



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

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y
PATOGENESIS MOLECULAR**

**Caracterización biológica de la proteína tirosina
fosfatasa PRL de *Entamoeba histolytica* (EhPRL) y su
participación en la patogenicidad**

T E S I S

Que presenta

M. en C. ANA LILIA RAMÍREZ TAPIA

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

Director de la Tesis:

Dr. José Luis Rosales Encina

México, D. F.

AGOSTO, 2015

El presente trabajo se desarrolló bajo la dirección del **Dr. José Luis Rosales Encina**, en el laboratorio 7 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la asesoría de la Dra. Patricia Talamás Rohana, del Dr. Marío Alberto Rodríguez Rodríguez y del Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández, de este departamento y de la Dra. María Del Carmen Guzmán Bracho del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, InDRE.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el proyecto 104119. Durante la realización de este trabajo la M. en C. Ana Lilia Ramírez Tapia estuvo becada por el CONACyT (**203353**, del 01 de febrero de 2009 al 01 de febrero del 2013).

AGRADECIMIENTOS

*Agradezco a mi director de tesis, el **Dr. José Luis Rosales Encina** por la oportunidad que me brindó para el desarrollo del presente trabajo de investigación, gracias Dr. José Luis por su tiempo, por el espacio que me otorgó en su laboratorio y por las enseñanzas.*

*Ofrezco un especial agradecimiento a mi comité tutorial por su tiempo y sugerencias, gracias por las contribuciones al presente trabajo. Agradezco a la **Dra. Patricia Talamás Rohana** por sus sugerencias al presente trabajo y por permitirme el acceso a su laboratorio y a los recursos, gracias por el tiempo y disponibilidad brindada.*

*Agradezco y reconozco la labor de la auxiliar del laboratorio 7, **Bióloga Lidia Baylón Pacheco**. Gracias Lidia por acompañarme en este camino desde el primer día de mi llegada y por facilitarme los medios para el desarrollo del proyecto.*

*Gracias a la auxiliar del laboratorio 7, **M. en C. Patricia Espíritu gordillo** por el apoyo técnico. Agradezco también a los técnicos de los laboratorios 7 y 9, a **Belem de Luna, Asael de Luna y a Enrique de Luna**.*

*Agradezco a todos los miembros del laboratorio 9 porque durante el desarrollo de este proyecto siempre me brindaron el apoyo y la asesoría. Agradezco al **M. en C. Carlos Osorio Trujillo**, a la **Dra. Veronica Ivonne Ramírez Hernández**, a la **Dra. Olga Garibay García**.*

*Finalmente, agradezco a mis compañeros y amigos del departamento porque con ellos el camino fue más ligero. Gracias **Jorge Antonio Pérez Saldaña, Juan Antonio Garibay García, Alberto Alonso Morales, Francisco Rendón Gandarilla, Luis Alberto Estrada Figueroa, Patricia Cuellar Silva, Rosa Elena Cárdenas**.*

DEDICATORIAS

*Dedico el resultado del trabajo de estos años a mis padres, la gran señora **Lilia Tapia Ávila** y el gran señor **Germán Bernando Ramírez Sánchez**, los tesoros que la vida me ha brindado. Gracias padres porque recorrieron conmigo cada paso, de rodillas o de pie, caminando o corriendo siempre estuvieron ahí y por Ustedes lo logré.*

*Dedico este logro a la pequeña **Aurora Ramírez Fitz**, que tu mundo siempre esté lleno de alegrías y éxitos.*

*A la vida...porque me has tirado y me he levantado y con todo me has llenado de aprendizaje, pero sobre todo porque me has dado el amor. Gracias **José Alfredo Díaz Gandarilla** porque me das el valor para continuar avanzando sin miedo al siguiente peldaño.*

CONTENIDO

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Epidemiología	1
I.2 Ciclo de vida	3
I.3 Patología	4
I.4 Patogenicidad y virulencia.	7
I.4.1 La locomoción en <i>E. histolytica</i>	12
I.5 Proteínas tirosina fosfatasas (PTPasas)	15
I.5.1. Mecanismo catalítico de PTPasas:	17
I.5.2. Estructura de PTPasas	18
I.5.3. Regulación de PTPasas	19
I.6 Proteína tirosina fosfatasa de regeneración de hígado (PTPasa-PRL)	21
I.6.1. Características estructurales	23
I.6.2. Localización celular y distribución en tejidos.	25
I.6.3. Función biológica de las PRL	25
I.6.4. Regulación de la expresión de PRL.	28
I.7. PTPasas en parásitos protozoarios	30
II. JUSTIFICACIÓN	33
III. HIPÓTESIS	34
IV. OBJETIVO GENERAL	34
IV.I OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
V. MATERIAL Y MÉTODOS	35
V.1 Cultivos celulares	35
V.2 Purificación de RNA total	35
V.3 Amplificación por RT-PCR	36
V.4 Clonación de EhPRL	37
V.5 Transformación de bacterias <i>E. coli</i> DH5 α	38
V.6 Transformación de bacterias <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	38

V.7 Purificación de DNA plasmídico-----	39 -
V.8 Reacción de secuenciación -----	39 -
V.9 Purificación de la proteína His6::EhPRL por cromatografía de afinidad a níquel (Ni-NTA)-----	40 -
V.10 Cuantificación de proteínas-----	41 -
V.11 Inmunización de ratones -----	41 -
V.13 Determinación de la actividad de fosfatasa -----	42 -
V.14 Ensayos de inhibición de la actividad de fosfatasa de rEhPRL -----	43 -
V.15 Purificación de colágena y fibronectina -----	44 -
V.16 Microscopía de fluorescencia -----	44 -
V.17 Fraccionamiento de trofozoitos e inmunotransferencia -----	45 -
V.18 Recuperación de trofozoítos de lesiones hepáticas -----	46 -
V.19 Expresión diferencial del mRNA de EhPRL -----	46 -
V.20 Construcción de plásmidos y transfección <i>E. histolytica</i> -----	47 -
V.21 Transfección de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> -----	50 -
V.22 Evaluación de la sobreexpresión del mRNA y proteína de las construcciones pNEO-C-HSV::EhPRL y pNEO-N-HSV::EhPRL -----	51 -
V.23 Ensayos de migración celular en transwell-----	52 -
V.24 Ensayos de cierre de herida (wound-healing) -----	53 -
V.25 Fraccionamiento celular de amibas -----	54 -
V.26 Análisis estadístico-----	55 -
VI. RESULTADOS -----	56 -
VI.1 La proteína EhPRL presenta alta homología con la familia PRL. -----	56 -
VI.2 Clonación de EhPRL. -----	59 -
VI.3 Purificación de la proteína recombinante rEhPRL.-----	65 -
VI.4 Caracterización de la actividad de fosfatasa de rEhPRL con 3- <i>o</i> -fluoresceín fosfato (OMFP) como sustrato. -----	68 -
VI.5 La proteína EhPRL se localiza tanto en la membrana plasmática como en el citoplasma. -----	76 -
VI.6 Regulación de la expresión del mRNA de EhPRL en trofozoítos adheridos a componentes de matriz extracelular -----	79 -

VI.7 El mensajero de EhPRL es inducido en trofozoítos recuperados de aha-----	87 -
VI.8 Sobre expresión de la proteína EhPRL de <i>Entamoeba histolytica</i> -----	91 -
VI.9 Las clonas positivas para pNEO-C-HSV::EhPRL y pNEO-N-HSV::EhPRL sobre expresan el mRNA y la proteína EhPRL -----	98 -
VI.10 La sobreexpresión exógena de EhPRL incrementa la migración -----	101 -
VI.11 Localización celular de pNEO-N-HSV::EhPRL y pNEO-C-HSV::EhPRL--	112 -
VII. DISCUSIÓN -----	117 -
VIII. CONCLUSIONES -----	132 -
IX. PERSPECTIVAS -----	133 -
X. REFERENCIAS -----	134 -

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Casos nuevos e incidencia de Amebiasis intestinal 2000-2014-----	2-
Figura 2. Incidencia de Amebiasis intestinal en México-----	2-
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i> -----	4-
Figura 4. Destrucción de tejido asociada con la infección de <i>E. histolytica</i> -----	6-
Figura 5. Modelo tradicional propuesto para el mecanismo de citotoxicidad de <i>E. histolytica</i> -----	10-
Figura 6. Polarización de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> -----	14-
Figura 7. Clasificación de PTPasas-----	16-
Figura 8. Mecanismo catalítico-----	18-
Figura 9. Estructura terciaria de PTPasa-----	19-
Figura 10. Línea de tiempo de la investigación de PRLs-----	21-
Figura 11. Diagrama esquemático de la estructura de PRL1-----	23-
Figura 12. Vías de señalización afectadas por las fosfatasa PRL-----	27-
Figura 13. Red de regulación propuesta y vías de señalización rio abajo de PRL----	29-
Figura 14. Esquematización de las construcciones pNEO-C-HSV::EhPRL y pNEO-N-HSV::EhPRL-----	48-

LISTA DE FIGURAS DE RESULTADOS

Figura 15. Alineamiento múltiple-----	58-
Figura 16. Clonación y secuenciación de EhPRL-----	60-
Figura 17. Mapeo de restricción de pRSET-A-EhPRL con la enzima Sspl-----	63-
Figura 18. Purificación de rEhPRL e inmunodetección de la proteína nativa-----	66-
Figura 19. Efecto del pH y la concentración de rEhPRL en la catálisis enzimática---	69-
Figura 20. Efecto de la concentración de sustrato OMFP en la catálisis enzimática--	72-
Figura 21. Inhibición de la actividad enzimática de rEhPRL-----	74-
Figura 22. EhPRL se localiza en membrana plasmática y en citoplasma-----	77-
Figura 23. Modulación del mRNA y proteína EhPRL en trofozoítos interactuados con FN-----	80-

Figura 24. Modulación del mRNA y proteína EhPRL en trofozoítos interactuados con COL-----	84-
Figura 25. El mRNA de EhPRL es sobreexpresado en trofozoítos recuperados de AHA.-----	88-
Figura 26. Modulación del mRNA en trofozoítos recuperados de AHA interactuados con componentes de MEC-----	90-
Figura 27. Secuenciación de las construcciones TOPO-C-HSV::EhPRL y TOPO-N-HSV::EhPRL-----	92-
Figura 28. Liberación del inserto de 2 clonas positivas para pNEO-N-HSV::EhPRL y pNEO-C-HSV::EhPRL-----	95-
Figura 29. Curva dosis-respuesta de trofozoitos con-----	96-
Figura 30. Efecto del G418 sobre el crecimiento de trofozoítos transfectados-----	97-
Figura 31. Análisis de la expresión de EhPRL en trofozoítos transfectados-----	99-
Figura 32. Migración de trofozoitos transfectados-----	102-
Figura 33. Migración celular en presencia de SFB-----	104-
Figura 34. Migración celular en presencia de FN-----	107-
Figura 35. Ensayo de cierre de herida-----	110-
Figura 36. Localización celular de pNEO-N-HSV::EhPRL y pNEO-C-HSV::EhPRL-----	113-
Figura 37. Fraccionamiento celular de trofozoítos transfectados-----	116-

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Patrones de unión identificados de PRL y sustratos putativos-----	26-
Tabla 2. PTPasas en <i>Entamoeba histolytica</i> y humano-----	31-
Tabla 3. Oligonucleotidos para la amplificación de pNEO-C-HSV::EhPRL y pNEO-N-HSV::EhPRL-----	49-

RESUMEN

Las proteínas tirosina fosfatasas de regeneración de hígado (PRLs) son un grupo de fosfatasas que no han sido estudiadas ampliamente en parásitos protozoarios. En humanos, las PRL están involucradas en cáncer metastásico, en la promoción de la migración celular y en la invasión. Las PTPasa son reconocidas cada vez más como efectoras importantes de las interacciones huésped-patógeno. En el presente trabajo, caracterizamos la única proteína tirosina fosfatasa PRL (PTPasa EhPRL) putativa del parásito intestinal eucariote, *E. histolytica*. Reportamos que la proteína EhPRL posee el motivo catalítico característico de las PTPasas, HCX₅R y la caja CAAX característica de la familia de PRLs; EhPRL presenta de 31-32% de homología con las tres isoformas de PRLs humanas. En la amiba, la proteína se expresó en niveles bajos pero detectables. La proteína recombinante (rEhPRL) tuvo actividad enzimática con el sustrato 3-*o*-metilo fluoresceína fosfato (OMFP); esta actividad enzimática fue inhibida por el inhibidor de PTPasas, *o*-vanadato. Por inmunofluorescencia demostramos que EhPRL nativa se localiza en el citoplasma y la membrana plasmática. Cuando los trofozoítos interactuaron con colágeno, EhPRL se relocalizó con el tiempo a estructuras similares a vesículas. La interacción con fibronectina aumentó la presencia de la enzima en el citoplasma. Mediante RT-PCR, demostramos que el mRNA de EhPRL se sobreexpresó cuando los trofozoítos interactuaron con colágeno, pero no con la fibronectina. Trofozoítos recuperados de absceso hepático amebiano mostraron mayores niveles de expresión del mRNA de EhPRL que los trofozoítos normales. Trofozoítos transfectantes que sobreexpresaron a EhPRL fusionada a una etiqueta HSV (HSV::EhPRL) en la región N-terminal presentaron un aumento significativo en la movilidad celular en respuesta a suero y fibronectina, dicha movilidad se incrementó únicamente cuando la caja CAAX de la región C-terminal de EhPRL estuvo libre para una posible prenilación que promueve su inserción en membranas celulares. Estos resultados sugieren fuertemente que EhPRL podría jugar un papel importante en la biología y respuesta adaptativa del parásito al ambiente en el huésped durante el desarrollo del absceso hepático amebiano, participando así en el mecanismo patogénico.

ABSTRACT

Protein tyrosine phosphatase of regenerating liver (PRL) is a group of phosphatases that has not been broadly studied in protozoan parasites. In humans, PRLs are involved in metastatic cancer, the promotion of cell migration and invasion. PTPases have been increasingly recognized as important effectors of host-pathogen interactions. We characterized the only putative protein tyrosine phosphatase PRL (PTPase EhPRL) in the eukaryotic human intestinal parasite *E. histolytica*. Here, we reported that the EhPRL protein possessed the classical HCX5R catalytic motif of PTPase and the CAAX box characteristic of the PRL family and exhibited 31-32% homology with the three human PRL isoforms. In amoebae, the protein was expressed at low but detectable levels. The recombinant protein (rEhPRL) had enzymatic activity with the 3-o-methyl fluorescein phosphate (OMFP) substrate; this enzymatic activity was inhibited by the PTP inhibitor o-vanadate. Using immunofluorescence we showed that native EhPRL was localized to the cytoplasm and plasma membrane. When the trophozoites interacted with collagen, EhPRL relocated over time to vesicle-like structures. Interaction with fibronectin increased the presence of the enzyme in the cytoplasm. Using RT-PCR, we demonstrated that EhPRL mRNA expression was upregulated when the trophozoites interacted with collagen but not with fibronectin. Trophozoites recovered from amoebic liver abscesses showed higher EhPRL mRNA expression levels than normal trophozoites. Transfected trophozoites overexpressing EhPRL fused to an HSV tag (N-HSV::EhPRL) showed a significant increase in cell motility in response to serum or fibronectin, the motility increased only when the CAAX box in C-terminal of EhPRL was free for possible prenylation and insertion into cell membranes. These results strongly suggest that EhPRL may play an important role in the biology and adaptive response of the parasite to the host environment during amoebic liver abscess development, thereby participating in the pathogenic mechanism.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Epidemiología

Entamoeba histolytica es el parásito protozoario causante de la amebiasis humana. El parásito presenta distribución mundial, pero afecta principalmente a países en vías de desarrollo; infecta alrededor de 500 millones de personas y anualmente 40,000-110,000 mueren por complicaciones [1, 2]. La amebiasis es considerada la tercera parasitosis causante de mortalidad mundial, después de la malaria y la esquistosomiasis y es la cuarta causa de muerte debido a infecciones por protozoarios después de la malaria, la enfermedad de Chagas y Leishmaniasis [1, 2].

En México, la amebiasis intestinal es una enfermedad de relevancia epidemiológica, colocándose en el lugar 14 dentro de las 20 principales causas de enfermedades transmisibles en el 2014 [3]. En la **figura 1** se muestra la incidencia reconocida por la Secretaría de Salud en México hasta el 2015 [4]. El índice de mortalidad en México, debido a las severas complicaciones de la amebiasis ha disminuido en los últimos 40 años gracias al mejoramiento en la accesibilidad de drogas efectivas contra el parásito [5]. Sin embargo, un estudio seroepidemiológico reportó que 8.41% de la población mexicana a desarrollado anticuerpos circulantes anti-amiba, indicando la alta exposición de la población mexicana al parásito [5].

De acuerdo a la distribución geográfica de la amebiasis en el país, en 2014 los estados del sur y sureste presentaron la mayor incidencia. El estado de Yucatán presentó la incidencia más elevada con 659.09 seguida de Guerrero con 634.45 y Oaxaca con 601.57 y del occidente, Nayarit con 600.65 (**Figura 2**). Estos cuatro estados en conjunto constituyen el 26.82% de la totalidad de los casos presentados durante el 2014 [4].

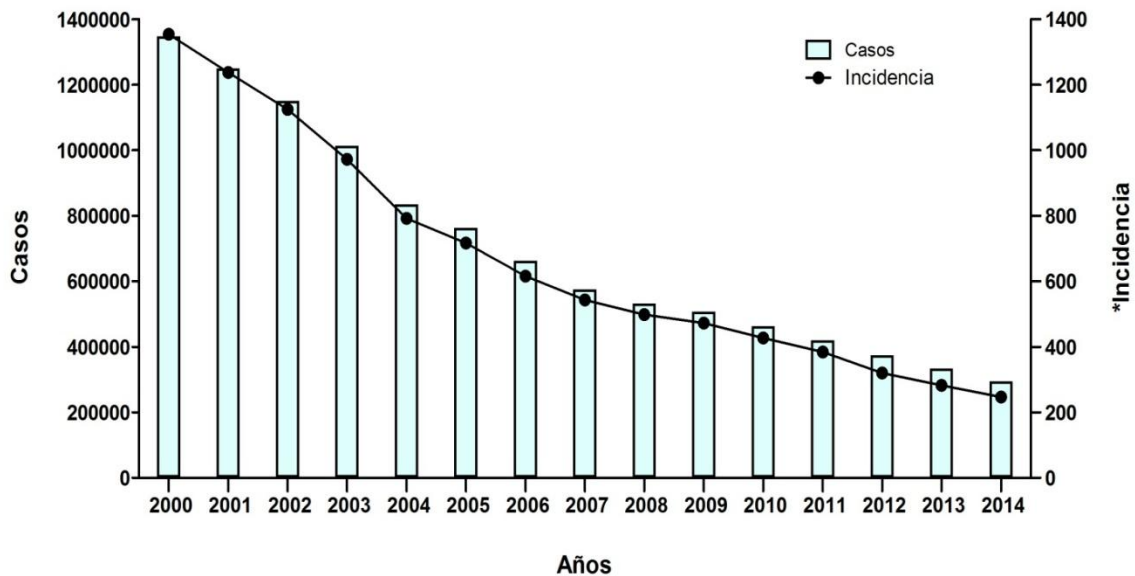


Figura 1. Casos nuevos e incidencia de Amebiasis intestinal 2000-2014, México.

*Incidencia por 100,000 habitantes. Fuente SINAVE/DGE/Secretaría de Salud [4].

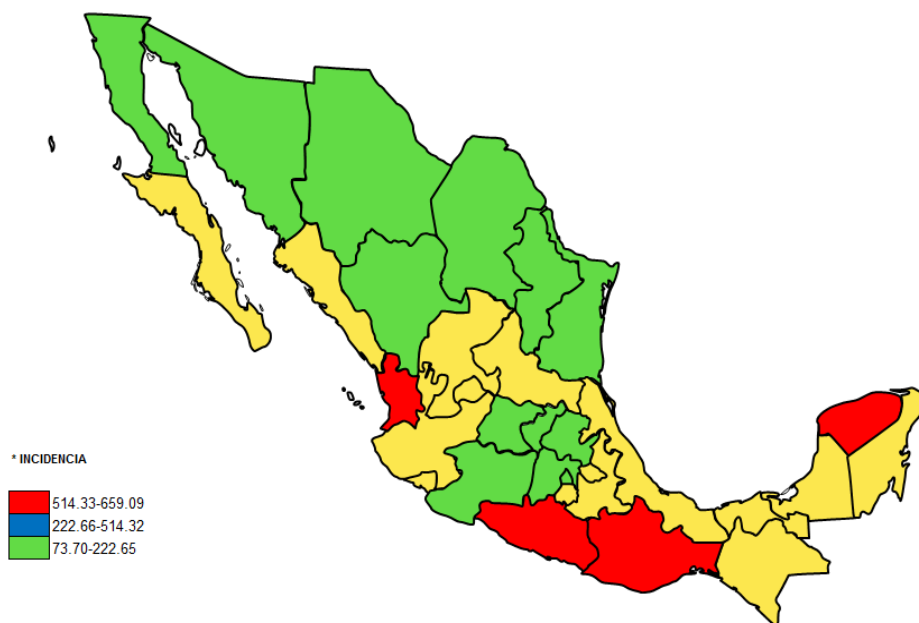


Figura 2. Incidencia de Amebiasis intestinal en 2014. Fuente: El número de casos nuevos por estado fue tomado de SINAVE/DGE/Secretaría de Salud; para el cálculo de la incidencia la población se tomó de las estimaciones y proyecciones por entidad federativa (2010-2030) de la Comisión Nacional de población, CONAPO. *Incidencia por 100 000 habitantes [4].

Con respecto a las complicaciones clínicas, las personas infectadas se dividen en dos grupos de acuerdo con sus manifestaciones clínicas: 90% son asintomáticos (portadores sanos) y 10% son sintomáticos, principalmente a nivel intestinal (disentería amebiana, colitis aguda, colitis no disentérica crónica, ameboma) y extraintestinal (absceso hepático amebiano, absceso cerebral, enfermedad genitourinaria y cutánea); solo del 2 al 20% de la población con síntomas clínicos son invadidas más allá de la mucosa intestinal [5]. El 1% de las personas infectadas pueden desarrollar patologías potencialmente fatales como colitis amebiana fulminante [2, 5] .

En México, la tasa media de incidencia de absceso hepático amebiano en el período de 1995-2000 fue de 10 casos por cada 100,000 habitantes, con un aumento significativo en 1997 cuando la tasa de casos llegó a 39 por cada 100,000 habitantes [5]. En el 2014 mediante el SINAVE/DGE la Secretaría de Salud reportó un total de 496 casos de AHA en México [3].

I.2 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *E. histolytica* comienza cuando el quiste (forma infecciosa) es ingerido por contaminación de comida y/o agua con materia fecal. Después de la ingestión y de pasar a través del estómago resistiendo el ambiente ácido, el organismo desenquista en el íleon terminal, donde se induce su transformación a metaquiste. Cada trofozoito tetranucleado que surge da lugar a 8 trofozoítos uninucleados, que emergen en el intestino grueso como un trofozoito activo y móvil. Los trofozoítos se adhieren fuertemente a la mucosa del colon donde se multiplican por fisión binaria y se diferencian a quiste cuando estos se mueven hacia el final del intestino grueso. Los quistes son entonces expulsados con las heces y pueden permanecer viables en un ambiente húmedo por meses (**figura 3**) [6, 7].

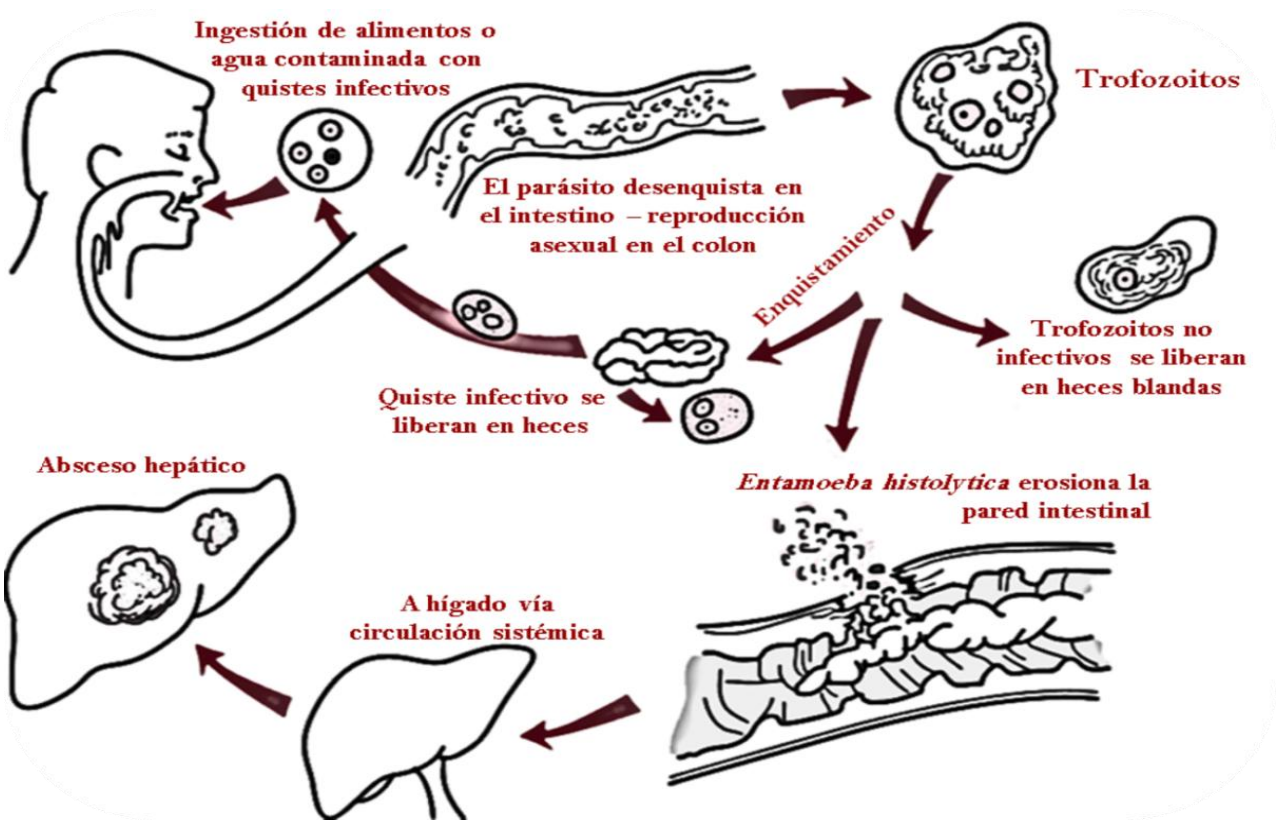


Figura 3. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*. La infección por este parásito puede seguir dos cursos. Infección no invasiva ocasionando disentería amebiana, colitis aguda, colitis no disintérica crónica o ameboma e infección invasiva diseminándose por torrente sanguíneo a órganos como hígado, cerebro y pulmones. Tomada y modificada de <http://aprendeparasitologia.blogspot.mx/2013/06/amebiasis.html>.

I.3 Patología

Dependiendo del órgano afectado, las manifestaciones clínicas de la amebiasis son intestinales o extraintestinales. Hay cuatro formas de amebiasis intestinal invasiva, las cuales son generalmente agudas: disentería o diarrea sanguinolenta, colitis fulminante, apendicitis amebiana y ameboma del colon (**figura 4**) [6, 7].

Disentería amibiana: La enfermedad intestinal invasiva puede ocurrir desde días hasta años después de la infección inicial. Esta forma es caracterizada por diarrea sanguinolenta copiosa, dolor abdominal difuso y raramente fiebre. Los pacientes con disentería tienen de 3 a 5 evacuaciones mucosanguinolentas por día, con moderado dolor cólico y fiebre [6, 7].

Colitis amebiana fulminante (CAF) es la forma más severa de la enfermedad intestinal, ésta es fatal en un 50 al 100% [6, 7]. La CAF se caracteriza por inflamación y lesiones ulcerosas necróticas en grandes áreas [8]. La inflamación prolongada en el tejido dañado observada en la amebiasis intestinal se ha propuesto como papel clave en el desarrollo de CAF; células de la mucosa del colon de pacientes con FAC expresaron IL-8, IL-10, IL-4 y TNF- β , pero no INF- γ , revelando que el mecanismo ameboidal mediado por los macrófagos activados está ausente [8].

Ameboma: Las complicaciones de la enfermedad intestinal incluyen fístulas rectovaginales y la formación de una masa intraluminal anular (ameboma), obstrucción del intestino, ulceraciones de piel perianal, megacolon tóxico, perforación, peritonitis y muerte. Un ameboma es una masa del colon que es formada por amibas que puede ser el resultado de una forma crónica o por una disentería amebiana [6, 7].

La diseminación de la infección amebiana a sitios extraintestinales involucra por orden de frecuencia al hígado, pulmón, pericardio, cerebro y piel [6, 7].

Diseminación de *E. histolytica* al hígado: El absceso hepático amebiano (AHA) resulta de la migración de los trofozoítos del colon al hígado a través de la circulación porta [7]. Es 10 veces más común en adultos que en niños y 3 veces más frecuente en hombres (de 20 a 40 años) que en mujeres [7]. Cuando el absceso está localizado en el lóbulo derecho, los síntomas característicos son tos irritante con dolor de pecho. Cuando el absceso se localiza en la parte superior del lóbulo izquierdo, puede causar

dolor epigástrico. El lóbulo derecho es 4 veces más frecuente de ser invadido que el izquierdo debido a que este recibe el peso del flujo venoso del colon derecho [7]. La invasión hepática por trofozoítos resulta en una marcada destrucción de tejido con el reclutamiento de neutrófilos, necrosis celular y formación de micro abscesos [7, 9].

Los trofozoítos de *E. histolytica* producen absceso hepático de manera experimental en hámsteres [10]. De manera natural, *E. histolytica* solo produce lesiones invasivas en el intestino del hombre [10], aunque no se descarta la posibilidad de que babuinos (*Papio hamadryas anubis*) puedan desarrollar absceso hepático, ya que un reciente estudio reveló que babuinos producen anticuerpos IgG e IgA contra la subunidad pesada de la lectina GAL/GALNAc, cuyos anticuerpos comparten especificidad de epítipo con los anticuerpos de humanos con infección asintomática o con aquellos curados de AHA [11].

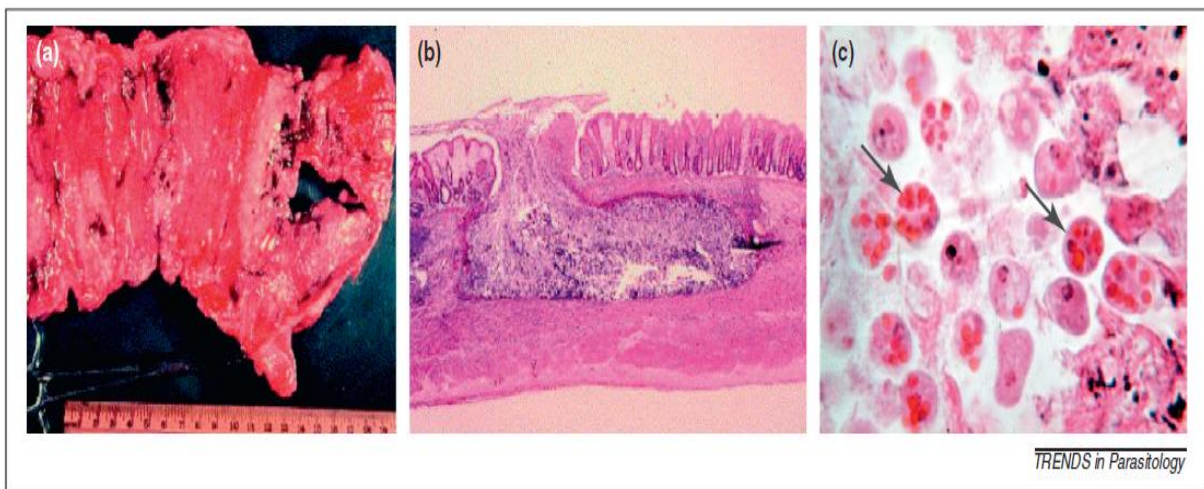


Figura 4. Destrucción de tejido asociada con la infección de *E. histolytica*. (a) Un ejemplo de colitis amebiana donde se muestra la presencia de múltiples úlceras. (b) Vista lateral de un tejido con úlceras en forma de “matraz”, clásicas de la infección. (c) Trofozoítos de *E. histolytica* (flechas) tomadas de una úlcera que muestra la presencia de numerosos eritrocitos ingeridos por el parásito. Tomada de Ralston, K. S. and Petri W. A [9].

Se han identificado cinco tipos de lesiones que corresponden a la progresión del daño causado por trofozoítos de *E. histolytica* [6]. En el estado inicial, las lesiones no específicas producidas por los trofozoítos son caracterizadas por engrosamiento de la mucosa debido a hiperplasia glandular y edema estromal. Las amibas están presentes en pequeña cantidad en la superficie del exudado. Cuando la lesión progresa, hay una depresión mucopénica debido a la pérdida de mucinas de la superficie y de células epiteliales glandulares; hay infiltrado de neutrófilos. Las amibas pueden estar presentes en un gran número en la superficie luminal, son particularmente abundantes adyacentes al sitio de la lisis epitelial. La lesión invasiva tardía con ulceraciones profundas corresponde a úlceras en forma de matraz. Las úlceras de la mucosa se extienden dentro de una gran área de la submucosa, la cual es particularmente susceptible a la acción lítica del parásito y produce abundantes microhemorragias. Se presenta un exudado denso que contiene eritrocitos, fibrina, material proteinaseo acelular. Finalmente, la pérdida de la mucosa y submucosa con la formación de tejido granulatoso es característico de úlcera granulomatosa [6].

I.4 Patogenicidad y virulencia.

La patogenicidad asociada a *E. histolytica* se ha relacionado con al menos tres características de la amiba, descritas a continuación:

i) Adhesión celular mediada por la lectina Gal/GalNAc:

El primer paso en el proceso de invasión de la mucosa intestinal es la penetración de una delgada capa de mucina altamente glicosilada que cubre el epitelio intestinal [12]. La destrucción de la célula huésped comienza con el contacto y la unión del trofozoito, la molécula clave en este proceso es la lectina Gal/GalNAc [13, 12]. La lectina Gal/GalNAc de la superficie del parásito se une a los residuos Gal/GalNAc expuestos por glicoproteínas de las células blanco. Esta adhesina es una proteína multifuncional de 260 kDa, es un heterodímero que presenta una subunidad pesada de 170 kDa y una subunidad ligera de 35/31 kDa, asociadas de forma no covalente por una subunidad intermediaria de 150 kDa [6, 12]. La isoforma de 35 kDa de la subunidad ligera es

altamente glicosilada y pierde el glicolípido GPI, el cual si está presente en el isoforma de 31 kDa [14]. La porción citoplasmática de la subunidad pesada tiene una identidad en la secuencia con el tallo citoplasmático de la β_2 -integrina que está involucrada en la señalización que controla la actividad adhesiva de la lectina amebiana [6]. La subunidad ligera muestra dos isoformas de 35 y 31 kDa, dicha subunidad está involucrada en la modulación de la actividad citopática del parásito [6]. El contacto de los trofozoítos con la célula huésped a través de la lectina Gal/GalNAc induce apoptosis celular [6, 9].

ii) **Secreción de amebaporos:**

Después del contacto con la célula huésped, el parásito secreta proteínas citotóxicas formadoras de poros (amebaporos) que atraviesan la membrana de la célula blanco [9]. El amebaporo es un péptido formador de poros de 77 aminoácidos, localizado en vesículas citoplasmáticas; se han descrito tres isoformas denominadas A, B, C que presentan homología con la granulosa y la NK-lisina producidas por células T citotóxicas y células NK y con saponinas [14, 15]; las 3 isoformas están presentes en una relación 35:10:1 [6]. El amebaporo es altamente soluble, pero es capaz de cambiar rápidamente a un estado insertado en membrana [15]; se une a los fosfolípidos cargados negativamente a través de residuos de lisina protonada, seguido por la inserción del péptido dentro de la bicapa lipídica conducido por el potencial negativo de membrana, de la membrana blanco [6]. Los poros formados a través de la membrana plasmática permiten el paso de agua, iones y otras moléculas pequeñas que resulta en hinchazón, y lisis de la célula blanco, como células epiteliales, linfocitos, polimorfonucleares y macrófagos [6].

Por este mecanismo, *E. histolytica* induce una rápida e irreversible liberación de calcio de la célula blanco que está asociada con la desestructuración de la membrana y muerte celular [9, 15]. Estudios con quelantes de calcio EGTA y EDTA mostraron un requerimiento absoluto de calcio extracelular en la citólisis amebiana de células blanco [15]. El tratamiento de las células blanco con verapamilo, un bloqueador lento de

canales de calcio, protege a la célula de lisis por la amiba [15]. Esto es, el Ca^{2+} puede actuar como un segundo mensajero y desencadenar la señalización celular del huésped para llevar a muerte por apoptosis [15].

iii) **Proteólisis por cisteína proteinasas (CPs):**

En el colon humano, la lamina basal que delimita el epitelio consiste principalmente de colágena tipo IV, laminina y proteoglicanos, y contienen un número de moléculas asociadas a la membrana basal tales como fibronectina (FN), tenascina C y entactina [6]. *E. histolytica* contiene una batería de proteasas que degrada los componentes de la matriz extracelular (ECM) y permiten o facilitan la invasión y diseminación lateral de trofozoítos [6].

Cisteína proteasas que van de 16 a 116 kDa son encontradas en extractos amebianos analizados en geles de sustrato [6]. De los componentes de ECM que *E. histolytica* encuentra durante la invasión colónica son laminina, colágeno tipo I y IV y fibronectina que son blanco para amebapain (EhCP1 o ACP3), histolisinas (EhCP2), EhCP5 y EhCP3, una proteasa neutra de 56 kDa [6]. En la **figura 5** se muestra un resumen de los eventos implicados en la patogenicidad de *E. histolytica*, antes descritos.

Figura 5. Modelo propuesto para el mecanismo de citotoxicidad de *E. histolytica* (en azul) hacia la célula blanco (en café) por acción de la lectina Gal/GalNAc (rectángulos verdes). Se muestran vesículas ácidas del parásito (círculos morados) que juegan un papel en la citotoxicidad debido a que su contenido es liberado hacia la célula blanco. Se desconoce como las moléculas efectoras del parásito, como KERP1 (rectángulos color rosa), los amebaporos y otros miembros de la familia SAPLIP (aros naranja) son transmitidas a la célula blanco. Hay proteínas adicionales, además de la lectina Gal/GalNAc, que participan en la unión a la célula blanco como TMKB1-9 y EhSTIRPs (rectángulos naranja, rectángulos turquesa). La lectina Gal/GalNAc puede contribuir por si sola al mecanismo citotóxico ya sea mediante la activación de la iniciación del programa citotóxico y/o mediante la activación de la entrada de calcio. Además, las cadenas intermedia y ligera de la lectina (igL, IgL) también podrían desempeñar algún papel en la muerte de la célula blanco. Se requiere de una entrada masiva de calcio extracelular (Ca^{2+} , círculos rosas) para la eliminación de células blanco; el mecanismo para la entrada de calcio es desconocido aunque podrían estar involucrados los amebapores y otros miembros de la familia SAPLIP. La entrada de calcio activa la calpaína, que activa por proteólisis a PTP1b, que a su vez induce la desfosforilación de residuos de tirosina fosforilada en proteínas de la célula blanco. Sin embargo, PTP1b podría no ser la única PTPasa responsable de la desfosforilación de tirosina. En última instancia, se activa la caspasa-3 (caspasa-3*) y la célula diana sucumbe a la muerte apoptótico. *Tomada y modificada de Ralston, K. S. and Petri W. A [9].*

Recientemente se han publicado nuevas aportaciones en el conocimiento del mecanismo de patogenicidad de *E. histolytica*:

iv) Trogocitosis. Una investigación pionera sobre los mecanismos de invasión de *E. histolytica* fue publicada recientemente [16], en donde se muestra evidencia de que *E. histolytica* mata por la ingestión de fragmentos de células vivas, lo que resulta en una elevación intracelular de calcio y eventualmente la muerte de dicha célula. Dicha internalización de fragmentos es denominada *trogocitosis* y es requerida para culminar en la muerte celular y contribuir en la invasión del tejido intestinal, abriendo un panorama distinto al modelo establecido para la destrucción del tejido durante la amebiasis.

E. histolytica presenta otras moléculas que favorecen su carácter invasivo, como metalocolagenasas que son proteasas que degradan colágeno tipo I y III; además secreta enzimas hidrolíticas como carbohidrato hidrolasas, las cuales degradan oligosacáridos de la mucina del colon, fosfatasas ácidas de unión a membrana que ayudan a destruir el citoesqueleto de la célula huésped [17].

I.4.1 La locomoción en *E. histolytica*

En la locomoción celular en mamíferos están involucrados al menos tres procesos: i) inicio o dirección del avance celular, ii) adhesión a los sustratos de la superficie a través de placas de adhesión, iii) empuje o movimiento del resto de la célula; dichos eventos deben ser rápidos y regulados con precisión. La fosforilación es un mecanismo ideal para controlar dichos eventos ya que ésta es una modificación postraducciona rápida y reversible [18].

En *E. histolytica*, la detección quimiotáctica y el proceso coordinado asociado con locomoción direccional parece ser central para iniciar la infección amebiana, por lo que los mecanismos de migración direccional también son de relevancia en el discernimiento de los mecanismos patogénicos desarrollados [19]. Los trofozoítos móviles de *E. histolytica* exhiben un pseudópodo frontal y un urópodo trasero (**figura 6**). La polarización de la amiba está asociada con la distribución diferencial en la célula de

complejos de actomiosina y de un grupo de proteínas que regular la dinámica del citoesqueleto [20]. La lectina Gal/GalNAc y algunas moléculas de superficie menos caracterizadas también se distribuyen asimétricamente en la membrana plasmática tras la activación, moléculas tales como receptores de superficie, moléculas de adhesión, microfilamento y los microtúbulos y componentes celulares asociados al tráfico de membranas necesarios para la endocitosis de moléculas de superficie [20]. La unión a FN o a componentes de MEC se traduce en información dentro del trofozoito activando la vía PKC con la producción de inositol trifosfato y la desfosforilación de varias proteínas [19].

