



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

TÍTULO DE LA TESIS
EFECTO DE LA PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASA DE *Entamoeba histolytica* EN
LA SECRECIÓN DE CITOCINAS POR MACRÓFAGOS ACTIVADOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

JUAN ESPEJEL ZARAGOZA



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

TUTORA:
DRA. MARÍA MAGDALENA AGUIRRE GARCÍA

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

"Efecto de la proteína tirosina fosfatasa de *Entamoeba histolytica* en la secreción de citocinas por macrófagos activados".

realizado por Espejel Zaragoza Juan con número de cuenta 4-0108210-6 quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en Biología. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario	Dra. Laila Gutiérrez Kobeh	
Propietario	Dra. María del Carmen Maldonado Bernal	
Propietario Tutora	Dra. María Magdalena Aguirre García	
Suplente	M. en C. Isabel Cristina Caheda Guzmán	
Suplente	M. en C. María del Rosario López Vancell	

Atentamente,
"POR MI RAZA HABLARÉ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D. F., a 02 de julio de 2008
EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

Dr. Zenón Cano Santana

Señor estudiante: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

Hoja de datos del jurado:

1. Datos del alumno

Apellido paterno: Espejel
Apellido materno: Zaragoza
Nombre(s): Juan
Telefono: (01595)9-28-45-13
Universidad: Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad: Facultad de Ciencias
Carrera : Biología
No. de cuenta 401082106

2. Datos del tutor

Grado: Dra.
Nombres(s): Maria Magdalena
Apellido paterno Aguirre
Apellido materno: García

3. Datos del sinodal 1

Grado: Dra.
Nombre(s): Laila
Apellido paterno Gutierrez
:
Apellido materno: Kobeh

4. Datos de sinodal 2

Grado . Dra.
Nombre(s). María del Carmen
Apellido paterno Maldonado
Apellido materno: Bernal

5. Datos del sinodal 3

Grado : M. en Ciencias
Nombre(s): Isabel Cristina
Apellido paterno: Cañeda
Apellido materno Guzmán

6. datos del sinodal 4

Grado : M. en Ciencias
Nombre: Ma. Del Rosario
Apellido paterno: López
Apellido materno: Vancell

7. Datos del trabajo escrito

Efecto de la proteína tirosina fosfatasa de *Entamoeba histolytica* en la secreción de citocinas por macrófagos activados 49p 2008

Dedicatorias:

Por empezar dedicaré a dios que es a lo primero que debo agradecer por darme la oportunidad de estar aquí, estar con lo mas importante que es mi familia y darme tantas lecciones todos los días, no sabes como a veces dudo de ti, pero las lecciones tan importantes que me haces reflexionar en el silencio me hacen darme cuenta de la realidad.

A mis padres, Faustino Espejel Cortes y Bernardina Columba Zaragoza Rosas por ser los ángeles que me han cuidado y protegido, así como aconsejado, siempre teniendo fe en mi, ellos se merecen gran parte del crédito Gracias pá y má.

A mi hermano Carlos Faustino a mi cuñada Blanca y los muchachos Oscar y Gerardo por ser parte de mi vida diaria y enseñarme cosa nuevas cada día que los veo.

A Carlos Zaragoza Carvajal, Matilde Luisa Rosas García, Melquíades Espejel Almaráz y Juanita Méndez Ramírez, se que siempre estan ahí junto a mi en todos los momentos.

A mi linda y amada Araceli Pérez López, no sabes que importante ha sido tu repentina y bellísima aparición en mi vida, todos los días los haces tu, gran parte de este trabajo lo debo a tu gran ayuda, tanto emocional como académica... Te amo y estoy dispuesto a compartir más contigo.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunoparasitología del Departamento de Medicina Experimental, de la Facultad de Medicina de la UNAM, Hospital Gral. De México, bajo la dirección de la Dra. María Magdalena Aguirre García

AGRADECIMIENTOS

A DGAPA con numero en Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN221606, por el apoyo economico para la realización de este proyecto

Agradezco ala Universidad Nacional Autónoma de México por darme la anhelada oportunidad de instruirme en su recinto académico, así como ala Facultad de Ciencias por ser una segunda casa.

Agradezco a la Dra. María Magdalena Aguirre García por la paciencia y oportunidad que me dio para realizar este trabajo y culminarlo. A la Dra. Ingerborg Becker Fauser por permitirme ingresar a su laboratorio y equipo de trabajo, así como sus grandes palabras de aliento.

A la Dra. Patricia Talamás y a su gran equipo de trabajo por la donación de la cepa de *Enatmoeba histolytica* HM1:IMSS

A mis sinodales : las Doctoras Laila Gutierrez Kobeh, Maria del Carmen Maldonado, Rosario Lopez Vancell y Cristina Cañeda Guzmán, por aportar mucho en las correcciones y comentarios

A mi querida Alma Reyna Escalona Montaña por grandes momentos, en los que necesitaba sus palabras y consejos, pues ha sido mi hermana mayor científica, que chido la hemos pasado Alma...

A todos mis compañeros Daniel Pardavé, Flavio German, Nancy, Edith, Bety , Palóma por esos momentos agradables y joviales , a Adriana Ruiz por sus necesarios consejos en redacción y técnicas,

Nuevamente a Cristina Cañeda por su gran ayuda en la elaboración de la tesis, no solo ha sido una de mis sinodales, sino tambien una buena amiga.

A mi hermano Carlos Zaragoza Lopez, no sabes que chido es haberte conocido carnal, que grato es el cbien desde ahora, y no sabes como extraño esos ratos de risa y comentarios que hacíamos.

A mis compadres de Rosy House , Joshua, Ivan Omar, Ricardo, por acompañarme en mis ratos de frustración así como a doña Rosy por ser como una tia que se preocupa por nosotros

A mi compadres Daniel Peña Duran y claro no menos importante Raul Marquez Romero(†) por estar ahí también en los momentos difíciles.

A toodos lo cuates del gimnasio Clemente, Gilberto, Manolo,Neto, Quique, Diego. Aldo.

Y los que en este momento no recuerde... ¡Gracias!

ÍNDICE GENERAL

Pag.

Índice general	i
Índice de imágenes.....	iii
Índice de figuras.....	iii
Resumen	v
1. Introducción	1
1.2 Agente etiológico de la amibiasis.....	1
1.2.1 Clasificación taxonómica de <i>Entamoeba histolytica</i>	1
1.2.2 Morfología de <i>Entamoeba histolytica</i>	2
1.2.3 Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i>	2
1.3 Formas clínicas de la amibiasis.....	5
1.3.1 Amibiasis intestinal.....	5
1.3.2 Amibiasis extraintestinal.....	5
1.3.2.1 Amibiasis hepática (absceso hepático amibiano).....	6
1.3.2.2 Amibiasis cerebral.....	7
1.3.2.3 Amibiasis pulmonar.....	7
1.4 Inmunología de la amibiasis.....	8
1.4.1 Participación de IL-10, IL-12 y TNF- α en la respuesta inmune.....	8
1.4.2 Moléculas de <i>E. histolytica</i> que participan en la evasión de la respuesta inmune.....	11
1.5 Moléculas involucradas en la virulencia de <i>E. histolytica</i>	13
1.5.1 Lectina N-acetil-D-galactosamina (Gal/Gal Nac).....	13
1.5.2 Ameboporo.....	13
1.5.3 Proteasas de cisteína.....	14
1.5.4 Fosfatasa ácida en <i>E. histolytica</i>	14
1.6 Antecedentes de Proteínas tirosinas fosfatasa en diferentes microorganismos...15	
1.6.1 Virus.....	15
1.6.2 Bacterias.....	15
1.6.3 Parásitos.....	17

2. Justificación	19
3.- Hipótesis	20
4. Objetivos	20
4.1 Objetivo general.....	20
4.2 Objetivos particulares	20
5 Material y métodos	21
5.1 Cosecha de trofozoítos	21
5.2 Obtención de la proteína tirosina fosfatasa de <i>Entamoeba histolytica</i>	21
5.2.1 Lisis de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> y obtención de la fracción solubilizada	21
5.3 Cuantificación de proteína	22
5.3.1 Purificación de la PTPasa de <i>E. histolytica</i> por cromatografía de afinidad (Concanavalina A-Sefarosa e Intercambio iónico (DEAE–celulosa	22
5.4 Actividad de fosfatasa Acida	23
5.5 Electroforesis en gel SDS-PAGE	23
5.6 Tinción con plata.....	24
5.7 Obtención de macrófagos a partir de médula ósea de ratón BALB/c	24
5.8 Estimulación de los macrófagos de médula ósea de ratón.....	24
5.9 Cuantificación de citocinas por el método de ELISA	25
5.9.1 Diagrama de flujo de la metodología.....	26
6. Resultados	27
6.1 Actividad específica en fraccionamiento subcelular de trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i>	27
6.2 Purificación de la PTPasa	27
6.3 Análisis electroforético del perfil de proteínas eluídas de columnas de Concanavalina- A y DEAE-Celulosa	27

6.4 Efecto de la PTPasa de <i>E. histolytica</i> en la producción de IL-10 por macrófagos derivados de médula ósea	28
6.5 Efecto de la PTPasa de <i>E. histolytica</i> en la producción de IL-12 por macrófagos derivados de médula ósea	28
6.6 Efecto de la PTPasa de <i>E. histolytica</i> en la producción de TNF- α por macrófagos derivados de médula ósea.....	29
7 Discusión	36
8. Conclusiones	42
9. Bibliografía.....	43
Apéndice:	47

Resumen

La amibiasis es causada por el parásito protozooario *Entamoeba histolytica*, este parásito es capaz de lisar una gran variedad de células, incluyendo hepatocitos, células intestinales, neutrófilos y macrófagos (M ϕ). Durante la infección e invasión el parásito tiende a enfrentarse a distintas barreras del organismo, entre ellas las barreras físicas y químicas del estómago que impiden el desarrollo de otros microorganismos, a lo cual el parásito puede sobrevivir en ese medio ácido gracias a su estadio de quiste. Al llegar al intestino y dañarlo, *E. histolytica* es capaz de persuadir a las células de la respuesta inmune innata como el neutrófilo y el macrófago. Las moléculas a las que se les atribuye su patogenia son la gal/gal-nac, ameboporo y las proteasas de cisteína, que hasta ahora se consideran como las más importantes. Actualmente se han hallado fosfatasa ácida en los lisados de *E. histolytica*; estas proteínas ya han sido estudiadas en distintos microorganismos como el caso de bacterias como *Yersinia* y *Salmonella*, se ha comprobado que son una clave en la infección. Hasta el momento se sabe que *E. histolytica* puede inducir la secreción de la citocina pro inflamatoria TNF- α en macrófagos derivados de médula ósea, que puede ser un mecanismo por el cual el parásito modifica su entorno frente al sistema inmune, así también pueden estar involucradas otras citocinas pro y anti inflamatorias como IL-12 e IL-10. Sin embargo se desconoce cual o cuales son las moléculas del parásito responsables de este evento, que favorecen un proceso de invasión. La presencia de cinasas y fosfatasa durante infecciones por patógenos están considerándose importantes durante el proceso de invasión. Estas enzimas controlan la fosforilación y desfosforilación de proteínas. La enzima específica encargada de la desfosforilación de proteínas en residuos de tirosina, es denominada proteína tirosina fosfatasa (PTPasa) que es de gran importancia en múltiples funciones, ya sea modificando crecimiento, diferenciación y comunicación celular; es por ello que en este trabajo se analizó el efecto de esta PTPasa purificada en la producción de IL-12(p40), IL-10 y TNF- α en M ϕ . Esto demostró que la PTPasa de *Entamoeba histolytica* es capaz de inducir la secreción de TNF- α e IL-12, de la misma manera se ve también incrementada la secreción de IL-10. La capacidad de esta molécula de *E. histolytica* radica en la posible modificación del sistema inmune a su conveniencia, tal vez siendo una herramienta más de su maquinaria patogénica.

1. Introducción

Entamoeba histolytica es un parásito protozoario causante de la amibiasis, esta parasitosis se define como una enfermedad que se presenta principalmente en países en vías de desarrollo y su más alta incidencia ha sido establecida en zonas marginadas que no presentan infraestructura sanitaria. Las formas clínicas de la amibiasis son la amibiasis intestinal y la extraintestinal, siendo el absceso hepático la lesión más común de amibiasis extra intestinal. La amibiasis está distribuida en todo el mundo siendo un riesgo actual para los países en desarrollo debido a la escasez de recursos económicos. Según la Organización Mundial de la Salud se calcula que hay aproximadamente 50 millones de casos de amibiasis y 100000 muertes al año^[1]. El 30% de la población infantil tanto de zona rural como urbana adquiere la enfermedad, mientras que en la población adulta se encuentra hasta en un 70%^[1].

1.2 Agente etiológico

1.2.1 Clasificación taxonómica de *Entamoeba histolytica* ^[2]

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Phylum: Rhizopoda (de protozoos formadores de pseudópodos)

Clase: Lobosea

Subclase: Gymnamoebia

Orden: Amoebida

Suborden: Tubulina

Familia: Entamoebidae

Género: *Entamoeba*

Especie: *Entamoeba histolytica*

1.2.2 Morfología de *Entamoeba histolytica*

E. histolytica presenta dos estadios: el quiste, que es esférico semitransparente con una membrana lisa y delgada. Esta fase es la infectiva, mide de 10 a 16 μm de diámetro y presenta cuerpos cromatoides, una pared de quitina capaz de resistir cambios bruscos de temperatura (Imagen 1a), así como la capacidad de resistir compuestos químicos tales como el hipoclorito de sodio. El otro estadio es el trofozoíto, que constituye la fase móvil del parásito siendo la fase invasiva, su cuerpo es alargado de 40 a 60 μm , semitransparente con un núcleo y pseudópodos que le proporcionan la capacidad de movimiento. Esta forma es susceptible a los cambios bruscos de temperatura y no es capaz de sobrevivir fuera del hospedero (Imagen 1b) [3].

