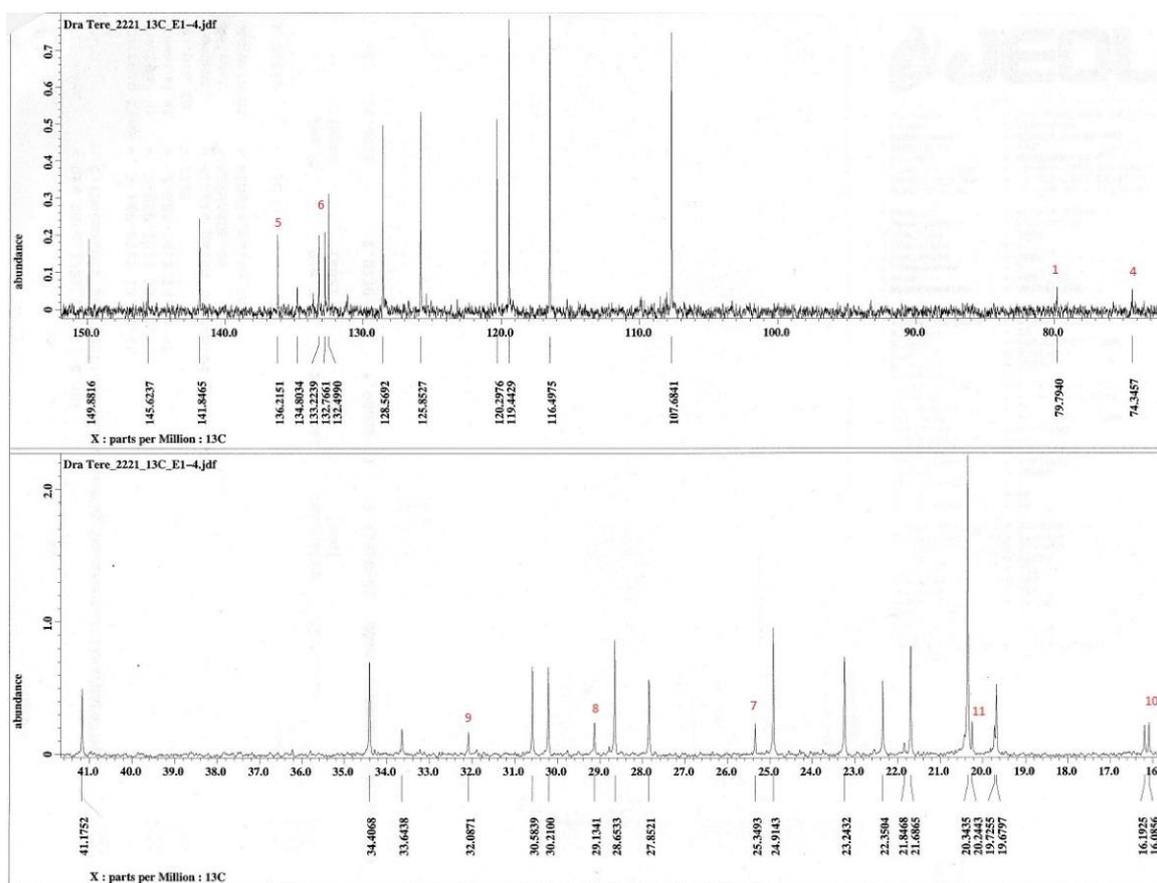


Figura A7. Espectro ampliado de ¹³C del aceite completo de *C. ambrosioides*.