Muchas de las proteínas que han sido implicadas en la adhesión a MEC y migración celular son fosforiladas, lo cual regula su plegamiento, actividad enzimática e interacción proteína-proteína [18]. Aunque la modulación de la movilidad celular por cinasas es bien conocida, evidencias recientes indican que las fosfatasas son requeridas en cada etapa del proceso de migración. Las fosfatasas, tales como las proteínas tirosina fosfatasas (PTPasa) pueden controlar la formación y mantenimiento del citoesqueleto de actina, regulan pequeñas GTPasas que actúan como interruptores moleculares y modulan la dinámica de adhesión a matriz, contracción de actina, liberación de la parte trasera de la célula y direccionalidad de la migración [18].

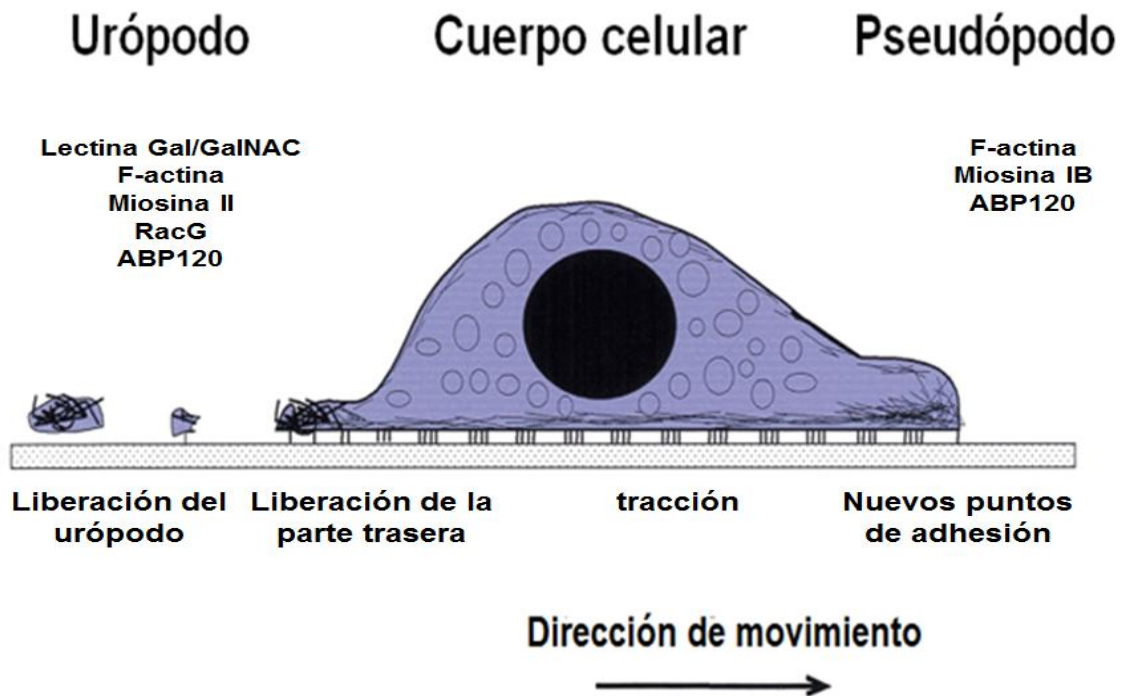


Figura 6. Polarización de trofozoítos de *E. histolytica*. La amiba se caracteriza por la presencia de un gran núcleo (círculo negro) y abundantes vesículas distribuidas en el citoplasma (círculos transparentes), un pseudópodo en la parte delantera de la célula en movimiento y un urópodo en la parte trasera. En la figura se enlistan moléculas que están presentes en una o ambas regiones de la célula. Los filamentos de actina subcorticales, concentrados típicamente en el pseudópodo y en el urópodo se representan con líneas delgadas. Las barras verticales conectan a la amiba con el sustrato representando puntos de adhesión. Los diferentes eventos asociados con el movimiento de la célula se muestran en la parte inferior de la figura, incluyendo la liberación de material membranoso en la parte trasera de células. RacG, proteína homóloga a Rac1. Tomada y modificada de Tavares P., et al. [20].

I.5 Proteínas tirosina fosfatasas (PTPasas)

La fosforilación de proteínas es sin duda la modificación postraduccional más común y mejor estudiada; la fosforilación en residuos de tirosina comprende sólo una pequeña fracción de todos los eventos de fosforilación de proteínas, en comparación con fosforilaciones en serina/treonina (S/T).

La fosforilación de proteínas -por proteínas tirosina cinasas (PTKs)- y la defosforilación de las mismas -por PTPasas- regulan un amplio espectro de vías de señalización fundamentales en procesos fisiológico, como: crecimiento celular, diferenciación, metabolismo, progresión a través del ciclo celular, comunicación célula-célula, adhesión celular y migración, transcripción de genes, actividad de canales iónicos, respuesta inmune y decisión de apoptosis/supervivencia [21]. Aberraciones en la fosforilación de proteínas juegan un papel importante en la patogénesis de numerosas enfermedades, incluyendo cáncer, diabetes y deficiencias inmunes [21]. Hay evidencias que indican que las PTPasas pueden tanto potenciar como antagonizar la acción de las PTKs.

Un análisis estricto del genoma humano identificó 107 PTPasas [22]. Las PTPasas no muestran similitud estructural con fosfatasas serina/treonina o con las fosfatasas ácidas o alcalinas de amplia especificidad. La marca que define a la super familia de PTPasas es la secuencia de su sitio activo **(H/V)C(X)₅R(S/T)**, también llamado motivo de señalización de PTP en el dominio catalítico [23].

Las PTPasas son agrupadas en cuatro subfamilias clasificadas con base en la secuencia de aminoácidos del dominio catalítico (**figura 7**):

i) **PTPasas basadas en cisteína tipo I**: Estas fosfatasas pueden ser divididas en subgrupos dependiendo de la similitud del dominio catalítico, comprende tanto PTPasas clásicas cuyo sustrato es específico para proteínas fosforiladas en tirosina y fosfatasas de especificidad dual (DUSP) que defosforilan proteínas fosforiladas tanto en tirosina (Y), serina (S), treonina (T) y algunos fosfolípidos [22, 23].

ii) **PTPasas basadas en cisteína tipo II:** contiene solo las fosfatasa LMWPTP (PTPasas de bajo peso molecular) cuyos sustratos son proteínas fosforiladas en tirosina [22, 23].

iii) **PTPasas basadas en cisteína tipo III,** tienen especificidad tanto para tirosina como para treonina. Este grupo contiene tres reguladores del ciclo celular Cdc25A, Cdc25B y Cdc25c [22, 23].

iv) **PTPasas basadas en ácido aspártico.** Estas PTPasas defosforilan PTyr y Pser [22, 23].

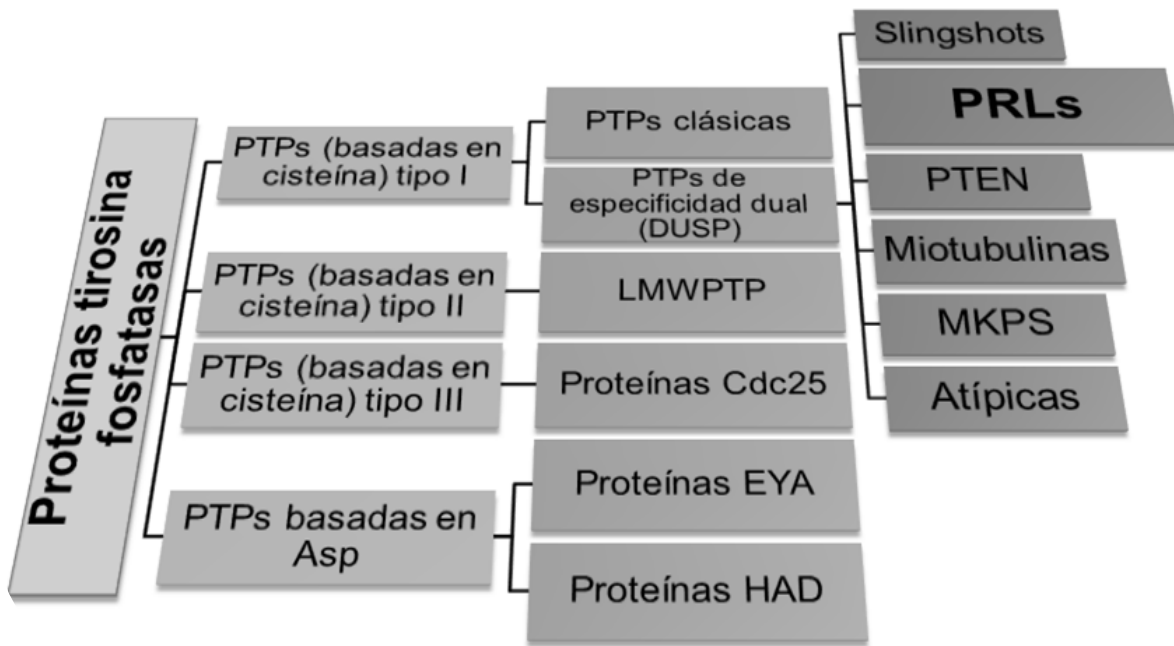


Figura 7. Clasificación de PTPasas. Las PTPasas pueden ser clasificadas en subgrupos con base en la similitud de su secuencia y a la presencia de dominios de unión o funcionales. DUSP: fosfatasa de especificidad dual, LMW: de bajo peso molecular (por su abreviación en inglés), Cdc25: fosfatasa 25 del ciclo de división celular, EYA: fosfatasa “eye absent”, HAD: fosfatasa de la superfamilia deshidrogenasa haloácida, PRL: fosfatasa de regeneración de hígado, PTEN: fosfatasa homóloga de tensina, MKPS, fosfatasa de la cinasa MAP. Tomada y modificada de Patterson R., et al. [23].

I.5.1. Mecanismo catalítico de PTPasas:

Las PTPasas pueden actuar como un interruptor de transducción de señales tanto de “encendido” como de “apagado” [24]. Estas enzimas no requieren iones metálicos y catalizan la hidrólisis de fosfato vía un intermediario covalente, fosfoenxina [24]. La reacción de PTPasas es nucleofílica y está compuesta de al menos dos pasos químicos.

El primer paso es la formación y la liberación del intermediario fosfoenxina (E-P) (**Figura 8**). La región nucleofílica del sitio activo en el motivo de señalización de PTP corresponde al residuo de cisteína (C) invariable. La sustitución del residuo de cisteína abate completamente la actividad de PTPasa y elimina su habilidad para formar E-P [24]. El paso de la formación de la fosfoenxina es asistida por un ácido aspártico (D) conservado, que actúa como un ácido general en la catálisis [24].

En el segundo paso, la hidrólisis de la fosfoenxina intermediaria ocurre por el ataque nucleofílico de una molécula de agua asistida por el mismo residuo D conservado, el cual funciona como una base general, originando la subsecuente liberación de la enzima y el fosfato inorgánico (Pi); por lo tanto, el residuo de R invariable media la unión del sustrato y la estabilización del estado de transición, aunque el residuo de R del sitio activo juega un papel en la unión del sustrato, es más importante para la catálisis [21, 24]. Un residuo de serina (S) o treonina (T) a menudo es encontrado en el motivo de señalización de PTPasa inmediatamente después del residuo R invariable [21, 24]. Además, un residuo conservado de glutamina (Q) es importante en la colocación precisa de la molécula de agua para la eficiente hidrólisis de la fosfoenxina [21, 24]. A pesar de variaciones en la estructura primaria y diferencias en la especificidad de sustrato del sitio activo, al parecer, este mecanismo es aplicado por todas las PTPasas.

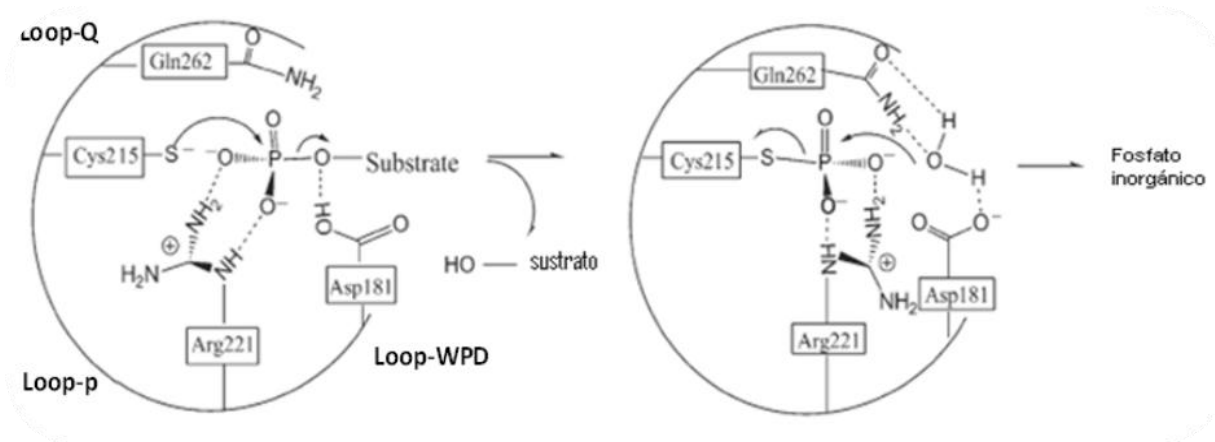


Figura 8. Mecanismo catalítico y estado de transición de la reacción de PTPasa de *Yersinia*. E-P: complejo enzima-sustrato, Asa Q: glutamina, Asa P: asa de unión a fosfato, Asa-WPD: comprendiendo triptófano, prolina y ácido aspártico. Tomada y modificada de Zhang Z.Y., et al. [21].

I.5.2. Estructura de PTPasas

Una de las características más estrictas de las PTPasas es que muchas de ellas contienen una combinación de dominios modulares. Se estima que 79 de las 107 PTPasas humanas contienen al menos un motivo adicional o dominios fuera de su dominio catalítico de PTPasas. Estos dominios modulan la interacción proteína-proteína o unión a fosfolípidos [22].

El sitio activo de las PTPasas está localizado dentro de una grieta en la superficie de la proteína [24]. En la parte inferior del sitio activo, está el asa de unión a fosfato (asa-P) formado por el motivo de señalización de PTPasas (PTPasa de *Yersinia*, **figura 9**) [24]. El residuo de D409 de la cadena lateral forma un puente de hidrógeno bidentado con dos de los oxígenos fosforil no unidos en el sustrato; R356 se encuentra en un asa flexible, el cual sufre un cambio conformacional mayor después de la unión del sustrato [24]. En la estructura de unión a ligando, el asa WPD (residuos 351-360) tiene un movimiento similar a una solapa para cubrir el sitio activo, colocando el D356, de la cadena lateral cerca del oxígeno del sustrato [24]. Esta observación es consistente con

el papel del D356 como donador de un protón al grupo transportado durante el paso de formación del complejo E-P. La interacción entre D409 y W354 es importante para el movimiento del asa WPD y la catálisis del ácido general [24]. Mutaciones en la región de bisagra en el residuo W354 por A inhiben completamente la catálisis. El residuo W354 juega un papel en la alineación de R409 para la unión del oxianión [24].

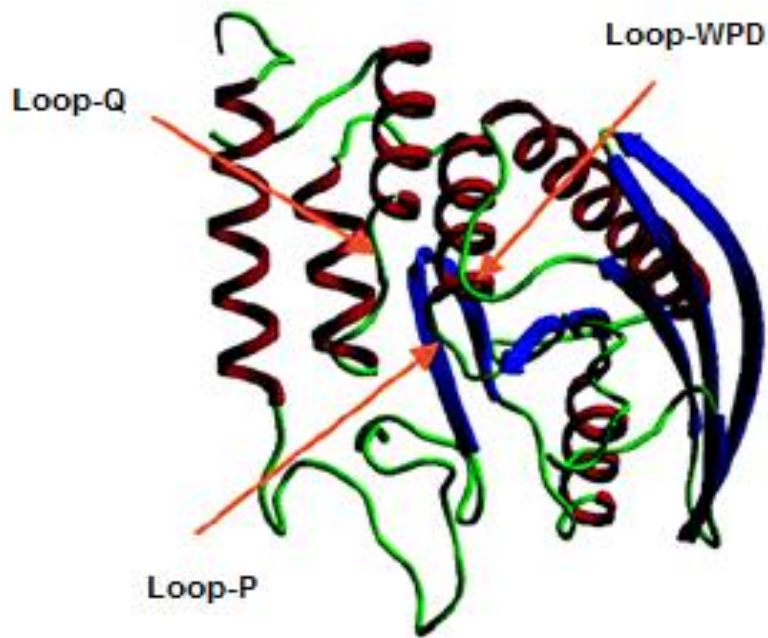


Figura 9. Estructura terciaria de PTPasa de *Yersinia* (diagrama de cinta). El sitio activo en el asa P contiene C403, D409 y T410. Adyacente al asa-P está el asa móvil WPD, con el puente de la D356 invariante. El asa-Q contiene el residuo Q446 conservado. Tomada de *Zhong-Yin Zhang, et al.* [24].

I.5.3. Regulación de PTPasas

Las PTPasas están sujetas a modificaciones tales como glicosilación, miristilación y fosforilación. La fosforilación de PTPasas en S, T y Y proporcionan sitios de unión para proteínas que contengan dominios SH2 [25]. La glucosilación es la modificación más restringida a las PTPasas transmembranales, las cuales contienen abundantes carbohidratos N y O ligados en su porción extracelular [22]. Dos grupos de DUSPs son

modificadas por ácidos grasos VHY (DUSP15) y VHX (DUSP22) que son miristiladas en el N-terminal de una manera similar a las Src de la familia de las PTK [22, 23]. Las PRLs son farnesiladas en el C-terminal similar a las proteínas Ras GTPasas [22].

Debido a la presencia de una cisteína en la hendidura catalítica, las PTPasas son sensibles a inactivación y oxidación reversible. La oxidación reversible de la cisteína conservada elimina sus propiedades nucleofílicas provocando profundos cambios en la conformación originando una fosfatasa inactiva [25]. Esto puede estar mediado por la producción regulada de especies reactivas del oxígeno, tales como H_2O_2 dentro de la célula que causa la conversión reversible del anión cisteína tiolato a ácido sulfénico que resulta en la inactivación de la actividad de PTPasa [26, 23].

I.6 Proteína tirosina fosfatasa de regeneración de hígado (PTPasa-PRL)

Las fosfatasa de regeneración del hígado (PRL) constituyen una subfamilia de PTPasas que han sido asociadas a la oncogénesis y metástasis [27]. En la **figura 10** se muestra una línea del tiempo donde se citan los hallazgos relevantes sobre la participación de PRLs en cáncer.

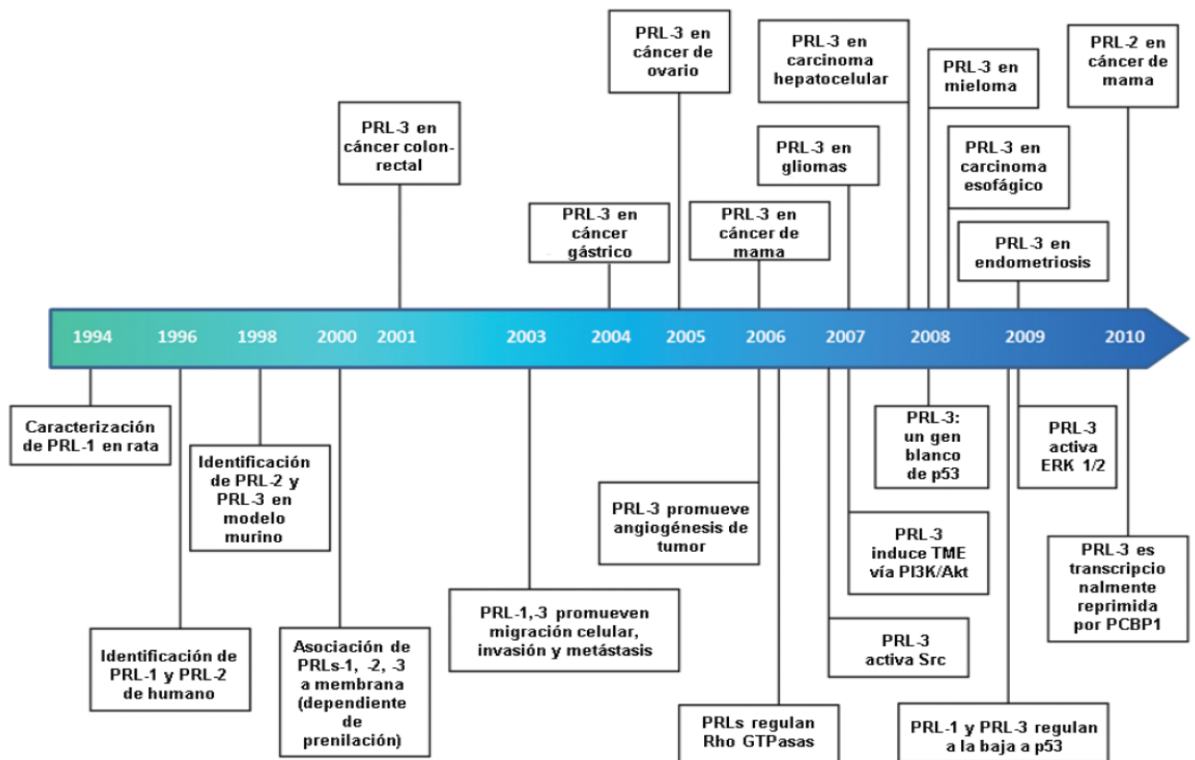


Figura. 10. Línea de tiempo donde se resumen los principales descubrimientos en la investigación de PRLs desde 1994 al 2010. EMT, transición epitelio-mesénquima. *Tomada y modificada de Qader A. O., et al. [28].*

Las fosfatasa PRL son una subfamilia de pequeñas DUSPs de amplia distribución en tejidos cuya expresión está incrementada en muchas líneas celulares de cáncer y tumores [29]. En humanos, esta subfamilia incluye tres miembros: PRL1, PRL2 y PRL3, que son altamente conservadas; PRL1 y PRL2 tienen una homología de 87%, PRL1 y PRL3 tienen una homología de 75%. Estos genes fueron inicialmente identificados como genes de expresión temprana en la regeneración de hígado [27, 30]. Las PRL

son proteínas pequeñas de ~20 kDa, en C-terminal contienen un motivo de prenilación denominado, CAAX (característica exclusiva en esta familia de PTP), una región polibásica y el motivo catalítico característico de las PTPasas, C(X)5R [27].

La prenilación de proteínas es una modificación post-traducciona con un papel importante en la dirección de proteínas a las membranas y en la interacción proteína-proteína [31]. El 0.5% de todas las proteínas son preniladas. Algunos ejemplos son las proteínas G heterotriméricas, laminina nuclear y proteína cinasas, proteínas de la superfamilia de proteínas G *Ras*, como *Rab*, *Rho* y *Rac*, las cuales tienen un papel importante en el tráfico de proteínas y organización del citoesqueleto [32]. La modificación isoprenoide puede ser catalizada por una de tres diferentes transferasas, dependiendo del isoprenoide y del motivo de prenilación de la proteína blanco. Dichas transferasas son farnesiltransferasa (FT), geranilgeranil transferasa I (GGT I) o GGT II; todas son α/β heterodímeros con una subunidad α común y utilizan el farnesil C15 o el geranilgeranil C20 respectivamente [31]. Estas enzimas reconocen el motivo de prenilación CAAX donde C es una cisteína, A es un residuo aromático y X puede ser M, S o Q para FT o L para GGT I [31]. La fosfatasa PRL2 está asociada con β GGT II *in vivo* [33, 31].

Se ha demostrado que PRL1-PRL3 requieren de la prenilación para su localización en membranas celulares [34]. Además, se ha reportado la presencia de una potencial señal de localización nuclear (NLS) cerca de C-terminal de todas las PRLs; esta región posee la secuencia KRRX12KYRPKMRLRF(R/K) parecida a una típica NLS bipartita con un agrupamiento inicial de residuos básicos separada de una región básica más cerca de C-terminal por un espacio de 10 a 12 residuos [34].

Las fosfatasas PRL tienen una región polibásica conservada en el C-terminal que está formada por múltiples lisinas y arginina (K151, R153, K155, R157, R159 y K161), esta región precede inmediatamente al motivo de prenilación CAAX [35] (**figura 11**). Se ha reportado que la prenilación de PRL1 por si sola es insuficiente para su localización en la membrana plasmática y que la región polibásica en C-terminal es requerida para la correcta dirección de PRL [35]. Los residuos cargados positivamente en la región polibásica pueden servir como una señal de localización nuclear en ausencia de

prenilación de PRL1 [35]. La apropiada localización celular de PRL1 requiere de la inserción del grupo farnesil dentro de la bicapa lipídica y la interacción iónica entre la región polibásica y la superficie ácida de la membrana. El crecimiento y migración celular mediada por PRL1 depende de la integridad estructural y de la fuerza de los residuos polibásicos en C-terminal [35].



Figura 11. Diagrama de la estructura de PRL1. T13 y G97 son los residuos involucrados en la homotrimerización; $^{104}\text{C(X)}_5\text{RAPV}^{113}$ es el dominio catalítico de PTPasa; $^{151}\text{CKYRPKMRLRFK}^{162}$ es la región polibásica y $^{169}\text{CCIQ}^{173}$ es el motivo de prenilación. Tomada y modificada de Sun J. P, et al. [35].

I.6.1. Características estructurales

Las PRL muestran alta similitud estructural con las pequeñas DUSP atípicas y con el dominio catalítico de la fosfatasa de lípidos PTEN [35]; sin embargo, la hendidura catalítica fuertemente hidrofóbica del sitio activo de las PRL difiere de la hendidura catalítica de las DUSPs, apuntando que las PRL requieren un sustrato único y específico para [35].

Usando resonancia magnética nuclear, se ha resuelto la estructura cristalina de PRL1 y PRL3 donde todos los aminoácidos conservados tienen un papel clave tanto en la estructura como en la catálisis [36, 37]. El primer grupo incluye residuos hidrofóbicos de cubierta y numerosas prolina y glicinas en las asas entre elementos de estructura secundaria. La región catalítica conservada, que participa en la unión del sustrato y confiere especificidad, incluye el asa P, el asa que contiene el ácido general (D72) y el asa $\alpha 5\text{-}\alpha 6$ [36]. Existen dos únicas características del asa P que podrían afectar su mecanismo catalítico y especificidad. Primero, los aminoácidos altamente conservados

V105AGLG109 definen el carácter hidrofóbico del asa P y pueden establecer una preferencia por sustratos más hidrofóbicos a diferencia de otras fosfatasa. Segundo, la secuencia C-terminal del asa P es muy inusual, A111-P112-V113, donde el residuo de prolina probablemente proporcionen una única limitación conformacional en su posición crítica [36-38]. La posición distante del asa móvil que contiene a D72 es otra causa de la pobre actividad hacia sustratos sintéticos. Probablemente bajo un rearrreglo conformacional inducido por el sustrato, PRL3 acerca a D72 a C104 y aumenta la catálisis [37].

A pesar de la similitud en la secuencia de aminoácidos entre estas proteínas existen diferencias significativas en la estructura del asa P de PRL1 y PRL3 [27]. El asa P en PRL3 [motivo C(X)5R], tiene una conformación abierta con las cadenas laterales de C104 y R110 orientadas hacia fuera del surco catalítico. En PRL1, el asa P está limitada con las cadenas laterales de C104 y R110 orientadas hacia dentro del surco. Los residuos de los sitios activos tanto de PRL1 y PRL3 son no polares en la naturaleza, con relativamente pocos residuos polares como C49 y D72 [27].

Además de la inactivación por oxidación de la cisteína catalítica, común para la mayoría de las PTPasas, las PRLs pueden ser inactivadas por una unión intradisulfuro entre la cisteína catalítica C104 y la cisteína vecina C49 [21]. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), promueve la formación de un puente disulfuro intramolecular entre C104 y C49 en solución y en la célula, lo cual soporta una regulación potencial de C49 en modular la actividad de PRL1 en respuesta a especies reactivas del oxígeno [38].

Se ha establecido que PRL1 existe como un homotrímero en el estado cristalino, en donde las porciones C-terminal de las proteínas están agrupadas permitiendo a las PRLs una unión cooperativa con la membrana [35]; tanto el motivo de prenilación como la región polibásica en el C-terminal son requeridos para anclar a PRL1 a la membrana. Además, la trimerización es esencial para la función de PRL1 dentro de las células. La participación del motivo CAAX en la formación de trímeros fue establecida por la remoción del motivo C-terminal, observando que esta ausencia impide la asociación de la proteína; es probable que la superficie C-terminal se encaje directamente en la membrana plasmática [35]. Además, se demostró que al evitar la formación de trímeros

se elimina la habilidad de PRL1 para promover el crecimiento celular y la migración, indicando que la formación del trímero de PRL1 es esencial para su función [35]. El trímero de PRL1 es estabilizado por una combinación de interacciones hidrofóbicas y polares. La inhibición de la formación de trímeros no tiene efecto en la asociación de PRL1 a la membrana [35, 38].

I.6.2. Localización celular y distribución en tejidos.

Se ha reportado que la expresión endógena de PRL1 es dependiente del ciclo celular ya que en células no mitóticas, PRL1 está localizada en membranas, como membrana plasmática, endosomas tempranos y retículo endoplásmico de manera dependiente de farnesilación; en células mitóticas, PRL1 está asociada con el centrosoma y el huso mitótico de una manera independiente de la farnesilación [39].

PRL1 y PRL2 son necesarias en el proceso normal de crecimiento celular y proliferación, las proteínas catalíticamente activas facilitan la progresión a través del ciclo celular, posiblemente por una disminución en los niveles del inhibidor de quinasas dependiente de ciclinas, p21Cip1 [40]. PRL3 se sobreexpresa consistentemente en cáncer colorectal metastásico pues se ha observado elevado en cada cáncer metastásico estudiado, pero dicha expresión no se observa o está en bajos niveles en tumores no metastásicos y epitelio colorectal normal [41].

I.6.3. Función biológica de las PRL

A pesar de la conservación en la secuencia alrededor del sitio catalítico que pudiera sugerir especificidad de sustrato similar en las PRLs, y debido a que los patrones de expresión de PRLs difieren entre tejidos, se ha sugerido que éstas tienen distintas funciones debido a diferencias en la interacción de proteínas y diferencias en su regulación [42]. En la **tabla 1** se muestran patrones de unión identificados para PRLs y sustratos putativos.

Tabla 1. Patrones de unión identificados de PRL y sustratos putativos

	Proteína de interacción	Efecto de la interacción	Método de validación	Referencias
PRL1	<i>ATF-7</i>	Desfosforilación de ATF-1 <i>in vitro</i>	Y2H ^a , IP ^b	Peters et al. [2001]
	<i>PRL1</i>	Formación de trímeros <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	IP	Jeong et al. [2005], Sun et al. [2007]
PRL2	<i>bGGT-II</i>	Unión competitiva con aGGT-II <i>in vivo</i>	Y2H, IP	Su et al. [2001]
PRL3^a	<i>CDH22</i>	N. D.	Y2H, PD ^c , IP	Liu et al. [2009]
	<i>Ezrina</i>	Desfosforilación de ezrina <i>in vitro</i> (indirecta) e <i>in vivo</i>	-	Forte et al. [2008], Orsatti, et al. [2009]
	<i>Factor de alargamiento 2</i>	N. D.	IP	Orsatti, et al. [2009]
	<i>Queratina 8</i>	Desfosforilación de KRT8 <i>in vivo</i>	IP	Mizuuchi et al. [2009]
	<i>Integrina $\alpha 1$</i>	N. D.	Y2D, PD	Peng et al. [2006]
	<i>PRL-3</i>	Formación de oligómeros <i>in vitro</i>	IP	Sun et al. [2007], Pascaru et al. [2009]

^aY2H, ensayo de doble híbrido; ^bIP, inmunoprecipitación; ^cPD Pull-down con GST. N.D., no determinado.

Se ha reportado que PRL1 y PRL3 promueven la motilidad e invasión en células de cáncer de colon por estimulación de la vía de señalización que involucra a la familia de Rho GTPasas, particularmente RhoA y RhoC [43]. PRL1 también es encontrada en el proceso fundamental de adhesión celular y migración en células de cáncer de pulmón humano al afectar la activación de Rac1, Cdc42, y c-Src [43]. PRL3 es capaz de activar el elemento de respuesta a suero (SRE) de una manera dependiente de Rho, sugiriendo que PRL3 puede regular la motilidad, la invasión y la metástasis a través de un efecto directo en el citoesqueleto de actina y a través de la regulación transcripcional de genes blancos [43].

En células HEK293, la sobreexpresión de PRL3 activa la cinasa Src, la cual encabeza una serie de vías de señalización que culminan en la fosforilación de ERK1/2, STAT3 y p130^{cas} [42]. La activación de estas vías probablemente contribuye al incremento en la motilidad y crecimiento celular. Se demostró que PRL3 induce activación de Src a través de la regulación a la baja de Csk, un regulador negativo de Src [42] (**Figura 12**).

Este mecanismo puede operar en líneas celulares de cáncer de colon donde se expresan mayores niveles de PRL3 y muestra un índice de migración más rápido [44].

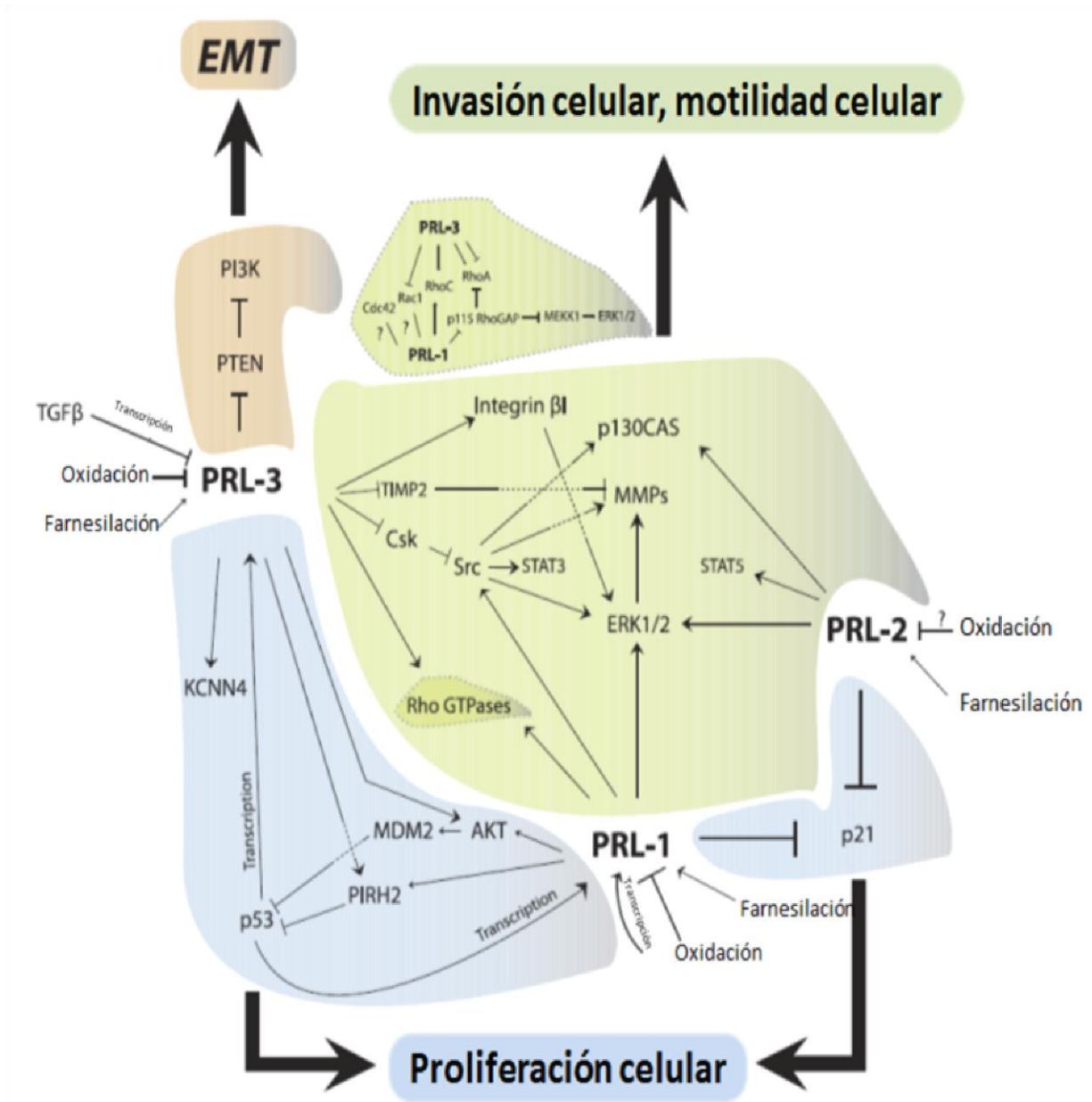


Figura 12. Resumen de las vías de señalización afectadas por las fosfatasa PRL y que resultan en migración y proliferación celular. Las flechas indican la regulación positiva; líneas cruzadas indican regulación negativa y signos de interrogación indican, ya sea que aún no se conoce o que no se han estudiado los procesos. *Tomada y modificada de Rios P., et al. [42].*

I.6.4. Regulación de la expresión de PRL.

Usando microarreglos de cDNA en células de cáncer colorectal HCT-116 p53 WT, en comparación con su contraparte isogénica “knockout” para p53, se encontró que la presencia de p53 correlaciona con una disminución en la expresión de PRL1 [27]. En humanos, PRL1 está en parte regulada por el factor de crecimiento de respuesta a crecimiento temprano 1 (EGR-1) [28]. En parte, la sobreexpresión de PRL3 en cáncer colorectal es derivada del incremento en el número de copias de PRL3 en las células [28]; este incremento está asociado con la amplificación de una gran porción de la región telomérica del cromosoma 8q que abarca 12 Mb, que incluye el oncogen c-Myc (**Figura 13**) [28, 27].

El primer indicio de la regulación post-transcripcional de PRL (regulación a nivel de mRNA) vino de la temprana conclusión de que PRL1 es regulada específicamente durante el transcurso de la regeneración hepática [28]. Posteriores reportes de la inducción de la expresión del mRNA de PRL en células bajo estimulación mitogénica y expuestas a medio condicionado con fibroblastos asociados a carcinoma, sugirieron que estímulos extracelulares que activan vías de señalización asociadas a factores de crecimiento regulan la expresión de PRL [28]. Egr-1 es un factor de transcripción activado por factores de crecimiento y es uno de los factores implicados en el aumento de la transcripción de PRL1 [28]. Herramientas bioinformáticas de predicción (CONSITE, TRED), sugieren que el promotor de PRL3 tiene diversos sitios putativos de unión a factores transcripcionales tales como n-MYC, STAT3 y NF-kb [28]. Un estudio reciente mostró que la estimulación de células de mieloma con IL-6, una citocina que promueve la actividad transcripcional de STAT3, puede inducir de 2.5 a 3.5 veces un incremento en los niveles de mRNA de PRL3 (**Figura 13**) [27].

Además de la regulación transcripcional de genes, la traducción es un paso importante en la expresión de proteínas. Recientemente se encontró que a nivel traduccional, la expresión de PRL3 podría estar negativamente regulada por interacción directa entre la proteína 1 de unión a poli(C) (PCBP1) y el triple motivo GCCCAG dentro de la región 5' no traducida del mRNA de PRL3 (5'UTR) [28]. La sobreexpresión o supresión de PCBP1 resulta en una supresión o incremento en el nivel de proteína de PRL3

respectivamente, sin inducir ningún cambio en el nivel del transcrito de PRL3 (**Figura 13**) [28].

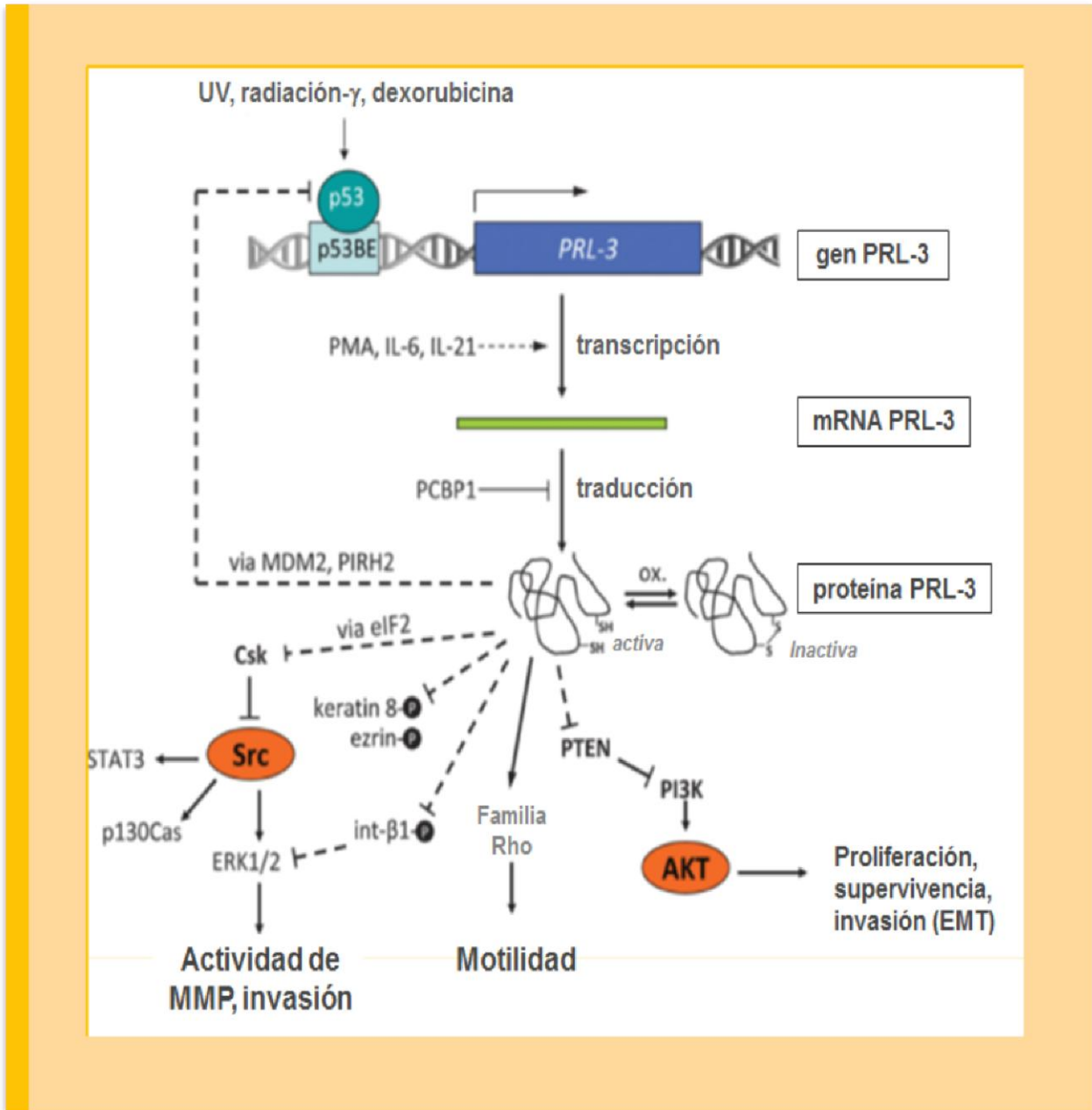


Figura 13. Red de regulación propuesta y vías de señalización río abajo de PRL. En la imagen se ilustran diferentes vías que culminan en progresión metastásica. Se incluyen la regulación a nivel de gen, de mRNA y proteína; también se señala la regulación por oxidación, oligomerización y fosforilación. *Tomada y modificada de Qader O. A, et al. [28].*

I.7. PTPasas en parásitos protozoarios

Las PTPasas han sido cada vez más reconocidas como efectoras importantes de las interacciones huésped-patógeno y su patogenicidad se ha explorado en hongos, parásitos, bacterias y virus [45]. Un ejemplo clásico es la participación de la PTPasa YopH de *Yersinia pestis*, agente causal de la peste bubónica. *Y. pestis* inyecta directamente a la altamente activa PTPasas YopH dentro del citoplasma de células inmunes durante la etapa temprana de la infección [46]. YopH intracelular desfosforila eficientemente proteínas claves en la señalización inhibiendo la activación de las células inmunes [46]. Cepas de *Salmonella spp* virulentas usan una estrategia similar, ellas inyectan en la célula huésped la fosfatasa SptP la cual interfiere con la activación de la vía de MAPKs [46].