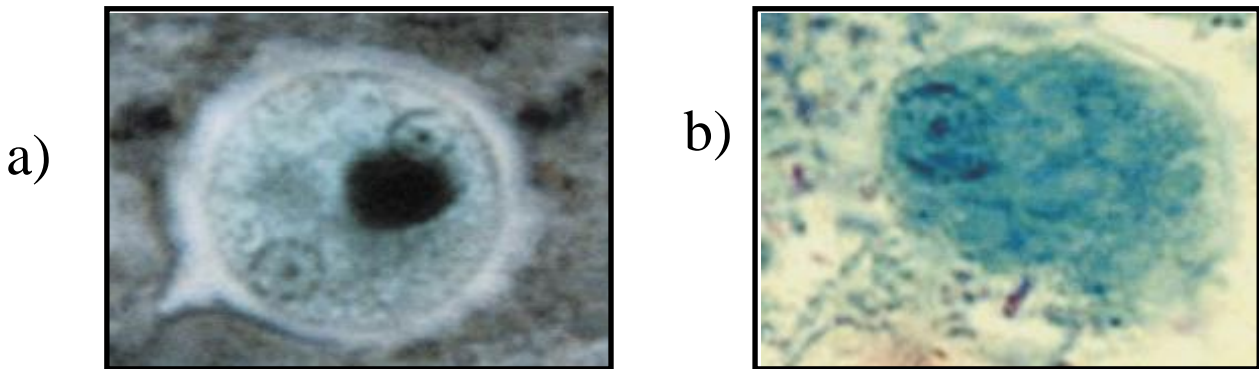


Imagen 1. Estadios de *Entamoeba histolytica*

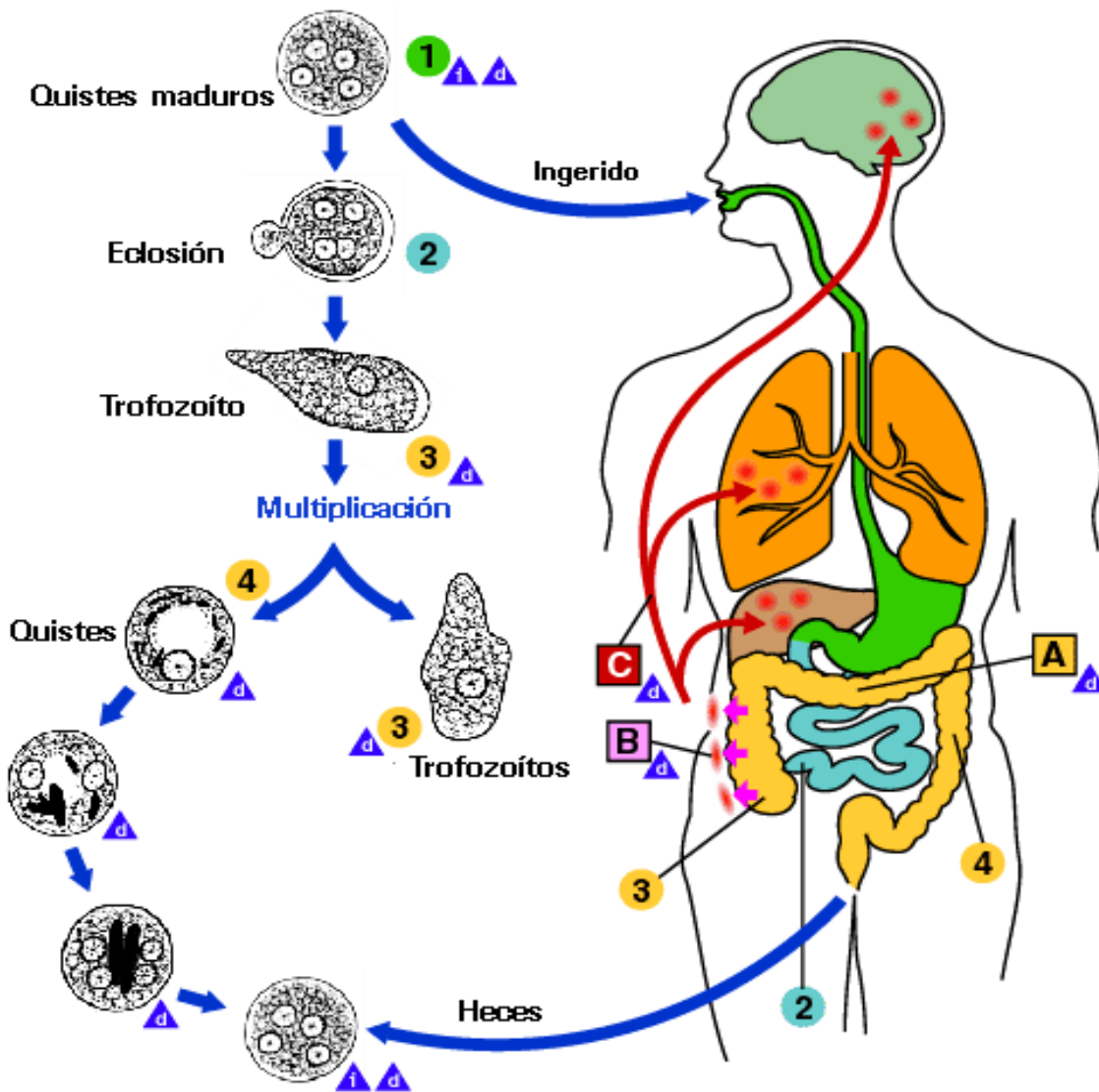
(a) El quiste presenta 4 núcleos

(b) El trofozoíto presenta pseudópodos y un solo núcleo [1].

1.2.3 Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*

El ciclo de vida de *E. histolytica* comienza con la ingesta de alimentos y/o agua contaminados por quistes, los quistes pasan al estómago y llegan al intestino delgado donde se desenquistan por la presencia de sales biliares, de esta manera se liberan los trofozoítos (fase invasiva), estos migran al colon donde se reproducen por fisión binaria y al mismo tiempo se producen los quistes que se eliminan en las heces. Los trofozoítos que quedan en el intestino penetran la capa de moco, llegan al torrente sanguíneo y pueden invadir otros órganos como hígado pulmón y sistema nervioso central (Imagen 2) [4]. Los

insectos y roedores pueden ser propagadores de quistes, pues están en contacto directo con las heces humanas. El hombre es el principal reservorio de *E. histolytica*, aún cuando pueden encontrarse amibas morfológicamente semejantes en otros vertebrados; la susceptibilidad de los humanos a la infección parece ser general, aunque pocos individuos que se encuentran infectados por el parásito permanecen como portadores asintomáticos ^[5].



▲_i = Forma infectante
 ▲_d = Forma diagnóstica

A = Colonización no invasiva
B = Enfermedad intestinal
C = Enfermedad extraintestinal

manos contaminados con heces. El desenquistamiento (2) ocurre en el intestino delgado y los trofozoítos (3) se liberan y migran al colon. Los trofozoítos se reproducen por fisión binaria y producen los quistes (4) que se eliminan con las heces. Debido a la protección de la pared de quitina, los quistes pueden sobrevivir días o semanas en el medio externo y son los responsables de transmisión. Los trofozoítos en el medio externo mueren rápidamente. En muchos casos los trofozoítos permanecen confinados en la luz intestinal (A, infección no invasiva) de los infectados, quienes son entonces portadores asintomáticos o eliminadores de quistes de *E. histolytica*. En algunos individuos los trofozoítos invaden la mucosa intestinal (B, enfermedad intestinal), o a través de la circulación, invaden el hígado, los pulmones, el cerebro etc. (C, enfermedad extraintestinal)^[6].

1.3 Formas clínicas de la amibiasis

1.3.1 Amibiasis intestinal

La amibiasis intestinal es la forma clínica más común que se manifiesta en el humano y se caracteriza por colonizar la mucosa intestinal. Provoca la disentería del intestino grueso, el desequilibrio en la permeabilidad intestinal del colon, así como la úlcera gástrica, que promueve la invasión a otros órganos^[7] (Imagen 3).

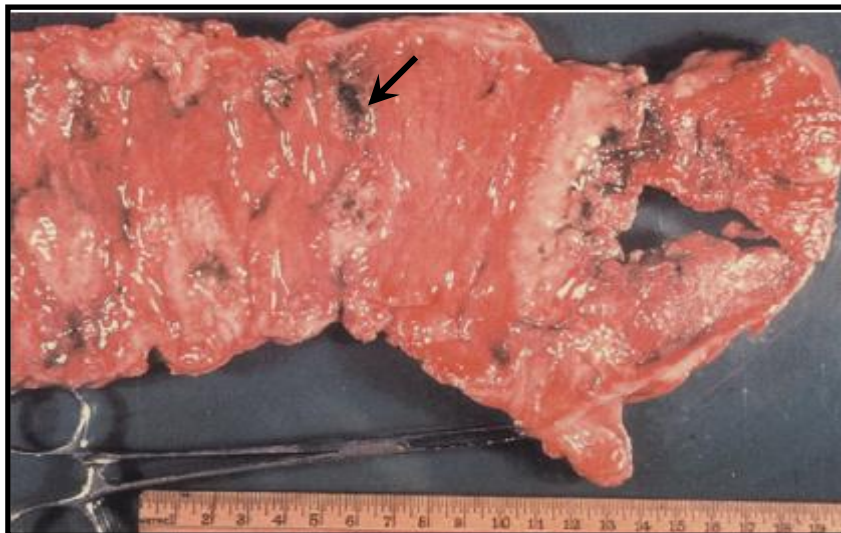


Imagen 3. La amibiasis en el intestino humano
Ulceración intestinal causada por *E. histolytica*^[1]. La flecha indica la ulceración.

1.3.2 Amibiasis Extraintestinal

Existen varios tipos de amibiasis extraintestinal, que son hepática, cerebral y pulmonar. La amibiasis extraintestinal se favorece por el transporte del parásito a través de la vena porta, siendo el absceso hepático la mayor prevalencia de patología extraintestinal^[8].

1.3.2.1 Amibiasis hepática (Absceso hepático amibiano)

La amibiasis hepática resulta de la migración de los trofozoítos desde el colon hacia el hígado, se caracteriza por la formación de un absceso, un área delimitada donde el parénquima del hígado está totalmente necrosado y de un color amarillento, el absceso hepático amibiano es de un tamaño variable, va desde pequeños puntos blancos amarillentos, hasta una área grande que puede llegar a tener 15 cm de diámetro (Imagen 4); es el primer indicio de invasión extraintestinal de órganos en el humano por parte de la amiba [9].

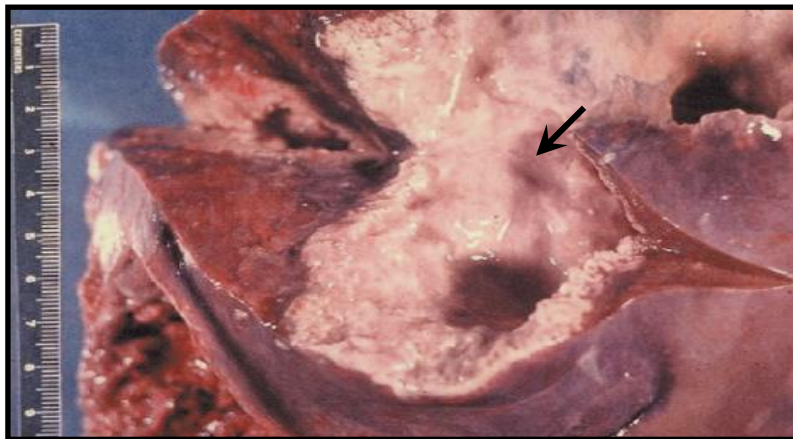


Imagen 4. Absceso hepático amibiano en humano
Ulceraciones en hígado causadas por *E. histolytica* [1].
La flecha indica el absceso.

1.3.2.2 Amibiasis cerebral

El 0.1% de los pacientes con absceso hepático también presentan absceso cerebral que se caracteriza por la invasión y destrucción de tejido neuronal; se observa que el tejido neuronal se degrada rápidamente con una progresión de la muerte celular (Imagen 5) ^[10].

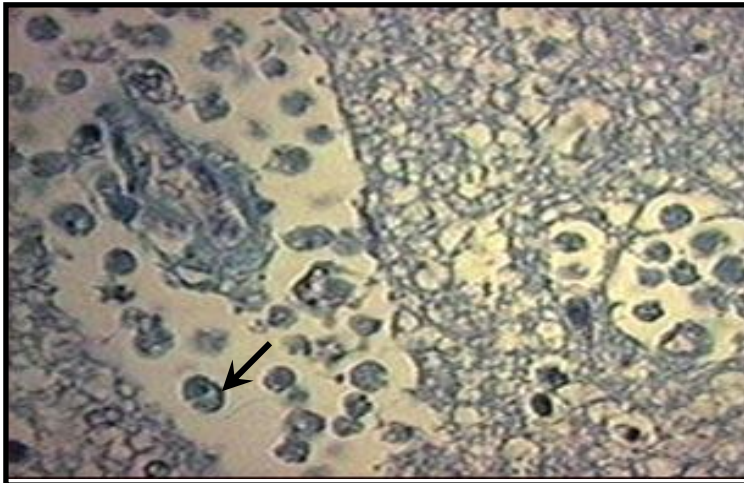


Imagen 5. Amibiasis cerebral, corte histológico de cerebro invadida por *E.histolytica*. La flecha indica la presencia del trofozoíto en el corte histológico de la masa encefálica invadida ^[1].

1.3.2.3 Amibiasis pulmonar

Se presenta en casos muy particulares, en donde se observa que ocurre una ruptura del absceso hepático como la consecuencia de un grado avanzado de la invasión, esto frecuentemente afecta al pulmón derecho necrosándolo, debido a que el pulmón derecho está detrás del hígado ^[11].

1.4 Inmunología de la Amibiasis

En el sistema inmune, el macrófago es una célula fagocítica por excelencia, se presenta como una célula de tamaño de 15 a 25 μ m; constituye una parte importante del sistema fagocítico mononuclear de la respuesta inmune innata, se caracteriza por ser una célula presentadora de antígeno por el complejo MHC (complejo principal de histocompatibilidad) clase II y es un potente microbicida; en el caso de microorganismos intracelulares como bacterias y extracelulares como parásitos; los macrófagos son activados por distintas moléculas como PAMPS (patrones moleculares asociados a organismos patogénicos) como el LPS (lipolisacáridos) y por vías de señalización, que pueden ser activadas por citocinas tales como TNF- α , IFN- γ , GM-CSF. Por otra parte, los mecanismos microbicidas de macrófagos dependen de vías de señalización mediadas por PTPasas, entre estas están las vías de señalización de JAK/STAT y MAPquinasas. Estos estímulos desencadenan reacciones como estallido respiratorio, generación de óxido nítrico liberado al medio como nitritos, estos mecanismos pueden ser en ocasiones dañinos para el organismo por lo que en ocasiones no son suficientes, siendo un blanco fácil de parásitos intracelulares y extracelulares como protozoarios o helmintos^[48].

1.4.1 Participación de IL-10, IL-12 y TNF- α en la respuesta inmune

En la respuesta inmune se encuentran citocinas tales como IL-10, IL-12, TNF- α , entre otras que regulan el proceso de patogénesis, en algunos casos las complicaciones de las infecciones por parásitos resultan de la respuesta inmune excesiva, pudiendo ser promovidas por el patógeno como la excesiva producción de IL2 y TNF- α ^[49].

En el caso de la Interleucina 10 (IL-10) se presenta como un inhibidor de la síntesis de IFN- γ , en macrófagos y de células dendríticas activadas. La citocina IL-10 se presenta como una clave en la inmunoregulación durante la infección por virus, bacterias, hongos, protozoarios y helmintos, que son responsables de muchas inmunopatologías, se ha encontrado que la secreción excesiva de IL-

10 puede alterar la respuesta pro inflamatoria, en este caso, se promueve una respuesta excesiva Th1 y de linfocitos CD8⁺ caracterizada por la sobreproducción de IFN- γ y TNF- α , este tipo de secreción también se asocia con infecciones por parásitos protozoarios como: *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma spp.* y *Plasmodium spp.* donde se observa que la patogenicidad aumenta^[50]. Un ejemplo más, es durante la infección por *Mycobacterium avium* que promueve una producción alta de IL-10 en ratones BALB/c pero no en ratones C57BL/6, y es correlacionado con la falla del ratón BALB/c para resolver la infección, observándose que la cepa susceptible es BALB/c, y que la poca secreción de IL-10 está relacionada con la eliminación de microorganismos patógenos^[51]. El incremento de IL-10 promueve que el microorganismo patógeno no sea eliminado, IL-10 podría directamente inhibir la eliminación del mismo y prolongar su sobrevivencia, por lo que el patógeno modula esta respuesta inmune^[52].

