



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

U. N. A. M.  
SUPERIORES CUAUTITLÁN

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN



"IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA  
PROTEINA TIROSINA FOSFATASA EN  
PROMASTIGOTES DE *LEISHMANIA MAJOR*"

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGA  
P R E S E N T A :  
ALMA REYNA ESCALONA MONTAÑO

ASESORA: DRA. MARÍA MAGDALENA AGUIRRE GARCÍA



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 ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Identificación y Caracterización de la Proteína Tirosina Fosfatasa  
en Promastigotes de Leishmania major"

que presenta 1a pasante: Alma Reyna Escalona Montaño  
con número de cuenta: 9660579-2 para obtener el título de :  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 22 de marzo de 2004

PRESIDENTE MVZ. Gerardo Cruz Jiménez

VOCAL Dra. Ma. Magdalena Aguirre García

SECRETARIO QFB. Martha P. Zúñiga Cruz

PRIMER SUPLENTE MVZ. Angel German Martínez Sosa

SEGUNDO SUPLENTE MC. Francisco López Mejía

**D E D I C A T O R I A S**

## A DIOS

❖ Por crearme y regalarme la vida hasta este momento, permitiendo concluir con una de mis metas.

❖ Porque en los momentos de soledad hiciste que yo sintiera tú presencia.

❖ Porque cada día permites experimentar cosas nuevas, arriesgándome a realizarlas teniendo la confianza que tú estas siempre conmigo.

❖ Por haber puesto en mi camino a esas personas que han estado en los buenos y malos momentos en el transcurso de mi vida y que son mis AMIGOS.

❖ Porque cada día que pasa me das fuerza y fortaleza para seguir Adelante.

## A MIS PADRES

❖ A quienes me han heredado el tesoro más valioso que puede darsele a un hijo: Amor.

❖ A quienes sin escatimar esfuerzo alguno han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme.

❖ A quienes la ilusión de su vida ha sido convertirme en persona de provecho.

❖ A quienes nunca podré pagar todos sus esfuerzos y desvelos ni aún con todas las riquezas más grandes del mundo.

Por esto y más .....**GRACIAS.**

## **A MIS ABUELOS**

**Josafat Escalona † y Luisa Godines**

A ti Abuelo:

Por el cariño que siempre me demostraste cuando estuviste con nosotros, pero se que desde donde tu estés miras el trabajo que yo estoy realizando, aunque materialmente no estas presente, siempre lo estarás en mi corazón. Con todo cariño para ti.

A ti Abuela:

Por la ayuda incondicional que siempre me has mostrado, escatimando algunas cosas, para que yo salga adelante.

**Enrique Montaña Godines y Bertha Navarrete de Montaña**

A ambos por el cariño que siempre me han mostrado.

## **A MIS HERMANOS:**

**Juan Pablo, Silvia Elena, Juan Carlos, Luis Fernando.**

A pesar de enojos, risas, momentos de tristeza, han colaborado también a formarme no solo como profesionista sino como persona, ya que sus críticas me han ayudado a mejorar.

Si se puede hacer las cosas siempre y cuando quieran realizarlas, así es que tienen un compromiso con ustedes mismos. De que ese afán de superación no desaparezca de sus mentes.

## **A MI SOBRINO**

**Yael Tonatiuh**

A ti mi niño que viniste a alegrar esta casa y que con tus risas me has contagiado, haciendo ligeros esos días que son difíciles para mí.

## A MIS AMIGOS

- ❖ Quienes han estado conmigo durante toda mi formación como profesionista (Primaria, Secundaria, Preparatoria, Universidad), pasando juntos buenos y malos momentos.
- ❖ Especialmente a mis amigos de la FESC –C1 ( Rocío, Verónica, Virginia, Fabiola, Beatriz, Minerva, Lilia, Raúl, Sergio, Claudia)
- ❖ Por el tiempo que me dedicaron para escucharme.
- ❖ Por brindarme su confianza.
- ❖ Por la paciencia que tuvieron hacia mi carácter.
- ❖ Y por todo lo que se me olvide, quiero decirles que los aprecio y los quiero mucho, GRACIAS a cada uno de ustedes por lo antes mencionado y por aceptarme a entrar a descubrir su mundo, que al igual que el mío está lleno de inquietudes, fantasías, metas, retos.

El camino ha sido largo y en ciertas ocasiones se torno un poco difícil pero ha valido la pena, porque gran parte de ese camino hemos estado juntos levantándonos de esos tropiezos y saliendo adelante juntos.

A todos aquellos que por cualquier circunstancia aún no terminan la carrera quiero decirles que lo importante es que siguen en el camino, que ya están casi a un paso de llegar a su meta y que es el momento de ponerle todas las ganas del mundo para llegar, así que muchachos y muchachas ¡Échenle ganas!.