En años recientes, la secuenciación del genoma de parásitos protozoarios como *E. histolytica* [47], *Giardia lamblia*; *Trichomonas vaginalis*, etc., ha sido completada [48]. Se ha reportado un análisis *in silico* del cinoma de estos parásitos [49, 50]; sin embargo, pocas investigaciones han sido enfocadas al estudio de su fosfatoma; solamente el fosfatoma de tres especies de cinetoplastidos ha sido reportado [48].

Del análisis del genoma de patógenos no metazoos se han predicho miembros de la familia de PRL en: *Toxoplasma gondii* (una PRL), *Trypanosoma brucei* (una PRL), *Leishmania major* (dos PRLs) y *Entamoeba histolytica* (una PRL) [45]. La caracterización experimental de PRL se ha reportado para *Trypanosoma cruzi* [51], *Plasmodium falciparum* [32] y *Tritrichomonas foetus* [52].

T. cruzi presenta tres genes putativos de PRLs pero solo la proteína TcPRL1 se ha caracterizado de forma experimental [51]. TcPRL1 se localizó en la vía endocítica de epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes, por la colocalización con cruzipaína y concanavalina A. TcPRL-1 es prenilada *in vitro* e *in vivo*, lo que sugiere que la prenilación es necesaria para la nueva localización en la vía endocítica. La PRL de *P. falciparum* (PfPRL), el agente causante de la malaria, se expresa en los estadios intraeritrocíticos del parásito y parcialmente asociada con el retículo endoplásmico; la proteína PfPRL recombinante también se prenila *in vitro* [32]. No se han detectado miembros de la familia de PRL en *T. vaginalis* [48]; sin embargo, por análisis *in silico* se

ha revelado que el dominio catalítico del subgrupo Cdc14 de este parásito, muestra significativa homología con la secuencia de aminoácidos de la PRL predicha en *E. histolytica* [52].

Similar al patógeno *T. vaginalis* que afecta a humanos, el parásito relacionado con bovinos, *T. foetus* tiene actividad de ecto fosfatasa en la superficie de sus formas endoflagelares intactas (FEF) y de aquellas en forma de pera (FP) asociada a proteínas similares a PRL [52].

E. histolytica tiene poco más de 100 genes putativos para proteínas fosfatasa (PP) [48], de los cuales 42 genes son putativos para PTPasas (**tabla 2**) (resultados preliminares de nuestro grupo de trabajo, obtenidos mediante una búsqueda de genes putativos para PTPasas con base en la secuencia consenso del dominio catalítico), en comparación con las 107 que se encuentran en el genoma humano.

Tabla 2. PTPasas en *Entamoeba histolytica* y humano.

GRUPO	PTPasa	<i>E. histolytica</i>	HUMANO
Clásicas	RTPasas	0	21
	NRTPasas	2	17
Especificidad dual	MKPasas	11	11
	PTEN	8	5
	Slingshot	1	3
	Myotubularinas	11	16
	CDC14	NE	4
	PRLs	1	3
	DUSP atípicas	NE	19
	Eya	0	4
Cdc25	Cdc25	7	3
LMW	LMW	1	1
TOTAL		42	107

La participación de las PTPasas, ha sido pobremente estudiada en la biología del parásito. Estudios han mostrado que la activación de PTPasas y desfosforilación de proteínas están asociadas con desactivación y muerte celular [15]. Se ha estudiado la participación de una fosfatasa ácida de membrana (MAP) de *E. histolytica* que presenta actividad de PTPasa y desfosforila específicamente O-fosfo-L-tirosina; se observó que la interacción de esta PTPasa con células HeLa afecta la integridad del citoesqueleto de actina, sugiriendo que la presencia de la actividad de PTPasa podría jugar un papel en la alteración de niveles de fosforilación de diferentes proteínas involucradas en transducción de señales, por lo que estas PTPasas pueden ser un elemento importante en el mecanismo patogénico [53].

Los antecedentes directos de nuestro grupo de trabajo, sobre el estudio de PTPasas en *E. histolytica*, son los reportados conjuntamente por Talamás-Rohana y Rosales-Encina que han clonado y caracterizado parcialmente dos genes que codifican para PTPasas de *E. histolytica*: EhPTPA [54] y EhPTPB (Pérez Saldaña JA, et al. En proceso de publicación). EhPTPA y EhPTPB muestran una identidad en la secuencia de amino ácidos de 37%; se sugiere que estas proteínas son PTPasas no receptoras o solubles, el alineamiento de las secuencias de los dominios catalíticos de EhPTPasa con PTPasas de vertebrados muestra la presencia de motivos conservados [54]. EhPTPA tiene actividad de fosfatasa *in vitro* y su mensajero se sobreexpresa en trofozoítos recuperados de absceso hepático amebiano, en comparación con los trofozoítos de cultivo, mientras que la expresión de EhPTPB no muestra cambios [54]. Esto da la posibilidad que EhPTPA pueda estar involucrada en la interacción huésped-parásito; además, se propone que ésta podría ser un gen de respuesta a estrés o un gen de respuesta adaptativa expresado por trofozoítos de *E. histolytica* durante el desarrollo del ALA [54].

II. JUSTIFICACIÓN

Países en vías de desarrollo presentan una alta incidencia de infección por *E. histolytica*, especialmente entre infantes y adolescentes en quienes, la diarrea infecciosa es la principal causa de mortalidad, situación clínica para la cual actualmente no existe una vacuna disponible y donde los terapéuticos hasta el momento ensayados inducen fuertes efectos secundarios.

La actividad de PTPasa ha sido reportada como factor patogénico en diversas infecciones ocasionadas por microorganismos como bacterias, hongos y parásitos pero se conoce poco acerca de PTPasas en *E. histolytica*. Estudios *in silico* del genoma de *E. histolytica* predicen una única secuencia codificante para la fosfatasa tipo PRL (fosfatasa de regeneración de hígado). PRL ha sido descrita en *Plasmodium falciparum* y *Trypanosoma cruzi*, donde su función no ha sido caracterizada completamente, en humanos existen tres isoformas de PRL (PRL-1, PRL-2, PRL-3) la cuales están asociadas con migración, invasión, metástasis y cáncer.

A la fecha no existen reportes de investigaciones enfocadas a caracterizar biológica y funcionalmente a la PTPasa PRL de *E. histolytica*. Por lo tanto, es de relevancia evaluar la participación de EhPRL en la migración e invasión de trofozoítos de *E. histolytica*, iniciando desde las bases bioquímicas que permitan comprender la estructura de la proteína e identificar motivos funcionales de tal manera que se pueda proponer a EhPRL como blanco para el desarrollo de drogas específicas para inhibir la migración, la invasión y por ende la patogenicidad de *E. histolytica*.

III. HIPÓTESIS

Si EhPRL se expresa y es funcionalmente activa en trofozoítos de *E. histolytica* esta proteína podría participar en migración e invasión.

IV. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la participación de la proteína tirosina fosfatasa EhPRL de *E. histolytica* en la biología del parásito y en el mecanismo de patogenicidad.

IV.I OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Expresar y caracterizar bioquímicamente a la PTPasa EhPRL recombinante.
2. Investigar a nivel de mRNA y proteína los patrones de expresión de EhPRL en respuesta a la interacción con componentes de matriz extracelular.
3. Estudiar la participación de EhPRL en la migración e invasión de *E. histolytica*.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

V.1 Cultivos celulares

Trofozoítos de *E. histolytica*, cepa HM1:IMSS, se cultivaron axénicamente en tubos de borosilicato a 37°C, en medio TYI-S-33 suplementado con 3% de vitaminas de Diamond [55], 10% de suero adulto bovino, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Los parásitos se recuperaron en la fase logarítmica de crecimiento por enfriamiento a 4°C por 10 min y centrifugación.

V.2 Purificación de RNA total

Para identificar el gen putativo que codificaba a la PRL en *E. histolytica*, en la base de datos del genoma de *E. histolytica* <http://pathema.jcvi.org/cgi-bin/Entamoeba/Pathema-HomePage.cgi> se examinaron a aquellos genes etiquetados como proteínas tirosina fosfatasas putativa. Los cebadores se diseñaron para amplificar la secuencia codificante completa reportada para EhPRL (GenBank: XM_652148.1; pathema: EHI_044560) con la adición de sitios de restricción para BamHI y EcoRI (5'-3'), respectivamente.

El transcrito de EhPRL se amplificó a partir de cDNA sintetizado a partir de un microgramo de RNA total de *E. histolytica* que se obtuvo por el método de Trizol (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY, USA), a partir de un tubo con trofozoítos crecidos por 48 h. Brévemente, las células se recuperaron por centrifugación, se lavaron con amortiguador de fosfatos (PBS) (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 4.3 mM, KH₂PO₄ 1.4 mM) centrifugando entre cada lavado a 735 xg en microcentrífuga (Eppendorf 5415 C) a temperatura ambiente. Para la lisis celular se utilizó un mililitro de trizol por cada 5-10 X 10⁶ células; la lisis se realizó por pipeteo constante; para la completa disociación de complejos de nucleoproteínas la muestra se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Para la separación del RNA, se adicionaron 200 µl de cloroformo por cada mililitro de trizol utilizado en el procedimiento anterior. Se agitó vigorosamente utilizando vórtex por 15 seg con descansos en hielo

por otros 15 seg, esto se repitió por 3 min. La muestra se centrifugó a 3,000 xg durante 15 min a 4°C para separar la fase acuosa superior.

El RNA de la fase acuosa se precipitó adicionando 500 μl de isopropanol por cada mililitro de trizol usado para la homogenización inicial, se incubó por 1 h a temperatura ambiente y el RNA total se separó por centrifugación a 3,000 xg durante 10 min a 4°C, se desechó el sobrenadante. La pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70% por cada mililitro de trizol utilizado inicialmente. Se agitó mediante vórtex hasta disolver la pastilla y se centrifugó a 1000 xg por 5 min a 4°C. La pastilla de RNA se secó ligeramente y se resuspendió en agua con dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.1%. Posteriormente, la suspensión de RNA se incubó con 10 μl de DNasa durante 30 min a 37°C y finalmente se incubó por 15 min a 60°C para inactivar proteínas dañinas para el RNA. El RNA total aislado se almacenó a -70°C.

V.3 Amplificación por RT-PCR

Para la amplificación del mensajero de EhPRL, 1.5 μg de RNA total de *E. histolytica* fue transcrito en forma reversa a cDNA utilizando oligonucleótido poly(dT) y la enzima transcriptasa reversa SuperScript II (ambos de Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Se utilizaron 2 μl de cDNA como molde para la amplificación por PCR más 10 pmol de cada primer y 5 U/ μl de la enzima Taq DNA polimerasa (New England Biolabs Inc., Tozer Road Beverly, Massachusetts, USA). Cada ciclo de PCR consistió de un paso de desnaturalización (5 min), un paso de alineamiento (1 min a 94°C, 1 min a 60°C y 1 min a 72°C) y un paso de extensión (7 min a 72°C). El DNA fue amplificado por 30 ciclos en el termociclador, iCycler thermocycler (Biorad Laboratories Inc., USA). Los oligonucleótidos diseñados para amplificar las 600 pb del mensajero de EhPRL son: 5'-CGGATCCATGGTATTATTAATTGTCTATTATTGCTG-3' (sentido) y 5'-GAGAATGTGTAATATTGCGTAAGAATTCCTG-3' (antisentido). El producto de amplificación se visualizó en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

V.4 Clonación de EhPRL

El producto de PCR correspondiente al mensajero EhPRL de *E. histolytica* fue subclonado en el vector pBluescript SK(+) (Stratagene, North Torrey Pines Road La Jolla CA, USA), en adelante nombrado como PBSK(+); tanto el producto de PCR como el vector fueron tratados con las enzimas de restricción BamHI (10 U) y EcoRI (10 U), la mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 2 h. Posteriormente, el vector se desfosforiló con una unidad de fosfatasa alcalina CIP en amortiguador para restricción N°3 (100 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl pH 7.9, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT) durante 1 h a 37°C. Después de esta incubación, tanto el cDNA de EhPRL digerido como el plásmido PBSK(+) digerido y desfosforilado se purificaron de geles de agarosa utilizando el kit de extracción de DNA en gel QIAEX II, siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante.

La reacción de ligación se realizó con el kit de ligación rápida de DNA, utilizando 1 U de T4 DNA ligasa (New England Biolabs Inc., Tozer Road Beverly. MA, USA). Se calcularon las cantidades de inserto requerido para obtener una relación molar de inserto:vector de 1:1 y 3:1; ajustado a 100 ng de DNA plasmídico. La mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 25 µl, ésta se incubó a temperatura ambiente durante 1 h y posteriormente se transformaron bacterias *E. coli* DH5α. Los plásmidos de las bacterias transformadas y crecidas en cajas de cultivo, se analizaron por restricción; se purificó el DNA plasmídico y se digirió para liberar el inserto de interés. Aquellas clonas que tenían el inserto se procesaron para análisis de secuenciación. Una vez confirmada la secuencia del mensajero EhPRL en PBSK, éste se subclonó siguiendo el método descrito, en el vector pRSET-A (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY, USA. Cat. No. V351-20) para producir la proteínas de fusión con una bandera de histidinas (His6::EhPRL) [56].

V.5 Transformación de bacterias *E. coli* DH5 α

A 100 μ l de medio LB conteniendo bacterias DH5 α competentes (*vide infra*), se adicionaron 8 μ l de la reacción de ligación ó 1 μ l de DNA plasmídico, se homogenizaron suavemente y se colocaron en hielo durante 20 min, a continuación se dio un choque térmico incubando las células a 37°C durante 5 min e inmediatamente después en hielo por dos min. Posteriormente se adicionó 1 μ l de medio Luria Bertani (LB) sin antibiótico y la reacción se incubó durante 40 min a 37°C. Las células se recuperaron por centrifugación a 735 xg durante 3 min en microcentrífuga a temperatura ambiente y las células transformadas se espatularon en cajas con medio LB/Ampicilina (Amp) (50 μ g/ml) las cuales se incubaron a 37°C durante 24 h.

V.6 Transformación de bacterias *E. coli* BL21(DE3)pLysS

El plásmido His6::EhPRL se transformó en células *E. coli* BL21(DE3)pLysS para la expresión de la proteína recombinante. El procedimiento para preparar célula competentes fue el siguiente: del stock original de bacterias *E. coli* BL21(DE3)pLysS no competentes se tomó una asada y se inocularon 5 ml de medio LB sin antibiótico, las células se cultivaron a 37°C durante toda la noche en agitación constante (200 r.p.m.). Al día siguiente, el cultivo primario se transfirió a 25 ml de medio LB fresco y se monitoreó el crecimiento hasta alcanzar una densidad óptica $_{600\text{ nm}}$ D.O. de 0.5. Se colectaron las células por centrifugación a 1300 xg por 10 min a 4°C. La pastilla obtenida se resuspendió en 2.5 ml de 50 mM de cloruro de calcio (CaCl₂) frío, se incubaron en hielo por 30 min y se centrifugaron a 1310 xg durante 5 min a 4°C. Nuevamente, las células se trataron con 1 ml de CaCl₂ frío, se distribuyó en alícuotas de 100 μ l. A una de estas alícuotas se adicionó el DNA transformante (10-100 ng) para incubarse en hielo durante 30 min. Después de la incubación se dio choque térmico a 42°C por 45 seg y en hielo durante 2 min. Se adicionó 1 ml de medio LB y el cultivo se incubó a 37°C en agitación por 45 min. Finalmente, con 100 μ l del cultivo se plaquearon cajas LB/Amp (50 μ g/ml) y se incubaron a 37°C durante 24 h [56].

V.7 Purificación de DNA plasmídico

Las colonias transformantes que crecieron en la placa LB/Amp se inocularon en medio LB/Amp (50 µg/ml) y se crecieron toda la noche a 37°C en agitación constante. Al día siguiente las células se cosecharon por centrifugación a 8,200 xg, durante 10 min a 4°C para descartar el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 1.5 ml de solución GTE (25 mM de Tris pH 8.0, 10 mM de EDTA, 50 mM de glucosa), utilizando vórtex. A continuación a la pastilla se le adicionó 1 µg/ml de lisozima y se homogenizó e incubó a temperatura ambiente por 15 min; posteriormente, la reacción se colocó en hielo durante 5 min, se adicionaron 3 ml de la solución II (NaOH 200 mM/SDS 1%) preparada al momento, se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 15 min. Después, se adicionaron 2.25 ml de acetato de potasio 3 M pH 4.8, se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 15 min. Para descartar el desecho celular y el DNA cromosomal, la solución se centrifugó a 11,750 xg durante 30 min, el sobrenadante se colocó en tubos corex de vidrio y se adicionaron 3 ml de isopropanol, se incubó por 15 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 11,750 xg durante 15 min a 4°C. La pastilla se resuspendió en 300 µl de agua estéril y se adicionaron 10 µg/ml de RNasa A y 100 µg/ml de RNasa T; finalmente, la mezcla se incubó durante 1 h a 37°C [57].

V.8 Reacción de secuenciación

Para las reacciones de secuenciación, el DNA plasmídico se purificó por columna (QIAGEN-TIP 20) como se describe a continuación. La columna se equilibró adicionando 1 ml de amortiguador QBT (750 mM de NaCl, 50 mM de MOPS pH 7.0, isopropanol al 15%, Tritón X-100 al 0.15%), en el centro de la columna se colocaron 300 µl del DNA plasmídico purificado, la columna se lavó 4 veces con 1 ml del amortiguador QC (1M de NaCl, 50 mM de MOPS pH 7.0, Isopropanol al 15%) y el DNA se eluyó con 800 µl del amortiguador QF (1.25 M de NaCl, 50 mM de Tris-HCl pH 8.5, Isopropanol al 15%). El DNA se precipitó con 560 µl de isopropanol por centrifugación a 8,160 xg durante 30 min a temperatura ambiente, la pastilla se lavó con etanol al 70%, finalmente la pastilla se resuspendió en 80 µl de agua estéril.

Una vez purificado el DNA plasmídico, en tubos estériles de 500 μ l para microcentrífuga, se colocó 1 μ g de DNA plasmídico, 8 μ l de amortiguador MIX, 10 pmol del oligonucleótido correspondiente (T3 o T7) y agua estéril para ajustar a un volumen de reacción de 20 μ l. La reacción de PCR para secuenciación, se realizó en un termociclador PCR Sprint (Thermolab System); primero a 96°C por 30 s, seguido de 30 ciclos de 96°C por 20 s, 56°C por 20 s y 60°C por 4 min. El producto de PCR se pasó por una columna centri-sep (Princeton Separation Inc.) previamente hidratada por 2 h, se centrifugó a 735 xg por 2 min a temperatura ambiente, la muestra se secó al vacío en un sistema “speed vac” durante 20 min. Las lecturas de secuenciación se realizaron en el departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN, con un equipo Perkin Elmer/Applied Biosystems 377-18E In DNA sequencer.

V.9 Purificación de la proteína His6::EhPRL por cromatografía de afinidad a níquel (Ni-NTA)

Una colonia de bacterias *E. coli* BL21(DE3)pLysS con el plásmido de interés se inoculó en 50 ml de medio LB/Amp (50 μ g/ml) y se incubó a 37°C con agitación a 3500 xg durante toda la noche. Al día siguiente se inoculó el cultivo primario en 500 ml de medio LB/Amp fresco y se creció hasta alcanzar una D.O._{600 nm} de 0.5. La expresión de la proteína se indujo adicionando 1 mM de IPTG e incubando durante 1.5 h a 30°C. Las células se cosecharon por centrifugación a 11,300 xg durante 10 min a 4°C. La pastilla se resuspendió en 50 ml de amortiguador de lisis (50 mM de Tris-HCl pH 8.5, 10 mM de β -ME, 1 mM de PMSF), se adicionó tritón al 2%, 1 μ g/ml de lisozima, 10 μ g/ml de RNasa y 5 μ g/ml de DNasa; esta reacción se incubó en hielo durante 20 min. Posteriormente se adicionó NP40 (Roche Diagnostics Corporation, Hague Rd, IN USA) al 2% y se incubó en hielo por 15 min más, después la muestra fue sonicada 8 veces con pulsos de 1 min y descansos de 2 min. Para separar el precipitado, el homogenizado se centrifugó a 17,400 xg durante 30 min a 4°C. La fracción soluble recuperada se interaccionó en una columna con resina Ni-NTA (níquel-nitrilo-triácido acético) de Novagen (Cat No. 69670. Novagen-EMD Chemicals, Pacific Center Ct, San Diego CA, USA) previamente equilibrada con 10 ml de amortiguador A con glicerol (20

mM de Tris-HCl pH 8.5, 100 mM de KCl, 10 mM de β -ME, glicerol al 10% v/v); posteriormente, se pasaron 2 volúmenes de amortiguador B (20 mM de Tris-HCl pH 8.5, 100 mM de KCl, 20 mM de Imidazol, 10 mM de β -ME, Tritón X-100 al 1%). Después la columna se lavó con dos volúmenes de amortiguador A con glicerol y 20 ml de amortiguador A sin glicerol. La proteína se eluyó con 10 ml de amortiguador C (20 mM de Tris-HCl pH 8.5, 100 mM de KCl, 10 mM de β -ME, 150 mM de Imidazol) [42]. Las proteínas se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 12% conteniendo SDS al 0.1% en presencia de amortiguador de muestra (BM) y posteriormente se visualizaron por tinción con azul de Coomassie [59].

V.10 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteína se cuantificó por el método de Bradford [60]. Para este fin la curva de calibración se realizó con albúmina sérica bovina (BSA) preparada a partir de una solución stock de 1 mg/ml. En una placa de 96 pozos se prepararon pozos independientes con 2, 4, 6, 8 y 10 μ g del stock de BSA y 1, 5 y 10 μ l de la proteína a cuantificar. Las muestras se llevaron a un volumen de 160 μ l con PBS, se adicionaron 40 μ l del reactivo Bradford 5X (0.01% de azul de coomassie G250, 4.7% de etanol, 8.5% de ácido fosfórico), se mezcló por pipeteo y las placas se leyeron en un lector de ELISA (Labsystem Multiskan MS) a 595 nm. Se incluyó como blanco un pozo conteniendo únicamente PBS y reactivo de Bradford [60].

V.11 Inmunización de ratones

Para obtener anticuerpos policlonales anti-EhPRL, ratones BALB/c hembras de 4 a 8 semanas de edad se inmunizaron dos veces por vía subcutáneas en la base de la cola con 10 μ g de la proteína His::EhPRL purificada, suspendida en Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, DTT 5 mM y 10% de glicerol, emulsificada con un volumen de adyuvante TiterMax (Cat No. T-2686. Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). El intervalo entre inmunizaciones fue de 8 días. Cuatro semanas después de la última

inmunización, los ratones se sangraron de la cola y el reconocimiento de los anticuerpos se monitoreó por inmunotransferencia.

V.13 Determinación de la actividad de fosfatasa

La actividad de proteína fosfatasa de las proteínas recombinantes se determinó midiendo la hidrólisis de *p*-nitrofenol fosfato, pNPP (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA. Cat. No. 104-0) ó 3-O-metil fluoresceína fosfato, OMFP (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA. Cat. No. M2629), según métodos publicados [58, 61], con algunas modificaciones. Cuando el ensayo se realizó con pNPP, la mezcla de reacción se hizo en amortiguador de acetato (0.2 M de acetato de sodio, pH de 5 a 8, 2 mM de DTT, 100 mM de NaCl) en un volumen de 100 μ l y el pNPP se adicionó a diferentes concentraciones (0.5-50 mM). La reacción se inició al agregar 0.5-1 μ g de la proteína recombinante correspondiente y se detuvo adicionando 20 μ l de NaOH 2 M. Cuando el ensayo fue realizado con OMFP, la mezcla de reacción se hizo en amortiguador de Tris (40 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl y 4 mM de DTT) pH 6.0-7.5 o acetato de sodio (100 mM de NaC₂H₃O₂) pH 4.5-6.0 para determinar el amortiguador y pH óptimos de reacción. El pH óptimo se determinó incubando cada uno de los amortiguadores y 500 ng de la proteína His::EhPRL a 37°C por 10 min y después se adicionaron 600 μ M de OMFP por reacción para iniciar la lectura. El cambio en la absorción fue registrado contra un blanco preparado de la misma forma, excepto que se adicionó agua en lugar de la solución con la proteína His::EhPRL. El amortiguador que se utilizó en el resto de los ensayos fue Tris-HCl 40 mM pH 6.0.

La cinética de hidrólisis de OMFP (600 μ M por reacción) se hizo con el amortiguador Tris-HCl 40 mM pH 6.0 y 0-1200 ng de la proteína His::EhPRL. La concentración de proteína recombinante que se utilizó para el resto de los ensayos fue de 300 ng. La titulación del sustrato se realizó utilizando un rango de 50-600 μ M de OMFP con las condiciones de reacción previamente descritas. El cambio en la absorción fue registrado contra un blanco preparado de la misma forma, excepto que se adicionó agua en lugar de la solución con el componente a analizar (proteína o sustrato). Las absorbancias de los productos fueron convertidos a concentración utilizando el

coeficiente de extinción molar para 3-metil fluorescein (OMF) de 41,900/M/cm [61], aplicado a la ley de Lambert-Beer. Las velocidades iniciales de reacción de la enzima (calculadas de la porción lineal del progreso de la curva) se graficaron contra la correspondiente concentración de producto y los parámetros cinéticos K_m y V_{max} se calcularon con el programa estadístico Graph Pad Prism 5, aplicando regresión no lineal directamente a la ecuación tipo Michaelis-Menten: $v = V_{max} * S / (K_m + S)$.

Las lecturas del desarrollo de las reacciones se realizaron en placas de 96 pozos; para la reacción con pNPP se utilizaron placas transparentes (Corning Costar, No. 3513) y para la reacción con OMFP se utilizaron placas de fondo oscuro (Corning costar, No. 3916). La liberación del producto *p*-nitrofenol (pNP) se detectó en un lector de ELISA (Multiescan) a 405 nm y el producto 3-O-metil fluoresceina fue detectado en un lector TECAN i-control 1.5.14.0 a 450 nm, utilizando el software Magellan (Tecan Group Ltd) en un modo cinético, realizando una cinética a 37°C de 60 ciclos con intervalos de tiempo de 2 min. Cada ensayo se realizó por duplicado y cada resultado representa el promedio de tres experimentos independientes.

V.14 Ensayos de inhibición de la actividad de fosfatasa de rEhPRL

Los ensayos de inhibición de la actividad enzimática se realizaron con los inhibidores: o-vanadato de sodio (Na_3VO_4), fluoruro de sodio (NaF), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y tartrato de sodio; todo los inhibidores se ensayaron en concentraciones de 1, 3 y 5 mM. La mezcla de reacción con el amortiguador Tris-HCl 40 mM pH 6.0 y 300 ng de la proteína His::EhPRL se preincubó con el inhibidor correspondiente durante 10 min a 37°C, posteriormente se adicionó OMFP. El cambio en la absorción a 450 nm fue registrado contra un blanco preparado de la misma forma, excepto que se adicionó agua en lugar de la solución con el inhibidor. Se consideró como el 100% de la actividad enzimática al valor obtenido ($U.A_{450D.O}$) de la reacción a la cual no se le adición la solución con el inhibidor [54].

Posteriormente, se realizó una curva dosis-respuesta para Na_3VO_4 a concentraciones de 0-1 mM con el fin de evaluar el efecto del inhibidor que en el ensayo anterior inhibió completamente la actividad de la fosfatasa con la concentración más baja ensayada y

para determinar la concentración inhibitoria 50 (IC50). La IC50 se calculó por regresión no lineal, representando gráficamente el porcentaje de inhibición de la actividad frente a log10 de las concentraciones. Las lecturas se realizaron en un lector TECAN i-control 1.5.14.0 a 450 nm, utilizando el software Magellan (Tecan Group Ltd) en un modo cinético, realizando una cinética a 37°C de 60 ciclos con intervalos de tiempo de 2 min. Los datos se graficaron y se analizaron utilizando el software Graph Pad Prism 5.

V.15 Purificación de colágena y fibronectina

Para los ensayos de interacción con componentes de matriz extracelular se purificó fibronectina (FN) y colágena (COL) como se indica a continuación. La FN se purificó de plasma humano por cromatografía de afinidad a gelatina-sefarosa como ha sido reportado [62]. Para este fin, se obtuvo ~ 30 ml de sangre entera de donadores voluntarios, el volumen final sangre por voluntario hasta alcanzar ~100 ml, la sangre se colectó en 5% de citrato de sodio y 10 mM/ml de fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF). La pureza de la proteína se siguió por SDS-PAGE al 7.5%. La fibronectina purificada se dializó en una solución conteniendo 0.15 M de NaCl y 0.05 M de Tris-HCl pH 7.4, se cuantificó a 280 nm utilizando un coeficiente de extinción de 1.28 ml/mg cm, y se almacenó a 4 °C [62]. La colágena tipo I se purificó de cola de rata; brevemente las fibras se solubilizaron en 0.5 M de ácido acético a 4°C durante 24 h y el material insoluble se removió por centrifugación. La cuantificación de la concentración de la fibronectina y de la colágena purificadas se determinó por electroforesis en gel de acrilamida-SDS, por comparación contra una curva estándar de BSA.

V.16 Microscopía de fluorescencia

Trofozoítos de *E. histolytica* se incubaron a 37°C durante diferentes tiempos (15-120 min) sobre cubreobjetos no cubiertos o cubiertos con 100 µg de FN o 100 µg de COL. Posteriormente se fijaron con 4% de *p*-formaldehído (Sigma-Aldrich. No. P6148) en PBS por 1 h a 37°C. Cuando se indica, después del proceso de fijación, las células se trataron durante 10 min con una solución para desenmascarar epítomos (0.1 M de Tris-

HCl pH 9.5 y 5% de urea calentada a 95°C) [63]. Después, las preparaciones se lavaron con PBS y se permeabilizaron o no, con Tritón X-100 al 1% en PBS, durante 15 min a temperatura ambiente. Cuando se indica, las preparaciones también se incubaron con Faloidina rodaminada (Invitrogene No. R415 300U), a una dilución 1:50 en PBS, durante 30 min a temperatura ambiente. Todas las preparaciones se bloquearon con 10% de suero fetal bovino (GIBCO) en PBS por 60 min a 37°C. Para el marcaje de la proteína EhPRL, los trofozoítos se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-rEhPRL (dilución 1:100 en PBS) durante 2 h a 37°C, posteriormente las células se incubaron con un anticuerpo secundario, anti-ratón [IgG (H+L)], acoplado a FITC (Jackson No. 115-09145), a una dilución 1:50 durante 1 h a 37°C. Finalmente, las preparaciones se lavaron y se montaron sobre portaobjetos conteniendo VectaShield con DAPI (Cat No. 1000. Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) y se observaron en el microscopio confocal Carl Zeiss LSM 700.

V.17 Fraccionamiento de trofozoitos e inmunotransferencia

Para evaluar la expresión de la proteína EhPRL nativa en respuesta a FN o COL, se recubrieron placas de 12 pozos (Corning Costar No. 3513) con 100 mg de FN o Col y se interactuó un total de (3×10^6) trofozoítos en fase *log* de crecimiento durante 0-120 min a 37°C, después del periodo de incubación los pozos se lavaron con PBS y se adicionó amortiguador de lisis (Tris-HCl pH 7.4, 1 mM de PMSF, 1 mM de TLCK, 1 mM de IA), las células se lisaron por pipeteo constante y la placa se incubó en hielo por 10 min para permitir el lisado completo; posteriormente la suspensión se transfirió a tubos eppendorf y se centrifugó a 12,100 $\times g$ por 10 min para eliminar el material insoluble. La fracción soluble fue separada y las proteínas cuantificadas. Para el fraccionamiento por SDS-PAGE, 50 μg de proteína fueron preparados adicionando amortiguador de muestra (glicerol al 2%, SDS al 4%, 50 mM de Tris-HCl pH 7.4, 200 mM de β -mercaptoetanol, azul de bromofenol al 0.2%) y calentando a 95°C por 5 min para posteriormente cargar en geles SDS-PAGE al 12%.

Las proteínas resueltas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.45 μm (Cat No. 162-0115. Bio Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA. Made in GE) a 60 volts por 2 h [64]. Después de la transferencia, las membranas se bloquearon con TBST-leche 5% (10 mM de Tris-HCl pH 8.0, 150 mM de NaCl, Tween 20 al 0.05%, leche descremada al 5%) durante 1 h a temperatura ambiente; se aplicaron 3 lavados con TBST y las membranas se incubaron con los anticuerpos de interés: anti-His6 monoclonal a una dilución 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, Delaware Ave., CA, USA. Cat. No. SC8036) o anti-His6::EhPRL policlonal, a una dilución 1:100, ambos en TBST; esta incubación se realizó toda la noche a 4°C; posteriormente la membrana se incubó con el anticuerpo secundario (IgG de cabra anti IgG, IgA, IgM de ratón) conjugado a fosfatasa alcalina (Pierce Protein Biology, Rockford, IL, USA. Cat. No. 31320) diluido 1:5,000 en TBST y la señal de los anticuerpos unidos se reveló con el kit de sustrato BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato) / NBT (Cloruro de nitro-azul de tetrazolio) (Invitrogen, Flynn Rd Camarillo. CA, USA. Cat. No. 00-2209).

V.18 Recuperación de trofozoítos de lesiones hepáticas

Para inducir una infección experimental con *E. histolytica*, 1.5×10^6 trofozoítos se resuspendieron en un volumen total de 100 μl de medio de cultivo TYI-S-33 y se inocularon en el lóbulo izquierdo del hígado de hámsteres machos (*Mesocricetus auratus*) de 60-80 g de peso. Los animales se sacrificaron a los siete días post-inoculación y los hígados con absceso se removieron bajo condiciones de esterilidad. Las áreas con lesión se cortaron en fragmentos y se transfirieron a medio de cultivo TYI-S-33 para incubarse en condiciones anaeróbicas a 36°C. Los trofozoítos recuperados se axenizaron durante siete días y posteriormente se recuperaron para la obtención de extractos totales de proteínas o extracción de RNA [65, 54].

V.19 Expresión diferencial del mRNA de EhPRL

Se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR a partir de RNA total aislado de trofozoítos cultivados axénicamente, cosechados en fase *log* de crecimiento interactuados o no

con FN o COL o de trofozoitos recuperados (7 días post-inoculación) de absceso hepático amibiano interactuados o no con FN o COL. Los ensayos se realizaron en las mismas condiciones de interacción con COL o FN como en el fraccionamiento de trofozoitos para obtención de proteínas totales, excepto que en lugar de adicionar amortiguador de lisis se adicionó trizol y se continuó el procedimiento de purificación según las indicaciones del proveedor, como previamente fue descrito. Los ensayos de RT-PCR se realizaron en las mismas condiciones como en la clonación del mRNA de EhPRL, previamente descritas. Como gen control, se amplificó el mensajero de GAPDH de *E. histolytica* utilizando oligonucleótidos específicos (sentido: 5'-TTCCAAAGGCTGAAGCTCAT-3' y antisentido 5'-CATGAAACATCGGGGTTCC-3'). Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% y las imágenes y el análisis densitométrico se realizó con el sistema de documentación de gel Syngene™ (SYngene, Synoptics Group)

V.20 Construcción de plásmidos y transfección *E. histolytica*

Para la sobreexpresión de EhPRL en trofozoitos de *E. histolytica* se diseñaron dos construcciones en el vector pEhNEO/CAT, el cual contiene el gen de resistencia a neomicina [66] y se nombraron como pNEO-N-HSV::EhPRL y pNEO-C-HSV::EhPRL (**Figura 14**), la cuales comprenden el marco de lectura completo para EhPRL y una etiqueta HSV de 13 aminoácidos derivada del virus herpes simple [67], la cual fue clonada en la región amino terminal de EhPRL (pNEO-N-HSV::EhPRL) o en la región carboxilo terminal de EhPRL (pNEO-C-HSV::EhPRL).

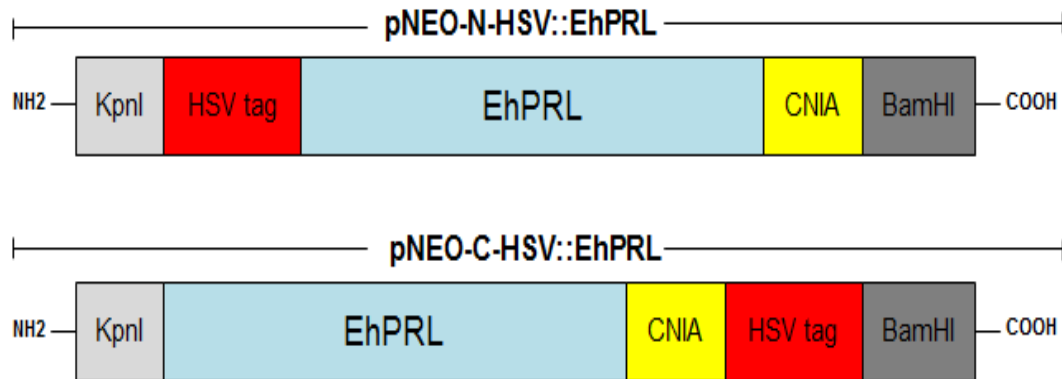


Figura 14. Esquema de las construcciones pNEO-C-HSV::EhPRL y pNEO-N-HSV::EhPRL para la sobreexpresión de la proteína EhPRL en trofozoítos de *E. histolytica*. El marco de lectura completo para EhPRL (1-600 pb. Recuadros azul y amarillo) se fusionó a una etiqueta HSV (HSV-Tag) de 13 aminoácidos (MSQPELAPEDPER); la etiqueta se insertó en la región amino terminal de EhPRL (pNEO-N-HSV::EhPRL) o en la región carboxilo terminal (pNEO-C-HSV::EhPRL); ambas construcciones fueron flanqueadas por los sitios de corte de las enzimas de restricción KpnI y BamHI. El recuadro amarillo (CNIA) representa la caja CAAX de EhPRL.

Para la construcción de los plásmidos pNEO-C-HSV::EhPRL y pNEO-N-HSV::EhPRL se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar la etiqueta HSV en la región N o C terminal del mensajero de EhPRL, respectivamente. Los oligonucleótidos correspondientes se muestran en la **tabla 3**. Para la amplificación de pNEO-C-HSV::EhPRL y pNEO-N-HSV::EhPRL se aisló RNA total de *E. histolytica* como ya ha sido descrito y se utilizaron 1.5 μg para la obtención del cDNA, siguiendo la metodología previamente descrita. Para la reacción de PCR se utilizaron como molde 2 μl del cDNA, 10 pmol de cada oligonucleótido y 5 U/ μl de la enzima Taq DNA polimerasa (New England Biolabs Inc., Tozer Road Beverly. Massachusetts, USA). Para definir las condiciones de amplificación se realizó una curva de temperatura a 60, 65 y 70°C; además se realizó una curva de amplificación a 60°C o 65°C con 1, 1.5 o 2 mM de MgCl_2 . La temperatura seleccionada fue de 65°C con 1 mM de MgCl_2 . Cada ciclo de PCR consistió de un paso de desnaturalización (5 min), un paso de alineamiento (1 min a 94°C, 1 min a 65°C y 1 min a 72°C) y un paso de extensión (7

min a 72°C). El DNA fue amplificado por 30 ciclos en el termociclador, iCycler thermocycler (Biorad Laboratories Inc., USA) y el producto de amplificación se visualizó en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

Tabla 3

Oligonucleotidos para la amplificación de pNEO-C-HSV::EhPRL y pNEO-N-HSV::EhPRL.

Construcción	Oligonucleótido sentido (5'–3')	Oligonucleótido antisentido (5'–3')
pNEO-C-HSV::EhPRL	GGTACCATGAGCCAGCCAGAACT CGCTCCTGAAGACCCAGAGGACA TGGTATTATTAATGTCTATTATTGC TGGCACTGAAAAACAATCTT	CGGGATCCTTACGCAATATTACACAT TCTCTTTTCTTGTGGAACATATGATTG AAT
pNEO-N-HSV::EhPRL	GGTACCATGGTATTATTAATGTCT ATTATTGCTGGCACTGAAAAACAA TCTTCTTTTAAC	CGGGATCCCGTTAATCCTCTGGGTC TTCAGGAGCGAGTTCTGGCTGGCT CGCAATATTACACATTCTCTTTTCTTG TGGAACATATGATTGAATAAATCG

Los amplicones de N-HSV::EhPRL y C-HSV::EhPRL se clonaron en el vector de clonación pCR4-TOPO (In vitrogen, No. de Catálogo K4575-J10) siguiendo las instrucciones del proveedor y posteriormente se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α . Las bacterias transformadas crecidas en las cajas de cultivo se analizaron por restricción, se purificó el DNA plasmídico y se digirió para liberar el inserto de interés. Aquellas clonas que tenían el inserto se procesaron para análisis de secuenciación.