La interleucina 12 (IL-12) es una citocina que induce la síntesis de IFN- γ e inhibe la producción de IL-4, aumentando la citotoxicidad de las células asesinas naturales (NK), por otra parte influye en la activación de la vía JAK/STAT en particular STAT 4.

Se ha analizado la presencia de IL-12 en enfermedades causadas por parásitos tales como *Toxoplasma gondii*, que está caracterizada por la secreción de la citocina IL-12, además se observa que al inocular IL-12 en ratones deficientes de ésta citocina hay protección, llegando a sanar. Al estar ligada una inhibición de esta citocina puede influir en la alteración de la respuesta, disminuyendo la citotoxicidad de células NK y linfocitos T CD8⁺ activados^[53].

El TNF- α estimula la atracción de monocitos y neutrófilos a la zona de infección, promueve la secreción de quimiocinas por los macrófagos. Sin embargo secretado en grandes cantidades al torrente sanguíneo puede provocar un choque séptico. Se ha observado que TNF- α es el principal mediador de la respuesta inflamatoria aguda a patógenos; al provenir

directamente de macrófagos se le denomina como una citocina autocrina, debido a que promueve la atracción de neutrófilos y monocitos al sitio de la infección, la activación del factor nuclear de transcripción κ B (NF κ B), que facilita también la síntesis de óxido nítrico, siendo un efecto nocivo para las células efectoras, promueve el daño e incluso apoptosis de macrófagos, la regulación de esta citocina puede intervenir como un quimioatrayente de microorganismos patógenos por grandes cantidades de TNF- α [54]

E. histolytica entra a su hospedero por medio de alimentos contaminados con quistes, la primera barrera a la que se enfrenta el quiste es al pH de los jugos gástricos del estómago, que gracias a esos cambios de acidez se degrada el quiste y el parásito puede eclosionar. Al eclosionar se enfrenta con la respuesta inmune innata para adherirse a las células epiteliales del intestino, proceso mediado por la lectina Gal/Gal Nac, y al mismo tiempo se promueve una citólisis de las células epiteliales por medio del ameboporo resultando una necrosis celular. El proceso de necrosis son secretadas al epitelio intestinal las citocinas pro inflamatorias como pro-IL-1 α y pro-IL-1 β , contenidas en el citosol, en este proceso se observa que las proteasas de cisteína promueven la conversión de pro-IL-1 β a IL-1 β y de pro-IL-1 α a IL-1 α , además se induce la liberación de IL-8, una quimiocina atrayente de neutrófilos y macrófagos. Durante la invasión del parásito se ha observado que hay un reconocimiento específico por anticuerpos IgA. Los Neutrófilos polimorfonucleares (PMN) son las primeras células en llegar al sitio de reconocimiento [12].

En la mayoría de los experimentos con la inmunidad que desencadena la amibiasis se ha encontrado que se monta una respuesta TH1 que se caracteriza por altos niveles de IL-12, por lo que también hay una baja secreción de IL-10. Pero el estímulo crónico por parte de *E. histolytica* provoca un incremento de los niveles de IL-10 en linfocitos extraídos de absceso hepático. Este es un proceso de regulación de citocinas por parte del parásito, ya que se presenta un efecto inhibitorio en macrófagos ante la respuesta antiinflamatoria por parte de IL-10 [8, 13, 14].

La habilidad citotóxica del macrófago está reducida en la amibiasis hepática aguda, esto sugiere que la supresión de los macrófagos es principalmente un evento local. Se ha demostrado que el parásito es capaz de modular los eventos de reconocimiento, el procesamiento y presentación de antígeno^[15], de estas células fagocíticas; así como la modulación de la secreción de citocinas y producción de moléculas efectoras, tal es el caso del incremento en la secreción de TNF- α , lo que lleva al daño epitelial beneficiando la invasión del parásito, así también se ha documentado que la citocina TNF- α , es capaz de funcionar como un quimioatrayente, lo que promueve la llegada de más trofozoítos al sitio del daño, todo ello aunado a la secreción de IL-12^[16].

Durante la infección en humanos se desarrollan anticuerpos específicos contra *E. histolytica* particularmente del isotipo IgG. El 80% de los pacientes que desarrollan absceso hepático generan anticuerpos del isotipo IgA. A pesar de la generación de anticuerpos no se observa una protección contra *E. histolytica* ya que el parásito es capaz de evadir la respuesta inmune adaptativa generada^[8].

1.4.2 Moléculas de *E. histolytica* que participan en la evasión de la respuesta inmune

E. histolytica posee mecanismos para evadir o modificar la respuesta inmune del hospedero^[17]. Se ha demostrado que *E. histolytica* es capaz de modular el estallido respiratorio en PMN (polimorfonucleares) y monocitos. En PMN humanos se observó que al estar en contacto con el parásito, estas células presentaron una disminución dosis dependiente del estallido respiratorio^[18]. Esta reportado que la inhibición del estallido respiratorio, puede estar mediada por el factor inhibidor de locomoción de monocitos (MLIF), pues al purificar y poner en contacto este pentapéptido con células fagocíticas se observa un efecto semejante en la inhibición del estallido respiratorio^[18, 19]. También se ha demostrado que el MLIF es capaz de inhibir la producción de óxido nítrico hasta en un 50%^[20]. Por el contrario se ha observado que la cepa axénica virulenta de *E. histolytica* (HM1:IMSS) es capaz de inducir estallido respiratorio en monocitos humanos y este evento se ve potenciado cuando los macrófagos

se estimulan con el factor estimulador de colonias de macrófagos (MCSF), que está relacionado con la actividad microbicida, esto comprueba que el parásito utiliza el MLIF como factor de virulencia^[21]. Además MLIF es capaz de modificar el balance de la producción de citocinas pro-inflamatorias/anti-inflamatorias en los linfocitos T CD4, encontrando que en presencia de MLIF se disminuye la secreción de IL-1 β (una citocina pro-inflamatoria) e incrementa la secreción de IL-10 (citocina anti-inflamatoria)^[22].

Por otra parte, se ha observado que hay disminución en los niveles de fosforilación en un extracto total de proteínas en linfocitos T que han sido puestos en contacto con *E. histolytica*^[20]. Estos datos sugieren que *E. histolytica* puede intervenir en vías de señalización donde la fosforilación de proteínas es importante para generar mediadores de la respuesta inmune.

En microorganismos patogénicos como bacterias y parásitos, el sistema inmune tiende a reconocer PAMPs (Patrones moleculares asociados a patógenos) en la respuesta inmune innata, en el caso de *E. histolytica* se ha observado que el lipofosfopeptidoglicano (LPPG) es capaz de disminuir la expresión del gen del receptor tipo Toll 2 (TLR-2) en monocitos humanos y además el receptor TLR2 está involucrado en el reconocimiento de LPPG, en este análisis se observa que hay un incremento de la secreción de IL-10 e IL-12, lo que se interpreta como la inducción de la respuesta inmune innata por parte de la molécula, la cual es reconocida como un PAMP^[23].

1.5 Moléculas involucradas en la virulencia de *E. histolytica*

E. histolytica presenta numerosas moléculas en su superficie, de las cuales algunas contribuyen a la virulencia del parásito. Las más importantes se expresan durante la fase móvil y son: La lectina N-acetyl-D-galactosamina (Gal/Gal Nac), el ameboporo, proteasas de cisteína y posiblemente fosfatasa, que aun no se sabe si participan en la virulencia^[24, 25].

1.5.1 Lectina N-acetyl-D-galactosamina (Gal/Gal Nac)

La Gal/Gal Nac de *E. histolytica* es una proteína que se localiza en la membrana del parásito y consta de una unidad pesada (170 kDa) de Glicosil fosfatidil inositol (GPI) anclada a la subunidad ligera (30 kDa) y un dominio CXXC, contiene subunidades intermedias de GPI en la proteína, es un factor importante para la adhesión de los trofozoítos a la pared intestinal, lo cual favorece la invasión. La mucina del epitelio del intestino es altamente polivalente en residuos terminales Gal/Gal Nac y se une a la lectina con afinidad. En la interacción parásito hospedero esta lectina se requiere para la lisis de las células epiteliales^[26]. La Gal/Gal Nac no es la única proteína que participa en la adhesión del parásito a la pared intestinal ya que al adicionar β -D-galactosa, un inhibidor específico de Gal/Gal Nac, no se inhibe totalmente la adhesión de *E. histolytica* y esto sugiere que existen otras moléculas que intervienen en la adhesión^[26, 27].

1.5.2 Ameboporo

En 1982 se descubrió una familia de polipéptidos (ameboporo) que forman parte de la membrana del parásito que al entrar en contacto con algunas células forman canales iónicos o poros en la membrana mediante un proceso de oligomerización, desestabilizando a la célula blanco, lo que ocasiona más tarde la lisis^[5]. El ameboporo consiste de tres isoformas A, B y C, que están formadas por 77 residuos polipeptídicos y tienen una conformación alfa hélice con un residuo de histidina conservado en el extremo carboxilo terminal ^[28].

1.5.3 Proteasas de cisteína

Las proteasas de cisteína del parásito son importantes para la virulencia, se ha observado que la secreción de estas proteasas de cisteína provocan el daño en la matriz extracelular y son importantes para la sobrevivencia de *E. histolytica* [24]. Se han descubierto y estudiado distintas proteasas de cisteína de *E. histolytica* entre las que se presentan CP1, 2, 3, 4, 5 y 6, afines a distintos sustratos [29]. La proteasa CP5 es la más importante, tiene un peso molecular de 56 kDa y su presencia es única para *E. histolytica*, se encuentra en una proporción de 1000 a 10000 proteínas de este tipo por cada trofozoíto, esta proteasa de cisteína está asociada a la membrana y se ha comprobado que la mala transcripción del gen *cp5* (gen específico de CP5) impide una eritrofagocitosis, reduce la actividad de proteasa de cisteína y el parásito no tiene la capacidad de generar absceso hepático; este resultado se generó también cuando se utilizó un inhibidor de proteasa de cisteína mezclado con trofozoítos de *E. histolytica*, demostrando la importancia que tiene CP5 [29].

1.5.4 Fosfatasas ácidas en *E. histolytica*

Las fosfatasas son enzimas encargadas de desfosforilar proteínas fosforiladas. Dependiendo del fosfo-aminoácido en donde actúan pueden clasificarse en proteínas tirosinas fosfatasas o serina treonina fosfatasas. Se ha reportado que trofozoítos de *E. histolytica* contienen y secretan fosfatasas ácidas [30, 31]. Se ha caracterizado una proteína de membrana de *E. histolytica* de 55 kDa como una proteína tirosina fosfatasa (PTPasa). Al analizar el efecto de la proteína purificada sobre un cultivo de células epiteliales se observó la desfosforilación de proteínas como f-actina que participan de manera importante en la deformación del citoesqueleto de actina en cultivos de células HeLa lo cual muestra una alteración por parte la PTPasa de *E. histolytica* [32].

Nuestro grupo de trabajo encontró que esta PTPasa purificada de membrana de trofozoítos de *E. histolytica* inhibió el estallido respiratorio de neutrófilos estimulados con N-formil–metil-leucina-fenilalanina (f-MLP) y se sabe que este

compuesto induce la fosforilación en tirosina de proteínas que participan en la vía de señalización dependiente de receptor que lleva a la activación del estallido respiratorio, mientras que en las células que se activaron con acetato de forbol miristato (PMA) no se observó el mismo efecto, cabe señalar que el PMA activa una vía independiente de receptor. Hasta el momento se desconoce el punto específico de la vía de señalización que lleva a la activación del estallido respiratorio donde actúe esta enzima ^[33].

El efecto de las PTPasas sobre células de mamíferos ha sido ampliamente estudiado; sin embargo, se sabe muy poco acerca de las PTPasas de parásitos y su asociación con la virulencia de los mismos ^[34].

1.6 Antecedentes de Proteínas tirosinas fosfatasas en diferentes microorganismos

1.6.1 Virus

Vaccinia codifica para una PTPasa de 20 kDa llamada VH1, la cual se produce durante la infección del virus. El VH1 es un prototipo de estudio de una familia de PTPasas que pueden desfosforilar sustratos con residuos fosfotirosina y fosfoserina/treonina que tienden a estar involucrados directa e indirectamente en el ciclo celular, ya que la región activa de VH1 es similar al regulador mitótico Cdc25 la cual desfosforila la Cdc2 cinasa en los aminoácidos Thr14 (Treonina-) y Tyr 15 (Tirosina) para entrar a mitosis ^[34].

1.6.2 Bacterias

La bacteria *Yersinia sp.*, patógena en humanos, secreta factores de virulencia llamados Yops (proteínas de membrana externas de *Yersinia*) que inhiben la acción fagocítica en macrófagos. De las 10 Yops analizadas y descritas en el plásmido de virulencia de *Yersinia*, sólo YopH (que se conoce como Yop2b y Yop51) es una PTPasa y esta proteína está involucrada en la desfosforilación de proteínas fosforiladas en tirosina, responsables de la reorganización del citoesqueleto, así como también de fosfoproteínas importantes en la transducción de señales ^[34, 35].

Se analizó la capacidad que tiene YopH para inhibir la fosforilación inducida por zymosan. Esto se realizó utilizando cepas deficientes tanto del plásmido de virulencia (pYV) como del gen específico de YopH, así como también la cepa silvestre de *Yersinia enterocolitica*, este experimento se realizó con macrófagos y se encontró que la deficiencia del gen de YopH y el plásmido de virulencia son importantes en la desfosforilación de la célula infectada; más aún, se demostró una inhibición de manera dosis dependiente de bacterias, en donde se observó que aumentaban los niveles de desfosforilación y al mismo tiempo se observó que el decrecimiento de la fosforilación estaba directamente relacionado con la disminución del estallido respiratorio^[36].

La fosforilación y desfosforilación en tirosina son importantes en el funcionamiento del citoesqueleto en células eucariontes, un ejemplo son las adhesiones focales de cinasas, como paxilina, p130^{cas} y SKAP-HOM, pues se ha comprobado hasta ahora, que las responsables de la desfosforilación de estas proteínas como defensa ante la fagocitosis son las proteínas YopH y YopE de *Yersinia sp*^[37].

Se ha observado que el efecto de las Yops ante la fagocitosis y el estallido respiratorio son importantes para *Yersinia*. En el caso de las citocinas, al crear cepas deficientes de Yop (E y H), se observó que los niveles de secreción de la citocina IL-12 se incrementó, lo que sugiere que estas proteínas también son importantes en la secreción de IL-12, el mismo caso se observó con la secreción de TNF- α frente a la supresión de la YopE, con ello se demuestra que TNF- α e IL-12 son esenciales para una respuesta óptima a la actividad microbicida de macrófagos y neutrófilos, pero que *Yersinia* puede utilizar estas Yops como factor de virulencia^[38, 39]; la IL-12 promueve la secreción de IFN- γ , el cual incrementa la actividad microbicida principalmente en macrófagos, TNF- α promueve la síntesis de óxido nítrico (NOS). Las proteínas de *Yersinia* que demostraron mayor importancia fueron YopE y YopH, que le dan la capacidad a la bacteria para evadir el sistema inmune y llevar a cabo la infección^[40]. En *Mycobacterium tuberculosis* se presenta una PTPasa denominada MptpA, la

cual tuvo la capacidad de modular fosforilación en tirosina e inhibir la fagocitosis en macrófagos Raw264-7^[41].