# AGRADECIMIENTOS

- ❖ A la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C-1. El brindarme la oportunidad de ser Universitaria, por educarme y por la meta que me ha permitido culminar.
- ❖ A DGAPA con número en Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN 210602-3 por el apoyo económico para la realización de este proyecto.
- ❖ A la Dra. María Magdalena Aguirre García por su asesoría en la parte experimental y escrita. Así también por sus palabras de aliento y superación.
- ❖ A la Dra. Ingeborg D. Becker Fauser, por permitirme realizar mi tesis en su laboratorio.
- ❖ A mis sinodales: MVZ. Gerardo Cruz Jiménez, Dra. María Magdalena Aguirre García, QFB. Martha Patricia Zúñiga Cruz, MVZ. Angel German Martínez Sosa, MC. Francisco López Mejía. por el tiempo que dedicaron para leer y corregir esta tesis.
- ❖ A los que integran el laboratorio de Inmunoparasitología del Departamento de Medicina Experimental de la UNAM (Dra. Ingeborg D. Becker , Lucy, Dra. Magda, Dra. Norma, Dra. Miriam, Dra. Laila, Dr. José, Cristina, Ivette, Iraís, Adriana, Rocely, Leonardo, Jesús, Edith, Héctor, Brenda, Sra. Susana por la ayuda recibida para la elaboración de está tesis.
- ❖ A Edith Fernández Figueroa por su ayuda en los ensayos de inmunoprecipitación.

- ❖ A. Omar Agni García Hernández por su asesoría en computo.
- ❖ A cada uno de mis profesores, laboratoristas que me formaron, desde el inicio hasta el final en la FESC C-1.
- ❖ A mis tíos ( Pablo Alanis e Eugenia Escalona) por la ayuda recibida para que este trabajo siguiera su cauce.

## ÍNDICE

	Pág
ÍNDICE.....	I
Lista de figuras.....	V
Lista de tablas.....	VI
Abreviaturas.....	VII
Resumen.....	IX
Apéndice.....	XI

### I. INTRODUCCIÓN

1.1	Leishmaniosis.....	1
1.2	Formas clínicas.....	3
1.2.1	Leishmaniosis cutánea localizada, úlcera del chiclero.....	3
1.2.2	Leishmaniosis cutánea difusa.....	4
1.2.3	Leishmaniosis mucocutánea ó Espundida.....	5
1.2.4	Leishmaniosis visceral ó Kala-azar.....	6
1.3	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> .....	7
1.3.1	Vector.....	7
1.3.2	Hospedero vertebrado.....	8
1.3.3	Inmunología de la leishmaniosis.....	11
1.4	Moléculas del parásito.....	13

1.4.1	LPG	14
1.4.2	gp 63	16
1.4.3	Fosfatasa s ácidas	17
1.5	Fosforilaci3n-desfosforilaci3n	18
1.6	Proteínas tirosinas fosfatasa s (PTPasas)	20
1.7	Clasificaci3n de las PTPasas	22
1.7.1	Fosfatasa s específicas de tirosina	22
1.7.1.1	Fosfatasa s específicas de tirosina tipo receptor	22
1.7.1.2	Fosfatasa s específicas de tirosina tipo citoplasmáticas	23
1.7.2	Fosfatasa s de especificidad dual tipo VH-1	25
1.7.2.1	Proteínas serina-treonina fosfatasa s	25
1.7.3	Fosfatasa s de bajo peso molecular	26
1.8	PTPasas en microorganismos infecciosos	27
1.8.1	Virus	27
1.8.2	Bacterias	27
1.8.3	Parásitos	28
1.8.3.1	<i>Trypanosoma brucei</i> y <i>T.cruzi</i>	28
1.8.3.2	<i>Ascaris suum</i>	29
1.8.3.3	<i>Entamoeba histolytica</i>	30
1.8.3.4	<i>Leishmania donovani</i>	30

## II. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

2.1	Justificación.....	32
2.2	Hipótesis.....	34

## III. OBJETIVOS

3.1	Objetivo general.....	35
3.2	Objetivos particulares.....	35

## V. METODOLOGÍA.

4.2	Crecimiento del parásito y su cultivo <i>in vitro</i> .....	38
4.3	Fraccionamiento de parásitos.....	40
4.4	Determinación de proteína.....	43
4.5	Determinación de la actividad de fosfatasa.....	45
4.6	Determinación de la actividad de PTPasa.....	46
4.6.1	Efecto de algunos agentes químicos en la actividad de PTPasa.....	47
4.7	Ensayos de inmunoprecipitación.....	48