Para la subclonación de N-HSV::EhPRL y C-HSV::EhPRL en el vector pEhNEO/CAT, los plásmidos TOPO-N-HSV::EhPRL y TOPO-C-HSV::EhPRL se digirieron con las enzimas BamHI y KpnI para liberar los insertos, con las mismas enzimas de restricción también se linearizó el plásmido pEhNEO/CAT. La subclonación se realizó bajo las

condiciones descritas previamente. El análisis para verificar las clonas positivas para pNEO-N-HSV::EhPRL y pNEO-C-HSV::EhPRL se llevó a cabo por restricción enzimática de las clonas positivas y el vector vacío, utilizando las enzimas BamHI y KpnI. Posteriormente, se purificó y cuantificó el DNA plasmídico de las clonas positivas para llevar a cabo la transfección de trofozoítos de *E. histolytica*.

V.21 Transfección de trofozoítos de *E. histolytica* con el vector pNEO-CAT

Un total de 3.5×10^6 trofozoítos crecidos en cajas de cultivo de 50 ml fueron cosechados en fase *log* de crecimiento y se lavaron 2 veces con PBS frío y 1 vez con amortiguador citomix (K_2HPO_4/KH_2PO_4 10 mM pH 7.6, KCl 120 mM, $CaCl_2$ 0.15 mM, HEPES 25 mM, EGTA 2 mM y KCl 5 mM). Posteriormente, las células se resuspendieron en 3 ml de amortiguador citomix, adicionando al momento, 4 mM de adenosin trifosfato (ATP) y 10 mM de glutatión. Bajo condiciones de esterilidad, se colocaron 800 μ l de las células en suspensión en cubetas para electroporación (electroporador Bio-Rad Gene Pulser), se adicionaron 100 μ g de DNA plasmídico correspondiente para pNEO-C-HSV::EhPRL, pNEO-N-HSV::EhPRL o pEhNEO/CAT vacío y las cubetas se colocaron en un sistema de electroporación Gene Pulser Xcell™, se aplicaron 2 pulsos eléctricos continuos de 3,000 V/cm a una capacitancia de 25 mF. Las células electroporadas se transfirieron a medio TYI-S-33 completo y se incubaron por 24 h a 37°C; la selección de clonas positivas se inició después de 48 h, utilizando el análogo de neomicina G418 (Invitrogen) a partir de 3 y hasta 50 μ g/ml [68, 66].

Para establecer la concentración letal del antibiótico de selección para los trofozoítos que no hubieran incorporado el plásmido de interés, 1×10^4 trofozoítos en fase *log* de crecimiento se incubaron con concentraciones de 0, 1, 3, 5 y 10 μ g/ml de G418 durante 24 h a 37°C; posteriormente se cuantificó la viabilidad de los trofozoítos por conteo en cámara de Neubauer. Una vez que las clonas transfectadas alcanzaron confluencia, éstas se adaptaron a concentraciones crecientes del antibiótico G418, ensayándose hasta 60 μ g/ml de G418 durante un periodo de incubación de 76 h. Para ensayos posteriores, la concentración utilizada para inducir la expresión de la proteína exógena fue 50 μ g/ml de G418 salvo que se indique otra cosa.

V.22 Evaluación de la sobreexpresión del mRNA y proteína de las construcciones pNEO-C-HSV::EhPRL y pNEO-N-HSV::EhPRL

Para evaluar la sobreexpresión de las proteínas de interés, primero se realizó un ensayo de RT-PCR a partir de RNA total de trofozoítos transfectados y crecidos durante 48 h a 37°C en 20 µg/ml de G418. Las condiciones de amplificación fueron similares a las descritas previamente. Como control negativo, se ensayó con el RNA procedente de trofozoítos transfectados con el vector vacío crecidos también durante 48 h a 37°C en 20 µg/ml de G418. Además, se amplificó el mensajero de GAPDH de *E. histolytica*, el cual se utilizó como gen de control de expresión. Finalmente, el nivel de expresión del mRNA se determinó a partir del análisis densitométrico realizado con el sistema de documentación de gel Syngene™ (SYngene, Synoptics Group) y se reportó como el porcentaje (%) del nivel de expresión de EhPRL, con respecto al vector vacío.

Posteriormente, el nivel de expresión de pNEO-C-HSV::EhPRL y pNEO-N-HSV::EhPRL también se evaluó a nivel de proteína. Brevemente, trofozoítos de *E. histolytica* crecidos durante 48 h a 37°C en 20 µg/ml de G418 se procesaron para la extracción de proteínas como se describió previamente (Fraccionamiento de trofozoitos e inmunotransferencia). Un total de 50 µg de proteína se resolvieron por SDS-PAGE al 12% y un gel réplica se transfirió a una membrana de nitrocelulosa; la concentración y resolución del perfil proteico se verificó por tinción con rojo de Ponceau. La inmunodetección de las proteínas de interés se realizó con el anticuerpo primario policlonal anti-HSV Tag (IgG de conejo, Genemay No. GMTA502P), el cual fue incubado toda la noche (ON) a 4°C, a una dilución 1:2500 en TBS-T y como anticuerpo secundario el anticuerpo monoclonal anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano a una dilución 1:5000 (Sigma, St. Louis, MO.); las membranas se lavaron y se revelaron por quimioluminiscencia. Como control de carg se evaluó, en la misma membrana previamente desnudada, la expresión de actina; para tal efecto, el anticuerpo monoclonal anti-actina se incubó a una dilución 1:1000 en TBST durante 4 h a temperatura ambiente y como segundo anticuerpo, se incubó el anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (Zymed. San Francisco, CA. Cat. No. 62-6120) y las membranas se revelaron por quimioluminiscencia.

Consecutivamente, se evaluó la localización celular de EhPRL exógena por inmunofluorescencia, las muestras se procesaron bajo las mismas condiciones descritas previamente, excepto que como primer anticuerpo se utilizó el anticuerpo anti-HSV Tag, el cual se diluyó 1:100 en PBS y se incubó ON a 4°C, como segundo anticuerpo se utilizó al anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a FITC (Zymed. Cat. No. 61-1611).

V.23 Ensayos de migración celular

Para los ensayos de migración se utilizaron cámaras Transwell de 6.5 μM de diámetro y membranas de policarbonato con un poro de 8 μM (Costar. Cat. No. 07-200-156). Primeramente, trofozoítos de *E. histolytica* se crecieron durante 48 h con 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de G418, posteriormente, el medio de cultivo se reemplazó con medio fresco sin SFA y los tubos se incubaron nuevamente a 37°C durante 4 h; tras el periodo de incubación, se adicionaron 2.0 μM del marcador Cell Tracker Green (Life Technology, No. C2925) y se incubaron nuevamente durante 45 min; las células marcadas se recuperaron por centrifugación, se aplicaron lavados con amortiguador TBS- CaCl_2 (50 mM de Tris-HCl pH 7.2, 150 mM de NaCl, 1 mM de CaCl_2) y las células se cuantificaron [69].

Las cámaras transwell se prepararon de la siguiente manera: en la cámara superior se colocaron 1×10^5 trofozoítos por pozo, resuspendidos en 400 μl de TBS- CaCl_2 , suplementado con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de BSA para el control de no migración, se incluyó un control de no migración para cada una de las 3 clonas de interés, o resuspendidos en 400 μl de medio de cultivo sin SFA; en la cámara inferior se colocaron 600 μl de solución quimioatrayente, conteniendo SFA al 15% o 50 μg de FN. Las cámaras se incubaron a 37°C en CO_2 durante 4 h. Posteriormente, las amibas que migraron se fijaron con *p*-formaldehído al 4% durante 30 min a 37°C y se midió la fluorescencia a 480-535 nm en el equipo Fluorscan Ascent (Thermolab System. Cat. No. 5210450). Para establecer el número de amibas que migraron, se realizó una curva de fluorescencia (U. A.) emitida por 100, 50, 15, 12.5 ó 7.5 mil trofozoítos, como controles negativos se incluyeron amibas no marcadas en TBS- CaCl_2 o medio de cultivo solo. La determinación del índice quimiotáctico se realizó según la siguiente fórmula: Índice

Quimiotáctico (CI)= % de migración quimiotáctica / % de migración al azar; mientras que el % de migración se determinó bajo la siguiente fórmula: % de migración= No. de Células en cámara inferior / No. total de células. Para obtener la significancia estadística se realizaron 3 ensayos independientes, por duplicado y los datos se analizaron por una prueba [69].

Para evaluar *in vivo* el efecto derivado del incremento en la capacidad de migración de los trofozoítos, se analizó la capacidad de los trofozoítos transfectados de producir absceso hepático en el modelo de hámster comparándolo con trofozoítos no transfectados o con trofozoítos transfectados con el vector vacío. La inoculación se llevó a cabo como ya se mencionó anteriormente y el grado de lesión producida se evaluó siete días post-infección.

V.24 Ensayos de cierre de herida (wound-healing)

Para evaluar alternativamente la actividad quimiotáctica de las proteínas de interés se realizaron ensayos de cierre de herida como se describe a continuación. Brevemente, trofozoítos de *E. histolytica* se crecieron durante 48 h con 30 µg/ml de G418, posteriormente, el medio de cultivo se reemplazó con medio fresco sin SFB y los tubos se incubaron nuevamente a 37°C durante 4 h; tras el periodo de incubación, los trofozoítos se recuperaron por centrifugación, se resuspendieron en medio sin suero y se colocaron ~5X10⁵ trofozoítos por pozo en placas de cultivo de 6 pozos (Costar Corning No. 3506), dicha cantidad permitió cubrir a confluencia cada pozo. La placa se incubó durante 15 min a 37°C en 5% de CO₂. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y con una punta de 0.5-10 µl las células del centro de cada pozo se rasparon de orilla a orilla a manera de “herida”, cuidadosamente se dio un lavado con PBS a 37° C para remover las células raspadas y se colocó medio de cultivo completo. Las placas se incubaron a 37°C en presencia de CO₂ durante 30, 60 y 120 min; concluido cada tiempo se retiró el medio de cultivo y se adicionó *p*-formaldehído para fijar las células durante 1 h a 37°C. Finalmente, se aplicaron lavados con PBS y las células fueron teñidas con Giemsa durante 15 min. El colorante excedente se retiró y se aplicaron lavados con PBS. Se tomaron fotografías representativas de al menos 3 puntos a lo

largo de la herida, de los pozos observados bajo un microscopio invertido CarlZeis con una cámara Nikon (modelo ECLIPSE 80i). Para cuantificar el área (μm) libre de células (no migración) o el ancho de la herida, se utilizó el software NIS-Elements BR-3-2, se graficaron los micrómetros correspondientes al ancho de la herida con respecto al tiempo tanto para pNEO-C-HSV::EhPRL, pNEO-N-HSV::EhPRL y para el vector vacío.

V.25 Fraccionamiento celular de amibas que sobre-expresan a la proteína EhPRL

El fraccionamiento celular se realizó mediante lisis hipotónica a partir de un cultivo de trofozoítos incubados con 40 μg de G418, los cuales se recuperaron en fase log de crecimiento. Brevemente, $\sim 3 \times 10^7$ trofozoítos fueron recuperados por centrifugación, se lavaron con PBS frío estéril 2 veces; la pastilla se resuspendió en 10 ml de amortiguador 1 conteniendo 100 mM de HEPES pH 7.5, 50 mM KCl, 10 mM MnCl_2 , 10 mM MgCl_2 , 10% glicerol) y se adicionó en el momento minicomplete 2x (Roche Life Science. Cat. No. 4693124001). La pastilla se dejó reposar por 10 min. Posteriormente, la suspensión celular se sonicó a máxima amplitud (100 Å) a 4°C, en 6 ocasiones o hasta que ya no se observaron células íntegras bajo el microscopio. La suspensión se centrifugó a 185 xg para empastillar el desecho celular; el sobrenadante se recuperó y se centrifugó a 100,000 xg por 45 min a 4°C. La pastilla obtenida se lavó con 10 ml de amortiguador 3 (50 mM de imidazol pH 7.0, 50 mM NaCl, 2 mM ácido 6-aminoexanoico, 2% de glicerol) con el coctel de inhibidores de preteasas. La pastilla se centrifugó nuevamente a 100,000 xg por 45 min a 4°C y se resuspendió en 2 ml de amortiguador 3 con inhibidores de proteasas para posteriormente homogenizar mecánicamente. Se prepararon alícuotas y se almacenaron a -70°C. Posteriormente, se realizó SDS-PAGE e inmunodetección utilizando como anticuerpo primario al anticuerpo monoclonal anti-HSV para observar a la etiqueta HSV tanto en fracción citoplasmática como fracción membranal de cada clona pNEO.

V.26 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante análisis de varianza ANOVA en 2 vías y cuando se indica se aplicó también una prueba Bonferroni. El análisis de dos variables se hizo por la prueba de T (t-Student's test). Todos los datos se analizaron con el programa estadístico Graph Pad Prism versión 5.1 (Graph Pad software, San Diego, CA). Las diferencias con $P < 0.05$ fueron consideradas significativas.

VI. RESULTADOS

VI.1 La proteína EhPRL presenta alta homología con la familia PRL.

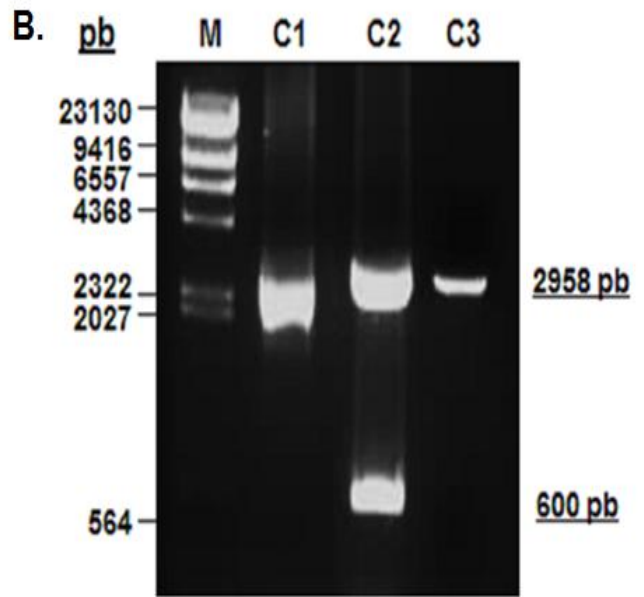
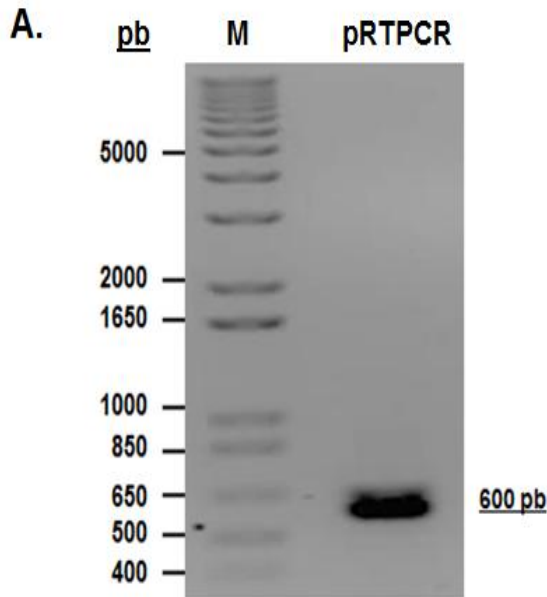
Por análisis *in silico*, nuestro grupo de trabajo encontró que el genoma de *E. histolytica* contiene un solo gen que codifica para una proteína tipo PRL (EhPRL) de 199 aminoácidos con un peso molecular de 22 kDa y punto isoeléctrico de 8.4. En la **figura 15A** se muestra un alineamiento mediante ClustalW2 de EhPRL con proteínas PRL de otros organismos y con las proteínas EhPTPA y EhPTPB. Este análisis reveló que EhPRL contiene motivos característicos de la familia de PTPasas, como aquellos involucrados en la actividad catalítica: el asa-P (**Figura 15A, rectángulo rojo**) y el asa WPD (**Figura 15A, rectángulo verde**); dichos motivos tienen las secuencias consenso XPFDD y HCX₅R, respectivamente. Se reconocieron aminoácidos diferenciales entre las secuencias PTPasas clásicas y PRLs inmediatos al asa-P (**Figura 15A, en amarillo**). El residuo Ser/Thr de PTPasas clásicas cambia en las PRLs por una alanina (Ala). Además, un residuo de cisteína en la posición 82 de EhPRL alineó con la cisteína de PRLs de mamíferos involucrada en la regulación redox [38] (**Figura 15A, recuadro naranja**); este residuo no alineó en la secuencias de EhPTPA o EhPTPB indicando que no es el mismo mecanismo de regulación para PRLs y PTPasas clásicas. El dominio CAAX característico de la familia de PRLs se identificó en EhPRL, pero no en las PTPasas clásicas (**Figura 15A, recuadro azul**). En la **figura 15A** además se muestran sombreados los aminoácidos conservados que establecen el porcentaje de similitud entre las proteínas alineadas, lo cual se resume en la **figura 15B**. EhPRL mostró 31-32% de similitud con las PRLs de humano; el porcentaje de similitud entre EhPRL y las PRLs de protozoarios como *Dictyostelium discoideum*, *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi* va del 26 a 41% (**Figura 15B**). Aún y cuando todas las proteínas pertenecen a la familia de fosfatasas, EhPTPA y EhPTPB comparten solo 3-17% de similitud con diferentes miembros de la familia PRL. EhPRL solo mostró 9 y 11% de similitud con EhPTPA y EhPTPB, respectivamente (**Figura 15B**) quedando restringida dicha similitud a los dominios involucrados en la catálisis enzimática.

Figura 15. La proteína EhPRL presenta alta homología con la familia PRL. **A.** La secuencia de PRL de *E. histolytica* (EhPRL: AIY30229) se comparó con los ortólogos indicados por un análisis de alineamiento múltiple ClustalW2 utilizando el programa accesible en el sitio del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). El recuadro naranja muestra la cisteína hipotética involucrada en la regulación redox; en el recuadro verde se muestra el asa WPD con el residuo de ácido aspártico conservado; en el recuadro rojo se muestra el asa P con el dominio consenso de PTPasas HCX₅R, el cual comprende los residuos catalíticos y en el recuadro azul se señala la caja CAAX específica para la familia de fosfatasas PRL. Los residuos idénticos entre todas las especies alineadas se muestran sombreados en negro y los residuos idénticos solo entre la familia de PRL se muestran sombreados en gris. **B.** Porcentaje de homología entre las secuencias del panel A, las cuales corresponden a los ortólogos de humano HsPRL-1 (AAB40597.1); HsPRL-2 (CAI21726.1); HsPRL-3 (NP_116000.1); PRL1 de *Trypanosoma cruzi* (TcPRL1, AAS19277.1); PRL de *Plasmodium falciparum* (PfPRL, XP_001347810.1); PRL de *Leishmania mexicana* (LmPRL, XP_001682101.1); PRL de *Dictyostelium discoideum* (DdPRL, XP_629773.1) y las PTPasas clásicas of *E. histolytica* PTPA (XP_655870.1) and PTPB (AAZ15802.1). La alineación se cortó manualmente para mostrar las regiones más relevantes.

VI.2 Clonación de EhPRL.

Para clonar la secuencia de la proteína EhPRL en un vector de expresión, el mRNA del gen *ehprl* se amplificó por RT-PCR, utilizando oligonucleótidos específicos, esto con el fin de eliminar el intrón predicho en la posición 438-497. El producto de PCR correspondió con el tamaño molecular esperado (600 pb) (**Figura 16A**). El amplicón se clonó en el vector pBSK para su secuenciación y análisis bioinformático (**Figura 16B**). El vector pBSK se digirió con las enzimas BamHI y EcoRI, el vector linearizado tiene un tamaño de 2958 pb (**Figura 16B, carril 3**). Posterior a la clonación, con el fin de identificar las clonas positivas, se purificó DNA plasmídico de las colonias crecidas en las placas de cultivo LB/amp. Para liberar el inserto correspondiente, el DNA plasmídico se digirió con las enzimas BamHI y EcoRI. En la **figura 16B, carril 2** se muestra el DNA plasmídico digerido de una clona positiva en donde el inserto liberado y el vector linearizado corresponden con los tamaños esperados. En la **figura 16B, carril 1** se muestra una clona negativa en donde solo se observa el fragmento de DNA correspondiente al vector linearizado.

Para corroborar la secuencia de nucleótidos del producto clonado se realizó la secuenciación correspondiente y el análisis bioinformático de la misma. La secuencia obtenida se depositó en el banco de genes (GeneBank) con el número de acceso KM456050. En la **figura 16C** se muestra el alineamiento entre la secuencia de aminoácidos de EhPRL deducida de la secuenciación de nucleótidos de nuestro producto de PCR clonado (ID: AIY30229) y la secuencia reportada en el banco de datos de genes (No. de acceso XP_657240). El alineamiento mostró que la traducción de la secuencia de nucleótidos de nuestro producto de PCR presentaba el cambio de un aminoácido en la posición 71, siendo glutamato para nuestro producto en lugar de la lisina de la proteína reportada (XM_652148) (**figura 16C, cambio remarcado en rojo**). Dicho cambio no se localizó en ningún motivo catalítico.



C.

EhPRL	MVLMSIIAGTEKQSSFNQTNRRNTQTEIPFQTIHVSKLSNPASLVEYNGLKFLIFDSPTD	60
XP_657240	MVLMSIIAGTEKQSSFNQTNRRNTQTEIPFQTIHVSKLSNPASLVEYNGLKFLIFDSPTD	60

EhPRL	DNVDNYISELERYNVTDVVRCCCHPSYDKKKLINNKIAIHELVEYQDEGCPSSRIISDFMRI	120
XP_657240	DNVDNYISELERYNVTDVVRCCCHPSYDKKKLINNKIAIHELVEYQDEGCPSSRIISDFMRI	120

EhPRL	VHAIFPNDQNPLGITLGVHCLSGIGRAPTLVAIALIELGMENTEAMKLVRRKRSAINVL	180
XP_657240	VHAIFPNDQNPLGITLGVHCLSGIGRAPTLVAIALIELGMENTEAMKLVRRKRSAINVL	180

EhPRL	QSRFIQSYVPQEKRCNIA	199
XP_657240	QSRFIQSYVPQEKRCNIA	199

Figura 16. Clonación y secuenciación de EhPRL. **A.** Se muestra el amplicón correspondiente para EhPRL (600 pb) amplificado a partir de mRNA total de *E. histolytica*. **B.** Clonación del amplicón correspondiente para EhPRL, en el vector pBSK. Se muestra el DNA plasmídico purificado de colonias que crecieron en placas de cultivo LB/amp. El DNA plasmídico se trató con las enzimas BamHI y EcoRI para liberar el inserto o no, del fragmento correspondiente al mensajero de EhPRL. El carril **C1** corresponde al DNA plasmídico de una clona negativa; sólo se observa el fragmento en pb correspondiente al vector pBSK linearizado (2958 pb). El carril **C2** corresponde al DNA plasmídico de una clona positiva en donde se liberó un fragmento de 600 pb, correspondiente para EhPRL y la linearización del vector pBSK. El carril **C3** corresponde al vector pBKS purificado, vacío y linearizado, el cual se utilizó para comparar los tamaños de los fragmentos superiores. **C.** Alineamiento mediante BLAST entre la secuencia de aminoácidos de EhPRL deducida de la secuenciación de nucleótidos de nuestro producto de PCR clonado y la secuencia reportada para la proteína en el banco de datos de genes, No. de acceso XP_657240. En el recuadro azul se muestra la secuencia consenso del sitio catalítico (CX5R) y en rojo se muestra el residuo de aminoácido que difiere entre ambas secuencias. M corresponde al marcador de pares de bases.

Posteriormente, el gen *Ehprl* se subclonó en el vector de expresión pRSET-A. La presencia de la secuencia de EhPRL en el vector de expresión se confirmó por mapeo de restricción con la enzima Sspl (**Figura 17**). El vector vacío pRSET-A (de 2987 pb), presenta dos sitios de corte para Sspl en las posiciones 894 y 1024 (**Figura 17A**); tras la digestión se originan dos fragmentos, uno de 130 pb y uno de 2770 pb, respectivamente (**Figura 17C, carril C1**). La secuencia del plásmido obtenido pRSET-A-*ehprl* (de 3469 pb) presenta tres sitios de corte para Sspl en las posiciones 798, 1466 y 1596 (**Figura 17B**), por lo que la digestión completa resulta en fragmentos de 2671, 662, y 136 pb, respectivamente (**Figura 17C, carril C2**).

Figura 17. Mapeo de restricción de pRSET-A-EhPRL con la enzima de restricción Sspl.

A. Esquema del patrón de restricción del vector pRSET-A. En los recuadros rojos, en las posiciones 1024 y 894, se indican los dos sitios de corte con la enzima Sspl, respectivamente.

B. Esquema del patrón de restricción del vector pRSET-A y la secuencia ehprl, que resulta en una construcción de 3469 pb. En los recuadros rojos, en las posiciones 798, 1460 y 1596, respectivamente, se indican los dos sitios de corte con la enzima Sspl.

C. Gel de agarosa al 1% con el producto de la digestión enzimática del vector vacío (**C1**) y de pRSET-A-ehprl (**C2**). Tras la digestión enzimática de pRSET-A-ehprl se obtienen tres fragmentos con los tamaños en pb señalados. M corresponde al marcador de pares de bases. Para **A** y **B**, los esquemas del patrón de restricción fueron obtenidos con la herramienta NEBcutter V2.0 de New England Biolabs, Inc.

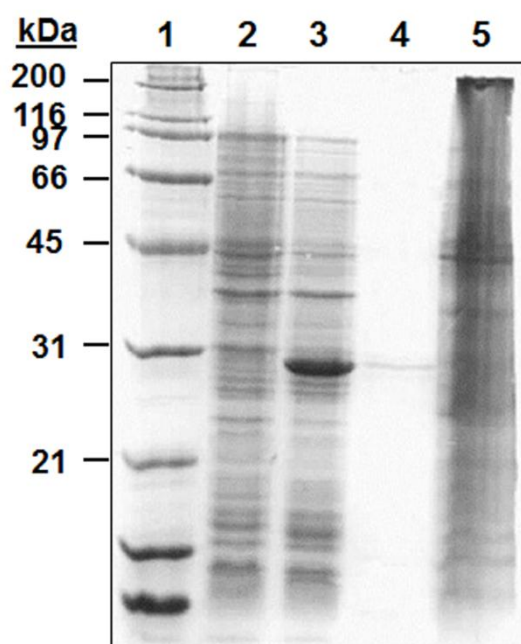
VI.3 Purificación de la proteína recombinante rEhPRL.

Una vez confirmada la correcta clonación en el vector de expresión pRSET-A del marco de lectura de 199 aminoácidos para una proteína tipo PRL de *E. histolytica*, se realizó la inducción de la proteína recombinante His6::EhPRL, citada en adelante como rEhPRL. Durante la etapa de inducción, cuando el cultivo bacteriano se incubó a 37°C, se favoreció la formación de cuerpos de inclusión; con el fin de evitar el uso de agentes caotrópicos para la solubilización de la proteína y su purificación, se analizaron variaciones en las concentraciones de IPTG, tiempo y temperatura de inducción de la proteína rEhPRL. Finalmente, la inducción fue estandarizada con 1 mM de IPTG, durante 1.5 h a 32°C. En la **figura 18A** se muestra la resolución por SDS-PAGE al 12% de un extracto total de bacterias sin inducción (**línea 2**) y bacterias inducidas con IPTG (**línea 3**); en ambos casos el cultivo se realizó en las mismas condiciones estandarizadas como se indicó anteriormente. Las condiciones establecidas para el cultivo bacteriano favorecieron la inducción de la proteína ya que en la fracción del lisado celular de bacterias inducidas se observó una banda principal de ~28 kDa (**Figura 18A, línea 3**).

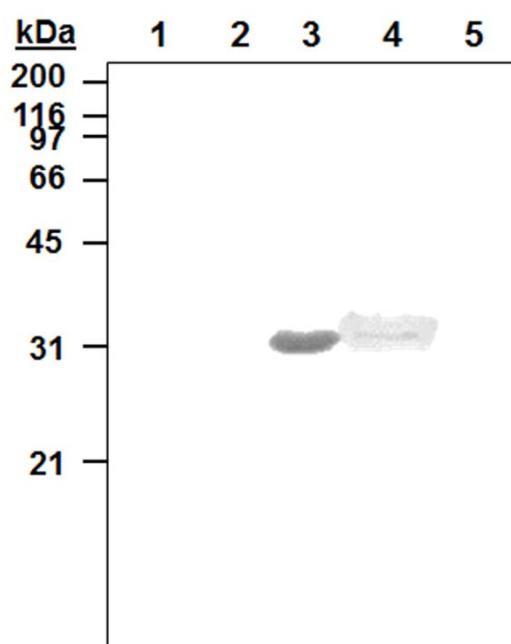
A continuación se realizó la purificación de la proteína rEhPRL; en la **figura 19A, línea 4**, se muestra la purificación, en donde la proteína eluida corresponde con el peso molecular de 22 kDa predicho para EhPRL más 6 kDa de la etiqueta de polihistidinas. La identidad de la proteína rEhPRL se confirmó por Western blot con el anticuerpo monoclonal anti-His6 (**Figura 18B, líneas 2 a 4**).

Posteriormente, la proteína rEhPRL se utilizó para inmunizar ratones Balb/c y obtener anticuerpos policlonales; dichos anticuerpos anti-rEhPRL reconocieron tanto la proteína recombinante (**Figura 18C, líneas 3 y 4**) como la nativa (**Figura 18C, línea 5**). En algunos ensayos, el antisero también reconoció proteínas de alto peso molecular (**Figura 18C, línea 4**), sugiriendo que rEhPRL podría formar dímero en condiciones particulares, ya que en extracto total de proteína no se observó dicho patrón, solo se observamos monómeros del peso molecular esperado. El suero preinmune de ratones no reconoció a la proteína rEhPRL ni a la nativa (**Figura 18D, líneas 3 a 5**).

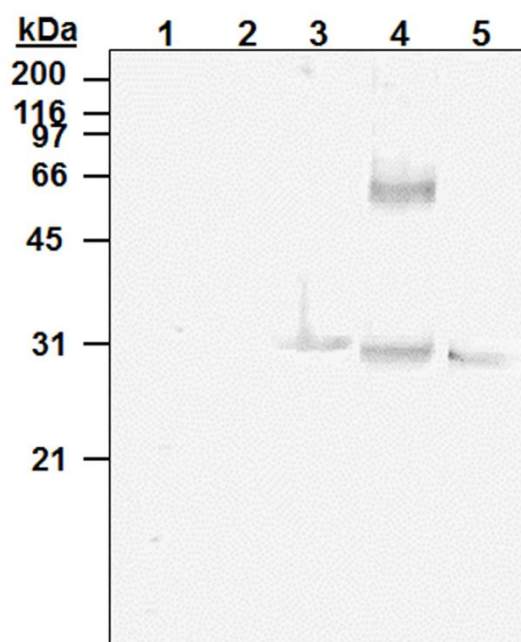
A.



B.



C.



D.

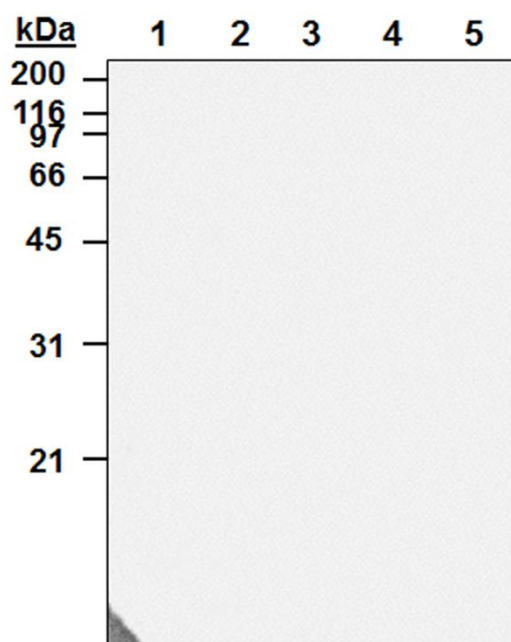


Figura 18. Purificación e inmunodetección de rEhPRL. **A.** SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomasie; marcador de peso molecular (1), extracto total de bacterias sin inducir (2), extracto total de bacterias inducidas con IPTG (3), proteína rEhPRL purificada por afinidad con un peso molecular de ~28 kDa (4), extracto total de *E. histolytica* (5). **B, C y D.** Ensayos de Western blot de extracto total de bacterias sin inducir (2), extracto total de bacterias inducidas con IPTG (3), proteína rEhPRL purificada por afinidad con un peso molecular de ~28 kDa (4), extracto total de *E. histolytica* (5) reaccionados con el anticuerpo anti-His6 (**B**), suero anti-rEhPRL (**C**) y suero preinmune (**D**). Los marcadores de peso molecular se muestran en las líneas 1.

VI.4 Caracterización de la actividad de fosfatasa de rEhPRL con 3-o-fluoresceína fosfato (OMFP) como sustrato.

Para el análisis de la actividad enzimática de una fosfatasa, existen comercialmente diversos sustratos fosforilados tales como *p*-nitrofenol fosfato (pNPP), 3-o-fluoresceína fosfato, 6,8-difluoro-4-metilumbeliferil fosfato (DiFMUP) y 2-cloro-nitrofenil fosfato (CNPP), entre otros. Inicialmente, se evaluó la actividad de fosfatasa de la proteína rEhPRL utilizando como sustrato a pNPP; sin embargo no se obtuvieron valores reproducibles para la determinación de los parámetros cinéticos correspondientes lo que indicó que, en las condiciones ensayadas, el pNPP no era un sustrato para rEhPRL. Se decidió entonces utilizar como sustrato alternativo el OMFP, el cual resultó adecuado para evaluar la actividad enzimática de rEhPRL, confirmando que en las condiciones ensayadas OMFP es un sustrato para rEhPRL (**Figura 19**).

El pH juega un papel importante en la actividad enzimática. En el presente ensayo, se evaluó la actividad enzimática de rEhPRL en dos amortiguadores distintos (Tris-HCl y $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$) a diferentes pHs, tal como se indica en material y métodos. El amortiguador de Tris-HCl a pH 6.0 fue el que proporcionó el ambiente óptimo en el cual la actividad de la enzima fue máxima (**Figura 19A**) ya que cuando la actividad se midió a un pH mayor a 6.0 ésta resultó fuertemente abatida, se observó una disminución del 78% en la actividad a pH 6.5, sugiriendo que *in vivo* EhPRL puede existir en un ambiente ácido y fuerzas iónicas específicas. Cuando la reacción se hizo con $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ en el rango de pH de 4.5 a 6.0, la actividad enzimática alcanzó como máximo 0.035 U.A, mientras que con Tris-HCl se obtuvo hasta 0.050 U.A. (**Figura 19A**).

Otro factor clave que afecta la velocidad de una reacción es la concentración de enzima (E). Una vez que se estableció el amortiguador y pH óptimos para la actividad, se incubaron diferentes cantidades de rEhPRL con OMFP por 2 h, la titulación de la enzima se muestra en la **figura 19B**. La proteína rEhPRL produce un incremento en la absorbancia dependiente de dosis y tiempo, relativo al control sin enzima. Los valores obtenidos al tiempo final de 2 h para cada concentración se muestran en la **figura 19C**. Con 300 ng de enzima el incremento en la absorbancia fue lineal durante el tiempo de incubación, por lo que se seleccionó dicha concentración para los ensayos posteriores.

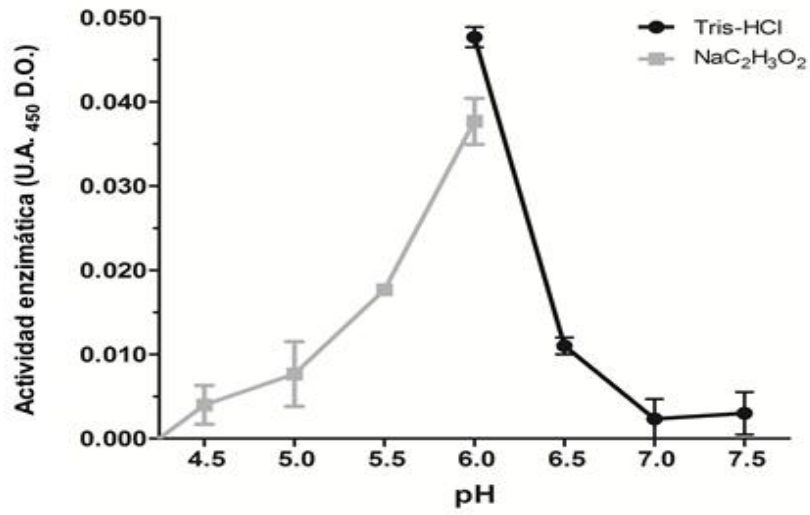
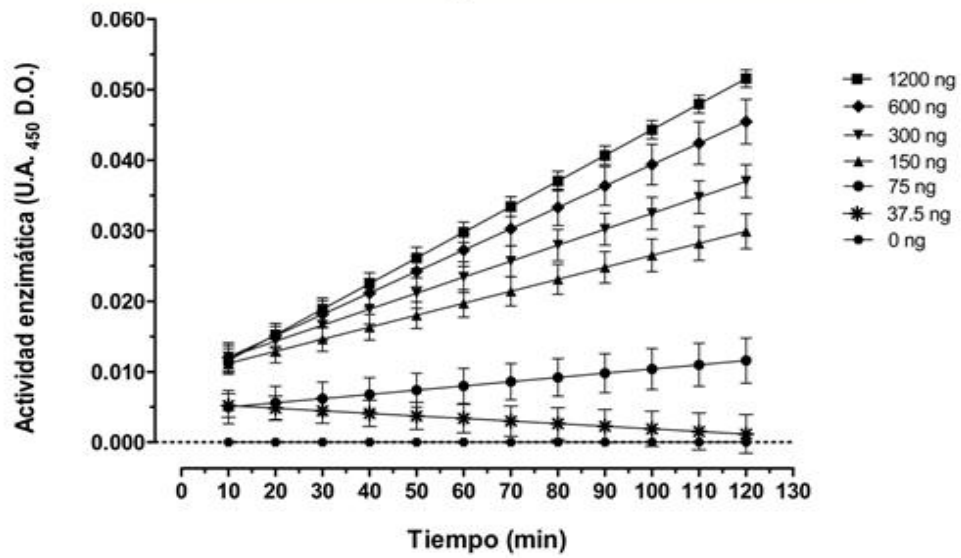
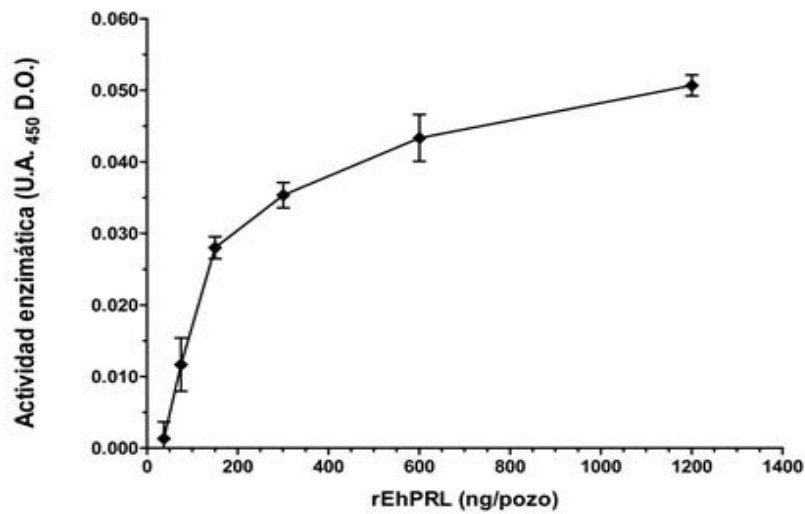
A.**B.****C.**

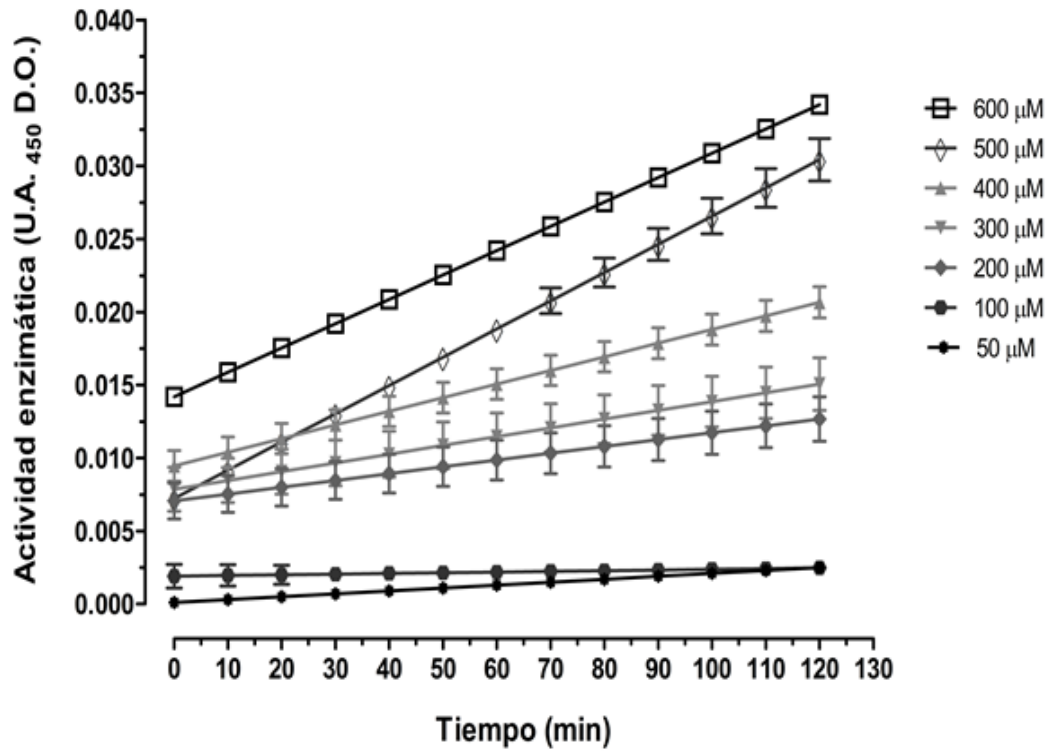
Figura 19. Efecto del pH y la concentración en la actividad de la enzima rEhPRL sobre 3-o-metilfluoresceina fosfato (OMFP). **A.** Influencia del pH sobre la actividad de fosfatasa con los amortiguadores de acetato de sodio (■ pH 4.5-6) o Tris-HCl (● pH 6-7.5). La máxima actividad de fosfatasa de rEhPRL se alcanzó con Tris-HCl a pH 6.0. **B.** Hidrólisis de OMFP dependiente de concentración de enzima (0-1200 ng). La concentración de 300 ng (▼) de enzima fue la seleccionada para la titulación de OMFP. **C.** Gráfica del punto final de reacción (120 min) para cada concentración de enzima utilizada en el ensayo de **B.** Todos los ensayos se realizaron en placas de 96 pozos a 37°C, se midió la absorbancia a 450 nm con lecturas constantes durante 120 min utilizando el equipo TECAN y el software Magellan. Las barras en las gráficas indican el promedio \pm SD de tres ensayos independientes por duplicado

Posteriormente, se determinó la velocidad de reacción a diferentes concentraciones de sustrato (**Figura 20**). La hidrólisis catalizada por rEhPRL con concentraciones crecientes de OMFP se muestra en la **figura 20A**. Los valores de velocidad inicial (V_0) y la concentración de sustrato $[S]$ se utilizaron para el cálculo de los parámetros cinéticos, V_{max} , K_m y K_{cat} (**Figura 20B**). La proteína rEhPRL mostró un comportamiento tipo Michaelis-Menten durante la hidrólisis de OMFP, con una K_m de $36.57 \pm 10 \mu\text{M}$ y una V_{max} de 6.94×10^{-16} (**Figura 20B**). El aumento saturable en la absorbancia, la K_m para OMFP a $\sim 40 \mu\text{M}$, y la V_{max} son consistentes con los valores publicados para PRLs de humano [61]. Se seleccionó una concentración de $40 \mu\text{M}$ de OMFP para el desarrollo de ensayos posteriores. La constante catalítica se obtuvo dividiendo V_{max} por el total de la concentración de enzima, resultando en una $K_{cat} = 5.09 \times 10^{-11} \text{ min}^{-1}$.