La bacteria Gram-negativa *Prevotella intermedia*, produce una fosfatasa ácida con actividad de PTPasa denominada ACPasa, se identificó que puede estar relacionada con alteraciones en actividad y en modulación del ciclo celular, al estudiar estas características se dedujo que puede funcionar como un factor de virulencia ^[42]. Por otra parte; *Salmonella typhimurium* requiere de una PTPasa denominada SptP; esta proteína pesa 56 kDa, es codificada en la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* y es inyectada al citosol de la célula hospedera mediante un sistema de secreción de tipo III presente en esta bacteria. SptP promueve la despolimerización de actina mediante su unión a las proteínas de la familia de las GTPasas pequeñas Rho, que incluye a Cdc42, Rac1 y Rho ^[43].

1.6.3 Parásitos

Las PTPasas en algunos parásitos se han considerado como factores de virulencia, por ejemplo *Trypanosoma cruzi* tiene una PTPasa asociada a su membrana la cual es esencial en todas las fases del parásito. Las PTPasas pueden estar relacionadas con procesos de desfosforilación de proteínas en tirosina importantes en la señalización intracelular del citoesqueleto de actina, como en el caso de la PTPasa de *Entamoeba histolytica* pues se ha reportado que participa en el daño del citoesqueleto de actina de células HeLa^[31]. En el caso de *Trypanosoma brucei* existe una TbPTPasa, que es variable en las diferentes fases del ciclo de vida del parásito, esta PTPasa se considera como un factor de virulencia ya que el parásito al ser inoculado al hospedero vertebrado podría utilizar esta enzima en un medio ácido como el fagolisosoma y sobrevivir a estas condiciones para su proliferación^[44].

Recientemente se aisló una PTPasa asociada a la membrana de promastigotes que se expresa en mayor cantidad en la fase metacíclica (infectiva) que en la fase procíclica de *Leishmania major*. El tratamiento con inhibidores específicos de PTPasa disminuyó la actividad de la enzima; mientras que inhibidores de fosfatasas específicos de serina treonina no presentaron efecto. Por otra parte se logró el enriquecimiento de una proteína de alrededor de 55 kDa y se

comprobó que comparte epitopos con la PTPasa de placenta humana y la PTPasa de *Trypanosoma brucei*^[45].

Se ha encontrado que promastigotes de *Leishmania mexicana* secretan una proteína al medio de cultivo, la cual mostró una actividad de PTPasa y presentó reacción cruzada con los anticuerpos anti-PTPasa de placenta humana en un peso molecular de aproximadamente 50 kDa. Sin embargo, aún se desconoce la participación de esta PTPasa en el proceso de la virulencia del parásito^[46].

Se ha reportado la presencia de dos PTPasas en *Ascaris sum*, la primera tiene un peso molecular de 50-55 kDa y la segunda de 180 kDa, ambas proteínas purificadas presentan una reacción cruzada con el anticuerpo monoclonal anti-PTPasa 1B de placenta. Mediante inmunolocalización se encontró la presencia de la enzima en la lámina muscular y en los huevos fértiles y se cree que puede intervenir en la evasión de la respuesta inmune^[47].

2. Justificación

Se ha demostrado que la presencia de PTPasas en patógenos es esencial para su virulencia, como en el caso de *Yersinia* y *Salmonella*, estas bacterias son capaces de modular la entrada a sus células blanco modificando la respuesta inmune del hospedero a través de sus PTPasas ^[34]. Por otra parte se ha demostrado que cuando los linfocitos T CD8⁺ están en presencia de *E. histolytica* hay disminución en el grado de fosforilación de proteínas con residuos de tirosina^[22]; mientras que el contacto de la PTPasa de 55 kDa de *E. histolytica* con células epiteliales promueve la ruptura del citoesqueleto de actina debido a la desfosforilación de proteínas como F-actina^[25]. Estos datos demuestran que las PTPasas de *E. histolytica* pueden ser importantes en la virulencia del parásito; sin embargo, no se ha profundizado en el estudio del efecto de esta enzima en células fagocíticas que participan en la respuesta inmune, por ejemplo los macrófagos, ya que se ha reportado que esta célula fagocítica participa de manera fundamental en los procesos tempranos de invasión por trofozoítos. A la fecha no se sabe si las PTPasas de *E. histolytica* pueden intervenir en las vías de señalización de macrófagos involucrados en la producción de moléculas efectoras que permitan el control de la infección. El analizar el efecto de la PTPasa de *Entamoeba histolytica* en la activación del macrófago permitirá tener un mejor entendimiento de la interacción hospedero-parásito y de esta manera saber como es que *E. histolytica* es capaz de evadir la respuesta inmune del hospedero.

3.- Hipótesis

La proteína tirosina fosfatasa de *Entamoeba histolytica* modula la secreción de las citocinas IL-10, IL-12 y TNF- α de macrófagos murinos.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Estudiar el efecto de la proteína tirosina fosfatasa de *Entamoeba histolytica* en la secreción de citocinas (como IL-10, IL-12 y TNF- α) por macrófagos murinos.

4.2 Objetivos particulares

- ❖ Purificar la PTPasa de *E. histolytica* por cromatografía de afinidad e intercambio iónico
- ❖ Analizar el efecto de la PTPasa de *E. histolytica* en la secreción de citocinas como IL-10, IL-12 y TNF- α , en macrófagos murinos derivados de médula ósea.

5.- Material y métodos

5.1 Cosecha de trofozoítos

La cepa que se utilizó para el estudio fue *Entamoeba histolytica* (HM1-IMSS), que fue donada por la Dra. Patricia Talamás del CINVESTAV-IPN. Las cajas de cultivo se colocaron en hielo durante 20 min para desprender a los trofozoítos. Una vez que se desprendieron, los trofozoítos se centrifugaron en una centrífuga modelo “eppendorf centrifuge” 5810R en tubos cónicos de 50 ml a 1500 rpm por 5 min a 4°C, el sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en PBS, nuevamente se centrifugó a 1500 rpm por 5 min a 4°C y se repitió la operación; se hizo otro lavado en el que se tomó una alícuota para el conteo de parásitos y la pastilla final se guardó a -70° C hasta su fraccionamiento.

5.2 Obtención de la proteína tirosina fosfatasa de *Entamoeba histolytica*

5.2.1 Lisis de trofozoítos de *E. histolytica* y obtención de la fracción solubilizada

La lisis se realizó siguiendo el protocolo reportado por Aguirre y cols. (2000). 100 millones de trofozoítos se descongelaron y se resuspendieron en buffer de lisis que contenía imidazol 10 mM, 2 µg/mL de leupeptina, 10 µg/mL de aprotinina, 5 mM de EDTA y 1mM de benzamidina, para cada 5 millones de trofozoítos se adicionó 1 ml del buffer de lisis. Se colocó en un tubo de 50 ml y se sonicó en un aparato “SONICS Vibra-cell” a una potencia del 37 % de amplitud de onda de sonido durante 10 min a 4 °C, se verificó la lisis al microscopio óptico. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm (SORVALL RC 6 PLUS) durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante 1 (SN1) se guardó a 4 °C y la pastilla (P1) se resuspendió en buffer de lisis al que se le adicionó Tritón X-100 al 2 %, la muestra permaneció en hielo durante 1 hora agitándose cada 15

minutos. Se centrifugó durante 15 min a 12000 rpm a 4 °C. Al sobrenadante 2 (SN2) se le agregó glicerol al 20 % y se guardó en alícuotas de 7 ml para su posterior uso, la pastilla 2 (P2) se resuspendió en buffer de lisis. Se determinó la actividad enzimática del fraccionamiento, finalmente se cuantificó la proteína y guardando las alícuotas a -70°C para su uso posterior en la purificación de la proteína.

5.3 Cuantificación de proteína^[48]

Para cuantificar las proteínas se usó un ensayo colorimétrico en muestras con y sin detergente. El ensayo se basó en la reacción de la proteína en muestras con una solución de tartrato de cobre alcalino y el reactivo de Folin. La reacción se llevó a cabo entre la proteína y el cobre en medio alcalino y la subsecuente reducción del reactivo de Folin por el complejo, desarrollando un color azul (reacción de Bradford). Las muestras que se analizaron en esta prueba fueron extracto total (Et) sobrenadante 1 (SN1), pastilla 1 (P1), sobrenadante 2 (SN2) y pastilla 2 (P2) siendo las últimas tres muestras las que contenían detergente Tritón X-100 al 2 % fueron analizadas.

Se comparó con una curva patrón de 0.5, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15 µg de albúmina bovina. La mezcla se incubó 15 min a temperatura ambiente y se analizó a una absorbancia de 750 nm. Por último los resultados se extrapolan en una curva de albúmina sérica bovina.

5.3.1 Purificación de la PTPasa de *E. histolytica* por cromatografía de afinidad (Concanavalina A-Sefarosa e Intercambio iónico DEAE–celulosa)

La purificación de la enzima se llevó a cabo de acuerdo al protocolo previamente reportado^[49]. La fracción membranal solubilizada fue pasada a través de una columna de afinidad de ConA–sefaraosa (Sigma- Aldrich catalog # C9017-25ML), previamente equilibrada con amortiguador de fosfatos que contenía Ca⁺² y Mg⁺² (0.68 mM de CaCl₂ y 0.49 mM de MgCl₂ . 6H₂O). La enzima fue eluída con el mismo amortiguador que contenía 0.1 M de αMM(alfa metil manopiranosido). Posteriormente el pico con mayor actividad enzimática

proveniente de la columna de afinidad fue pasado a través de cromatografía de intercambio iónico por una columna de DEAE-celulosa (dextrosa de intercambio iónico) previamente equilibrada con Tris 10 mM pH 7.4, NaCl 50 mM y 10 μ M de α -MM. La enzima fue eluída con un gradiente de NaCl (50-400mM) en Tris 10 mM pH 7, con 10 μ M de α -MM. Las fracciones que se colectaron con actividad de fosfatasas ácidas de ambas columnas fueron analizadas en geles al 10% (SDS-PAGE).

5.4 Actividad de fosfatasa ácida

Se utilizó una microplaca de 96 pozos en donde se colocó 1 μ l del SN1 y SN2, a una dilución 1:10 y para las otras muestras [P1 y P2 N.U.(no unido) Lavados, eluídos] se adicionaron 10 μ l de cada uno y 80 μ l de amortiguador de acetato de sodio 0.2 M pH 5; y 10 μ l de p-NPP 0.1 M. La placa se incubó a 37 °C durante 1hr y la reacción se detuvo con 20 μ l de NaOH 2 N. Por último se analizó la reacción de las muestras en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm (cada condición por duplicado).

5.5 Electroforesis en gel SDS-PAGE

Se tomaron los eluídos con mayor actividad correspondientes a ambas columnas, Con-A, DEAE y se precipitaron en acetona, en una proporción 1:10 v/v, durante 24 hrs, después, los eluídos precipitados en acetona fueron centrifugados a 12000 rpm a 4 °C durante 10 min, se retiró y evaporó la acetona, se agregó buffer muestra con β -mercaptoetanol y se hirvieron las muestras durante 5 min a 95 °C. Después las muestras se corrieron en un gel SDS-PAGE al 10 %, a un voltaje constante (120mV).

5.6 Tinción con plata

El gel obtenido de la electroforesis se fijó en solución desteñidora durante 30 min a temperatura ambiente en agitación constante, se lavó 4 veces con agua bidestilada por 40 min, con cambios cada 10min; se preparó la solución teñidora (H₂O, SCS [Silver Complex Solution catalog.#161-0462] RMS [Reduction Moderador solution catalog # 161-0463] IDR[Image development reagent catalog # 161-0464] kit de Bio-rad), se mezcló bien y se agregaron 5 ml del acelerador, se le agregó al gel, se agitó constantemente hasta que se observó una tinción café en el gel, distinguiendo bandas de peso molecular y de la proteína que se buscó; por último se agregó el ácido acético al 1% para detener la reacción.

5.7 Obtención de macrófagos a partir de médula ósea de ratón BALB/c

Se extrajo la médula ósea del fémur de ratones hembras de 6 a 8 semanas de edad de la cepa BALB/c. Las células obtenidas se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 min a 4°C. Las células se cultivaron en cajas Petri de 10 cm con medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 100µl de L-Glutamina y 1µl de M-CSF murino recombinante por cada 10ml del total para diferenciar las células progenitoras a macrófagos. El cultivo se continuó durante 7 días a 37 °C y 5 % de CO₂. Posteriormente se desprendieron las células adheridas a las cajas Falcon con PBS a 4°C, se determinó el número de células y se colocaron en placas de 24 pozos para ser estimuladas en proporción de un millón de células por mililitro de medio DMEM para cada condición.

5.8 Estimulación de los macrófagos de médula ósea de ratón

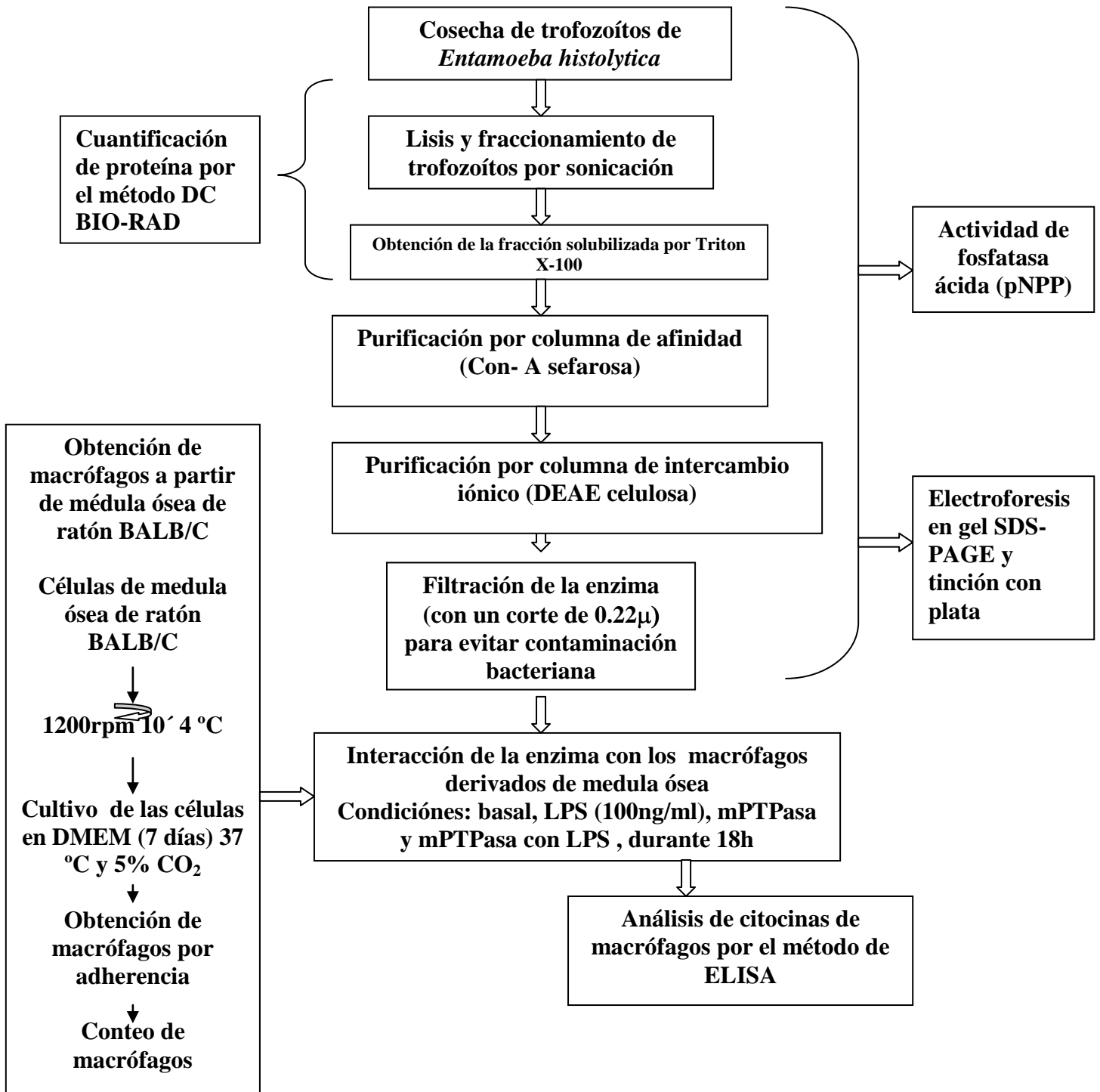
Una vez diferenciados los macrófagos, se colocaron 1X10⁶ células para cada condición asignada durante 18 hrs., células con medio DMEM solo, con 100 ng/mL de LPS y 400 µl de la PTPasa, esta dosis de enzima fue a partir de pruebas dosis dependientes, probando que la cantidad de enzima optima fué de 400µl para estimular las células. Posteriormente se colectaron las células

con el sobrenadante, se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min y se obtuvo el sobrenadante para determinar las citocinas.