Para identificar el tipo de fosfatasa de rEhPRL evaluamos el efecto de inhibidores sobre su actividad. Como inhibidor de tirosina fosfatasas se ensayó el *o*-vanadato de sodio; como inhibidor de Ser/Thr fosfatasas se utilizó fluoruro de sodio (NaF), como inhibidor de fosfatasas ácidas se utilizó tartrato de sodio y el H_2O_2 se utilizó como inhibidor de fosfatasas dependientes de cisteína. Todos los inhibidores se utilizaron en concentraciones de 1, 5 y 10 mM. La actividad enzimática se inhibió por completo con *o*-vanadato de sodio desde la concentración de 1 mM. El porcentaje de actividad enzimática obtenido para NaF, H_2O_2 y sin inhibidor muestra que dichos inhibidores no tienen efecto sobre la actividad enzimática de rEhPRL a concentraciones de 1 mM, mientras que a 3 y 5 mM muestran una inhibición parcial; estos resultados sugieren que rEhPRL tiene actividad de proteína tirosina fosfatasa y no de serina treonina fosfatasa (**Figura 21**). En la **figura 21** se muestra la actividad enzimática de rEhPRL en porcentaje (%) la cual corresponde a la actividad máxima de muestras sin inhibidor.

Con el objetivo de corroborar el efecto inhibitorio observado con *o*-vanadato de sodio, se realizó una curva de actividad con las mismas condiciones previas, excepto que las concentraciones del inhibidor fueron menores a 1 mM. Como se observa en la **figura 21**, el efecto inhibitorio de *o*-vanadato de sodio sobre rEhPRL es dependiente de dosis; como resultado de este ensayo se obtuvo un valor de IC_{50} de 0.169 mM.

A.



B.

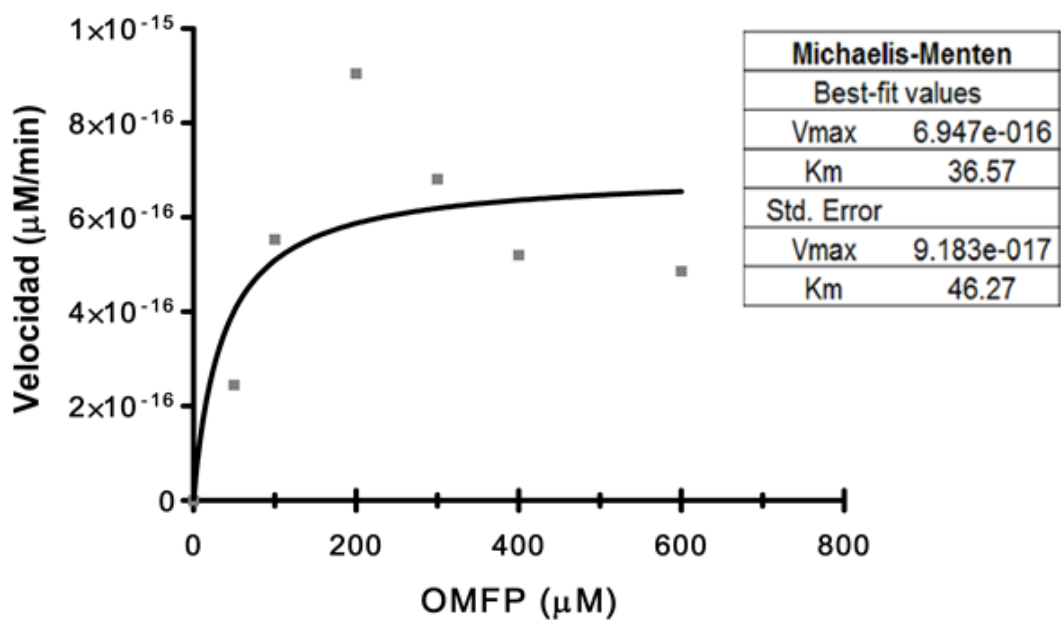
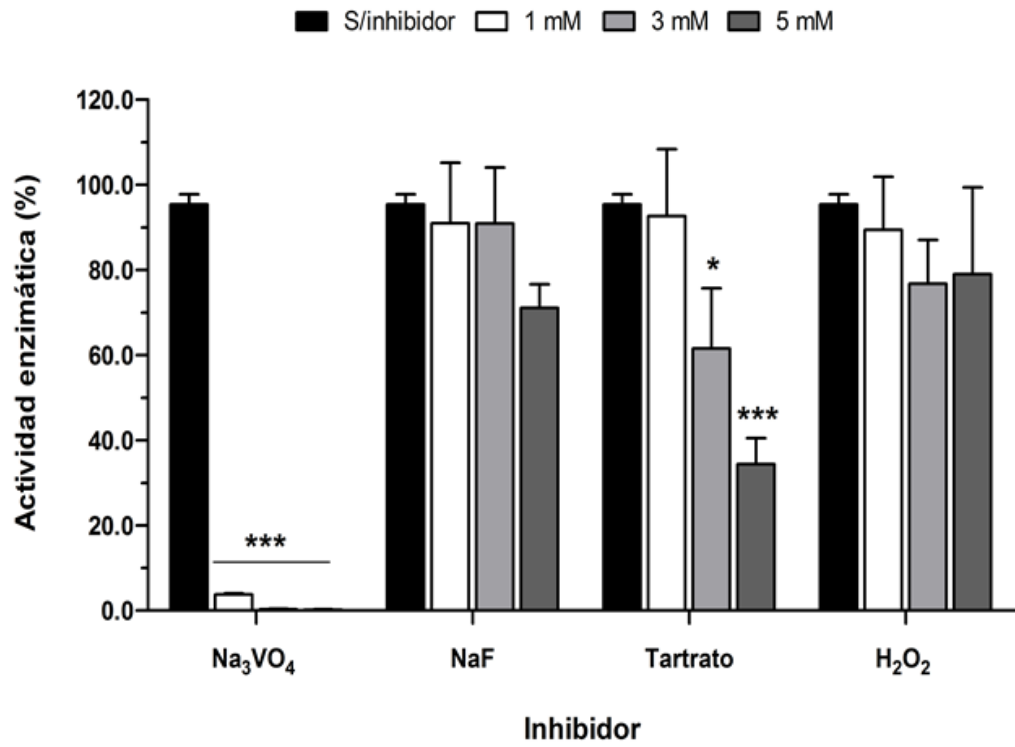


Figura 20. Efecto de la concentración del sustrato OMFP en la actividad de rEhPLR. A. Titulación de OMFP a diferentes concentraciones. Se utilizaron 300 ng de rEhPRL por pozo y se incubaron con la concentración indicada de OMFP durante 120 min. **B.** La proteína rEhPRL produce un incremento saturable en la intensidad de absorbancia con una Km para OMFP de ~ 36 μM y una V_{max} of 6.9e-016 $\mu\text{M}/\text{min}$. Todos los ensayos se realizaron en placas de 96 pozos a 37°C, se midió la absorbancia a 450 nm con lecturas constantes durante 120 min utilizando el equipo TECAN y el software Magellan. Se muestran los resultados de tres ensayos independientes a partir de lotes diferentes de la proteína purificada.

A.



B.

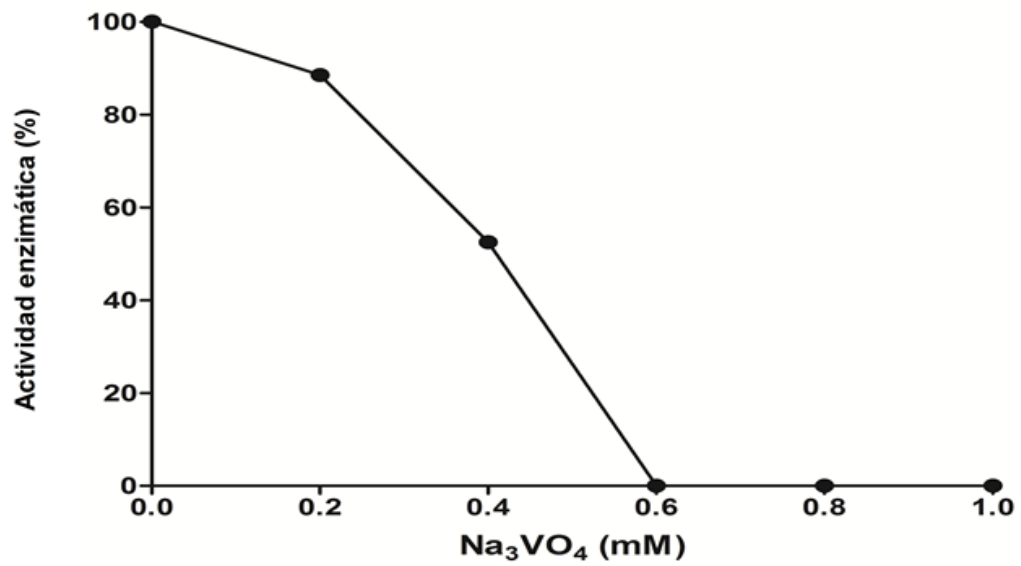


Figura 21. Inhibición de la actividad enzimática de rEhPRL. A. Efecto en la actividad de rEhPRL de 1, 3 o 5 mM del inhibidor de fosfatasas (Na_3VO_4), de serina treonina fosfatasas (NaF), de fosfatasas ácidas (tartrato) y fosfatasas dependientes de cisteína (H_2O_2). Las barras indican el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes por duplicado y el análisis estadístico se realizó con el programa Graph Pad Prism versión 5.1, comparando para cada condición, la actividad enzimática con inhibidor vs sin inhibidor. (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.001$. **B.** Curva dosis-respuesta que muestra el efecto de Na_3VO_4 , este ensayo se realizó adicionando de 0-1 mM del inhibidore. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pozos, se determinó la absorbancia a 450 nm a 37°C en el equipo TECAN.

VI.5 La proteína EhPRL se localiza tanto en la membrana plasmática como en el citoplasma.

La localización celular de EhPRL fue evaluada por inmunofluorescencia indirecta en trofozoítos permeabilizados (**Figura 22, páneles A, C, E y G**) y no permeabilizados (**Figura 22, páneles B, D, F y H**). En trofozoitos permeabilizados, se observó que EhPRL se localiza consistentemente en el citoplasma (**Figura 22E**), en donde es posible observar la fluorescencia en forma de puntos distribuidos homogéneamente. La proteína EhPRL también se localizó en la membrana plasmática de los trofozoitos. En la **figura 22F** se muestran trofozoitos no permeabilizados en donde la fluorescencia fue observada en forma de parches en toda la periferia (flecha amarilla). Debido a que EhPRL se localiza en la membrana plasmática, existe la posibilidad de que los lípidos de membrana enmascaren epítopes de EhPRL necesarios para el reconocimiento del anticuerpo anti-rEhPRL. Por este motivo se implementó un procedimiento, a base de urea, para desenmascarar epítopes. En la **figura 22G y H** se muestran imágenes representativas de preparaciones de trofozoítos permeabilizados (**Figura 22G**) y no permeabilizados (**Figura 22H**), las cuales fueron sometidas al proceso de desenmascaramiento encontrándose que, tanto en los trofozoítos permeabilizados como en los no permeabilizados, la intensidad de la fluorescencia incrementó considerablemente, en comparación con los trofozoitos no tratados con urea (**Figura 22E y F**); el perfil de reconocimiento hacia EhPRL fue el mismo que en aquellas células no tratadas con urea. En la **figura 22C y D** se muestra el reconocimiento del suero preinmune.

PERMEABILIZADAS NO PERMEABILIZADAS

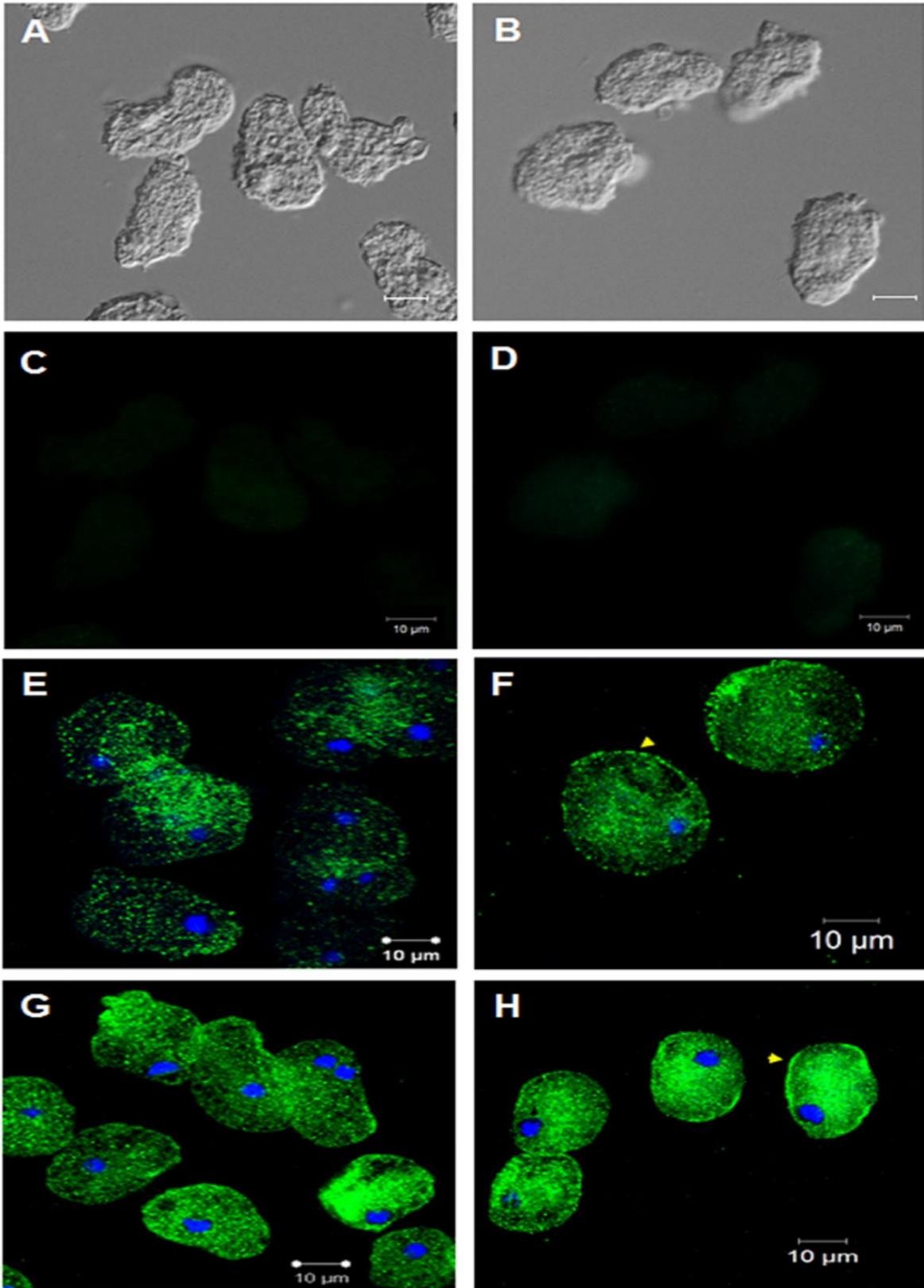


Figura 22. EhPRL se localiza en membrana plasmática y en citoplasma. Trofozoítos axénicos adheridos a vidrio fueron analizados por IFI utilizando como anticuerpo primario al anti-rEhPRL. Se permeabilizaron trofozoítos con 1% de tritón X-100 (**páneles A, C, E y G**) y trofozoítos no permeabilizados se muestran en los **paneles B, D, F y H**. El anticuerpo reconoce a la proteína nativa en puntos distribuidos homogéneamente en el citoplasma (**E**) y en la periferia de la célula (**F**). Para desenmascarar epítopes de EhPRL, los trofozoítos adheridos fueron tratados con 5% de urea (**G, H**). Las preparaciones de trofozoítos reaccionadas con el suero preinmune se muestran en **C y D**; los mismos controles en contraste de fases, se muestran en **A y B**. Los nucleos fueron contrateñidos con DAPI y todas las imágenes se tomaron en el microscopio confocal Carl Zeiss LSM 700. Todas las fotografías se capturaron con el objetivo 40X bajo las mismas condiciones de ganancia digital con zoom de 0.5.

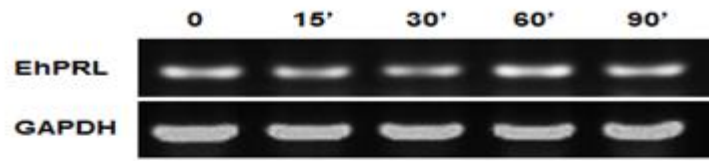
VI.6 Regulación de la expresión del mRNA de EhPRL en trofozoítos adheridos a componentes de matriz extracelular

En el proceso invasivo de *E. histolytica*, es reconocida la participación de la motilidad amebiana durante la interacción con el sustrato, tal como componentes de matriz extracelular, MEC. Por RT-PCR punto final se evaluó la modulación del mRNA de EhPRL de trofozoítos interactuados con fibronectina (FN) o colágena (COL) (**Figuras 23 y 24 respectivamente**). En trofozoítos axénicos de *E. histolytica*, existen niveles basales del mensajero de EhPRL (**Figuras 23A y 24A**) ya que los niveles del mensajero no variaron significativamente durante el periodo estudiado (0 a 90 min), con relación al gen constitutivo EhGAPDH, cuando los trofozoítos se incubaron en placas no recubiertas. En trofozoítos axénicos de *E. histolytica* incubados con FN no se observó variación significativa (**Figura 23B**).

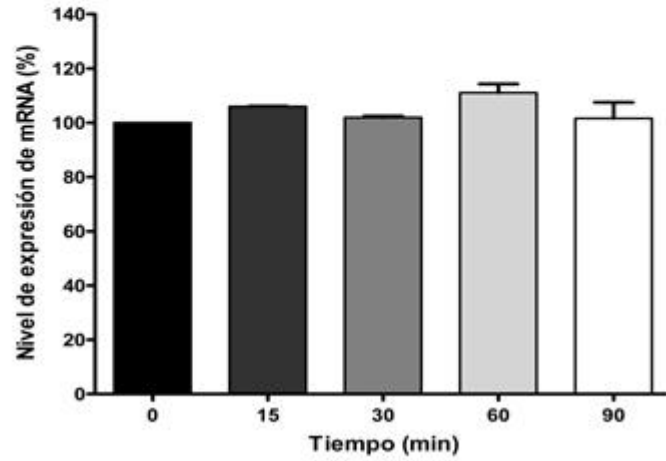
Debido a que no siempre existe una relación directa entre el nivel de mRNA y el nivel de proteína, se realizaron ensayos de WB para evaluar a la proteína EhPRL en respuesta a FN o COL. Bajo las condiciones ensayadas no fue posible determinar el comportamiento de la proteína EhPRL post-interacción ya que el anticuerpo anti-EhPRL no reconoció a la proteína en los trofozoitos después del primer tiempo de interacción con FN, sugiriendo que tras la interacción con componentes del huésped la proteína EhPRL podría sufrir cambios conformacionales que enmascaren epítopes para el reconocimiento. Por lo que para evaluar la modulación de la proteína por la interacción con FN se realizaron ensayos de inmunofluorescencia (**Figura 23C y D**).

Por inmunofluorescencia indirecta, se observó que en aquellos trofozoítos no permeabilizados, interactuados con FN (**Figura 23C**) la intensidad de fluorescencia en la membrana plasmática no cambió durante los tiempos de incubación. No obstante, en trofozoítos permeabilizados (**Figura 23D**) si se observó un incremento en la intensidad de fluorescencia a partir de los 15 min y hasta los 120 min, tiempo en el cual la fluorescencia fue intensa y homogénea en todo el citoplasma (**Figura 23D**). Estos datos sugieren que la interacción de *E. histolytica* con FN resulta en una modulación intracelular de la proteína EhPRL y que EhPRL está presente de forma constitutiva en la membrana plasmática.

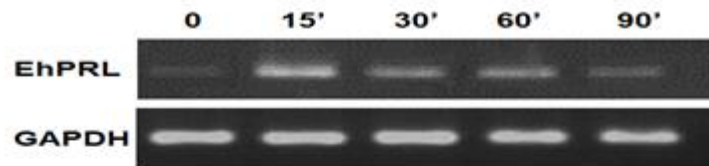
A.



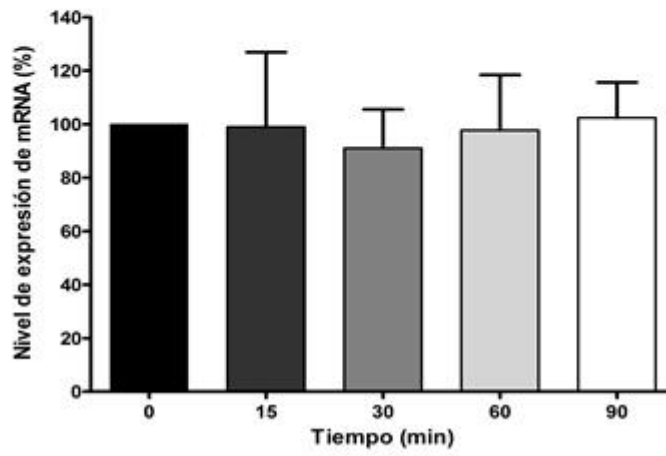
No cubierta



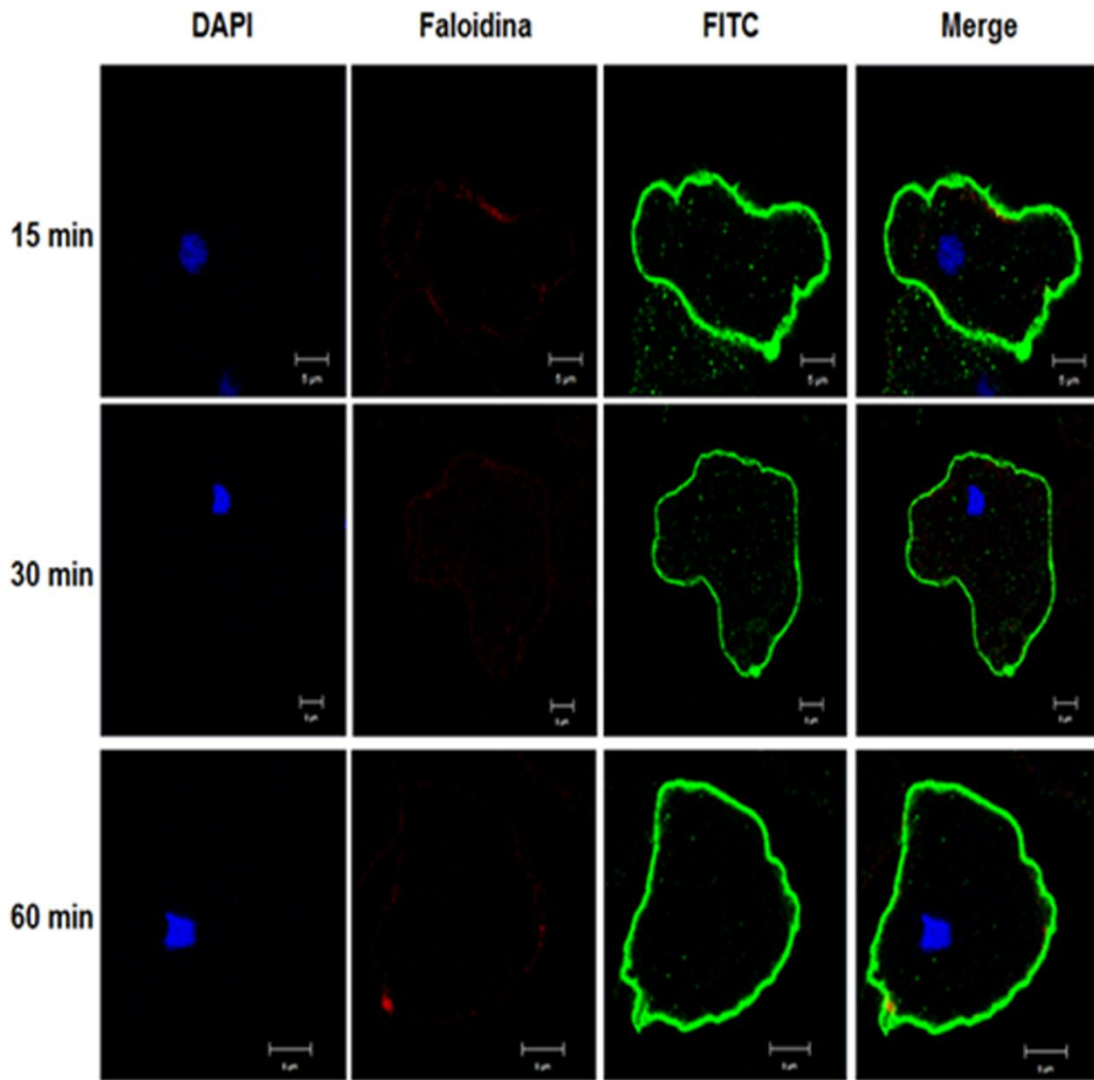
B.



Fibronectina



C.



D.

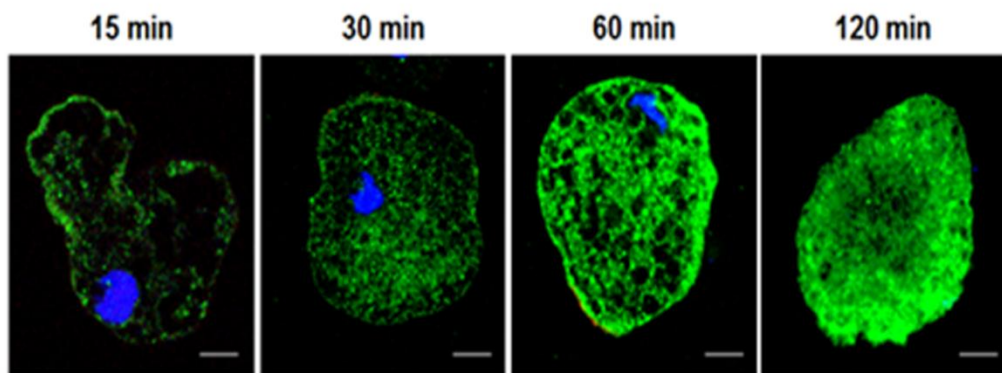


Figura 23. Modulación del mRNA y proteína EhPRL en trofozoítos interactuados con FN.

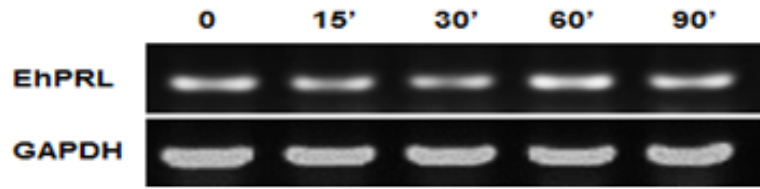
A. RT-PCR a partir de RNA total de trofozoítos de cultivo e interactuados durante 0 a 90 min, en placas no recubiertas. El panel superior corresponde a un gel de agarosa al 1% teñido con BrEt en donde se muestra el amplicón para EhPRL y el control del gen constitutivo, EhGAPDH. La gráfica inferior corresponde al análisis densitométrico. **B.** RT-PCR a partir de RNA total de trofozoítos axénicos interactuados sobre placas recubiertas con 100 μ g de FN. El análisis densitométrico se muestra debajo del gel de agarosa teñido con BrEt. Para **A** y **B**, se muestra el promedio de 3 experimentos independientes los cuales fueron normalizados al tiempo cero y se representan como porcentaje del nivel de expresión de mRNA. **C y D.** Inmunofluorescencia indirecta de trofozoítos permeabilizados (C) o no permeabilizados (D) después de su interacción sobre placas recubiertas con 100 μ g de fibronectina. La F-actina se tiñó con faloidina rodaminada y como segundo anticuerpo se usó un anti-ratón acoplado a FITC; los núcleos se contra tiñeron con DAPI. Todas las fotos se tomaron en el Microscopio Confocal Carl Zeiss LSM 700. Tamaño de barra = 5 μ M.

Adicionalmente, la interacción de trofozoítos axénicos de *E. histolytica* con COL indujo un cambio significativo en el nivel de mRNA (**Figura 24B**), en comparación con los niveles basales a tiempo cero y en comparación con los niveles de mRNA observados cuando la interacción se hizo con FN (**Figura 23**). Con COL, se observó un incremento en los niveles de mRNA dependiente de tiempo; a partir de 15 min de interacción y hasta 90 min se observó una modulación positiva con relación al tiempo cero, con una significancia estadística (** $p < 0.05$) y entre los tiempos de 30 y 60 min en comparación con el nivel de mRNA a 90 min de interacción (significancia estadística, * $p < 0.05$) (**Figura 24B**). Estos datos indican que el mRNA de EhPRL es modulado positivamente en respuesta a COL y que dicha modulación es dependiente de tiempo, en donde el nivel de mRNA (%) incrementa a partir de 15 min de interacción.

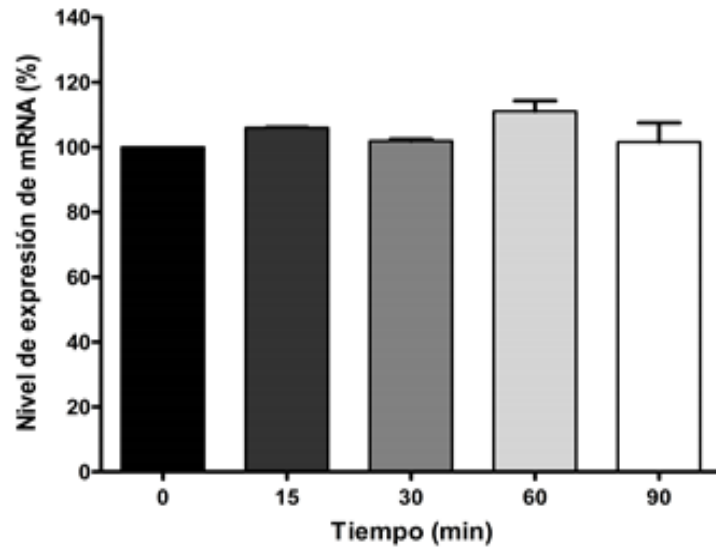
La distribución de la proteína nativa, en respuesta a la interacción con COL se evaluó por inmunofluorescencia (**Figura 24C y D**). La microscopia confocal muestra que EhPRL se localiza de forma constante, en la membrana plasmática durante 15 a 60 minutos (**Figura 24C**, trofozoítos no permeabilizados), sugiriendo que esta proteína podría ser necesaria en la membrana plasmática para participar activamente en eventos tales como interacción célula-célula, adhesión o migración.

Además, EhPRL se localizó en el citoplasma (**Figura 24D**, trofozoítos permeabilizados). En la **figura 24D**, se observa claramente un incremento en la intensidad de fluorescencia en citoplasma entre los 15 minutos y hasta 60 minutos de interacción, sugiriendo una probable movilización de la proteína, de membrana a citoplasma. La proteína EhPRL también se detectó colocalizando con actina cortical a los 15 minutos de interacción (**Figura 24D**), sugiriendo que EhPRL puede estar involucrada en el rearreglo del citoesqueleto provocado por la interacción con MEC. Interesantemente, la proteína EhPRL se redistribuyó de la membrana plasmática a estructuras similares a vesículas cuando los trofozoítos se interactuaron durante 120 min (**Figura 24D**), lo que sugiere que el componente de matriz celular COL, induce la redistribución de la proteína a estructuras similares a vesículas, las cuales se localizaron con mayor proximidad a la membrana plasmática, siendo probablemente, tiempos tempranos del reciclamiento de la proteína.

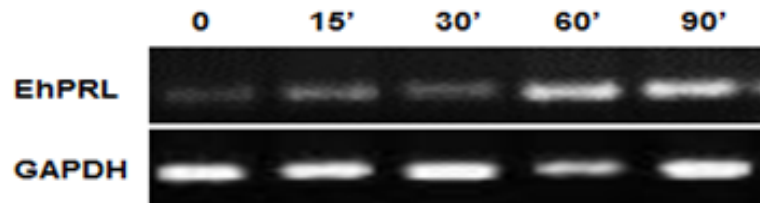
A.



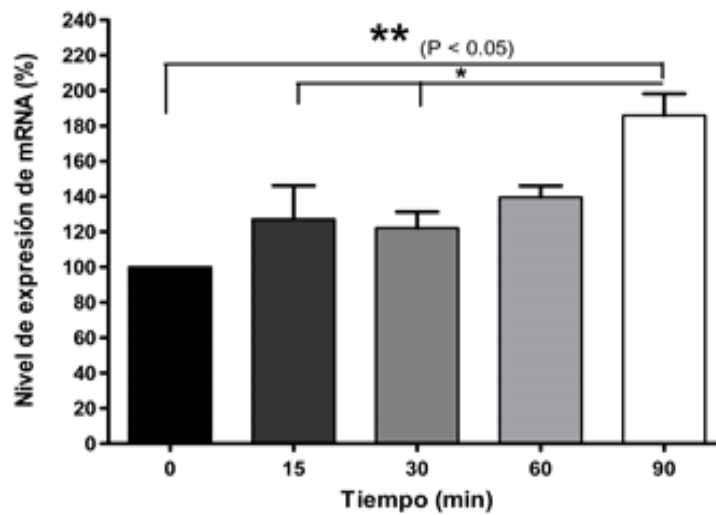
No cubierta



B.



Colagena tipo I



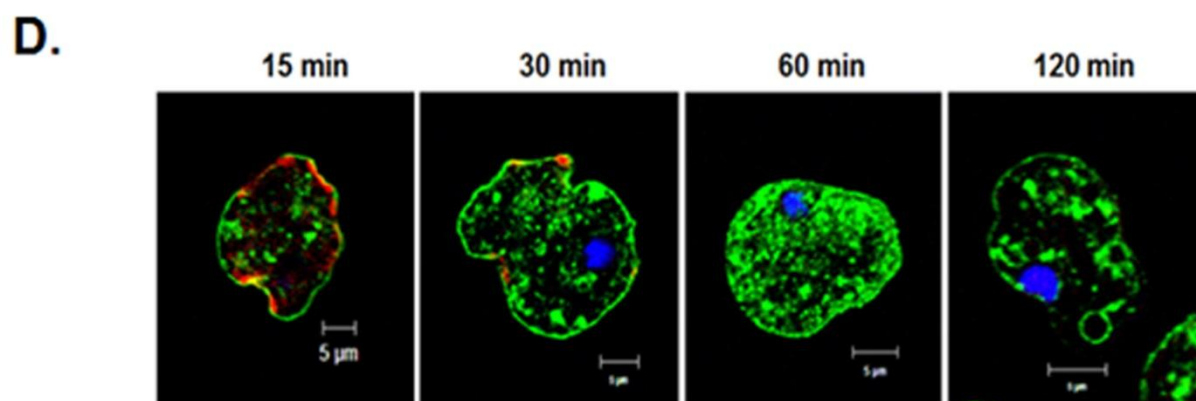
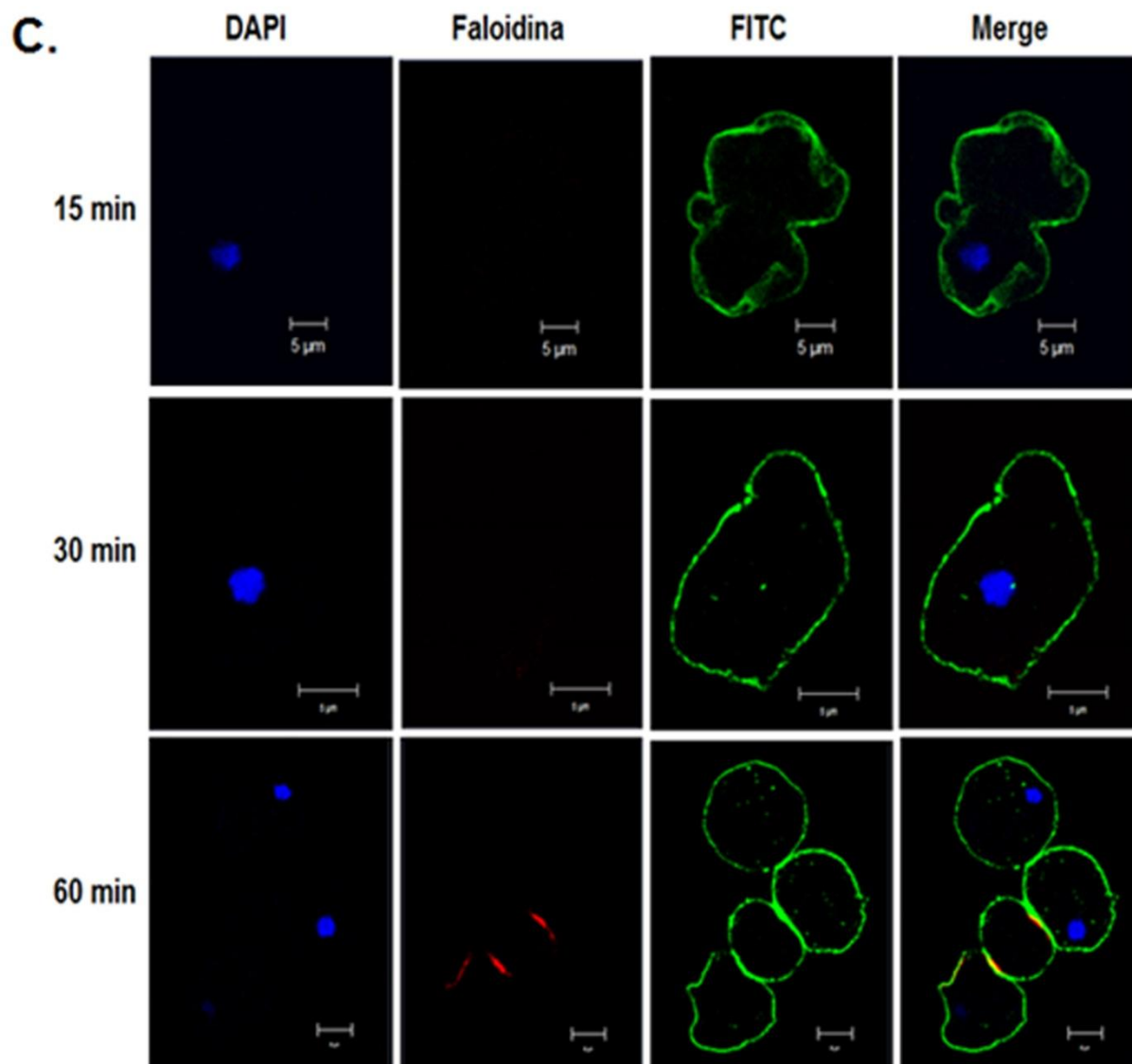


Figura 24. Modulación del mRNA y proteína EhPRL en trofozoítos interactuados con COL.

A. Ensayos de RT-PCR a partir de RNA total de trofozoítos de cultivo e interaccionados durante 0 a 90 min sobre placas no recubiertas. El panel superior corresponde a un gel de agarosa al 1% teñido con BrEt en donde se muestra el amplicón para EhPRL y el control del gen constitutivo, EhGAPDH. **B.** Ensayos de RT-PCR a partir de RNA total de trofozoítos cultivados en condiciones axénicas e incubados durante 0 a 90 min sobre placas recubiertas con 100 μ g de COL. El análisis densitométrico se muestra debajo de cada imagen de gel. Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes los cuales fueron normalizados al tiempo cero y se representan como porcentaje (%) del nivel de expresión de mRNA. Se obtuvo una significancia estadística de la interacción de trofozoítos con colágena entre el tiempo cero y 90 min (** $p < 0.01$) y entre 30 ó 60 minutos y 90 minutos (* $p < 0.05$). **C y D.** Inmunofluorescencia indirecta de trofozoítos incubados sobre colágena. En **C** se muestran preparaciones de trofozoítos no permeabilizados y en **D** son trofozoítos permeabilizados. La F-actina se tiñó con faloidina rodaminada y como segundo anticuerpo se usó un anti-ratón acoplado a FITC; los núcleos se contra tiñeron con DAPI. Todas las fotos se tomaron con el Microscopio Confocal Carl Zeiss LSM 700. Tamaño de barra = 5 μ M.