5.9 Cuantificación de citocinas por el método de ELISA

Se cuantificó la cantidad de TNF- α , IL-12p40 e IL-10 presente en los sobrenadantes. Para cada citocina se utilizaron las siguientes concentraciones de anticuerpo de captura: 2 μ l/mL disuelto en buffer de unión fosfato dibásico de sodio 0.1 M a pH 6 para TNF- α ; 1 μ l/mL para IL-12 p40 y 2.5 μ l/mL para IL-10 disueltos en buffer de unión fosfato dibásico de sodio pH 9. Se colocaron 50 μ l por pozo y se incubó durante toda la noche a 4⁰C. Las placas se lavaron cuatro veces con una solución PBS 1X y 0.01% de Tween 80. La placa se bloqueó con 200 μ l de la solución bloqueadora (NaOH 1N diluido en PBS 1X pH=7, con 5gr de Caseína [SIGMA catalog # C-7078]) durante 30 min a temperatura ambiente. Después se lavó la placa 3 veces; se colocaron 100 μ l por pozo para la curva estándar así como de las muestras, la curva estándar consiste de una serie de diluciones de la citocina recombinante y sirve como control positivo, se incubó a 4⁰C durante toda la noche. Transcurrido el tiempo de incubación la placa se lavó 4 veces, se colocó el anticuerpo de detección (el anticuerpo de detección se diluye en albumina bovina al 1% con 0.05% de tween 20) se colocaron 100 μ l por pozo del anticuerpo de detección y se incubó 1 hora a temperatura ambiente; (se utilizó una concentración de anticuerpo de detección 2 μ l/ml para TNF- α ; 0.5 μ l/ml para IL-12; 1 μ l/ml para IL-10). Se lavó la placa 6 veces. Se colocaron 100 μ l de estreptavidina-fosfatasa alcalina a una dilución 1:2000 en albúmina bovina al 1% con 0.05% de Tween 20. Se incubó por 30 min. a temperatura ambiente. La placa se lavó 8 veces. Por último se preparó la solución reveladora (compuesta por un buffer de sustrato y el sustrato de fosfatasa pNPP), se colocaron 100 μ l por pozo, se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad. La placa se analizó en un espectrofotómetro (312e BIO-TEK Instruments) a una longitud de onda de 405 nm. Se construyó una curva patrón obteniendo las concentraciones para las citocinas en pg/ml.

5.9.1 Diagrama de flujo de la metodología utilizada



6. Resultados

6.1 Actividad específica en fraccionamiento subcelular de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*

Antes de purificar la proteína se analizó la actividad específica en todas las fracciones subcelulares: Et, SN1, P1, SN2 y P2. En la Figura 1 se muestra la actividad específica de las fracciones subcelulares de los trofozoítos de *E. histolytica*, se seleccionó la fracción de mayor actividad específica que fue la fracción SN2 para el proceso de purificación.

6.2 Purificación de la PTPasa

En la Figura 2A se observó el patrón típico de elución de la columna de afinidad. La fracción solubilizada se pasó a través de la columna de Con-A sefarosa y el material fue eluido con 0.1 M de α -MM, resultando un pico de actividad. Este pico de mayor actividad enzimática fue pasado a través de una columna de DEAE-celulosa (Fig. 2B). Este paso de fraccionamiento se usó para incrementar la pureza y actividad enzimática.

6.3 Análisis electroforético del perfil de proteínas eluidas de columnas de Concanavalina- A y DEAE-Celulosa.

El análisis electroforético de las proteínas obtenidas, presentó un patrón de varias proteínas en la muestra del material eluido de la columna de Con-A. Sin embargo el material eluido de la columna de DEAE presentó un enriquecimiento de la proteína en donde se presenta una banda que representa una proteína de aproximadamente 55 kDa. En la Figura 3A en la columna 1 se observó a los marcadores de peso molecular y en la columna 2 a la proteína purificada, en donde se apreció la presencia de 4 proteínas de aproximadamente 20, 29, 55 y 60 kDa. En la figura 3B se muestran los análisis de los eluidos provenientes de la columna de DEAE-celulosa, en 1, los marcadores de peso molecular y en 2 los eluidos precipitados con acetona,

donde se observó una molécula única con un peso molecular de 55 kDa aproximadamente.

6.4 Efecto de la PTPasa de *E. histolytica* en la producción de IL-10 por macrófagos derivados de médula ósea

La cuantificación de IL-10 se realizó mediante ELISA. En la Figura 4 se observó que el efecto que ejerció la enzima purificada es notable, y esto se observó al comparar la condición de los macrófagos no estimulados, que presentaron una secreción basal de 121 pg/ml de la citocina, sin embargo, con la condición de los macrófagos más la PTPasa, en donde hay un incremento que induce la enzima, este incremento se pudo analizar en 256 pg/ml y es más notable cuando los macrófagos son estimulados con el LPS y la PTPasa, pues se observa una secreción 4 veces más que el basal.

6.5 Efecto de la PTPasa de *E. histolytica* en la producción de IL-12 por macrófagos derivados de médula ósea

En la Figura 5 se muestra el efecto de la PTPasa en la producción de IL-12 por macrófagos. Se observa un incremento en la secreción de hasta 7 veces de IL-12 por macrófagos incubados con la PTPasa con una concentración de (4187 pg/ml) en comparación con el basal (737 pg/ml). Sin embargo, este incremento resulta menor si se compara con el control positivo que es el estímulo con LPS, cuando los macrófagos se estimulan con LPS y la PTPasa se observa que el incremento que logra el LPS es por la PTPasa de *E. histolytica*.

6.6 Efecto de la PTPasa de *E. histolytica* en la producción de TNF- α por macrófagos derivados de médula ósea.

En la Figura 6 se observa un incremento en la secreción de TNF- α en los macrófagos que fueron estimulados con LPS y con la PTPasa, pero también se observó un incremento mayor en la secreción de esta citocina cuando los macrófagos fueron estimulados con LPS y la PTPasa(2100 pg/ml) al mismo tiempo. Como control se adicionó polimixina B para descartar que la secreción de TNF- α fuera ocasionada por el LPS contaminante; cuando los macrófagos fueron estimulados con la PTPasa y tratados con polimixina hubo secreción de TNF- α lo que comprueba que esta producción de TNF- α es inducida por la PTPasa amibiana.

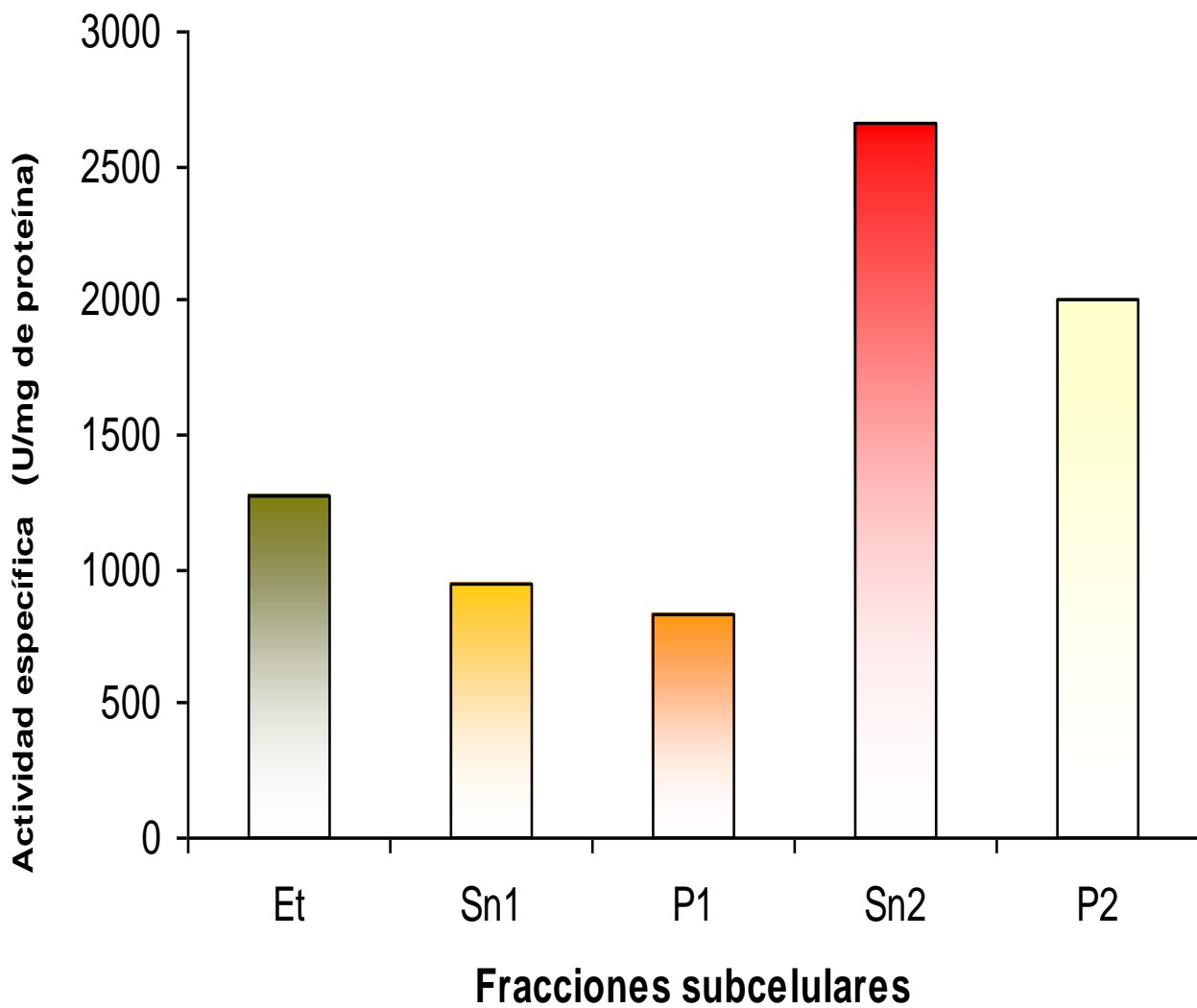


Fig. 1 Donde “U” representa la densidad óptica sobre los mg de proteína, experimento representativo de un total de 4
Et; Extracto total, Sn1:Sobrenadante 1, P1: pastilla 1, Sn2 sobrenadante 2, P2, pastilla 2

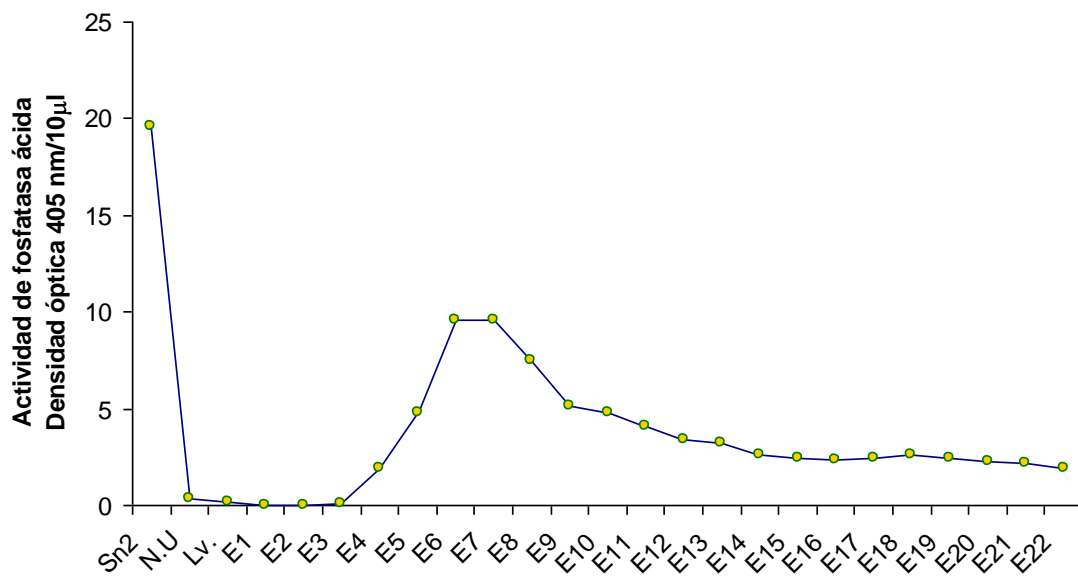
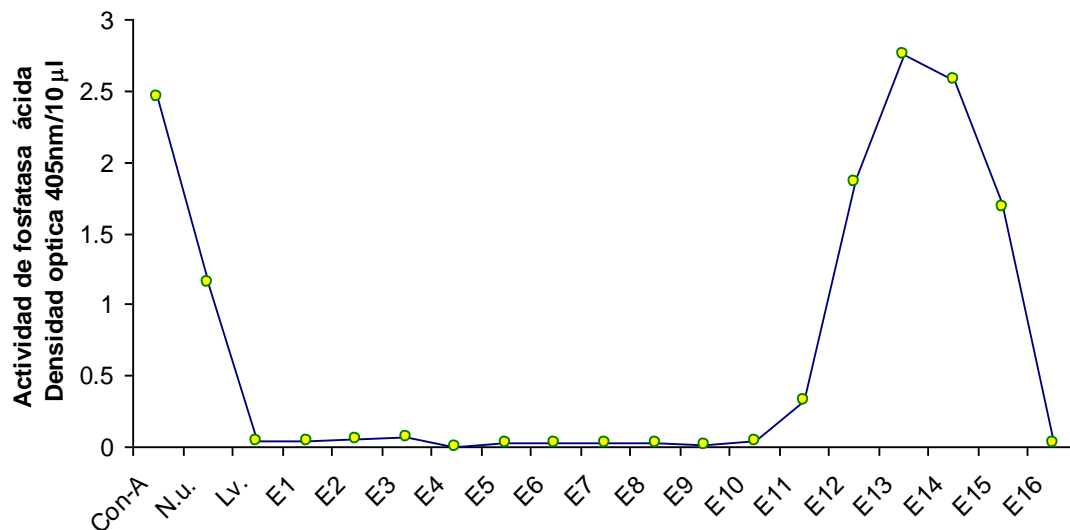
A**B**

Fig. 2 Purificación de la PTPasa por cromatografía de columna de afinidad (Concavalina-A sefarosa) y cromatografía de columna de intercambio iónico (DEAE-celulosa) actividad en eluidos (E1.....E22...)
A) Purificación por Con-A
B) Purificación por DEAE-celulosa

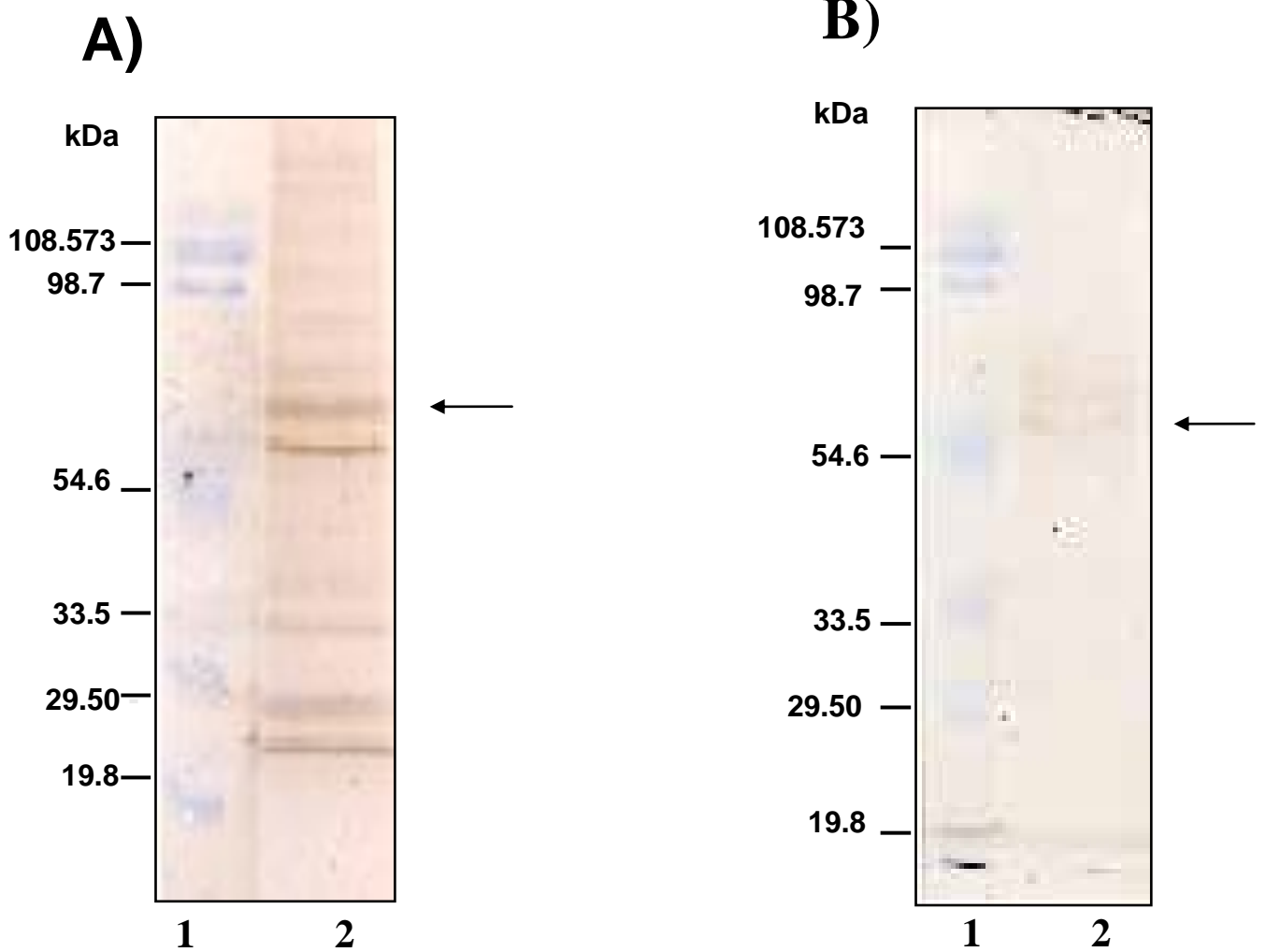


Fig. 3 Análisis electroforético del proceso de purificación de de la PTPasa de *E. histolytica* . (A) Purificación por Con-A, (B) Purificación por DEAE.
 1.- Marcador de Peso molecular
 2.- Eluídos provenientes de las columna de Con-A y DEAE celulosa

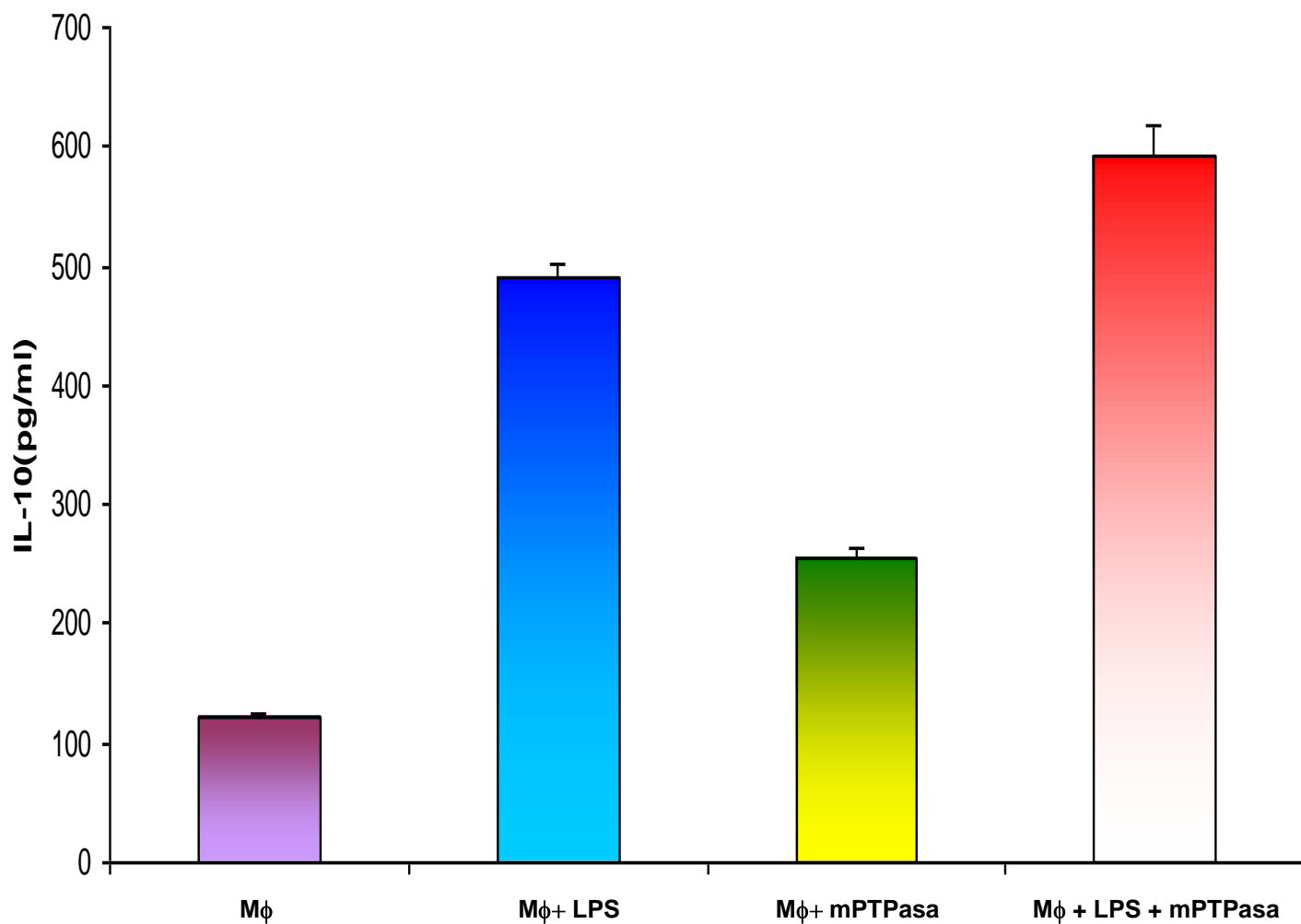


Fig 4 Efecto de la PTPasa de *Entamoeba histolytica* en la producción de IL-10 por macrófagos derivados de médula ósea. Condiciones: macrófagos sin estímulo (Mφ), macrófagos más lipopolisacrido (Mφ+LPS), macrófagos más la PTPasa ambiana (Mφ+mPTPasa), macrófagos más lipopolisacridos más la PTPasa (Mφ+LPS+mPTPasa) n=4

Las barras representan el promedio \pm el error estándar de 4 experimentos por grupo, se encontraron diferencias significativas entre las diferentes condiciones y el basal (* p < 0.05)

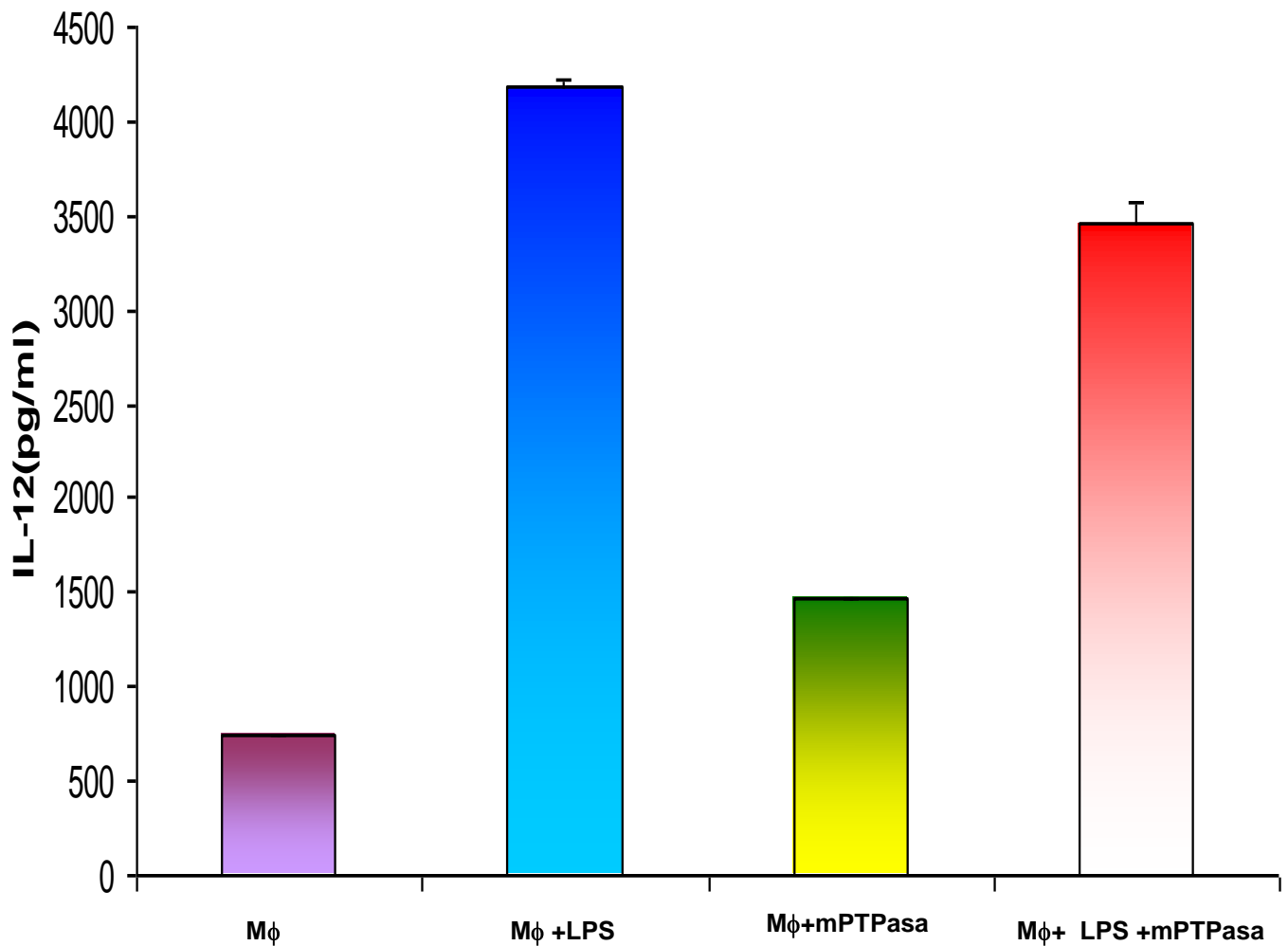


Fig. 5 Efecto de la PTPasa de *E. histolytica* en la producción de IL-12 por macrófagos derivados de medula ósea. MQ: macrófagos sin estímulo, Mφ+LPS: macrófagos estimulados con lipopolisacarido, Mφ+PTP: macrófagos más la PTPasa, Mφ+LPS+PTP: macrófagos mas lipolisacarido mas la PTPasa amibiana

n=4

Las barras representan el promedio \pm el error estándar de 4 experimentos por grupo, se encontraron diferencias significativas entre las diferentes condiciones y el basal (* p < 0.05)

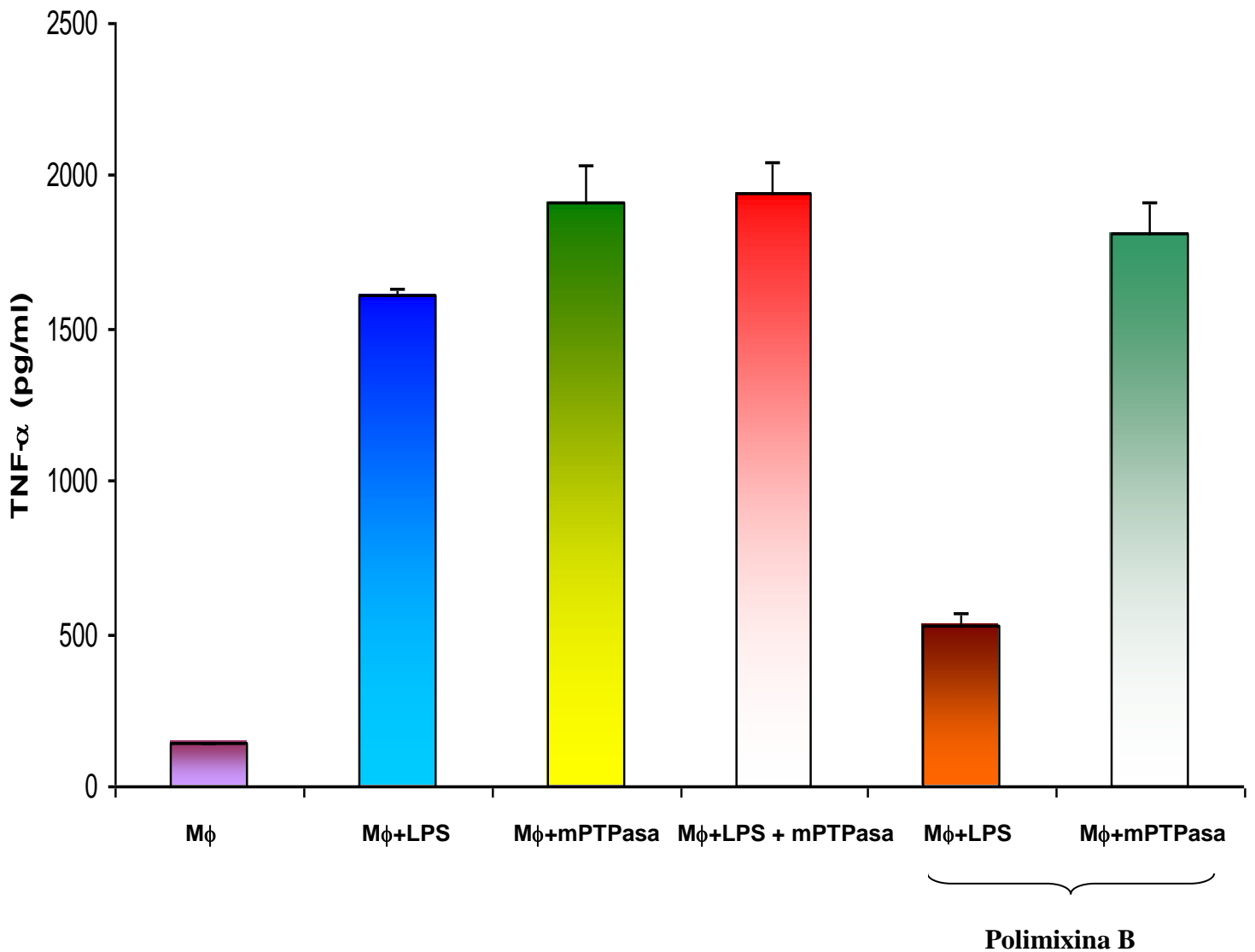


Fig. 6 Efecto de la PTPasa de *E. histolytica* en la producción de TNF- α por macrófagos derivados de médula ósea.