VI.7 El mensajero de EhPRL es inducido en trofozoítos recuperados de absceso hepático

La sobrevivencia de *E. histolytica* dentro del ambiente hostil del hígado, en particular durante la formación del absceso hepático amibiano, está acompañada de un fuerte proceso adaptativo que requiere de la regulación específica de un número de genes y proteínas. El conocimiento de esta respuesta regulatoria es un paso importante en la comprensión de la patogénesis de *E. histolytica*. Mediante ensayos de RT-PCR, en el presente estudio se comparó el nivel de expresión del mRNA de EhPRL entre amibas crecidas axénicamente y aquéllas recuperadas de absceso hepático amebiano, inducido experimentalmente en hámsteres. En la **figura 25A** se muestra una fotografía representativa de un hígado con absceso amibiano. En la **figura 25B**, se muestra el amplicón que corresponde a EhPRL (600 pb); se incluyó como control interno el amplicón de GAPDH (350 pb). El análisis densitométrico ajustado al gen constitutivo se muestra en la **figura 25C** en donde el nivel de mRNA se representa como porcentaje (%). Como puede observarse, el nivel del mRNA de EhPRL es claramente sobreexpresado en amibas provenientes de absceso hepático; dicha sobreexpresión es de al menos dos veces con respecto al nivel de expresión observado en amibas crecidas en un ambiente libre de estrés, es decir, axénicamente. Estos datos sugieren que el mensajero de EhPRL también es regulado positivamente durante el desarrollo del absceso hepático amebiano.

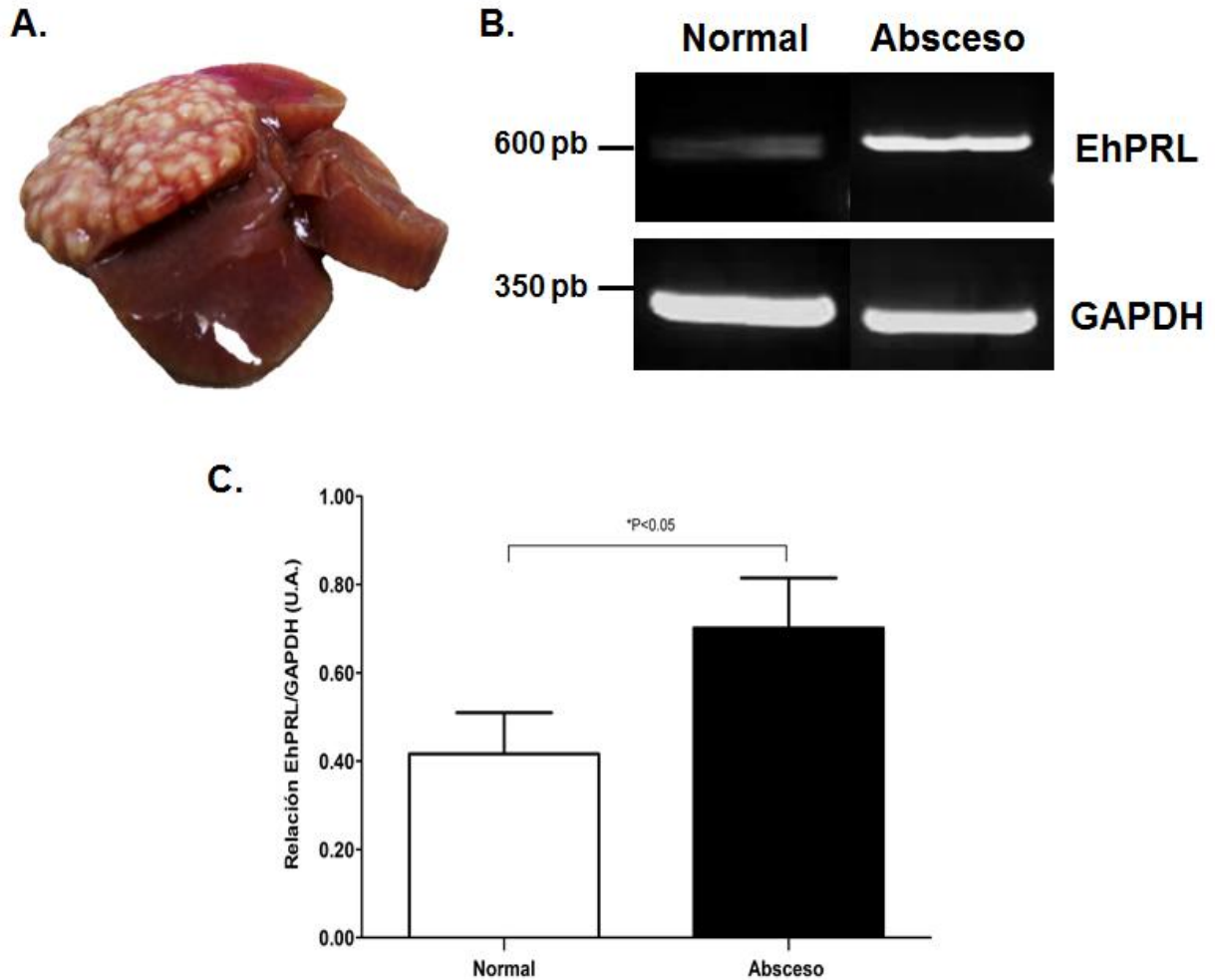


Figura 25. El mRNA de EhPRL es sobreexpresado en trofozoítos recuperados de absceso hepático. **A.** Imagen representativa de un absceso desarrollado por *E. histolytica* (AHA). **B.** Gel de agarosa que muestra los amplicones correspondientes para EhPRL y GAPDH, de muestras de trofozoítos axénicos y recuperados de AHA. **C.** Análisis densitométrico del producto de RT-PCR donde se muestra aumento en expresión de al menos el doble del mRNA de EhPRL en trofozoítos recuperados de AHA, en comparación con trofozoítos axénicos. Las imágenes y el análisis densitométrico se procesaron con el sistema de documentación SynGene™ (SynGene, Synoptics group). Las barras indican el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes, el análisis estadístico se realizó con el programa Graph Pad Prism versión 5.1.

Posteriormente, habiendo observado una regulación positiva del mRNA de EhPRL de trofozoítos recuperados de lesión hepática, se evaluó el comportamiento de dicho mensajero en trofozoítos recuperados de absceso hepático en respuesta a la interacción con FN o COL (**Figura 26**). Un ensayo de RT-PCR se llevó a cabo con amibas recuperadas de lesión hepática, las cuales se interactuaron también con FN o COL; dicha interacción se realizó en las mismas condiciones que con amibas de cultivo. En estos experimentos no se observó una significancia estadística para la modulación del mRNA de EhPRL en amibas recuperadas de lesión sin interacción e interaccionadas con FN (**Figura 26**).

Interesantemente, en aquellas amibas recuperadas de AHA e interactuadas con COL observamos un comportamiento inverso a lo observado en amibas de cultivo interactuadas con COL (**Figura 24B**). En el ensayo de interacción con COL, la modulación en la expresión del mensajero de EhPRL fue en el sentido inverso ya que se encontró una disminución estadísticamente significativa en la interacción con COL a partir de 30 min (* $p < 0.05$) y hasta los 120 min del ensayo (** $p < 0.001$). Estos resultados sugieren que el mensajero de EhPRL es regulado de una forma finita y específica en respuesta al sustrato (FN o COL) y ambiente de interacción (condiciones de cultivo o estrés en el desarrollo *in vivo*, de AHA) y que COL es un elemento del huésped, modulador del mRNA de EhPRL.

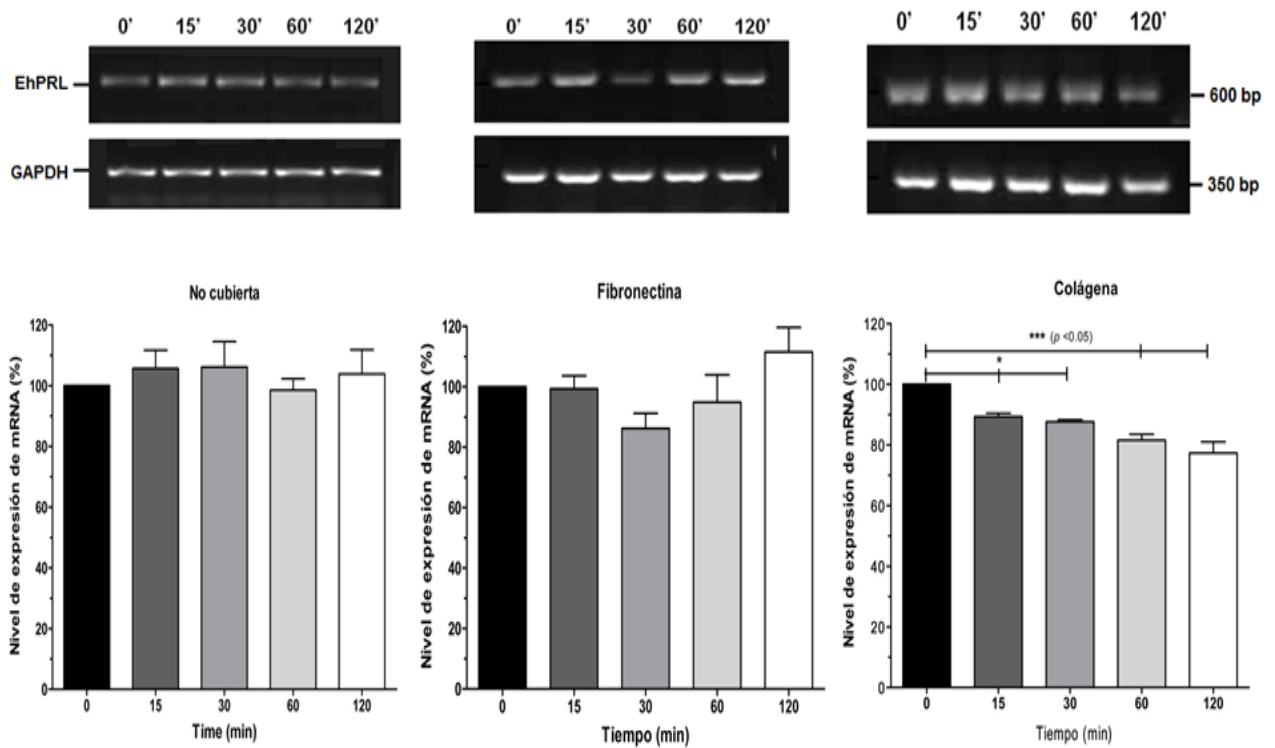


Figura 26. Modulación del mRNA en trofozoítos recuperadas de AHA interactuados con componentes de MEC. El nivel de expresión del mensajero de EhPRL se evaluó en las mismas condiciones como las mencionadas en las figuras 23 y 24, excepto que las amibas interaccionadas fueron aquéllas recuperadas de lesión hepática tal como se indica en la figura 25. El análisis densitométrico se muestra debajo de cada imagen de gel. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes los cuales fueron normalizados al tiempo cero y se representan como porcentaje (%) del nivel de expresión de mRNA. Se obtuvo una significancia estadística de la interacción de trofozoítos con COL entre el tiempo cero y 120 min (***) y entre tiempo cero y 15 ó 30 min (* $p < 0.05$).

VI.8 Sobre expresión de la proteína EhPRL de *Entamoeba histolytica*

Para evaluar de una manera más precisa el papel de EhPRL en la biología de *Entamoeba histolytica*, se sobreexpresó la proteína en trofozoítos de cultivo. La sobreexpresión de la proteína se consiguió con el uso de un vector que permitió el control preciso de expresión del gen de interés. El sistema para la transformación estable seleccionado fue el vector de expresión amebiano pNEO-CAT, el cual permite la expresión continua de genes heterólogos en el parásito; el vector pNEO-CAT contiene el gen neomicina fosfotransferasa (NEO) como un marcador de selección para la transfección del parásito. En este vector se clonó el marco de lectura completo de EhPRL, adicional a una etiqueta de tipo HSV para inmunodetección (**Figura 14**), la cual se insertó en: (i) la región amino terminal de EhPRL y (ii) la región carboxilo terminal de EhPRL. El interés por clonar la etiqueta HSV en la región N o C-terminal de EhPRL fue el de evaluar cómo dicha etiqueta podía o no intervenir en la prenilación de la proteína, en la región C-terminal.

El primer paso para la sobreexpresión de EhPRL fue el diseño de los oligonucleótidos que permitieran la inserción de la etiqueta HSV en N o C-terminal (**Tabla 3**). Con dichos oligonucleótidos y a partir de RNA total de *E. histolytica*, se amplificó el mensajero del gen ehPRL. El amplicón de las construcciones C-HSV::EhPRL y N-HSV::EhPRL (cada una con un peso molecular de 639 pb, respectivamente), se clonó en el vector de clonación PCR 4-TOPO (construcciones denominadas TOPO-C-HSV::EhPRL y TOPO-N-HSV::EhPRL). Tras la clonación, las construcciones TOPO-C-HSV::EhPRL y TOPO-N-HSV::EhPRL se secuenciaron para corroborar la secuencia de nucleótidos del producto clonado; además se verificó la clonación correcta de la etiqueta HSV-tag, del marco de lectura completo de EhPRL y de los sitios respectivos de restricción para KpnI y BamHI (**Figura 27**). Además se realizó un alineamiento entre la secuencia de aminoácidos de EhPRL deducida de la secuenciación de nucleótidos del producto de PCR clonado y la secuencia reportada para la proteína en el banco de datos de genes, No. de acceso XP_657240. El BLAST no mostró cambios en la secuencia deducida.

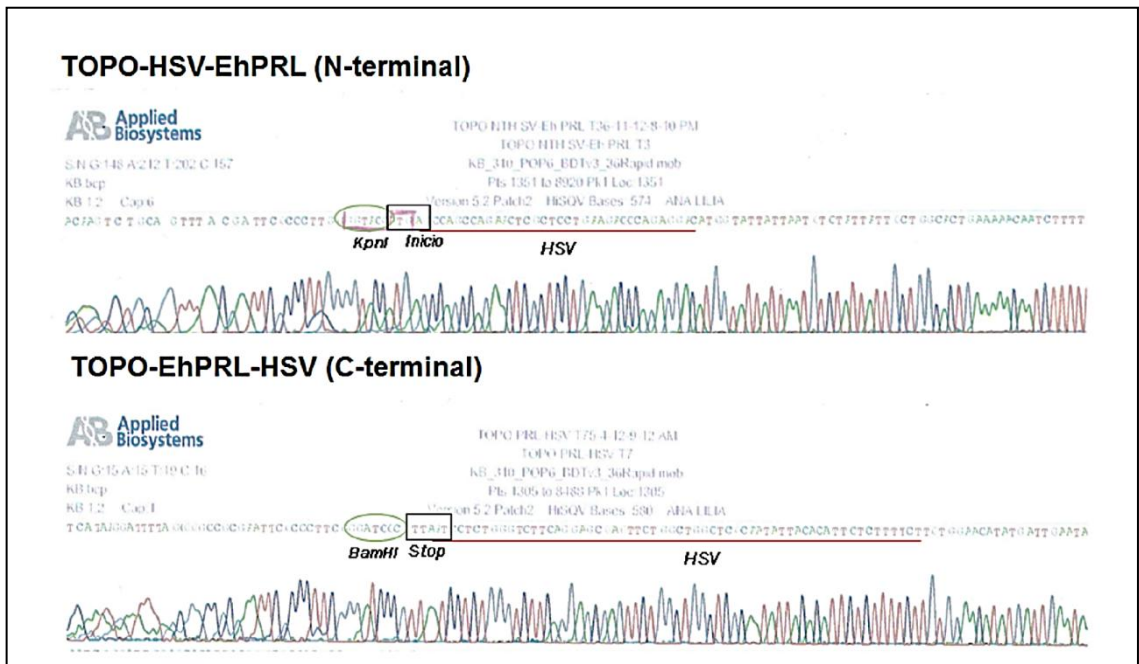


Figura 27. Secuenciación de las construcciones TOPO-C-HSV::EhPRL, TOPO-N-HSV::EhPRL. Se muestran los sitios de restricción para BamHI y KpnI y la secuencia codificante para la etiqueta HSV.

Posteriormente, se realizó la subclonación dirigida de los fragmentos de interés por restricción con las enzimas BamHI y KpnI, en el vector pNEO-CAT el cual tiene un peso molecular de ~6.3 kb. Las construcciones se denominaron pNEO-C-HSV::EhPRL y pNEO-N-HSV::EhPRL y tienen cada una un peso molecular de ~6.8 kb. Con el fin de identificar las clonas positivas, se purificó DNA plasmídico de las colonias crecidas en las placas de cultivo LB/amp y se trató con las enzimas KpnI y BamHI para liberar el producto clonado. En la **figura 28** se muestra la liberación de los insertos de una clona positiva tanto para pNEO-C-HSV::EhPRL (**A**) como para pNEO-N-HSV::EhPRL (**B**), en cuyos casos el tamaño de los fragmentos liberados (~639 pb) y del vector vacío (pNEO ~6.1 kb), corresponden con los tamaños esperados.

Al mismo tiempo en que se realizaron las construcciones, con el fin de establecer la concentración del antibiótico G418, requerida para inducir la muerte de aquellos trofozoítos que no incorporaran la resistencia por la transfección de construcciones en el vector pNEO, se realizó una curva de crecimiento de amibas sin transfectar, las cuales se cultivaron durante 24 h con concentraciones crecientes de G418. Como se muestra en la **figura 29**, la concentración mínima letal de G418, requerida para matar en 24 h, al 100% de amibas que no incorporan el vector con el cassette de resistencia es de 5 µg/ml.

Durante la selección de las clonas de interés se estableció que las concentraciones óptimas de cultivo en presencia de G418, al momento del ensayo fueron las de 10 y 20 µg/ml (**Figura 30**), las cuales permitieron inducir la sobreexpresión de EhPRL y al menos mantener el número inicial de células. En la **figura 30** se muestra una curva de crecimiento de trofozoítos seleccionados con G418 y cultivados durante 72 h con 5, 10, 20 ó 40 µg/ml de G418. Los resultados muestran que utilizando 20 µg/ml del antibiótico aún se recuperaban amibas resistentes, por lo que para los posteriores experimentos se utilizaron 20 µg/ml de G418 pero la incubación se realizó únicamente durante 48 h. Los trofozoítos seleccionados se mantuvieron en cultivo con concentraciones superiores y crecientes del antibiótico para su adaptabilidad; hasta el momento de la presente redacción, dichas clonas positivas son capaces de crecer en presencia de 60 µg/ml del antibiótico G418 (dato no mostrado). Interesantemente, también observamos

que después de las 72 h de cultivo, el conteo de trofozoítos transfectados con pNEO-N-HSV::EhPRL fue mayor en comparación con el número de células obtenidas tanto para el vector vacío como para pNEO-C-HSV::EhPRL. Partiendo de que el ensayo se inició con un total de 100,000 células por construcción y todas se sometieron al mismo tiempo y temperatura de incubación, de la **figura 30**, también podría especularse que la transfección con pNEO-N-HSV::EhPRL favoreció la replicación celular.

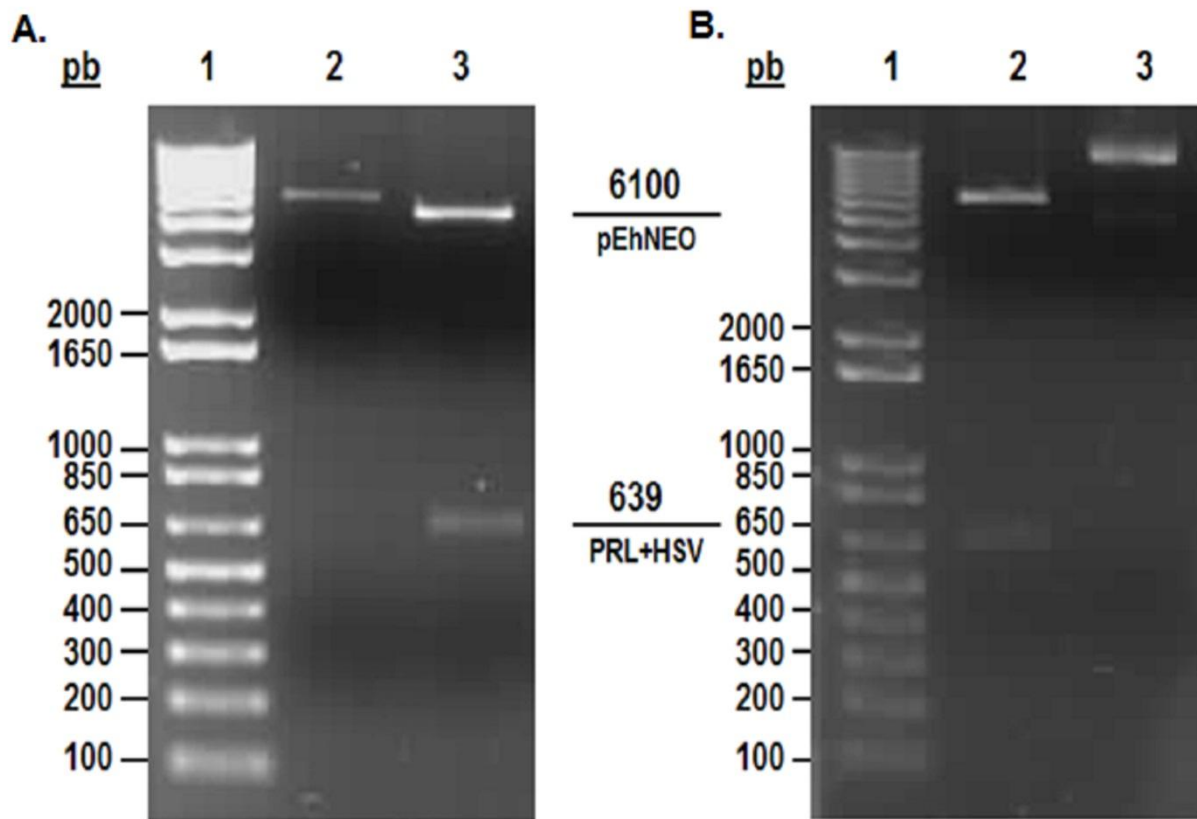


Figura 28. Liberación del inserto pNEO-N-HSV::EhPRL y pNEO-C-HSV::EhPRL de clonas positivas. **A.** Construcción pNEO-N-HSV::EhPRL; el carril 2 corresponde al plásmido purificado, linearizado por la digestión con KpnI; el carril 3 corresponde a HSV::EhPRL de 639 pb liberado por la digestión con BamHI y KpnI. **B.** pNEO-C-HSV::EhPRL; el carril 3 corresponde al plásmido purificado, linearizado por la digestión con KpnI y el carril 2 corresponde a HSV::EhPRL de 639 pb liberado por la digestión con BamHI y KpnI. En ambos casos, el carril 1 corresponde al marcador de pares de bases.

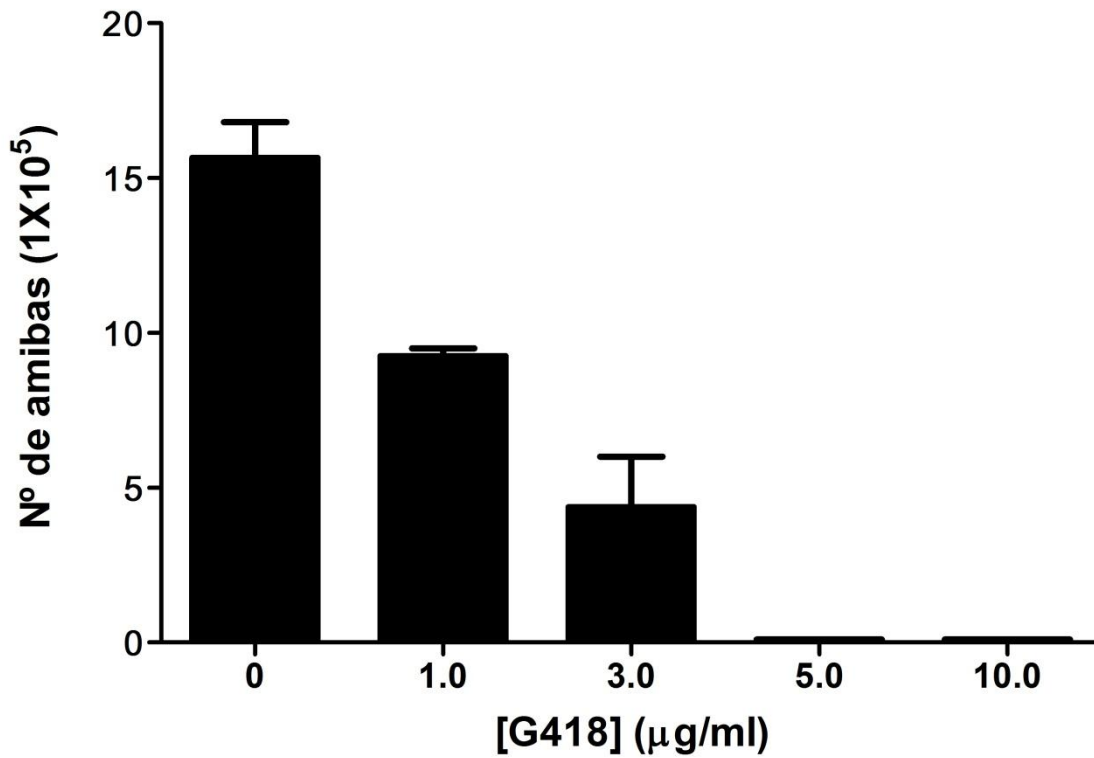


Figura 29. Curva dosis-respuesta de trofozoítos con G418. Un total de 100,000 trofozoítos no transfectados se cultivaron en presencia de diferentes concentraciones de G418 (0 a 10 µg/ml). Después de 24 h de cultivo, los trofozoítos se recuperaron y se resuspendieron en PBS para su cuantificación en cámara de Neubauer. La gráfica representa el promedio de dos ensayos independientes.

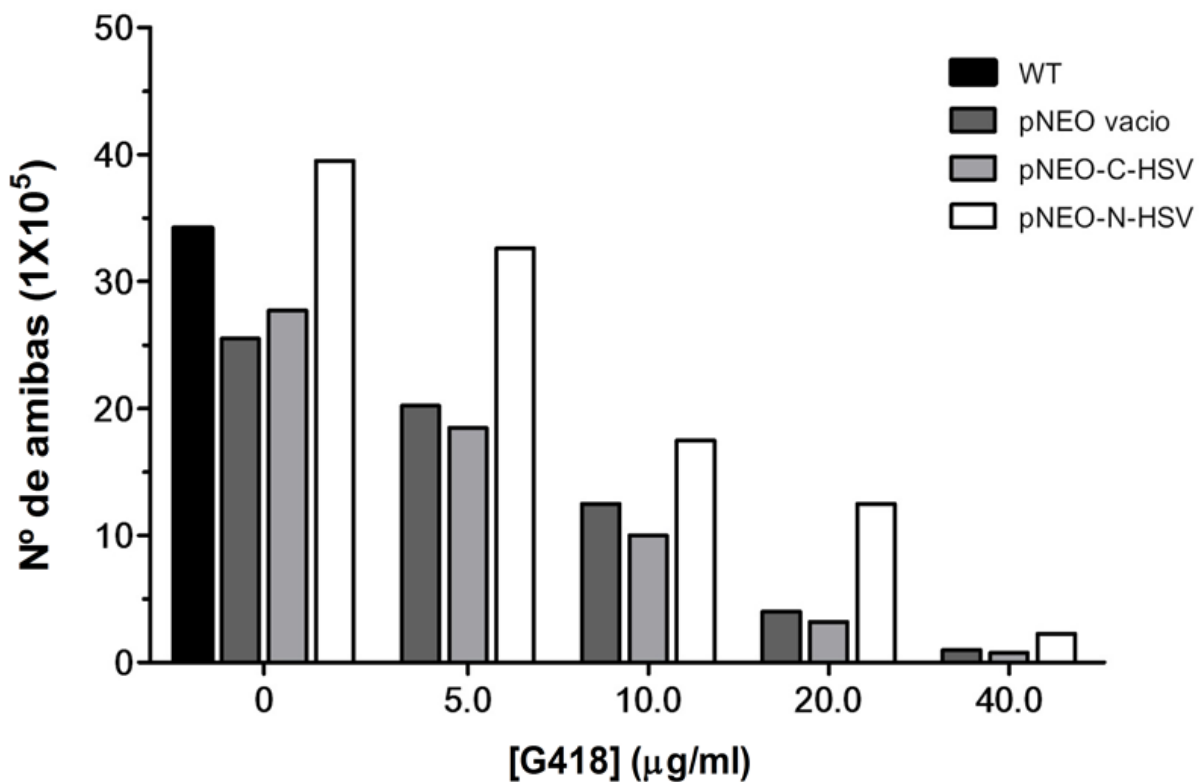


Figura 30. Efecto del G418 sobre el crecimiento de trofozoítos transfectados. Un total de 1×10^5 trofozoítos transfectados con pNEO-C-HSV, pNEO-N-HSV, vector vacío y trofozoítos no transfectados se cultivaron en presencia de diferentes concentraciones de G418 (0-40 µg/ml) durante 72 h y se cuantificaron mediante cámara de Neubauer.

VI.9 Las clonas positivas para pNEO-C-HSV::EhPRL y pNEO-N-HSV::EhPRL sobre expresan el mRNA y la proteína EhPRL

Una vez que se establecieron las condiciones de cultivo para las clonas de interés (tiempo de incubación y concentración de G418), se evaluó el nivel de expresión del mensajero y de la proteína correspondiente. Las clonas positivas del vector vacío, pNEO-C-HSV::EhPRL y pNEO-N-HSV::EhPRL se seleccionaron con 20 $\mu\text{g/ml}$ de G418 durante 48 h y se realizó un ensayo de RT-PCR (**Figura 31A y B**). Los resultados muestran que los trofozoítos transfectados con pNEO-N-HSV::EhPRL (**Figura 31A**) y pNEO-C-HSV::EhPRL (**Figura 31b**) expresan el mensajero en al menos 200%, en comparación con la expresión del mensajero de EhPRL de trofozoítos transfectados solo con el vector vacío, nivel considerado como 100% de expresión. El análisis densitométrico se realizó para cada réplica, ajustando la concentración a la del control interno GAPDH y las gráficas muestran el error estándar de dos experimentos independientes.

Posteriormente, para establecer si el mensajero sobreexpresado codificaba proteínas tipo EhPRL fusionadas a HSV, se evaluó el nivel de expresión de la proteína por la detección de la etiqueta por western blot con un anticuerpo anti-HSV (**Figura 31D**). Los extractos totales de proteína fueron obtenidos de trofozoítos transfectados y cultivados en las mismas condiciones que para la extracción de RNA total y el perfil proteico resuelto por SDS-PAGE al 12% se muestra en la **figura 31C**. El anticuerpo anti-HSV reconoció una proteína predominante de 35 kDa, en las construcciones N y C, la cual corresponde con el peso molecular predicho de 28 kDa de EhPRL más la etiqueta HSV. El anticuerpo anti-HSV únicamente reconoce a las clonas pNEO-C-HSV::EhPRL y pNEO-N-HSV::EhPRL que contienen dicha etiqueta y no reacciona de manera cruzada con otras proteínas en el extracto total de trofozoítos transfectados con el vector vacío.

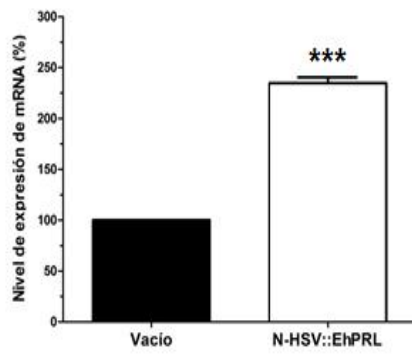
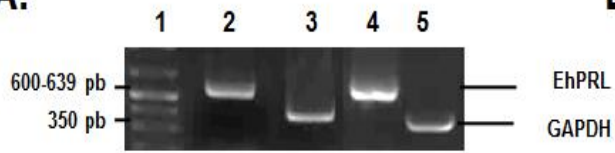
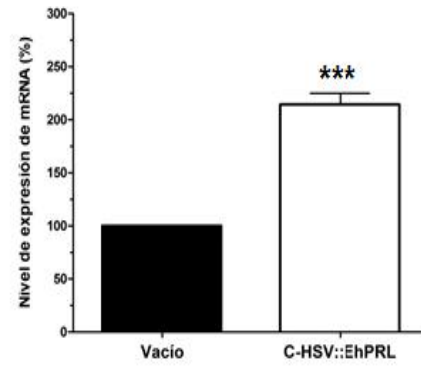
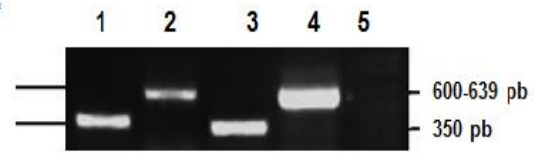
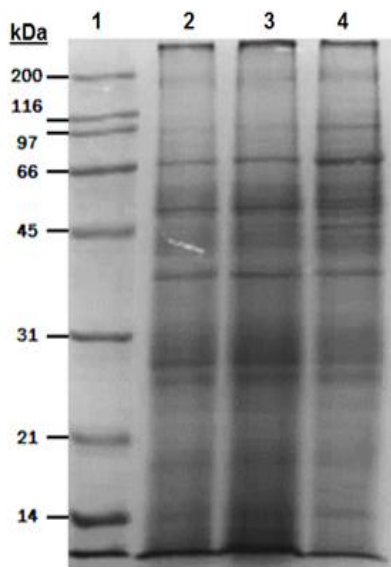
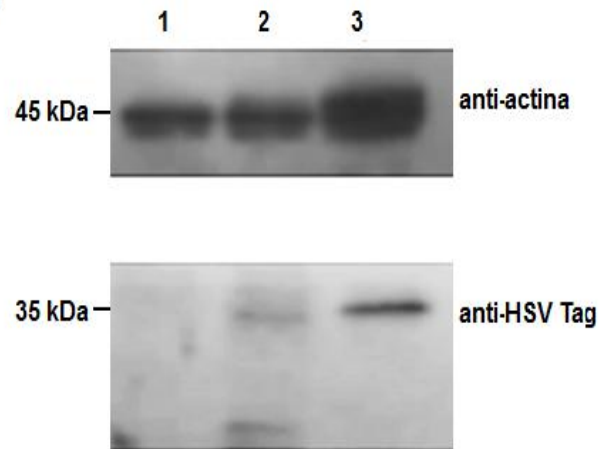
A.**B.****C.****D.**

Figura 31. Análisis de la expresión de EhPRL en trofozoítos transfectados. A y B. Ensayos de RT-PCR de trofozoítos transfectados con pNEO-N-HSV::EhPRL (**A**) o con pNEO-C-HSV::EhPRL (**B**). En **A**, la **línea 1** es el marcador de pb, **líneas 2 y 3** corresponden al vector vacío y **líneas 4 y 5** a pNEO-N-HSV::EhPRL. En **B**, las **líneas 1 y 2** corresponden al vector vacío, las **líneas 3 y 4** a pNEO-C-HSV::EhPRL y la **línea 5** es el marcador de pb. En ambos paneles, en la parte superior se muestran geles de agarosa representativos con el amplicón de EhPRL (600-639 pb) o GAPDH (350 pb); debajo se muestran las gráficas del análisis densitométrico. Las imágenes y el análisis densitométrico se procesaron con el sistema de documentación SynGene™ (SynGene, Synoptics group). Las barras indican el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes, el análisis estadístico se realizó con el programa Graph Pad Prism versión 5.1. (***) $P < 0.001$. **C.** SDS-PAGE al 12% de lisados totales de trofozoítos transfectados con el vector vacío (**línea 2**), con pNEO-C-HSV::EhPRL (**línea 3**) o pNEO-N-HSV::EhPRL (**línea 4**). La **línea 1** es el marcador de peso en kDa. **D.** Ensayos de Western blot de lisados totales de trofozoítos transfectados con el vector vacío (**línea 1**), con pNEO-C-HSV::EhPRL (**línea 2**) o pNEO-N-HSV::EhPRL (**línea 3**) reaccionados con el anticuerpo anti-actina (45 kDa) y anti-HSV tag (35 kDa).

VI.10 La sobreexpresión exógena de EhPRL incrementa la migración

Para evaluar la participación de la proteína EhPRL en la migración de *E. histolytica*, se realizaron ensayos en transwell para determinar el índice de quimiotaxis (CI, por sus siglas en inglés, chemotaxis index) utilizando como quimioatrayentes suero adulto bovino (SAB) o FN. Se permitió la migración de los trofozoítos durante 4 h; se capturaron fotografías en contraste de fase de las amibas que migraron a la cámara inferior y las mismas placas fueron fijadas para cuantificar la intensidad de fluorescencia emitida.

En la **figura 32** se muestran fotografías representativas tomadas de las placas de cultivo pos-migración (trofozoítos que migraron a la cámara inferior); dichas fotografías fueron tomadas en contraste de fase para cada clona de interés. Como control negativo o no quimiotrayente se colocó TBS-CaCl₂. Los resultados mostraron una mayor migración de células a la cámara inferior en presencia de SFB o FN, en comparación con aquellos trofozoítos incubados solo con TBS-CaCl₂, independientemente del plásmido transfectado. Al comparar la migración de los trofozoítos transfectados se observó que aquellos transfectados con pNEO-N-HSV::EhPRL muestran mayor número de células en la cámara inferior, tanto para SFB como FN en comparación con pNEO-C-HSV::EhPRL o el vector vacío.

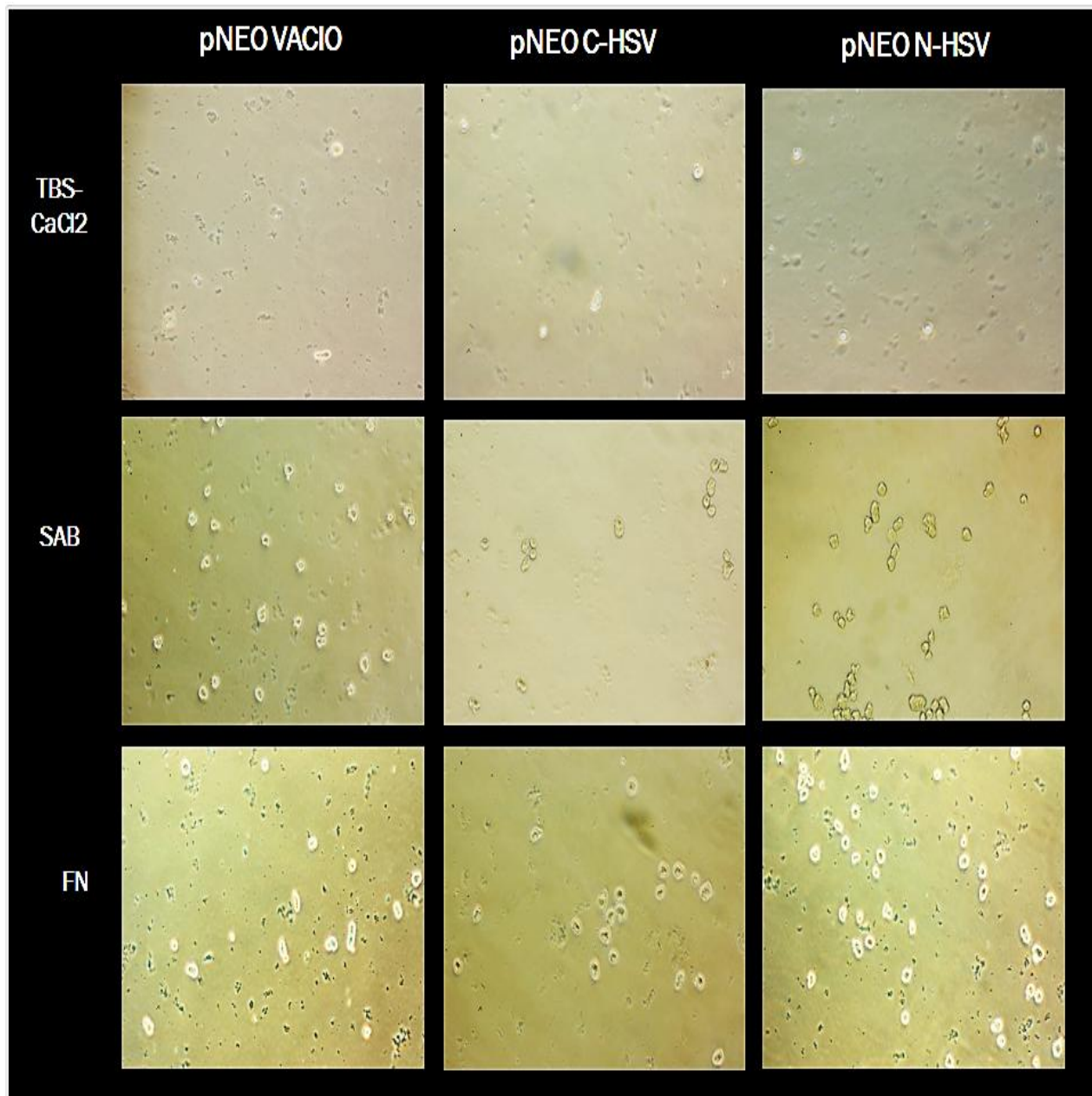


Figura 32. Migración de trofozoítos transfectados. Ensayos de migración en cámaras transwell, de trofozoítos transfectados con el vector vacío (pNEO vacío), pNEO-C-HSV::EhPRL o pNEO-N-HSV::EhPRL. Como quimioattractantes se utilizó suero adulto bóvido al 15% (SAB) o fibronectina (FN) y TBS-CaCl₂ se utilizó como control negativo. Se muestran fotografías representativas de la cámara inferior de transwell, con trofozoítos que migraron post-incubación. Las fotografías se tomaron con una cámara Nikon, en contraste de fases a 10X en un microscopio invertido CarlZeis.

Para la determinación cuantitativa de la fluorescencia emitida por los trofozoítos que migraran a la cámara inferior trofozoítos en cultivo fueron marcados con Cell-tracker Green. La intensidad de fluorescencia (unidades de fluorescencia) emitida por los trofozoítos que migraron se extrapoló en una curva de fluorescencia obtenida con $0-1 \times 10^5$ amibas marcadas. La intensidad de fluorescencia en la cámara inferior es proporcional al número de trofozoítos que migraron. Posteriormente se determinó la actividad quimiotáctica (CI, por sus siglas en inglés, chemotaxis index) de los trofozoitoitos transfectados (**Figuras 33 y 34**), la cual corresponde al cociente de dividir el porcentaje de migración quimiotáctica y el porcentaje de migración al azar, tanto en presencia de SFB (**Figura 33**) como en presencia de FN (**Figura 34**).

Como resultado, se determinó que en presencia de SFB (**Figura 33**), los trofozoítos transfectados con pNEO-N-HSV::EhPRL migraron en mayor proporción que aquéllos transfectados con pNEO-C-HSV::EhPRL o con el vector vacío. Únicamente los trofozoítos transfectados con pNEO-N-HSV::EhPRL exhibieron un índice de quimiotaxis estadísticamente significativo ($*p < 0.05$), en comparación con los trofozoítos transfectados con el vector vacío. Esto es, en presencia de SFB, la sobreexpresión de pNEO-N-HSV::EhPRL provocó que los trofozoítos migraran una unidad de índice más que aquéllos transfectados con el vector vacío siendo el CI del vector vacío, 1.5 mientras que el CI para N-HSV::EhPRL resultó de 2.5 ($*p < 0.05$). Estos resultados sugieren fuertemente la participación de la proteína EhPRL en la migración de *E. histolytica*.