Mφ: macrófagos sin estímulo, Mφ+LPS: Macrófagos estimulados con lipopolisacrido(100 ng/ml), Mφ+mPTPasa(400 μ l): macrófagos mas la PTPasa, Mφ+LPS+PTPasa: macrófagos mas lipolisacrido mas la PTPasa (400 μ l). Y otras condiciones Mφ+LPS y Mφ+PTPasa(400 μ l), usando Polimixina B.

n=4

Las barras representan el promedio \pm el error estándar de 4 experimentos por grupo, se encontraron diferencias significativas entre las diferentes condiciones y el basal (* p < 0.05)

7.- Discusión

Las proteínas tirosinas fosfatasas juegan un papel importante en múltiples funciones celulares tales como activación, proliferación y diferenciación. Las PTPasas participan en la defosforilación de residuos de tirosina de varios procesos fisiológicos esenciales. Se ha encontrado que el balance en los eventos de fosforilación es importante en diversas patologías como diabetes, cáncer y auto inmunidad^[50]. Es por ello que se les ha considerado un aditamento más de algunos patógenos.

Los microorganismos patógenos como virus, bacterias y tal vez parásitos han usado estas PTPasas para evadir la respuesta inmune del hospedero a su conveniencia, un ejemplo es la influencia de las Yops de *Yersinia enterocolitica* para poder resistir la fagocitosis, en donde también se asocia la Yop D a la inhibición del estallido respiratorio y la MtpA de *Mycobacterium tuberculosis* que inhibe la fagocitosis^[37, 41], lo que tienen en común estos microorganismos patógenos es la habilidad para modular la desfosforilación en tirosina por PTPasas que ellos poseen^[51]. Debido a los antecedentes^[51] es posible que las PTPasas en parásitos y en particular *E. histolytica* puedan tener la capacidad de modificar también el efecto de células del sistema inmune del hospedero, puesto que se ha demostrado que las proteínas de este tipo tanto de membrana como de secreción en este parásito pueden ocasionar destrucción de citoesqueleto en células HeLa ^[25, 32].

En *E. histolytica* actualmente no se conoce del todo si las PTPasas juegan un papel importante en la virulencia y que posiblemente intervengan en la invasión del trofozoíto. Hasta ahora solo hay estudios acerca de los factores de virulencia de *E. histolytica* como ameboporo, la lectina Gal/Gal Nac y proteasas de cisteína; puesto que no se ha estudiado mucho acerca de posibles proteínas fosfatasas de *E. histolytica* que intervengan de manera directa o indirecta en el sistema inmune. La importancia de este estudio radicó en la posible participación de esta proteína purificada en la activación de macrófagos murinos.

Los mecanismos de reconocimiento de moléculas durante la fagocitosis en las células del sistema inmune, en este caso en el macrófago, tienden a ser dirigidos por distintos procesos de fosforilación en tirosina. En el caso de la amibiasis se sabe que el macrófago juega un papel importante en las etapas tempranas de la infección. Posiblemente moléculas presentes en la superficie del trofozoíto de *Entamoeba histolytica* son las principales en evitar la activación del macrófago. El macrófago es una célula fagocítica por excelencia, durante la activación de esta célula ocurren procesos de señalización involucrándose la fosforilación y desfosforilación de proteínas, como en las cascadas de señalización de JAK/STAT o MAPquinasas; esta célula se caracteriza por presentar mecanismos microbicidas muy potentes, como la generación de óxido nítrico y de radicales libres del oxígeno como el estallido respiratorio, el macrófago también se considera como una célula presentadora de antígeno proceso que es mediado por el complejo principal de histocompatibilidad clase II, el macrófago interactúa con linfocitos presentando el antígeno procesado y además al mismo tiempo los linfocitos activados estimulan al macrófago^[52]. La importancia del macrófago radica en la inflamación, esta célula es atraída por la quimiocina IL-8, generada por la activación de IL-1 β , al mismo tiempo se genera una secreción de altos niveles de TNF- α que promueve la inflamación en el sitio de interacción.

Se purificó una molécula de membrana de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* y se observó que al final de la purificación en la fracción membranal se detectó una actividad específica de fosfatasa ácida alta; este estudio demostró que además de la PTPasa de interés, hay una gran cantidad de proteínas presentes en la membrana del trofozoíto, que aún no se conoce su función, recordando que la desfosforilación presentada en células del hospedero en estudios anteriores, esta asociada a proteínas de membrana del parásito

Por otra parte, la regulación de citocinas pro y anti-inflamatorias se asocia con las PTPasas de microorganismos patógenos; Las PTPasas de bacterias patógenas como *Yersinia sp.* contribuyen a la inhibición de la secreción de las

citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-2 (esta última citocina responsable de la proliferación de linfocitos T)^[53]. Por otra parte en parásitos protozoarios se ha observado la capacidad de disminuir la inmunopatología, que se desencadena en el sistema inmune, ya sea por la inhibición de citocinas pro-inflamatorias, a su vez aumentando las anti-inflamatorias como la IL-10^[54].

La citocina IL-10 se ha caracterizado como una citocina inmunoregulatoria durante la infección causada por parásitos protozoarios, debido a que disminuye la respuesta Th1 así como la respuesta de células TCD8 (que se caracterizan por una alta secreción de INF γ y TNF- α). La IL-10 promueve la inhibición del complejo principal de histocompatibilidad II (MHC II), limitando la producción de citocinas pro-inflamatorias y la presentación de antígenos^[54].

Se puede observar en los resultados que la PTPasa de *Entamoeba histolytica* aumentó la secreción de la citocina IL-10, tanto como el control de LPS, se ha reportado que parásitos protozoarios como *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp y *Trypanosoma cruzi*, tienen la capacidad de aumentar la secreción de esta citocina. Inclusive al interactuar el LPS con la PTPasa se observó un aumento mayor, esta activación posiblemente este relacionada con reportes bibliográficos que han sugerido que *E. histolytica* interactúa con bacterias Gram negativas como *Shigella dysenteriae* y *E. coli*; que al entrar en contacto con estas se desencadena una motilidad y adhesión mas intensa por parte del parásito, algo que se presenta con un 70% de viabilidad de las bacterias fagocitadas por la amiba^[55]; al analizar esta interacción se relacionaría como estímulo que fomentaría una reacción de activación por parte del LPS junto con la PTPasa, que en un caso especial interactuarían tanto el LPS como la PTPasa, aunque cabe señalar que en modelos murinos se ha encontrado que el protozooario *E. histolytica* inhibe la secreción de IL-10^[56], algo que sería ligado con la interacción de todo el parásito, mas no con una sola molécula, puesto que en altos niveles de IL-10 es susceptible el hospedero a infecciones por parásitos^[57]. Además se ha demostrado que hay un péptido anti-inflamatorio denominado factor inhibidor de locomoción de monocitos (MLIF), que tiene la capacidad de aumentar la citocina anti-inflamatoria IL-10. Este péptido también se ha observado que inhibe estallido respiratorio de monocitos ambas

funciones son muy semejantes a las observadas que presenta la PTPasa amibiana que purificamos^[33].

Sin embargo, se observó que la PTPasa de *Entamoeba histolytica* indujo la secreción de IL-10 como de IL-12 lo que no coincide con el balance esperado por la tendencia de mayor secreción de IL-10 y menor secreción de IL-12^[52], este resultado tendría una relación con lo que se ha observado con la LPPG de *E. histolytica*, que induce la secreción de ambas citocinas en la respuesta inmune innata^[23]. Esto a su vez podría ser una alternativa que le permitiría interaccionar frente al epitelio celular del intestino, para después al interaccionar con más células del hospedero modificar la secreción de citocinas para su beneficio, que con la PTPasa, en este caso una sola molécula, promover otras funciones como la secreción de la citocina IL-12; inducir los niveles altos de IL-12 ayudaría a que migren células NK al sitio de la invasión, al mismo tiempo la secreción de INF- γ activaría mas macrófagos secretando a su vez citocinas pro-inflamatorias como el TNF- α , un complejo adicional para poder generar una lesión periférica^[58, 59].

Se percibió que la PTPasa de *E. histolytica* incrementó los niveles altos de TNF- α , se ha reportado que con la secreción de TNF- α hay una mayor atracción de macrófagos y neutrófilos, generando al mismo tiempo radicales libres del oxígeno, y generando a su vez estallido respiratorio^[33], donde el daño no solo puede ser ocasionado por el parásito, sino también por las células efectoras(macrófagos, NK, neutrófilos), o por la lisis de las células involucradas en el proceso de la respuesta inmune durante la inflamación^[60]. Por otro lado al activar el factor nuclear de transcripción *kappa* B a través de la secreción de TNF- α , generaría una mayor cantidad de moléculas efectoras en donde se provocaría un daño al tejido del parénquima intestinal y hepático, esto ayudaría a una mejor invasión y la posibilidad de que el parásito utilice esta señalización como quimioatrayente, todo esto estaria relacionado con lo que se ha observado, que al existir mayor secreción de TNF- α hay movilidad de trofozoítos hacia el sitio de la respuesta como un quimioatrayente, encontrándose también que TNF- α es una citocina con mayor frecuencia en

enfermedades gastrointestinales y parasitarias^[61, 62]; puede ser un mecanismo involucrado, aunque aun no se sabe específicamente a que nivel pueda ser activado. Múltiples procesos celulares están involucrados en fosforilación en residuos tirosina, que involucran la participación de vías de señalización como JAK/STAT y MAPquinasas, se sabe que multiples fosfatasa y cinasas participan en estas vías de señalización.

La PTPasa de *E. histolytica* puede estar involucrada también como un PAMP (patrón molecular asociado a membrana de patógeno), aunque no se ha demostrado que es reconocido por PRRs (receptores de reconocimiento de patrones) de células del sistema inmune^[23].

Al conocer todas las moléculas que intervienen durante el proceso de invasión del parásito puede ocurrir una sincronía en el uso de estas, que posiblemente intervengan como herramientas útiles y como accesorios que promueven un mayor daño en su momento adecuado. Por ello se analizó si la PTPasa puede constituir un factor de virulencia, tal vez utilizando sustratos específicos en las vías de señalización del hospedero y de esta manera promover una evasión del sistema inmune. Algo que se podría sugerir también es, que *E. histolytica* tendría esta alternativa como un mecanismo semejante a un tipo de secreción III como el de *Salmonella*^[63], no siendo como tal, pero teniendo una correlación en la adhesión al epitelio por la Gal-Gal Nac, la formación de ameboporo, que además de promover lisis celular, fomentaría la introducción de enzimas como la PTPasa de membrana de *E. histolytica* la cual también se ha encontrado que puede ser secretada al exterior.

La posible asociación de bacterias gram negativas, que aún no se ha comprobado, pero puede ser una alternativa que también sea utilizada durante el daño epitelial. Con este tipo de alternativa, la modulación de citocinas promovería la respuesta de macrófagos con la de neutrófilos y causaría la patogenia de este parásito protozoario causante de la amibiasis.

En este caso sería también una alternativa, el regular la respuesta inmune de acuerdo a las vías de señalización involucradas con PAMPs, que se desencadenan con patógenos al estar frente a las células de la respuesta inmune innata, pudiendo funcionar la PTPasa tanto como un PAMP o como una enzima activa dentro del citoplasma de la célula afectada; esto se puede

comparar con moléculas semejantes en procariontes que a su vez utilizan estas PTPasas como medios de patogénesis, en el caso de *Salmonella*^[63] y *Yersinia*^[35], pues ocurre un efecto en la desestructuración de citoesqueleto algo semejante ya reportado en *E. histolytica*^[25], en donde hay proteínas de citoesqueleto fosforiladas en residuos tirosina, siendo un blanco para las PTPasas de microorganismos patógenos. Para TNF- α e IL-12 se sabe que son citocinas esenciales para la respuesta de los macrófagos y neutrófilos, durante la invasión por *Yersinia* son suprimidas estas citocinas por la YopH^[38, 39], *E. histolytica* al contar con estas citocinas como quimioatrayentes puede promover mayor daño, puesto que TNF- α implica la secreción de radicales libres del oxígeno así como la permeabilidad de la membrana de células epiteliales y la atracción de neutrófilos y macrófagos al sitio del daño.

En estudios anteriores solo se ha observado el efecto del parásito total durante la respuesta inmune humoral efectora, por lo que una proteína específica podría ser un aditamento mas en el efecto que ejerce *Entamoeba histolytica* hacia las células del hospedero.

La activación de macrófagos depende de la generación de citocinas específicas en el sistema inmune, el promover un desequilibrio al organismo, ya sea por la disminución o aumento de estas, así como la intervención en la síntesis de citocinas puede generar una ventaja del parásito o microorganismo patógeno frente a la respuesta inmune del hospedero, puesto que en algunas vías de señalización se requieren procesos mediados por fosforilación, lo que algunos microorganismos ya han modificado co-evolutivamente^[50].

Se ha observado recientemente la capacidad en los patógenos para modificar esa fosforilación siendo una estrategia que ha demostrado tener éxito durante la patogénesis, un caso muy peculiar es la desfosforilación de proteínas a nivel de citoesqueleto, impidiendo la fagocitosis, pero posiblemente el intervenir en procesos de señalización ayude también a impedir mecanismos microbicidas. Un ejemplo es la vía de señalización la JAK/STAT, que es un proceso regulado por receptores fosforilados en tirosina que a su vez requieren fosforilación y desfosforilación; principalmente llevan a cabo funciones importantes, tal es el

caso de la activación de mecanismos microbicidas. Este trabajo abre un nuevo panorama del cual resulta interesante analizar la posible vía de señalización en el macrófago a través de la cual participa esta PTPasa de *E. histolytica* al inducir la secreción de citocinas

8. Conclusiones

Este estudio permitió concluir que *E. histolytica* cuenta con una PTPasa que participó en el estímulo de la secreción de las citocinas IL-10, IL-12 y TNF- α , algo que no se había estudiado con esta enzima purificada frente a macrófagos murinos.

Hasta el momento se desconoce en qué vía pudiera afectar esta enzima a nivel celular, pero es probable que sea una molécula más del parásito utilizada durante la invasión como un aditamento que le permita su sobrevivencia dentro del hospedero,

9. Bibliografía

1. Stanley, S.L., Jr., *Amoebiasis*. Lancet, 2003. **361**(9362): p. 1025-34.
2. Margulis Lynn, H.I.M.e.a.L.E., *Illustrated Glossary of Protoctista* Jones and Bartlett publishers,, 1992: p. 34-40.
3. Leber, A.L., *Intestinal amebae*. Clin Lab Med, 1999. **19**(3): p. 601-19, vii.
4. Dobell, C., *The Amoebae Living in Man A Zoological Monograph*. Sons & Danielsson, 1919: p. 34-39.
5. Martinez, P., *Amibiiasis*. Editorial Panamericana, 1989: p. 206.
6. DPDx, L.I.o.P.o.P.H.C. *Parasites and Healt Amebiasis* 2006 [cited; Available from: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Amebiasis.htm>.
7. Iruzen, E.M., T.F. Jackson, and A.E. Simjee, *Asymptomatic intestinal colonization by pathogenic Entamoeba histolytica in amebic liver abscess: prevalence, response to therapy, and pathogenic potential*. Clin Infect Dis, 1992. **14**(4): p. 889-93.
8. Carrero, J.C.C.-R., C. Aguilar-Diaz, H. Diaz-Gallardo, M. Y. Lacleste, J. P. Morales-Montor, J., *The role of the secretory immune response in the infection by Entamoeba histolytica*. Parasite Immunol, 2007. **29**(7): p. 331-8.
9. Boonyapisit, S., O. Chinapak, and U. Plengvanit, *Amoebic liver abscess in Thailand, clinical analysis of 418 cases*. J Med Assoc Thai, 1993. **76**(5): p. 243-6.
10. De Villiers, J.P. and G. Durra, *Case report: amoebic abscess of the brain*. Clin Radiol, 1998. **53**(4): p. 307-9.
11. Takaro, T., Bond , W.M. , *Pleuropulmonary , pericardial and cerebral complications of amoebiasis* Surg. Gynecol Obstet., 1958. **107**: p. 209-229.
12. Seydel, K.B., T. Zhang, and S.L. Stanley, Jr., *Neutrophils play a critical role in early resistance to amebic liver abscesses in severe combined immunodeficient mice*. Infect Immun, 1997. **65**(9): p. 3951-3.
13. Garcia-Zepeda, E.A., et al., *Regulation of the inflammatory immune response by the cytokine/chemokine network in amoebiasis*. Parasite Immunol, 2007. **29**(12): p. 679-84.
14. Campbell, D. and K. Chadee, *Survival strategies of Entamoeba histolytica: Modulation of cell-mediated immune responses*. Parasitol Today, 1997. **13**(5): p. 184-90.
15. Sharma, M.P. and V. Ahuja, *Amebiasis*. N Engl J Med, 2003. **349**(3): p. 307-8; author reply 307-8.
16. Blazquez Samantha, Z.C., Guigon Ghislaine , Olivo-Marin Jean-Christophe, Guille´n Nancy and Labruye`re Elisabeth *Human Tumor Necrosis Factor is a Chemoattractant for the Parasite Entamoeba histolytica*. Infection and Immunity, 2006. **74**(2): p. 1407-1411.
17. Haque, R., et al., *Amebiasis*. N Engl J Med, 2003. **348**(16): p. 1565-73.
18. Arbo, A.H., M. Ramirez, A. Ignacio Santos, J., *Entamoeba histolytica inhibits the respiratory burst of polymorphonuclear leukocytes*. Arch Invest Med (Mex), 1990. **21 Suppl 1**: p. 57-61.
19. Rico, G.D.-G., O. Gimenez-Scherer, J. A. Kretschmer, R. R., *Effect of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by Entamoeba histolytica upon the respiratory burst of human leukocytes*. Arch Med Res, 1992. **23**(2): p. 157-9.

20. Rico, G., et al., *The monocyte locomotion inhibitory factor produced by Entamoeba histolytica inhibits induced nitric oxide production in human leukocytes*. Parasitol Res, 2003. **90**(4): p. 264-7.
21. Garcia Lloret, M.I.R.R., L. M. Ramirez, A. Santos Preciado, J. I., *Macrophage colony-stimulating factor enhances the respiratory burst of human monocytes in response to Entamoeba histolytica*. Arch Med Res, 1992. **23**(2): p. 139-41.
22. Rojas-Dotor, S.R., G.Perez, J. Velazquez, J. Silva, R. Morales, E. Kretschmer, R., *Cytokine expression in CD4(+) cells exposed to the monocyte locomotion inhibitory factor produced by Entamoeba histolytica*. Parasitol Res, 2006. **98**(5): p. 493-5.
23. Maldonado Carmen , T.W., Ramírez Antonio, Carrera Manuel ,Sánchez Joaquín , López-Macías Constantino and Isibasi Armando, *Lipophosphopeptidoglycan of Entamoeba histolytica Induces an Antiinflammatory Innate Immune Response and Downregulation of Toll-Like Receptor 2 (TLR-2) Gene Expression in Human Monocytes*. Archives of Medical Research, 2000. **31**: p. 571-573.
24. Gilchrist, C.A. and W.A. Petri, *Virulence factors of Entamoeba histolytica*. Curr Opin Microbiol, 1999. **2**(4): p. 433-7.
25. Aguirre-Garcia, M.M., M. Anaya-Ruiz, and P. Talamas-Rohana, *Membrane-bound acid phosphatase (MAP) from Entamoeba histolytica has phosphotyrosine phosphatase activity and disrupts the actin cytoskeleton of host cells*. Parasitology, 2003. **126**(Pt 3): p. 195-202.
26. Frederick, J.R. and W.A. Petri, Jr., *Roles for the galactose-/N-acetylgalactosamine-binding lectin of Entamoeba in parasite virulence and differentiation*. Glycobiology, 2005. **15**(12): p. 53R-59R.
27. Braga, L.L.N., H. McCoy, J. J.Eacker, S. Wiedmer, T. Pham, C. Wood, S. Sims, P. J. Petri, W. A., Jr., *Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesion of Entamoeba histolytica*. J Clin Invest, 1992. **90**(3): p. 1131-7.
28. Leippe, M.B., H. Hecht, O. Grotzinger, J., *Ancient weapons: the three-dimensional structure of amoebapore A*. Trends Parasitol, 2005. **21**(1): p. 5-7.
29. Espinosa-Cantellano, M. and A. Martinez-Palomo, *Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease*. Clin Microbiol Rev, 2000. **13**(2): p. 318-31.
30. Aguirre-Garcia, M.M., J.L. Rosales-Encina, and P. Talamas-Rohana, *Secreted Entamoeba histolytica acid phosphatase (SAP)*. Arch Med Res, 1997. **28 Spec No**: p. 184-5.
31. Anaya-Ruiz, M., J.L. Rosales-Encina, and P. Talamas-Rohana, *Membrane acid phosphatase (MAP) from Entamoeba histolytica*. Arch Med Res, 1997. **28 Spec No**: p. 182-3.
32. Anaya-Ruiz, M., J.L. Perez-Santos, and P. Talamas-Rohana, *An ecto-protein tyrosine phosphatase of Entamoeba histolytica induces cellular detachment by disruption of actin filaments in HeLa cells*. Int J Parasitol, 2003. **33**(7): p. 663-70.
33. Cabrera, A.M.R., *Efecto de la proteína tirosina fosfatasa de Entamoeba histolytica en el estallido oxidativo de neutrofilos activados*, in Facultad de estudios superiores Cuautitlan. 2005, Universidad Nacional Autónoma de México México. p. 45.
34. Ninfa, E.G. and J.E. Dixon, *Protein tyrosine phosphatases in disease processes*. Trends Cell Biol, 1994. **4**(12): p. 427-30.

35. Hu, X. and C.E. Stebbins, *Dynamics of the WPD loop of the Yersinia protein tyrosine phosphatase*. Biophys J, 2006. **91**(3): p. 948-56.
36. Green, S.P.H., E. L. Robins-Browne, R. M. Phillips, W. A., *Role of YopH in the suppression of tyrosine phosphorylation and respiratory burst activity in murine macrophages infected with Yersinia enterocolitica*. J Leukoc Biol, 1995. **57**(6): p. 972-7.
37. Grosdent, N., et al., *Role of Yops and adhesins in resistance of Yersinia enterocolitica to phagocytosis*. Infect Immun, 2002. **70**(8): p. 4165-76.
38. Bohn, E. and I.B. Autenrieth, *IL-12 is essential for resistance against Yersinia enterocolitica by triggering IFN-gamma production in NK cells and CD4+ T cells*. J Immunol, 1996. **156**(4): p. 1458-68.
39. Autenrieth, I.B., et al., *Immune responses to Yersinia enterocolitica in susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 mice: an essential role for gamma interferon*. Infect Immun, 1994. **62**(6): p. 2590-9.
40. Monnazzi, L.G., I.Z. Carlos, and B.M. de Medeiros, *Influence of Yersinia pseudotuberculosis outer proteins (Yops) on interleukin-12, tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production by peritoneal macrophages*. Immunol Lett, 2004. **94**(1-2): p. 91-8.
41. Castandet, J., et al., *Tyrosine phosphatase MptpA of Mycobacterium tuberculosis inhibits phagocytosis and increases actin polymerization in macrophages*. Res Microbiol, 2005. **156**(10): p. 1005-13.
42. Chen, X.A., T. Awano, S. Iida, T. Barik, S. Takehara, T., *Isolation, cloning, and expression of an acid phosphatase containing phosphotyrosyl phosphatase activity from Prevotella intermedia*. J Bacteriol, 1999. **181**(22): p. 7107-14.
43. Kaniga, K.U., J. Bliska, J. B. Galan, J. E., *A secreted protein tyrosine phosphatase with modular effector domains in the bacterial pathogen Salmonella typhimurium*. Mol Microbiol, 1996. **21**(3): p. 633-41.
44. Bakalara, N., et al., *Trypanosoma brucei and Trypanosoma cruzi: life cycle-regulated protein tyrosine phosphatase activity*. Exp Parasitol, 1995. **81**(3): p. 302-12.
45. Bakalara, N., et al., *Characterization of a life-cycle-stage-regulated membrane protein tyrosine phosphatase in Trypanosoma brucei*. European Journal Biochemistry, 1995. **234**(3): p. 871-7.
46. Gómez, S.J.N., *Participación de las proteínas tirosina fosfatasas (PTPasas) en la infección de macrófagos por Leishmania mexicana*. 2007, Universidad Autónoma del Estado de México p. 65.
47. Wimmer, M., et al., *Ascaris suum: protein phosphotyrosine phosphatases in oocytes and developing stages*. Exp Parasitol, 1998. **88**(2): p. 139-45.
48. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
49. Aguirre-García, M.M., J. Cerbon, and P. Talamas-Rohana, *Purification and properties of an acid phosphatase from Entamoeba histolytica HM-1:IMSS*. Int J Parasitol, 2000. **30**(5): p. 585-91.
50. Tonks, N.K., *Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(11): p. 833-46.
51. Teixeira, J.E. and B.J. Mann, *Entamoeba histolytica-induced dephosphorylation in host cells*. Infect Immun, 2002. **70**(4): p. 1816-23.
52. Janeway Charles A, T.P., Walport Mark, Shlomchik Mark J., *INMUNOBIOLOGÍA*. 2ª ed, ed. MASSON. 2003, Barcelona

53. Yao, T., et al., *Suppression of T and B lymphocyte activation by a Yersinia pseudotuberculosis virulence factor, yopH*. J Exp Med, 1999. **190**(9): p. 1343-50.
54. Couper Kevin N., B.G.a.R.E.M., *IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection*. The Journal of immunology, 2008(180:): p. 5771-5777.
55. Galván-Moroyoqui José Manuel, D.-R.M.d.C., Franco Elizabeth , Meza Isaura *The Interplay between Entamoeba and Enteropathogenic Bacteria Modulates Epithelial Cell Damage*. PLoS Negl Trop Dis, 2008. **2**(7).
56. Ivory Catherine, S.K.a.K.C., *Innate resistance to Entamoeba histolytica in murine models*. TRENDS in Parasitology, 2006. **23**(2).
57. Roque, S.N., C. Appelberg, R. Correia-Neves, M., *IL-10 underlies distinct susceptibility of BALB/c and C57BL/6 mice to Mycobacterium avium infection and influences efficacy of antibiotic therapy*. J Immunol, 2007. **178**(12): p. 8028-35.
58. Beadling, S.M.a.C., *Regulation of innate and adaptive immune responses by the related cytokines IL-12, IL-23, and IL-27* Archives of Immunology, 2006. **54**: p. 15-24.
59. S-K Lin, K.S.-H., Lin L-D, Wang C-C, Kuo MYP, Lin C-T, Hsiao M, Hong C-Y., *Nitric oxide promotes the progression of periapical lesion via inducing macrophage and osteoblast apoptosis*. Oral Microbiol Immunol : : , 2007. **22**: p. 24-29.
60. Ventura-Juarez, C.-R., Tsutsuni V., *Early interactions of Entamoeba histolytica trophozoites with parenchymal and inflammatory cells in the hamster liver: an immunocytochemical study*. Canadian Journal of Microbiology, 2002. **48**(2): p. 123.
61. Clark, I.A., *How TNF was recognized as a key mechanism of disease*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2007. **18**: p. 335-43.
62. Blazquez Samantha, Z.C., Ghislaine Guigon, Jean-Christophe Olivo-Marin, Nancy Guille´n, and Elisabeth Labruye`re, *Human Tumor Necrosis Factor is a Chemoattractant for the Parasite Entamoeba histolytica*. Infect. Immun., 2006. **74**(2): p. 1407-11.
63. Fu, Y. and J.E. Galan, *The Salmonella typhimurium tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton*. Mol Microbiol, 1998. **27**(2): p. 359-68.

Apendice

Buffer de lisis :

Imidazol	10mM
EDTA	5mM
Benzamidina	1mM
Leupeptna	2 µg/ml
Aprotinina	10 µg/ml
β-mercaptoetanol	0.1%

por cada 5 millones de amibas se utiliza 1 ml de buffer de lisis y al Sn2 se le agrega Triton X-100 al 2 %

PBS 1X

NaCl	8gr
KCL	0.2gr
Na ₂ HPO ₄	1.44gr
KH ₂ PO ₄	0.24gr
H ₂ O	c.b.p. 1000 ml
pH	sin ajustar

La mezcla para tinción con plata (Bio-rad) se preparó de la manera siguiente:

- 1) 7ml de H₂O BIDEESTILADA
- 2) 1ml de silver satín plus , silver complex solution(SCS)
- 3) 1ml de reduction moderador solution (RMS)
- 4) 1ml de image development reagent (IDR)

PBS Ca⁺⁺Mg⁺⁺

CaCl ₂	0.1gr
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.1gr
KCl	0.2gr

NaCl	8gr
KH ₂ PO ₄	0.2gr
Na ₂ HPO ₄	0.917gr
H ₂ O	c.b.p. 1000ml
pH	sin ajustar

Buffer A

Tris-HCl	10mM(pH 7.4)
NaCl	50mM
α-MM	10μM

Buffer B

Tris-HCl	10mM(pH 7.4)
NaCl	400mM
α-MM	10μM