Por otro lado, los trofozoítos que sobreexpresaron a la proteína C-HSV::EhPRL migraron en la misma proporción que los trofozoítos transfectados con el vector vacío (no se observó una significancia estadística entre el CI de C-HSV::EhPRL y el vector vacío). Estos resultados sugieren que la disponibilidad de la caja CAAX de EhPRL, es relevante durante la migración, probablemente para la modificación postraduccional correcta y colocación posterior en membrana.

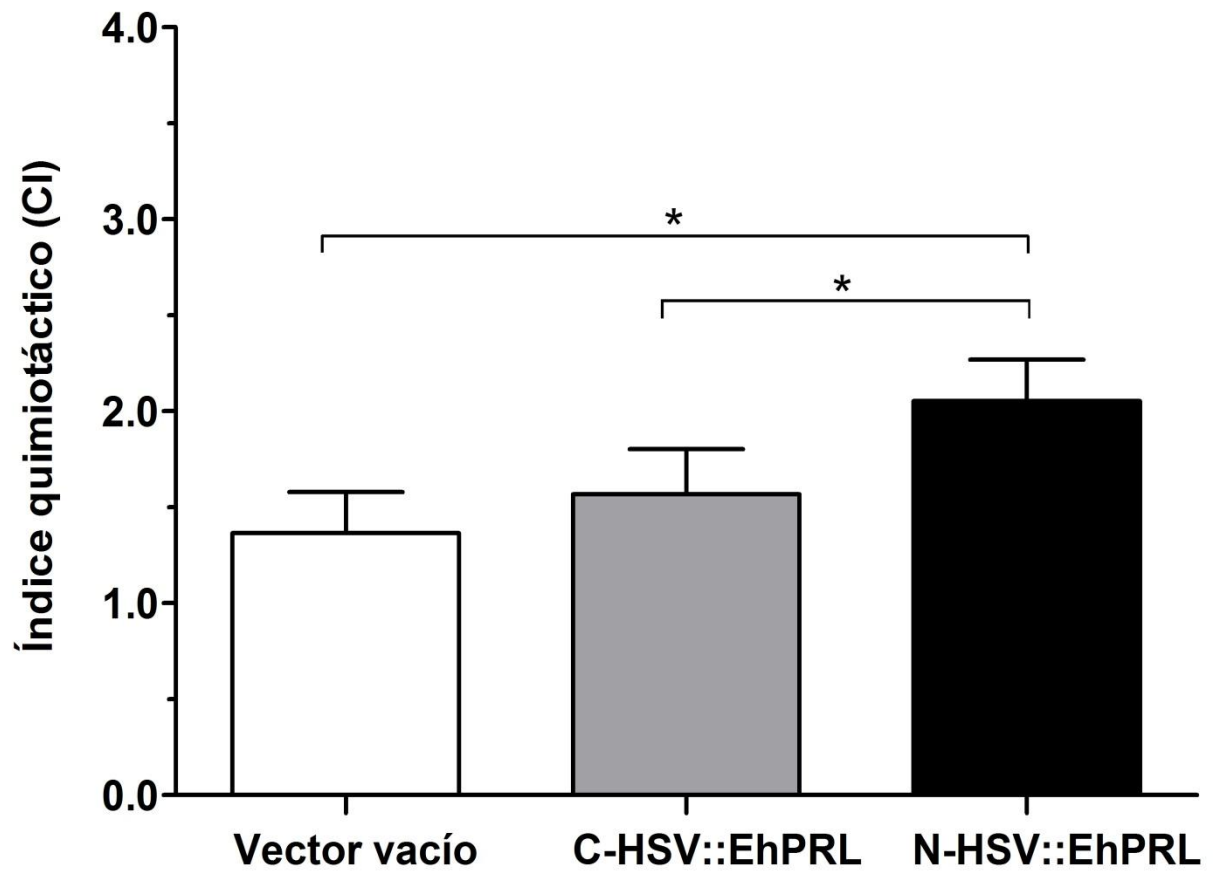


Figura 33. Migración celular en presencia de SAB. Un total de 1×10^5 trofozoítos transfectados, crecidos en $30 \mu\text{g/ml}$ de G418 y marcados con Cell Tracker Green se incubaron en cámaras transwell durante 4 h a 37°C . Se midió la fluorescencia de las amibas que migraron a la cámara inferior y se obtuvo el cociente del % de migración quimiotáctica sobre el % de migración al azar (CI). Los trofozoítos transfectados con el vector vacío o con pNEO-C-HSV::EhPRL migraron en la misma proporción, $\text{CI}=1.2-1.6$, no se obtuvo significancia estadística. Los trofozoítos transfectados con pNEO-N-HSV::EhPRL migraron en mayor proporción con respecto a trofozoítos control o pNEO-C-HSV::EhPRL (CI vector vacío= 1.5, CI para N-HSV= 2.5. (*) $p < 0.05$. El análisis estadístico fue por ANOVA en dos vías y la gráfica representa el resultado de 3 ensayos independientes

Para corroborar los resultados anteriores, también se realizaron los ensayos de migración en transwell en presencia de un quimioatrayente preferente para *E. histolytica*, como lo es FN (**Figura 34**). De los ensayos de migración en transwell en presencia de la FN se encontró que los trofozoítos transfectados con pNEO-N-HSV::EhPRL también resultaron con una actividad quimiotáctica (CI) significativa estadísticamente (** $p < 0.05$), en comparación con los trofozoítos transfectados con el vector vacío. Esto es, en presencia de FN, la sobreexpresión de N-HSV::EhPRL provocó que los trofozoítos migraran 2.5 unidades de índice de quimiotaxis más que aquéllos transfectados con el vector vacío, siendo el CI para los trofozoítos transfectados con el vector vacío de 1.5, mientras que el CI para N-HSV::EhPRL fue de 3.5, ** $p < 0.05$. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la proteína EhPRL participa en la migración de *E. histolytica*; que dicha participación es en respuesta al quimioatrayente, teniendo preferencia por al menos un componente de la MEC, que es FN.

Por otro lado, los trofozoítos que sobreexpresan C-HSV::EhPRL, en presencia de FN, resultaron con un índice de quimiotaxis (CI) como el observado para los trofozoítos transfectados con el vector vacío (**Figura 34**). Tal comportamiento fue como se observó en presencia de SFB, sugiriendo nuevamente que la disponibilidad de la caja CAAX de EhPRL, es relevante durante la migración, probablemente, para la modificación postraducciona l correcta y colocación posterior en membrana.

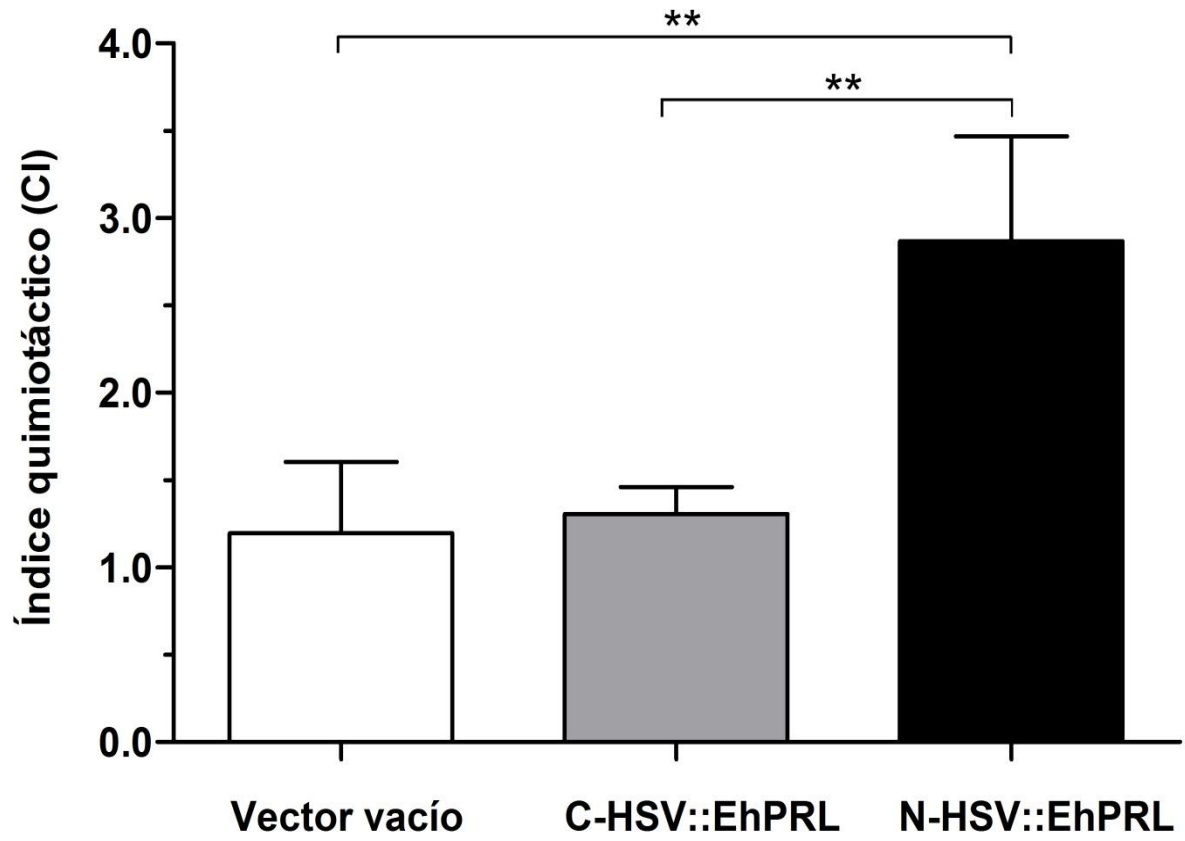
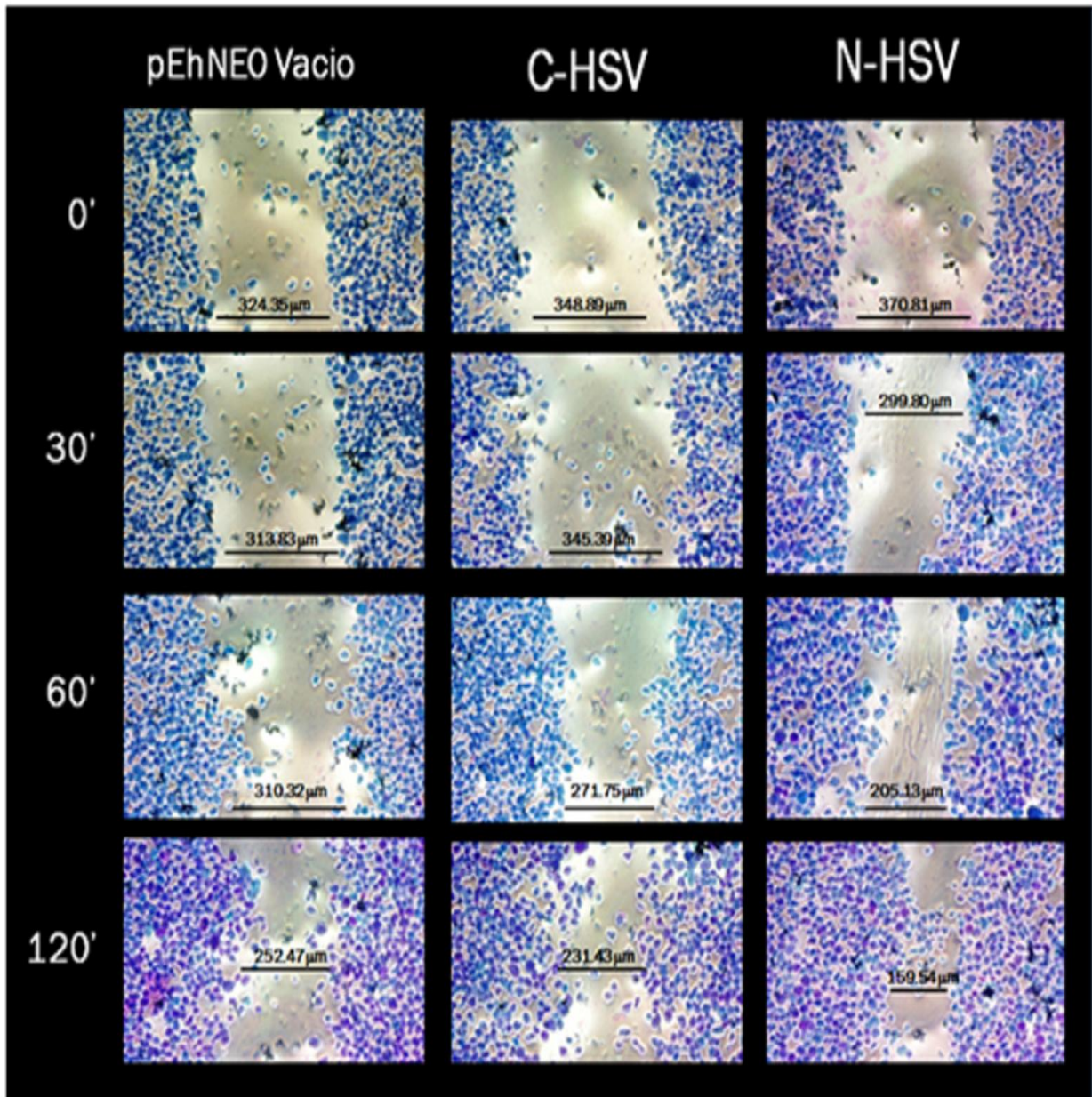


Figura 34. Migración celular en presencia de FN. Un total de 1×10^5 trofozoítos transfectados, crecidos en $30 \mu\text{g/ml}$ de G418 y marcados con Cell Tracker Green se incubaron en cámaras transwell durante 4 h a 37°C . Se midió la fluorescencia de las amibas que migraron a la cámara inferior y se obtuvo el cociente del % de migración quimiotáctica sobre el % de migración al azar (CI). Los trofozoítos transfectados con el vector vacío o con pNEO-C-HSV::EhPRL migraron en la misma proporción, $\text{CI}=0.8-1.6$, no se obtuvo significancia estadística. Los trofozoítos transfectados con pNEO-N-HSV::EhPRL migraron en mayor proporción con respecto a trofozoítos control o pNEO-C-HSV::EhPRL (CI vector vacío= 1.6, CI para N-HSV= 3.4. (**)) $p < 0.01$. El análisis estadístico fue por ANOVA en dos vías y la gráfica representa el resultado de 3 ensayos independientes.

Como una forma alternativa de evaluar la participación de EhPRL en la migración de *E. histolytica*, se realizaron ensayos de cierre de herida (**Figura 35**). Se muestran fotografías representativas del cierre de herida observado en el cultivo en placa, de trofozoítos que fueron crecidos en presencia de 30 μg de G418 y sometidos posteriormente a ayuno como se indica en material y métodos. El cierre de herida se evaluó a diferentes tiempos; se midió el ancho de la herida en distintos puntos a lo largo de la herida y la cifra indicada (**Figura 35, A**) corresponde al promedio, en micras. En la **figura 35, A**, se observa que, tras una incubación de 120 min, aquellos trofozoítos sobreexpresando N-HSV::EhPRL migraron hasta el punto en el que la herida se cerró en determinados sitios (ancho de la herida= 150 μM a 120 min en comparación con 370.81 μM al tiempo cero). Sin embargo, para los casos de trofozoítos sobreexpresando C-HSV::EhPRL o transfectados con el vector vacío, tras los mismos 120 min de incubación, no se alcanzó a cerrar la herida.

Esto es, tal como se observó en los ensayos en transwell, aquellos trofozoítos sobreexpresando N-HSV::EhPRL incubados en presencia de SFB, migraron más (proporcional a una menor amplitud de herida en $\mu\text{m}/\text{tiempo}$) que aquéllos sobreexpresando C-HSV::EhPRL o transfectados con el vector vacío, corroborando nuevamente la participación de EhPRL en la migración de *E. histolytica* y la relevancia de la disponibilidad bioquímica de la caja CAAX para que la proteína pueda participar en la migración del parásito.

A.



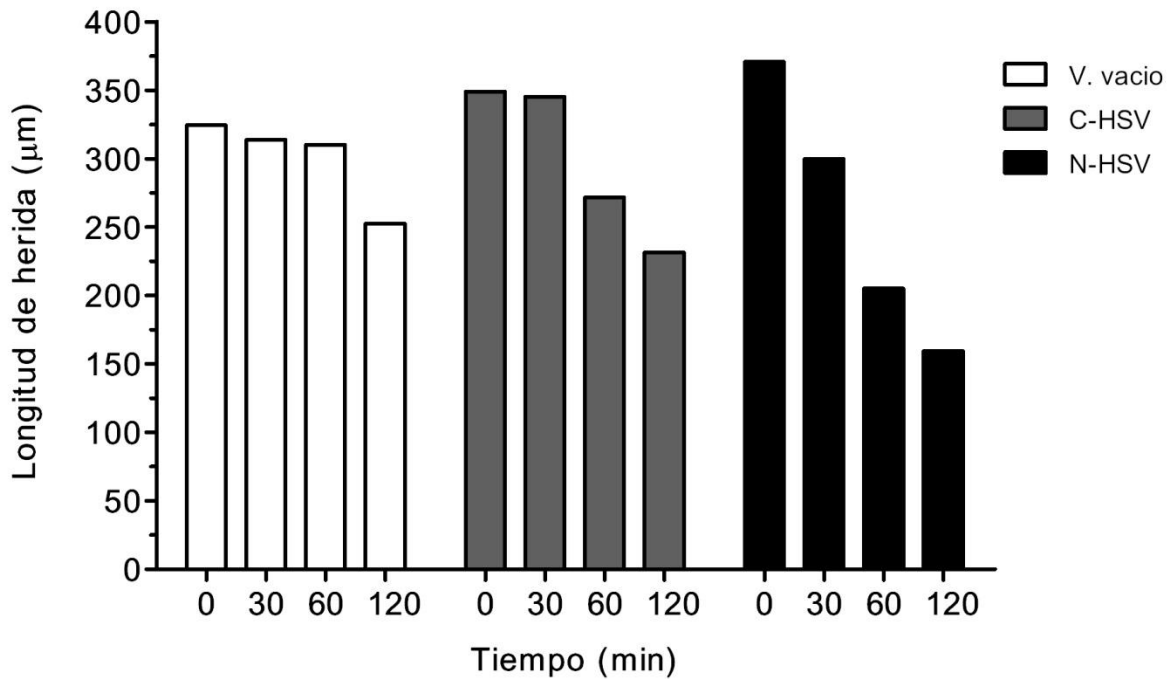


Figura 35. Ensayo de cierre de herida. Trofozoítos transfectados y cultivados sobre placas de 6 pozos en presencia de 30 $\mu\text{g/ml}$ de G418, se incubaron en ausencia de suero por 4 h. Se realizó una herida en el radio del pozo y se adicionó medio incompleto para permitir la migración durante 30, 60 y 120 min a 37°C. Posteriormente se fijaron las preparaciones por 1 h con *p*-formaldehído al 4% y las células se tiñeron con Giemsa. Se capturaron fotografías en campo claro **(A)**. Utilizando el programa NIS-Elements BR-3-2, se ajustó la escala de medición y se determinó el ancho de al menos 3 puntos a lo largo de la herida de fotografías representativas (graficado como ancho de herida en μm); se promedió el ancho de la herida y se graficó con respecto al tiempo de incubación **(B)**. Se muestra el resultado de una réplica realizada por duplicado.

VI.11 Localización celular de pNEO-N-HSV::EhPRL y pNEO-C-HSV::EhPRL

Adicionalmente, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para evaluar la localización de la proteína EhPRL en trofozoitos sobreexpresando a N-HSV::EhPRL o C-HSV::EhPRL (**Figura 36**). Las preparaciones se incubaron en presencia del anticuerpo anti-HSV para marcar la etiqueta presente en cada construcción.

En las preparaciones de amibas sobreexpresando N-HSV::EhPRL se observó un patrón de reconocimiento igual que el observado en amibas no transfectadas de la **figura 25**; es decir, la proteína N-HSV::EhPRL se localizó en membrana plasmática y de vesícula y en citoplasma (**Figura 36, pánel derecho**). La sobreexpresión de N-HSV::EhPRL no resultó en cambios en la localización subcelular de la proteína distintos de lo observado con la proteína nativa. Sin embargo, en aquellos trofozoítos que sobreexpresaban C-HSV::EhPRL la localización de la proteína en la membrana plasmática fue en menor proporción (**Figura 36, pánel central**); además, en trofozoítos permeabilizados se localizó a la proteína C-HSV::EhPRL agrupada en estructuras parecidas a cometas, con apariencia no relacionada a vesículas, sugiriendo que la presencia de una proteína interferida estructuralmente en C-terminal, EhPRL podría agruparse en estructuras de almacenamiento o reciclaje. Se requiere realizar ensayos de colocalización con actina o con marcadores de vesícula para elucidar si dichas estructuras similares a cometas son agregados de actina o si corresponden a estructuras celulares diferentes a las reportadas para *E. histolytica*. En trofozoítos transfectados con el vector vacío, no se observó una detección de la etiqueta HSV por el anticuerpo anti-HSV (**Figura 37, pánel izquierdo**).

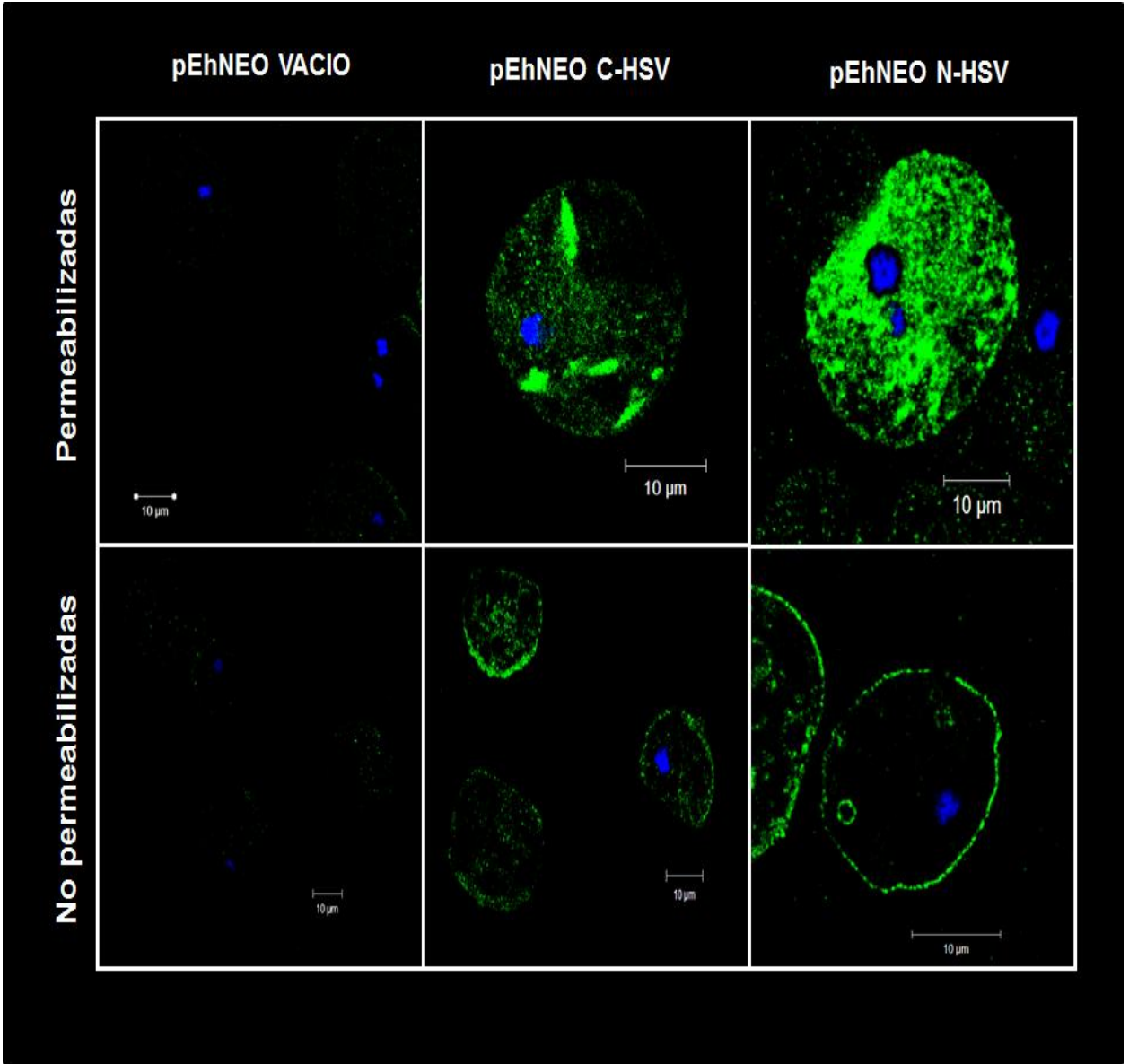


Figura 36. Localización celular de pNEO-N-HSV::EhPRL y pNEO-C-HSV::EhPRL. Trofozoítos crecidos en 30 $\mu\text{g/ml}$ de G418 se adhirieron y se fijaron a cubreobjetos. Los trofozoítos se permeabilizaron o no con p-formaldehído. Las preparaciones se incubaron con el primer anticuerpo anti-HSV y como segundo anticuerpo se utilizó anti-conejo acoplado a FITC. Los nucleos se contratiñeron con DAPI y todas las imágenes se tomaron en el microscopio confocal Carl Zeiss LSM 700. Como control negativo se incluyeron trofozoítos con vector vacío que no presentan epítotope para el reconocimiento por el anticuerpo anti-HSV.

Como resultado de las observaciones anteriores, se decidió realizar ensayos de fraccionamiento celular de trofozoítos transfectados con pNEO-N-HSV::EhPRL, pNEO-C-HSV::EhPRL o con el vector vacío a fin de confirmar la relocalización de la proteína EhPRL en ausencia de una caja CAAX disponible o con interferencia estructural en C-terminal (**Figura 37**). Como resultado de la inmunodetección de la proteína EhPRL con el anticuerpo anti-HSV, para el caso de trofozoítos que sobreexpresaban a N-HSV::EhPRL, la proteína se detectó tanto en fracción membranal como en fracción citoplasmática. Para el caso de trofozoítos sobreexpresando a C-HSV::EhPRL, la proteína se detectó prácticamente sólo en fracción citoplasmática, mientras que en la fracción membranal la detección fue prácticamente nula. Como control de especificidad del anticuerpo primario (anti-HSV), se analizaron las fracciones membranales y citoplasmáticas de trofozoítos transfectados con el vector vacío, en cuyo caso no se observó reconocimiento alguno por el anticuerpo anti-HSV (**Figura 37**). Se muestra el resultado representativo de dos ensayos independientes realizados con diferentes alícuotas de un mismo fraccionamiento celular, por lo que aún se requiere la confirmación de dicha observación a partir de fracciones celulares independientes. Juntos, los resultados anteriores confirman que la proteína EhPRL se localiza tanto en membrana plasmática como en fracción citoplasmática y sugieren fuertemente que la interferencia estructural de la región C-terminal de EhPRL, en donde se localiza la caja CAAX, resulta en un impedimento para que la proteína se localice predominantemente en membranas, provocando su acumulación en el citoplasma.

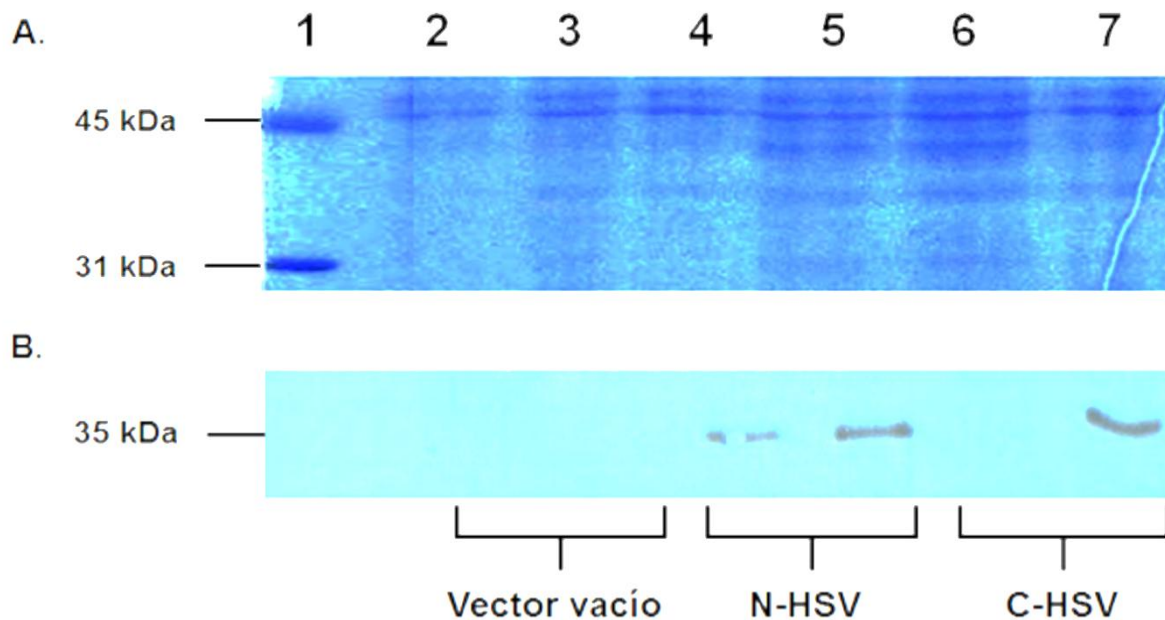


Figura 37. Fraccionamiento celular de trofozoítos transfectados con pNEO-C-HSV::EhPRL, pNEO-N-HSV::EhPRL o vector vacío. A. Gel SDS-PAGE al 12% con 50 μ g de proteína del vector vacío (líneas 2 y 3), pNEO-N-HSV::EhPRL (líneas 4 y 5) o pNEO-C-HSV::EhPRL (líneas 6 y 7). La línea 1 corresponde al marcador de peso molecular, líneas 2, 4 y 6 corresponden a la fracción membranal de trofozoítos y los carriles 3, 5 y 7 a la fracción citoplasmática de cada clona. **B.** Ensayo de Western blot de fracción membranal (líneas 2, 4 y 6) y fracción citoplasmática (líneas 3, 5 y 7) de trofozoítos transfectados con el vector vacío (líneas 2 y 3), pNEO-N-HSV::EhPRL (líneas 4 y 5) o pNEO-C-HSV::EhPRL (líneas 6 y 7), reaccionadas con el anticuerpo anti-HSV tag. Se muestra un resultado representativo de dos ensayos independientes.

VII. DISCUSIÓN

La familia de fosfatasas PRL en eucariotas superiores ha sido ampliamente descrita como una proteína tirosina fosfatasa (PTPasas) que conducen al desarrollo de cáncer; las proteínas PRL promueven la proliferación celular, la migración, la invasión, el crecimiento tumoral y la metástasis [28]. Tras la publicación de la secuencia completa del genoma de diversos parásitos protozoarios, se ha resaltado la participación de las PTPasas en la interacción huésped-parásito y en la patogenicidad [45]. A partir de la publicación del genoma de *E. histolytica* [47] se inició la búsqueda *in silico* de genes putativos de PTPasas; se reportó la presencia de un sólo gen putativo para una fosfatasa de la familia PRL, en el parásito protozoario *E. histolytica* (EhPRL) [48], en comparación con las 3 PRLs en humano.

EhPRL tiene una homología de 31-32% con las PRLs de humano que incluye los motivos catalíticos típicos de la familia de PTPasas, como los el asa P y el asa WPD, los cuales están involucrados en la actividad catalítica sugiriendo una especificidad similar hacia el sustrato. Entre las características particulares de la familia de PRLs se distinguen el motivo de prenilación CAAX localizado en la región C-terminal el cual está presente en EhPRL (CNIA) (**Figura 17**). La prenilación de PRLs en esta caja CAAX, se asocia con la localización de la proteína en la membrana y en compartimentos endosomales tempranos [34]. En el parásito *Trypanosoma cruzi*, se reportó que TcPRL1 es prenilada *in vivo*, por extractos de epimastigotes; se sugiere que la prenilación de la proteína favorece la localización de TcPRL1 en la vía endocítica de estadios específicos del parásito [51]. En *E. histolytica* se reportó la presencia de al menos una proteína farnesiltransferasa (EhFT) y una proteína geranil geranil transferasa (EhGGT) activas, que catalizan la inserción de isoprenoides en proteínas Ras, Rho o Rac, con dominio CAAX [70, 71]. La enzima EhGGT puede modificar de forma promiscua proteínas en donde CAAX es CVLS o CVLL (Ras), o modificar proteínas Ras, Rho/Rac cuando X de CAAX es P, K, M, A [71]. Cuando la proteína Ras (EhRas4) presenta un dominio CAAX tal como CVVA, la proteína es modificada postraduccionalmente por inserción isoprenoide por la enzima EhFT, pero si este motivo es cambiado por la secuencia CVLL, dicha proteína no se modificada, lo que

indica que EhFT tiene sustratos específicos [70]. La secuencia CAAX en EhPRL es CNIA, por lo que se sugiere que dicha proteína podría ser geranilada por la enzima EhGGT.

Las PRL son fosfatasa basadas en cisteína, presentan un residuo de cisteína nucleofílico dentro de un motivo conservado (**Figura 17A**). Estudios sobre la activación/inactivación de fosfatasa basadas en cisteína han identificado al menos dos vías de inactivación: 1) la formación de un puente disulfuro entre la cisteína catalítica Cys¹⁰⁴ y la Cys⁴⁹ (numeración para PRL3), que resulta en una enzima oxidada e inactiva; y 2) la inactivación por la conversión de la cisteína catalítica Cys¹⁰⁴ a glicina [72]. En este sentido, la Cys⁸¹ de EhPRL puede ser el equivalente de la Cys⁴⁹ de PRL3, sugiriendo que la actividad enzimática de EhPRL podría también, ser regulada por la oxidación reversible de la cisteína catalítica.

En este trabajo se reporta por primera vez la clonación, expresión y purificación de la proteína recombinante EhPRL. La secuencia de ácidos nucleicos obtenida (ID: KM456050) codificó para una proteína EhPRL (ID: AIY30229) la cual presentó un cambio del amino ácido glutamato (E⁷¹) con respecto a la secuencia reportada en el GenBank (XP_657240), la cual presenta el residuo de lisina (K⁷¹), sin embargo dicha modificación no se localiza dentro de ningún motivo involucrado en la actividad catalítica (**Figura 17C**).

Durante la purificación de la proteína recombinante His::EhPRL (rEhPRL) nos enfrentamos a la baja purificación de la proteína y a la formación de cuerpos de inclusión por lo que se probaron varios protocolos, con variaciones en temperaturas y tiempo de inducción y teniendo en consideración evitar el uso de agentes caotrópicos desnaturizantes. El método óptimo fue induciendo la producción de la proteína a 32°C durante 1.5 h y realizando la lisis celular con tritón X-100 y NP40 en condiciones no desnaturizantes. La proteína eluida se dializó inmediatamente para evitar la formación de enlaces disulfuro intramoleculares favorecida por el Ni²⁺ incorporado durante la purificación y evitar así, mecanismos de oxidación/inactivación.

Los anticuerpos policlonales (anti-rEhPRL) obtenidos en este trabajo con la proteína recombinante reconocen por WB tanto a la proteína recombinante como a la proteína nativa en un lisado total de células. La proteína nativa se expresa en bajos pero detectables niveles; interesantemente en algunos ensayos los anticuerpos reconocieron proteínas o complejos de proteínas en la parte superior de la membrana de nitrocelulosa, sugiriendo una posible oligomerización de EhPRL o una vinculación a lípidos o proteínas de alto peso molecular ya que los anticuerpos anti-rEHPRL podrían también reconocer epítomos no lineales. La oligomerización se ha reportado para PRL1 y PRL3 [61, 38], más no hay reportes de dicho evento en proteínas PRL de parásitos protozoarios.

Con el fin de determinar si EhPRL oligomeriza realizamos ensayos de entrecruzamiento con rEhPRL y glutaraldehído en geles nativos siguiendo un protocolo publicado [35]; pero bajo las condiciones ensayadas no se observó oligomerización (datos no mostrados); tampoco observamos bandas con pesos moleculares correspondientes a dímeros o trímeros de EhPRL en lisados totales de *E. histolytica*. La trimerización de PRL1 ya ha sido reportada [36], la interfase trimérica de PRL1 se da en los residuos Asp¹²⁸, Gln¹³¹, Arg¹³⁴, Gln¹³⁵ y Arg¹³⁸ de la primer molécula de PRL (C-terminal) con Glu¹¹, Thr¹³, Lys³⁹, Tyr⁴⁰, Pro⁹⁶ y Gly⁹⁷ de la segunda molécula. Dicha caracterización se realizó con la proteína PRL1 truncada en la región C-terminal que, tras la farnesilación *in vivo*, resultó en una oligomerización débil en comparación con la proteína completa. La trimerización y la localización a la membrana por la farnesilación parecen cooperar al proporcionar fuerzas adherentes fortalecidas para su localización y a la vez por el incremento de la concentración local de monómeros pero la sola farnesilación de la proteína es insuficiente para ubicarla en la membrana [36]. Es necesaria mayor experimentación para establecer si la ahora reportada EhPRL trimeriza o no y bajo que estímulos podría originarse una trimerización.

Por otra parte, hipotetizamos que el reconocimiento del anti-rEhPRL, en la región de alto peso molecular en membranas de nitrocelulosa con extracto total, podría ser por la unión de EhPRL a lípidos. Recientemente, se ha sugerido que el papel de PRL3 en la migración celular está relacionada con su capacidad para desfosforilar PI(4,5)P2 ó

PI(3,4,5)P3 en lugar de fosfopéptidos [73], por lo que la interacción de EhPRL con lípidos también requiere ser estudiada.

En el presente trabajo se reporta por primera vez la caracterización enzimática de la fosfatasa EhPRL. El rango de pHs reportados para la actividad enzimática de PRLs oscila entre 5.5 hasta 8.0 [72, 35]. Bajo nuestras condiciones de ensayo, el pH óptimo para rEhPRL es 6.0 lo que sugiere que ésta proteína podría funcionar *in vivo* en un ambiente ácido como en compartimentos vesiculares, apoyando nuestros hallazgos sobre la localización de EhPRL en vesículas. En humano, PRL1 se localiza en lisosomas tempranos y tardíos [34] y en *T. cruzi* TcPRL1 colocalizó con cruzipaina en la vía endocítica de epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes. Las PTPasas EhPTPA y EhPTPB, estudiadas por nuestro grupo de trabajo, también tienen un pH óptimo de actividad ácido (Pérez-Saldaña JA., y col. Por publicar). La fosfatasa de bajo peso molecular de *E. histolytica* (LMW) tiene un pH óptimo de 6.5 [74].

Para la caracterización enzimática de las PTPasas clásicas EhPTPA y EhPTPB y LMW de *E. histolytica*, el sustrato utilizado fue pNPP, el cual también ha sido el óptimo para el estudio de otras PTPasas [75]. Bajo las condiciones ensayadas, pNPP no fue hidrolizado por EhPRL. Se ha reportado que pNPP no es un sustrato para otras PRL ya que la actividad de PRL1 hacia este sustrato común para las PTPasa es menor que las PTPasa típicas [35]. Los datos estructurales y bioquímicos sugieren que el sitio activo de las PRLs no es óptimo para la hidrólisis de sustratos no específicos. La característica más notable que explica esto es que la hendidura catalítica de las PRLs es menos profunda, en comparación con las PTPasas clásicas; por ejemplo, PRL3 tiene una hendidura catalítica abierta con una superficie relativamente plana que expone el sitio catalítico [27]. Se ha sugerido que durante la catálisis la unión de moléculas pequeñas sustrato o sustratos no específicos no es suficiente para inducir un cambio conformacional en PRL para permitir el correcto posicionamiento del asa P, lo que podría explicar la preferencia de las PRLs, incluyendo a EhPRL, por sustratos de mayor tamaño como son los compuesto aril fosfatos de dos o más anillos tal como OMFP sobre pNPP [38].

Otra característica bioquímica de las PRLs, como EhPRL, que explica la reducción de la actividad de fosfatasa recae en la presencia de un residuo de alanina posterior al asa P (HCX5R), en lugar de los residuos Ser/Thr presente en las PTPasas clásicas, como EhPTPA y EhPTPB (**Figura 15A**). La ausencia de un grupo hidroxilo proporcionado por la Thr conservada, impide una formación correcta del enlace S-HO entre los residuos Thr y Cys del sitio catalítico, implicados en la hidrólisis de la fosfoenzima intermediaria; el grupo hidroxilo faltante para la actividad catalítica, derivado de dicha modificación, es proporcionado por el sustrato fisiológico [37]. Esta teoría fue corroborada por **McParland V., et al., en 2011**, quien reportó que la sustitución de Ala111 (del sitio catalítico) por Ser, resultó en una proteína PRL3 con actividad enzimática considerablemente mayor que la proteína no mutada, indicando que el ácido general requerido para la catálisis necesita ser proporcionado apropiadamente por otro residuo dentro de la proteína o por el propio sustrato. Así también, la mutante PRL1/R110S resulta en una variante con pérdida de función [35]. El remplazo de Arg110 por Ser no solo disminuyó el valor de K_m en comparación con la proteína WT, sino que también disminuyó el valor K_{cat}/K_m para la reacción con pNPP. Las mutantes PRL1/A111S y PRL1/A111S/V113T son variantes con ganancia de función que presentan valores de K_{cat}/K_m mayores que PRL1 WT [35]. Como se mencionó antes, la baja actividad enzimática también ha sido atribuida a la oligomerización de PRL que podría contribuir a un acceso limitado del sustrato al sitio activo de la enzima [61, 76].

En el análisis de la actividad enzimática de EhPRL, se encontró que el valor de K_m concuerda con los valores reportados para PRL3, la cual tiene una K_m de 34.4 μ M con OMFP como sustrato [37]. En otro estudio publicado, se reportan valores de K_m para PRL1 con pNPP, OMFP, DiFMUP o 2-Cl4-NO2 como sustratos, siendo superior ~2-3 órdenes de magnitud, la K_m con pNPP que con OMFP o DiFMUP; en dicho estudio también se reportan valores de k_{cat} , los cuales fueron similares para todos los sustratos aril fosfato, sin embargo los valores de pKa difieren notablemente, lo que sugiere que el paso determinante de la velocidad de reacción de PRL1 es durante la hidrólisis de la fosfoenzima intermediaria [38].

La actividad enzimática de EhPRL se inhibió potencialmente con Na_3VO_4 indicando que EhPRL tiene actividad de tirosina fosfatasa. Na_3VO_4 es un inhibidor competitivo, ya que es estructuralmente un análogo del grupo fosfato que mimetiza el estado de transición de la reacción de transferencia del grupo fosforil [77]. Se ha reportado el mecanismo de inhibición de vanadato unido a PRL3 en donde se sugiere que la unión del vanadato induce cambios estructurales en el asa WPD, el asa P, las hélices $\alpha 4$ - $\alpha 6$ y la región polibásica; dichos cambios conformacionales sugieren que el asa WPD se mueve de una conformación cerrada a una abierta y que dicha flexibilidad del asa puede estar relacionada con el índice catalítico de PRL3 y el reconocimiento del sustrato [78].

Por otra parte, que el H_2O_2 no inhibe a EhPRL sugiere que la actividad enzimática puede no ser regulada por la oxidación del residuo Cys⁸²; sin embargo, el efecto observado puede más bien deberse a la detección de la actividad en un tiempo post-oxidación/inhibición; es decir, en un estado no reducido de la proteína tal como recientemente ha sido sugerido [79]. **Yosuke Funato, et al., en el 2013** reportaron un análisis del curso de la reacción del estado oxidativo de PRLs en donde reveló que la oxidación de PRLs causada por el tratamiento con H_2O_2 , fue reversible y la gran mayoría de proteínas PRL retornó a un estado reducido a los 90 min después del tratamiento. Por lo tanto, en las condiciones ensayadas en el presente estudio, al momento de la lectura tras 2 h de inhibición, la proteína EhPRL ya habría retornado a un estado reducido. Para ampliar el estudio de inhibición por oxidación reversible de EhPRL, se deben realizar ensayos de inhibición a tiempos cortos y sin la adición de DTT ya que, si bien en el presente estudio no se adicionó DTT al amortiguador de reacción enzimática, al momento de la purificación de la enzima recombinante, se adicionó al amortiguador de elución, (5 mM de DTT) para evitar la formación de puentes disulfuro intramoleculares potencialmente promovido por el Ni^{2+} durante la cromatografía. Se requieren Investigaciones farmacológicas, para el desarrollo de inhibidores selectivos de PTPasas, ya que en el mercado existen pocos inhibidores específicos de PTPasas con fines terapéuticos.

Con respecto a la localización celular de EhPRL, al igual que otras PRL, ésta se localizó en el citoplasma, en la membrana plasmática y en estructuras similares a vesículas, en trofozoítos de *E. histolytica*. La localización de PRLs se ha asociado a varios factores: en primer lugar, su localización depende de la prenilación de la proteína en la caja CAAX. Esta es una modificación lipídica que implica la adición covalente de un isoprenoide tal como un grupo farnesil de 15 de carbonos o de un grupo geranilgeranilo de 20 átomos de carbono a la cisteína de la caja CAAX. La prenilación promueve las uniones a membrana aunque también desempeña un papel en interacciones proteína-proteína [31]. La delección o mutación en la caja CAAX provoca la localización de PRL1, únicamente en el citoplasma y el núcleo; además, la delección de la caja CAAX también compromete la habilidad de PRL1 para promover el crecimiento celular y la migración [35].

En segundo lugar, la localización en membranas se ve favorecida por la presencia de una secuencia conservada predominantemente básica en la región C-terminal. Se ha sugerido que esta secuencia básica puede estar involucrada en la dirección de la proteína a través de una interacción electrostática con las cabezas de fosfolípidos de la membrana, cargados negativamente [17, 35]. En este contexto, hipotetizamos que la localización de EhPRL en la membrana plasmática podría ser por una prenilación *in vivo* y además, dicha localización podría ser favorecida por la presencia de una región básica (¹⁷1KRSGAINVLQSRFIQSYVPQEK¹⁹³) en el C-terminal. Aún cuando no se observó una trimerización de EhPRL, otros mecanismos podrían favorecer su localización.

Entre los efectos adversos que acontecen, tras la fijación de preparaciones con, por ejemplo, formalina o *p*-formaldehído, está el enmascaramiento de epítomos antigénicos para el reconocimiento por anticuerpos en ensayos de IFI o inmunohistoquímica. Nosotros especulamos que algunos epítomos de EhPRL podrían ser enmascarados tras el proceso de fijación con *p*-formaldehído, favoreciendo la formación de enlaces entrecruzados entre epítomos de interés y proteínas no relacionadas, por los grupos formaldehído. Por esta razón, después de la etapa de fijación las preparaciones se trataron con un amortiguador de 0.1 M de Tris-HCl, pH 9.5 conteniendo 5 % de urea

calentada a 95°C como se describe en material y métodos. Epítopes de EhPRL son enmascarados cuando la proteína llega a la membrana plasmática ya que dichos epítopes fueron expuestos para el reconocimiento por anti-rEHPRL, tras el tratamiento con la solución de urea. El mecanismo de recuperación de antígeno parece implicar una re-naturalización de las proteínas fijadas a través de una serie de cambios conformacionales sufridos, incluyendo la posible ruptura (hidrólisis) de enlaces de entrecruzamiento inducidos por formalina; todo el proceso está impulsado por la energía térmica de la fuente de calor o por la fuerza alcalina del tratamiento [80]. La urea es un agente caotrópico útil para la solubilización y la desnaturalización de las proteínas, ha sido útil en la solubilización de complejos de proteínas a los cuales EhPRL podría estar unido; este resultado refuerza el reconocimiento del anticuerpo anti-rEHPRL, en la parte superior de la membrana en el WB del extracto total.

La adhesión a MEC y su subsecuente degradación facilita la invasión y es un paso crítico en la patogénesis de la amebiasis. Como una forma de evaluar la participación de EhPRL durante la patogénesis, decidimos evaluar la modulación del mensajero de EhPRL por RT-PCR, en respuesta a la interacción de trofozoítos con componentes de MEC como FN y COL. No se observó diferencia significativa en la expresión del mRNA tras la interacción con FN pero si en la interacción con COL lo que sugiere que la regulación es específica y que además la regulación de EhPRL podría ocurrir también a nivel traduccional. Como se sabe, no siempre es posible correlacionar el nivel de expresión del mRNA con el nivel de expresión de su proteína, en este sentido, la diferencia entre la expresión de proteína y el mRNA de PRL1, en líneas celulares de cáncer de pulmón, ha sido reportado por **Nakashima, M. y Lazo J.S., en el 2010**. Dicho grupo de trabajo muestra que en las líneas celulares ensayadas, los niveles de mRNA son más altos que los niveles de proteína, incluso en la línea de células de pulmón sano; sin embargo, la línea celular más patogénica A549 mostró mayor nivel de proteína que mRNA [81].

En el presente trabajo se evaluó por WB el nivel de EhPRL en trofozoítos incubados con FN, sin embargo ésta no fue reconocida por el antisuero anti-rEhPRL. Los ensayos de WB mostraron un reconocimiento en la parte superior de la membrana (datos no

mostrados), lo que fortalece la posibilidad de una permisible formación de complejos proteicos inducida por la interacción con componentes de MEC, lo que provocaría el enmascaramiento de epítopes lineales. La ausencia del reconocimiento de EhPRL en extractos totales por WB, se afrontó con la evaluación alternativa por IFI. Se observaron cambios en la organización del citoesqueleto de actina; en los sitios de contacto con la MEC se observó la formación de placas de adhesión y estructuras similares a lamelipodios, como se ha reportado [19]. Interesantemente, si se observó una modulación de EhPRL citoplasmática, durante el tiempo; la intensidad de la fluorescencia fue mayor a 60-120 min que a 15 min post interacción indicando la relevancia del anclaje constante de EhPRL a la membrana plasmática.

La adhesión de trofozoítos a FN ha sido ampliamente estudiada; se ha reportado que la adhesión de trofozoítos a FN es mediada por la proteína de 140 kDa, β 1-integrina y proteínas de unión a colágeno; además, se ha reportado que las proteínas FAK, Src, paxilina y vinculina también están implicadas en esta adhesión y reestructuración del citoesqueleto, similar a lo observado para mamíferos [82]. Por tal motivo, Es necesario un análisis exhaustivo de las redes de regulación y las vías de señalización río abajo de EhPRL en respuesta a la FN para vincular el comportamiento del mRNA y proteína.

Un mecanismo propuesto para que EhPRL promueva la migración celular en respuesta a FN, como ha sido mostrado en el presente trabajo, podría ser por la regulación fina de la activación o supresión de c-Fos mediada por la unión a receptores tipo integrina. Recientemente, **Hao Liu, et al., en el 2013**, reportaron que en células de cáncer de ovario, PRL3 suprime la expresión de la integrina α 2, pero no de su heterodímero obligatorio, β 1; además, suprime la expresión de paxilina por la supresión de c-Fos más no cJun o Sp1 [83]. En células LoVo, de cáncer de colon se ha reportado que PRL3 promueve la migración (en respuesta a medio suplementado con suero) e invasión (en presencia de matrigel) a través de la señalización β 1 integrina-ERK1/2-MMP2. En forma similar, utilizando técnicas de doble híbrido, se ha mostrado que PRL3 interactura con la integrina α 1, la cual actúa como proteína andamio para reclutar a PRL3 para la desfosforilación de la integrina β 1, aunque no se ha reportado una interacción directa entre PRL3 y la integrina β 1 [28]. Por tal motivo, bajo estímulos

apropiados, dependientes de la interacción con FN, EhPRL podría inducir la supresión de c-Fos y suprimir la expresión o activación de receptores tipo integrina ($\beta 1$ o $\beta 2$) promoviendo así la migración celular y la invasividad de trofozoítos tras la disminución de receptores que mantienen adherida a la célula al sustrato. EhPRL podría requerir de mecanismos de regulación muy finos que orquesten su función, en respuesta a FN o COL, de tal forma que se regule su participación en la migración en respuesta a FN, o en la degradación e invasión de MEC como respuesta a COL.

También se evaluó el comportamiento del mensajero de EhPRL en trofozoítos interaccionados con COL, por RT-PCR e inmunofluorescencia. Se observó una modulación positiva del mensajero con respecto al tiempo ya que el mRNA de EhPRL aumentó a los 30 min (* $p < 0.05$) y hasta los 90 min de interacción (** $p < 0.01$). La interacción de *E. histolytica* con COL ha sido estudiada pero los eventos de señalización no están completamente aclarados. La participación de EhPRL en estos eventos se describe por primera ocasión en el presente trabajo.

Dadas las observaciones obtenidas de la interacción de trofozoítos con FN y COL, podemos señalar que EhPRL podría estar involucrada en dos procesos relevantes para la patogenicidad. Por un lado, EhPRL podría participar en la migración inducida por unión del trofozoito a la FN, a través de la unión del receptor $\beta 1$ -integrina de *E. histolytica*, tal como se observó en los ensayos de migración en transwell. Y por otro lado, podría participar en la invasión a través de la degradación de componentes de MEC debido a la modulación del mRNA y proteína EhPRL.

A continuación se describe una posible secuencia de eventos biológicos desencadenados por la unión de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* a COL, en donde EhPRL podría estar involucrada. La modulación del mRNA de EhPRL y los cambios en la localización e intensidad de proteína, estudiados por IFI, sugieren el siguiente orden de eventos:

- I. Se ha reportado la participación del receptor tipo- $\beta 1$ integrina de *E. histolytica* en la adhesión a COL durante el proceso de invasión del tejido humano [84]; por lo tanto, la unión y activación del receptor tipo $\beta 1$ -integrina ($\beta 1$ -EhFNR) (y

probablemente también de proteínas de unión al colágeno de 30 kDa) son los primeros eventos desencadenados. **Mittal K., et al, en el 2008**, reportó que la interacción con galactosa, en un cultivo celular de trofozoítos, inhibe la adhesión del trofozoito a COL de una manera dosis dependiente mientras que la manosa no ejerce efecto significativo en la adhesión a FN, sugiriendo que la lectina Gal/GalNac puede servir como un receptor de COL. La subunidad pesada Hgl de la lectina Gal/GalNac presenta homología en la región C-terminal, con las integrinas $\beta 2$ y $\beta 7$ de mamíferos [85].

EhPRL colocaliza con la actina cortical la cual forma parte de estructuras que funcionan como organelos de transducción de señales durante la adhesión mediada por receptores y la locomoción celular de modo que, EhPRL podría unirse a proteínas agrupadas en las placas de adhesión, como el receptor $\beta 1$ -integrina o vinculina, y tras desfosforilación del o los sustratos naturales, activar las vías de señalización que culminan en la degradación de la MEC promoviendo la invasión.

- II. Tras la activación de receptores tipo $\beta 1$ -integrina, se forma un complejo de señalización multimolecular alrededor del receptor, similar a adhesiones focales de células de mamíferos. Las moléculas que forman este complejo son paxilina, pp125^{FAK}, vinculina y Src las cuales promueven la reestructuración del citoesqueleto de actina [82].

En *E. histolytica* se ha reportado que tras la activación de la vía de señalización mediada por STAT, río abajo de la fosforilación de Src y la fosforilación de pp125^{FAK}; o tras la activación de la vía de señalización mediada por STAT, río abajo de la activación de ERK1/2 por la activación de proteínas Ras, se conduce a una señalización membrana-núcleo que resulta en la sobre regulación de la expresión de c-Fos, lo que se ha asociado con un aumento agudo de la actividad de la proteína de unión a DNA, AP-1 [86].

- III. En mamíferos se ha reportado que el incremento en la transcripción del factor AP-1, a través de la activación de ERK1/2, induce la sobre regulación de

metaloproteasas de matriz como MMP2 y MMP9, lo que resulta en la liberación de proteasas que degradan la MEC. **Lirong P., et al., en 2009** demostró que PRL3 se asocia indirectamente con la integrina $\beta 1$, mientras que la integrina $\alpha 1$ actúa como un andamio para reclutar a PRL3 para la desfosforilación en tirosina de la integrina $\beta 1$. La sobreexpresión de PRL3 se correlaciona positivamente con la fosforilación de ERK1/2, que lleva a la sobre regulación de las metaloproteinasas de matriz MMP2 y MMP9 [87, 88].

- IV. La movilización y liberación de metaloproteasas derivadas de *E. histolytica* no ha sido reportada; sin embargo, sugerimos que como elemento de degradación en contraparte, el parásito protozoario puede movilizar y liberar proteínas con actividad colagenolítica mediante la movilización y liberación de gránulos electron densos (GED). Se ha reportado que, tras la interacción de los trofozoítos con COL, se promueve la movilización y liberación de estos GED que contienen factores importantes en la patogenicidad, tales como cisteína proteasas EhCP1 y EhCP2, entre otras proteínas citolíticas, involucradas en la degradación de la ECM [89, 90].

El mecanismo antes descrito es una propuesta que debe ser evaluada a detalle para delucidar la función de EhPRL y su participación en la patogenicidad.

En este contexto, se ha reportado la sobrerregulación de genes que codifican para PTPasas y su participación en la enfermedad. En humanos, la sobreexpresión de MKP-1 y MKP-8 se ha asociado con el progreso del cáncer [91]. En *E. histolytica*, por DD-PCR **Bruchhaus I., et al., en el 2002**, reportaron la sobreexpresión de genes específicos, en amibas recuperadas de abscesos hepáticos (ferrodoxina, ciclofilina, Rab7D, Grainin, flavoproteína y proteínas que unen calcio 1 y 2), indicando que muchos genes del parásito son regulados en respuesta a estrés [92]. También se ha reportado la expresión diferencial de PTPasas en *E. histolytica*; **Herrera-Rodríguez S., et al., en 2006** reportó la sobreexpresión de EhPTPA en amibas recuperadas de absceso hepático, dicha sobreexpresión no se observó para EhPTPB, sugiriendo que la

maquinaria de PTPasas es necesaria para la adaptación del parásito al ambiente del hígado pero que además, no todas las PTPasas están involucradas en mecanismos de patogenicidad [54]. En el presente trabajo demostramos que el mRNA de EhPRL también es sobrerregulado en trofozoítos recuperados de absceso hepático. De acuerdo con nuestros resultados, durante el desarrollo de AHA, EhPRL podría fungir como un gen de respuesta a la interacción del trofozoito con el tejido del huésped, orquestando la movilidad de los trofozoítos y la invasión por degradación de la MEC en el intestino, para promover la colonización e invasión a órganos distales ya que EhPRL incrementa la motilidad del trofozoito. La participación de la familia de PRL, en el proceso oncogénico se ha estudiado ampliamente [42].

Sin embargo, una baja regulación del mRNA de EhPRL también se observó en respuesta a la interacción de los trofozoítos recuperados de AHA, con COL. Este comportamiento inesperado requiere ser estudiado ampliamente, sin embargo hipotetizamos que la modulación a la baja puede ser debido a que, como ha sido sugerido por **Pagarigan K., et al., en el 2013**, EhPRL, tal como PRL1, podría actuar también, contrarrestando la actividad oncogénica de Src. No es imprudente hipotetizar que la activación de la maquinaria patogénica de amibas axénicas se induce en respuesta a COL y que, a través de la cascada de señalización dependiente de STAT, EhPRL podría orquestar una mayor migración celular y la invasión; mientras que alternativamente, EhPRL también podría actuar como una proteína de supresión de la migración o del crecimiento celular, cuando un exceso de estímulos inducido por COL se añade a los trofozoítos que ya han sido previamente estimulados, por su pase a través del hígado. De esta manera, se estaría apoyando la presunción de que PRL contrarresta el crecimiento excesivo inducido por Src al restringir la división celular. **Pagarigan T. K.**, sugiere que el mecanismo para contrarrestar a Src es independiente de la capacidad de PRL1 para inhibir el crecimiento bajo condiciones normales, que es dependiente del motivo CAAX. PRL1 no afecta directamente la actividad de Src [93]. En virtud de esta última condición, EhPRL podría unirse a otras proteínas Src de membrana o a la propia Src y actuar como una proteína supresora tumoral. Este importante hallazgo pone en realce la necesidad de identificar las condiciones que permiten a EhPRL transformarse en una proteína patógena.

Además, se requiere un análisis del promotor de EhPRL para establecer si la modulación del mensajero, en respuesta a COL, está regulada dependiendo de las funciones específicas de EhPRL (aumento o inhibición del crecimiento, de la invasión y de la migración), dependiendo de las condiciones de cultivo (trofozoítos axénicos o recuperado de absceso hepático); o si dichos cambios a nivel de mRNA, son una disminución en la transcripción del gen EhPRL durante la interacción con COL. Un comportamiento similar ha sido descrito por **Hernández-Alejandro M., et al., en el 2013**, quienes reportan que la expresión de la proteína EhRabB disminuyó después de 5 min de la interacción de los trofozoítos con eritrocitos. Hernández-Alejandro M., et al., muestran que esta interacción induce una disminución drástica en la vida media del mensajero de EhrabB. Ensayos con el promotor mostraron que el motivo URE1 situado en la región promotora de EhrabB está implicado en la regulación de la expresión de este gen durante la fagocitosis, lo que sugiere que la expresión de genes particulares de este parásito se controla en varias etapas [94].

Como una forma de evaluar la participación de EhPRL en la migración de trofozoítos de *E. histolytica*, se obtuvieron trofozoítos transfectantes que sobreexpresaban a la proteína EhPRL. Los ensayos de migración en transwell muestran claramente la participación de EhPRL en la migración de la amiba, en respuesta a quimioattractantes como SFB o FN. La estrategia experimental, como se explica en materiales y métodos, se diseñó para evaluar la participación de la caja CAAX o de prenilación de EhPRL en la migración celular.

La disponibilidad de la región C-terminal para una posible modificación postraduccional por isoprenoides, tal como miristoilación o farnesilación, es un aspecto bioquímico relevante para que EhPRL pueda direccionarse correctamente en la membrana; esto es, la interferencia de la etiqueta HSV, a la caja CAAX en C-terminal, resultó en una proteína EhPRL que no promueve la migración del trofozoito en respuesta a SFB o FN (C-HSV), mientras que la proteína N-HSV, cuya proteína no está interferida por la etiqueta HSV en C-terminal, si promueve la migración de trofozoítos, en comparación con C-HSV o con el vector vacío. **Fiordalisi James J., et al, en el 2006**, reportaron el efecto de las proteínas PRL1 y PRL3 en la migración celular, en donde el motivo CAAX

fue mutado por SAAX. Como resultado de la mutación, la migración e invasión de células SW480 fue inhibida, sugiriendo que PRL1 o PRL3 promueven la invasión y motilidad de una forma dependiente de farnesilación [43].

En el mismo contexto, **Qi Zeng, et al., en el 2000** evaluó el efecto de la delección del motivo CAAX de PRL2, perdiendo así la marca para prenilación. Como resultado de la delección, PRL2 se localizó en el núcleo indicando que la prenilación es necesaria para la asociación de la proteína en la membrana plasmática y endosomas tempranos [34]. El reconocimiento de la proteína no farnesilada, por delección de CAAX, también ha sido descrita para TcPRL1; dicha proteína truncada se localizó en el citoplásmica de los epimastigotes [51]. El mismo efecto se reportó para PRL3 por **Pascaru Mihaela, et al., en el 2009** quienes mostraron que la proteína truncada en CAAX se relocizaba en el núcleo, confirmado que la asociación a membranas plasmáticas y endosomas tempranos es dependiente de la prenilación. Por tal motivo, se decidió estudiar, por IFI y fraccionamiento subcelular, la localización de las proteína N-HSV::EhPRL y C-HSV::EhPRL. Por IFI no se observó una relocalización de la proteína C-HSV “no farnesilada” al núcleo, como se ha reportado para las 3 PRL de humano y TcPRL1; sin embargo, se observaron estructuras atípicas de agregación de la proteína, similar a “cometas de actina”; dichas estructuras no se tiñeron con faloidina rodaminada, por lo que este interesante hallazgo debe ser ampliamente estudiado. Si bien, la proteína no prenilada, C-HSV no se localizó en el núcleo de *E. histolytica*, por WB de fracciones citoplásmicas y membranales de trofozoítos transfectantes que sobreexpresaban a C-HSV, se encontró a la proteína mayormente en la fracción citoplasmática, en comparación con la proteína N-HSV, la cual se localizó tanto en la fracción citoplásmica como en la membranal. Estos resultados concuerdan con lo previamente reportado pero, para un mayor detalle de la participación de CAAX en EhPRL, se requiere de la construcción de la proteína EhPRL truncada en CAAX para evaluar el efecto también, en la actividad catalítica ya que se ha reportado que en PRL3, la caja CAAX ejerce un efecto inhibitorio en la catálisis, probablemente por la disminución del acceso al sustrato, por la trimerización favorecida que resulta en el ocultamiento del dominio catalítico [61].

VIII. CONCLUSIONES

- 1) *El genoma de E. histolytica* contiene un solo gen, ***ehp1***, que codifica una PTPasa EhPRL funcional.
- 2) La proteína EhPRL comparte los dominios característicos de la familia de PRLs; estructuralmente es similar a HuPRL3.
- 3) EhPRL muestra una mayor afinidad hacia el sustrato OMFP.
- 4) EhPRL tiene actividad de proteína tirosina fosfatasa ya que es inhibida enzimáticamente por el inhibidor Na_3VO_4 en una manera dependiente de dosis.
- 5) EhPRL se localiza tanto en citoplasma como en la membrana plasmática, esta última ubicación podría ser resultado de una prenilación y tras la relocalización se estaría favoreciendo el contacto cercano de la proteína con lípidos o receptores de membrana para la activación de vías de señalización involucradas en la patogénesis.
- 6) El presente estudio muestra diferencias en la expresión del mensajero de EhPRL, en respuesta a MEC tal como FN o COL.
- 7) Cuando los trofozoítos se incuban con FN se induce una colocalización de EhPRL con la actina cortical o proteínas formando complejos mientras se incrementa también la proteína citoplasmática durante el tiempo.
- 8) La sobreexpresión de EhPRL promueve la migración celular en respuesta a FN, dicha migración es dependiente de farnesilación en la caja CAAX de la región C-terminal.
- 9) La interferencia en CAAX de EhPRL (por la etiqueta HSV) induce la relocalización de la proteína C-HSV::EhPRL, a estructuras similares a “cometas” en el citoplasma; dicha interferencia resulta en la detección de la proteína C-HSV::EhPRL en la fracción citoplasmática.
- 10) EhPRL puede estar asociada con la patogenicidad ya que esta proteína se sobreexpresa en amibas recuperadas de absceso hepático.
- 11) EhPRL participa en la migración amibiana.

IX. PERSPECTIVAS

Para la continuidad del presente trabajo se proponen las siguientes perspectivas:

- Evaluar el efecto de la sobreexpresión de EhPRL en la invasión mediante ensayos en matrigel.
- Ensayos de inhibición de EhPRL mediante siRNA y su evaluación en la migración e invasión.
- Búsqueda de sustratos celulares de EhPRL mediante ensayos de pull-down, inmunoprecipitación y WB para el discernimiento de las vías de señalización involucradas.
- Evaluar el efecto de la sobreexpresión de EhPRL *in vivo* en el modelo de AHA en hámster.
- Búsqueda de inhibidores naturales de EhPRL derivados de extracto de epazote.

X. REFERENCIAS

1. Garcia Zepeda E.A., et al. *Regulation of the inflammatory immune response by the cytokine/chemokine network in amoebiasis*. Parasite Immunol. 2007. Vol. 29(12): p. 679-84.
2. Pinilla A.E., et al. *History of the Entamoeba histolytica protozoan*. Rev Med Chil. 2008. Vol. 136(1): p. 118-24.
3. SINAVE. *Anuarios de morbilidad*. 2014 [cited 2015]; Available from: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>.
4. SINAVE. *Boletín epidemiológico*; 2015. Vol. 32, semana 1. Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica.
5. Ximenez C., et al. *Reassessment of the epidemiology of amebiasis: state of the art*. Infect Genet Evol. 2009. Vol. 9(6): p. 1023-32.
6. Espinosa Cantellano M. and Martinez-Palomo A. *Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease*. Clin Microbiol Rev. 2000. Vol. 13(2): p. 318-31.
7. Pritt B.S. and Clark C.G. *Amebiasis*. Mayo Clin Proc. 2008. Vol. 83(10): p. 1154-9; quiz 1159-60.
8. Sierra-Puente R.E., et al. *Expression of immune modulator cytokines in human fulminant amoebic colitis*. Parasite Immunol. 2009. Vol. 31(7): p. 384-91.
9. Ralston K.S. and Petri W.A., Jr. *Tissue destruction and invasion by Entamoeba histolytica*. Trends Parasitol. 2011. Vol. 27(6): p. 254-63.
10. Campos Rodriguezp R. and Jarillo-Luna A. *The pathogenicity of Entamoeba histolytica is related to the capacity of evading innate immunity*. Parasite Immunol. 2005. Vol. 27(1-2): p. 1-8.
11. Abd-Alla M.D., et al. *Natural infection of baboons by Entamoeba histolytica elicits anti- gal-lectin heavy subunit IgA and IgG antibodies with shared epitope specificity to that of humans*. J Egypt Soc Parasitol. 2013. Vol. 43(3): p. 723-35.
12. Faust D.M. and Guillen N. *Virulence and virulence factors in Entamoeba histolytica, the agent of human amoebiasis*. Microbes Infect. 2012. Vol. 14(15): p. 1428-41.
13. Ackers J.P. and Mirelman D. *Progress in research on Entamoeba histolytica pathogenesis*. Curr Opin Microbiol. 2006. Vol. 9(4): p. 367-73.
14. Ralston K.S. and Petri W.A. *The ways of a killer: how does Entamoeba histolytica elicit host cell death?* Essays Biochem. 2011. Vol. 51: p. 193-210.
15. Teixeira J.E. and Mann B.J. *Entamoeba histolytica-induced dephosphorylation in host cells*. Infect Immun. 2002. Vol. 70(4): p. 1816-23.
16. Ralston K.S., et al. *Trogocytosis by Entamoeba histolytica contributes to cell killing and tissue invasion*. Nature. 2014. Vol. 508(7497): p. 526-30.
17. Que X. and Reed S.L. *Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis*. Clin Microbiol Rev. 2000. Vol. 13(2): p. 196-206.
18. Larsen M., et al. *Phosphatases in cell-matrix adhesion and migration*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003. Vol. 4(9): p. 700-11.
19. Meza I., et al. *The cytoskeleton of Entamoeba histolytica: structure, function, and regulation by signaling pathways*. Arch Med Res. 2006. Vol. 37(2): p. 234-43.

20. Tavares P., et al. *Cell polarization and adhesion in a motile pathogenic protozoan: role and fate of the Entamoeba histolytica Gal/GalNAc lectin*. Microbes Infect. 2000. Vol. 2(6): p. 643-9.
21. Liang F., et al. *Proteomic approaches to studying protein tyrosine phosphatases*. Mol Biosyst. 2007. Vol. 3(5): p. 308-16.
22. Alonso A., et al. *Protein tyrosine phosphatases in the human genome*. Cell. 2004. Vol. 117(6): p. 699-711.
23. Patterson K.I., et al. *Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets*. Biochem J. 2009. Vol. 418(3): p. 475-89.
24. Zhang Z.Y. *Chemical and mechanistic approaches to the study of protein tyrosine phosphatases*. Acc Chem Res. 2003. Vol. 36(6): p. 385-92.
25. Soulsby M. and Bennett A.M. *Physiological signaling specificity by protein tyrosine phosphatases*. Physiology (Bethesda). 2009. Vol. 24: p. 281-9.
26. Ostman A., et al. *Regulation of protein tyrosine phosphatases by reversible oxidation*. J Biochem. 2011. Vol. 150(4): p. 345-56.
27. Stephens B.J., et al. *PRL phosphatases as potential molecular targets in cancer*. Mol Cancer Ther. 2005. Vol. 4(11): p. 1653-61.
28. Al-Aidaros A.Q. and Zeng Q. *PRL-3 phosphatase and cancer metastasis*. J Cell Biochem. 2010. Vol. 111(5): p. 1087-98.
29. Dumauval C.M., et al. *Cellular localization of PRL-1 and PRL-2 gene expression in normal adult human tissues*. J Histochem Cytochem. 2006. Vol. 54(12): p. 1401-12.
30. Zhao W.B. and Wang X. *Phosphatases of regenerating liver: a novel target in human solid tumors*. Chin Med J (Engl). 2008. Vol. 121(15): p. 1469-74.
31. Zhang F.L. and Casey P.J. *Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences*. Annu Rev Biochem. 1996. Vol. 65: p. 241-69.
32. Pendyala P.R., et al. *Characterization of a PRL protein tyrosine phosphatase from Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol. 2008. Vol. 158(1): p. 1-10.
33. Si X., et al. *Interaction of farnesylated PRL-2, a protein-tyrosine phosphatase, with the beta-subunit of geranylgeranyltransferase II*. J Biol Chem. 2001. Vol. 276(35): p. 32875-82.
34. Zeng Q., et al. *Prenylation-dependent association of protein-tyrosine phosphatases PRL-1, -2, and -3 with the plasma membrane and the early endosome*. J Biol Chem. 2000. Vol. 275(28): p. 21444-52.
35. Sun J.P., et al. *Phosphatase activity, trimerization, and the C-terminal polybasic region are all required for PRL1-mediated cell growth and migration*. J Biol Chem. 2007. Vol. 282(39): p. 29043-51.
36. Jeong D.G., et al. *Trimeric structure of PRL-1 phosphatase reveals an active enzyme conformation and regulation mechanisms*. J Mol Biol. 2005. Vol. 345(2): p. 401-13.
37. Kozlov G., et al. *Structural insights into molecular function of the metastasis-associated phosphatase PRL-3*. J Biol Chem. 2004. Vol. 279(12): p. 11882-9.
38. Sun J.P., et al. *Structure and biochemical properties of PRL-1, a phosphatase implicated in cell growth, differentiation, and tumor invasion*. Biochemistry. 2005. Vol. 44(36): p. 12009-21.

39. Wang J., et al. *The tyrosine phosphatase PRL-1 localizes to the endoplasmic reticulum and the mitotic spindle and is required for normal mitosis.* J Biol Chem. 2002. Vol. 277(48): p. 46659-68.
40. Werner S.R., et al. *Enhanced cell cycle progression and down regulation of p21(Cip1/Waf1) by PRL tyrosine phosphatases.* Cancer Lett. 2003. Vol. 202(2): p. 201-11.
41. Saha S., et al. *A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer.* Science. 2001. Vol. 294(5545): p. 1343-6.
42. Rios P., et al. *Molecular mechanisms of the PRL phosphatases.* FEBS J. 2013. Vol. 280(2): p. 505-24.
43. Fiordalisi J.J., et al. *PRL tyrosine phosphatases regulate rho family GTPases to promote invasion and motility.* Cancer Res. 2006. Vol. 66(6): p. 3153-61.
44. Liang F., et al. *PRL3 promotes cell invasion and proliferation by down-regulation of Csk leading to Src activation.* J Biol Chem. 2007. Vol. 282(8): p. 5413-9.
45. Heneberg P. *Finding the smoking gun: protein tyrosine phosphatases as tools and targets of unicellular microorganisms and viruses.* Curr Med Chem. 2012. Vol. 19(10): p. 1530-66.
46. Mustelin T., et al. *Protein tyrosine phosphatases and the immune response.* Nat Rev Immunol. 2005. Vol. 5(1): p. 43-57.
47. Loftus B., et al. *The genome of the protist parasite Entamoeba histolytica.* Nature. 2005. Vol. 433(7028): p. 865-8.
48. Andreeva A.V. and Kutuzov M.A. *Protozoan protein tyrosine phosphatases.* Int J Parasitol. 2008. Vol. 38(11): p. 1279-95.
49. Miranda-Saavedra D., et al. *The complement of protein kinases of the microsporidium Encephalitozoon cuniculi in relation to those of Saccharomyces cerevisiae and Schizosaccharomyces pombe.* BMC Genomics. 2007. Vol. 8: p. 309.
50. Ward P., et al. *Protein kinases of the human malaria parasite Plasmodium falciparum: the kinome of a divergent eukaryote.* BMC Genomics. 2004. Vol. 5: p. 79.
51. Cuevas I.C., et al. *Characterization of farnesylated protein tyrosine phosphatase TcPRL-1 from Trypanosoma cruzi.* Eukaryot Cell. 2005. Vol. 4(9): p. 1550-61.
52. Pereira-Neves A., et al. *Tritrichomonas foetus: characterisation of ecto-phosphatase activities in the endoflagellar form and their possible participation on the parasite's transformation and cytotoxicity.* Exp Parasitol. 2014. Vol. 142: p. 67-82.
53. Aguirre-Garcia M.M., et al. *Membrane-bound acid phosphatase (MAP) from Entamoeba histolytica has phosphotyrosine phosphatase activity and disrupts the actin cytoskeleton of host cells.* Parasitology. 2003. Vol. 126(Pt 3): p. 195-202.
54. Herrera-Rodriguez S.E., et al. *Cloning and partial characterization of Entamoeba histolytica PTPases.* Biochem Biophys Res Commun. 2006. Vol. 342(4): p. 1014-21.
55. Diamond L.S., et al. *A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba.* Trans R Soc Trop Med Hyg. 1978. Vol. 72(4): p. 431-2.
56. *pRSET A, B, and C For high-level expression of recombinant proteins in E. coli.* Invitrogen. 2001. Vol.

57. Ausubel F.M., *Current Protocols in Molecular Biology*. Vol. II. 2004.
58. Laurel-Carranza A., *Identificación de los posibles sustratos para la proteína tirosina fosfatasa de Entamoeba histolytica (EhPTPA)*, in *Patología Experimental*. 2007, CINVESTAV-IPN: México D.F. p. 87.
59. Laemmli U.K. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*. 1970. Vol. 227(5259): p. 680-5.
60. Bradford M.M. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*. 1976. Vol. 72: p. 248-54.
61. Pascaru M., et al. *Analysis of molecular determinants of PRL-3*. *J Cell Mol Med*. 2009. Vol. 13(9B): p. 3141-50.
62. Ruoslahti E., et al. *Fibronectin: purification, immunochemical properties, and biological activities*. *Methods Enzymol*. 1982. Vol. 82 Pt A: p. 803-31.
63. Shi S.R., et al. *Use of pH 9.5 Tris-HCl buffer containing 5% urea for antigen retrieval immunohistochemistry*. *Biotech Histochem*. 1996. Vol. 71(4): p. 190-6.
64. Towbin H., et al. *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979. Vol. 76(9): p. 4350-4.
65. Chavez-Munguia B., et al. *Entamoeba histolytica: ultrastructure of trophozoites recovered from experimental liver lesions*. *Exp Parasitol*. 2004. Vol. 107(1-2): p. 39-46.
66. Singh U., et al. *Transcription initiation is controlled by three core promoter elements in the hgl5 gene of the protozoan parasite Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997. Vol. 94(16): p. 8812-7.
67. Aguilar-Rojas A., et al. *Entamoeba histolytica: inhibition of cellular functions by overexpression of EhGEF1, a novel Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor*. *Exp Parasitol*. 2005. Vol. 109(3): p. 150-62.
68. Hamann L., et al. *Transfection and continuous expression of heterologous genes in the protozoan parasite Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995. Vol. 92(19): p. 8975-9.
69. Gonzalez De la Rosa C.H., et al. *EhGEF2, a Dbl-RhoGEF from Entamoeba histolytica has atypical biochemical properties and participates in essential cellular processes*. *Mol Biochem Parasitol*. 2007. Vol. 151(1): p. 70-80.
70. Kumagai M., et al. *Molecular cloning and characterization of a protein farnesyltransferase from the enteric protozoan parasite Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem*. 2004. Vol. 279(3): p. 2316-23.
71. Makioka A., et al. *Characterization of protein geranylgeranyltransferase I from the enteric protist Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*. 2006. Vol. 145(2): p. 216-25.
72. Orsatti L., et al. *Mass spectrometry study of PRL-3 phosphatase inactivation by disulfide bond formation and cysteine into glycine conversion*. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2009. Vol. 23(17): p. 2733-40.
73. McParland V., et al. *The metastasis-promoting phosphatase PRL-3 shows activity toward phosphoinositides*. *Biochemistry*. 2011. Vol. 50(35): p. 7579-90.
74. Linford A.S., et al. *Crystal structure and putative substrate identification for the Entamoeba histolytica low molecular weight tyrosine phosphatase*. *Mol Biochem Parasitol*. 2014. Vol. 193(1): p. 33-44.

75. Anaya-Ruiz M., et al. *An ecto-protein tyrosine phosphatase of Entamoeba histolytica induces cellular detachment by disruption of actin filaments in HeLa cells.* Int J Parasitol. 2003. Vol. 33(7): p. 663-70.
76. Skinner A.L., et al. *Enzyme activity of phosphatase of regenerating liver is controlled by the redox environment and its C-terminal residues.* Biochemistry. 2009. Vol. 48(20): p. 4262-72.
77. Huyer G., et al. *Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate.* J Biol Chem. 1997. Vol. 272(2): p. 843-51.
78. Jeong K.W., et al. *Structure and Backbone Dynamics of vanadate-bound PRL-3: Comparison of 15N NMR Relaxation Profiles of free and vanadate-bound PRL-3.* Biochemistry. 2014. Vol.
79. Ishii T., et al. *Thioredoxin-related protein 32 (TRP32) specifically reduces oxidized phosphatase of regenerating liver (PRL).* J Biol Chem. 2013. Vol. 288(10): p. 7263-70.
80. Shi S.R., et al. *Antigen retrieval techniques: current perspectives.* J Histochem Cytochem. 2001. Vol. 49(8): p. 931-7.
81. Nakashima M. and Lazo J.S. *Phosphatase of regenerating liver-1 promotes cell migration and invasion and regulates filamentous actin dynamics.* J Pharmacol Exp Ther. 2010. Vol. 334(2): p. 627-33.
82. Flores-Robles D., et al. *Entamoeba histolytica: a beta 1 integrin-like fibronectin receptor assembles a signaling complex similar to those of mammalian cells.* Exp Parasitol. 2003. Vol. 103(1-2): p. 8-15.
83. Liu H., et al. *PRL-3 suppresses c-Fos and integrin alpha2 expression in ovarian cancer cells.* BMC Cancer. 2013. Vol. 13: p. 80.
84. de Lourdes Munoz M., et al. *Entamoeba histolytica trophozoites activated by collagen type I and Ca(2+) have a structured cytoskeleton during collagenase secretion.* Cell Motil Cytoskeleton. 2001. Vol. 50(1): p. 45-54.
85. Mittal K., et al. *Entamoeba histolytica: lipid rafts are involved in adhesion of trophozoites to host extracellular matrix components.* Exp Parasitol. 2008. Vol. 120(2): p. 127-34.
86. Cruz-Vera J., et al. *Collagen-induced STAT family members activation in Entamoeba histolytica trophozoites.* FEMS Microbiol Lett. 2003. Vol. 229(2): p. 203-9.
87. Luo Y., et al. *PRL1 promotes cell migration and invasion by increasing MMP2 and MMP9 expression through Src and ERK1/2 pathways.* Biochemistry. 2009. Vol. 48(8): p. 1838-46.
88. Peng L., et al. *PRL-3 promotes the motility, invasion, and metastasis of LoVo colon cancer cells through PRL-3-integrin beta1-ERK1/2 and-MMP2 signaling.* Mol Cancer. 2009. Vol. 8: p. 110.
89. Chavez-Munguia B., et al. *Entamoeba histolytica electrondense granules secretion in vitro and in vivo: ultrastructural study.* Microsc Res Tech. 2012. Vol. 75(2): p. 189-96.
90. Debnath A., et al. *Identification of genomic responses to collagen binding by trophozoites of Entamoeba histolytica.* J Infect Dis. 2004. Vol. 190(3): p. 448-57.
91. Pulido R. and Hoofft van Huijsduijnen R. *Protein tyrosine phosphatases: dual-specificity phosphatases in health and disease.* Febs J. 2008. Vol. 275(5): p. 848-66.

92. Bruchhaus I., et al. *Differential gene expression in Entamoeba histolytica isolated from amoebic liver abscess*. Mol Microbiol. 2002. Vol. 44(4): p. 1063-72.
93. Pagarigan K.T., et al. *Drosophila PRL-1 is a growth inhibitor that counteracts the function of the Src oncogene*. PLoS One. 2013. Vol. 8(4): p. e61084.
94. Hernandez-Alejandro M., et al. *The small GTPase EhRabB of Entamoeba histolytica is differentially expressed during phagocytosis*. Parasitol Res. 2013. Vol. 112(4): p. 1631-40.