5.1	Actividad específica de fosfatasa en los diferentes pasos del fraccionamiento subcelular de <i>Leishmania major</i> .....	50
5.2	Esquema de solubilización de la PTPasa asociada a membrana de <i>L. major</i> en sus dos fases de crecimiento procíclica y metacíclica.....	50
5.3	Determinación del pH óptimo de la fosfatasa en la fracción solubilizada de <i>Leishmania major</i> .....	53
5.4	Actividad de PTPasa en promastigotes de la fase metacíclica y procíclica de <i>Leishmania major</i> .....	53
5.5	Efecto de los inhibidores específicos de PTPasa de <i>Leishmania major</i> .....	56
5.6	Análisis electroforético del fraccionamiento de <i>Leishmania major</i> .....	56
5.7	Identificación de la PTPasa de <i>Leishmania major</i> por inmunoelectrotransferencia con un anticuerpo monoclonal $\alpha$ - PTPasa 1B de placenta humana.....	59

5.7	Identificación de la PTPasa de <i>Leishmania major</i> por inmunoelectrotransferencia con un anticuerpo $\alpha$ - Try ACP 115 de <i>Trypanosoma brucei</i> .....	59
5.7	Inmunoprecipitación de la PTPasa de <i>Leishmania major</i> .....	59
<b>VI.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>63</b>
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>69</b>
<b>VIII.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>71</b>
<b>IX.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>73</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Úlcera típica de leishmaniosis cutánea localizada, .....	3
Figura 2	Lesiones nodulares en un paciente con leishmaniosis cutánea difusa.....	4
Figura 3	Lesiones de la mucosa orofaríngea en leishmaniosis mucocutánea.....	5
Figura 4	Parásito dentro del macrófago.....	8
Figura 5	Parásito en el medio de cultivo.....	8
Figura 6	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> .....	10
Figura 7	Moléculas que presenta <i>Leishmania</i> en su superficie.....	13
Figura 8	Esquema general de la estructura de la LPG de promastigotes de <i>Leishmania</i> .....	15

## INDICE DE TABLAS

Tabla No 1 Casos de leishmaniosis cutánea americana por grupo de edad -----	2
Tabla No2. Solubilización de la PTPasa asociada a membrana de <i>Leishmania major</i> en sus dos fases de crecimiento procíclica y metacíclica _____	52
Tabla No 3 Efecto de inhibidores específicos de fosfatasa sobre la actividad de PTPasa _____	57

## ABREVIATURAS

A	Alanina
Ag	Plata
BSA	Albúmina sérica bovina
C	Concentración
CR	Receptores de complemento
D	Ácido aspártico
E	Ácido glutámico
D.O	Densidad óptica
EDTA	Ácido-Etilén-diaminotetraacético
ET	Extracto total
FA	Fosfatasa ácida
g	Gramos
I	Isoleucina
IL	Interleucina
lt	Litros
L	Leucina
mg	Miligramos
mM	Milimolar
M	Molar
ml	Mililitros

min	Minutos
NaOH	Hidróxido de sodio
N	Normal
NO	Óxido nítrico
nm	Nanómetro
PTPasa	Proteína tirosina fosfatasa
Pm	Peso molecular
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PVDF	Membrana de polivinilidenodifluoruro
PNC	Papel de Nitrocelulosa
p-NPP	p-Nitrofenilfosfato
P1	Pastilla 1
P2	Pastilla 2
RPM	Revoluciones por minuto
S	Serina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SN1	Sobrenadante 1
SN2	Sobrenadante 2
$\alpha$ -PTPasa- 1 $\beta$	Anti-proteína tirosina fosfatasa 1B de placenta humana
$\mu$ l	Microlitros
$\mu$ g	Microgramos

## RESUMEN

Las enfermedades parasitarias a través de los años han jugado un papel importante en el deterioro cultural, económico del ser humano, en diversas partes del mundo, especialmente en los lugares marginados.

La leishmaniosis es una enfermedad, que afecta a la piel y vísceras del hombre es transmitida por el piquete del mosquito hembra *Phlebotomus* en el viejo mundo y *Lutzomyia* en el nuevo mundo. Esta enfermedad incapacita al campesino y le hacen perder sus cosechas, que muchas veces son de autoconsumo, aunque esto no afecte la producción a nivel nacional, a él lo hunden más en la miseria.

El estudio de este parásito ha sido abordado con diferentes enfoques: Inmunológico, bioquímico, biología molecular, clínico, epidemiológico.

El enfoque de este trabajo es a nivel bioquímico con la identificación y caracterización de la proteína tirosina fosfatasa.

Las proteínas tirosina fosfatasas son enzimas hidrolíticas que remueven grupos fosfato de residuos fosforilados en tirosina y han sido descritas como factores de virulencia en diferentes microorganismos patógenos. En el parásito *Leishmania* han sido poco estudiados los mecanismos de fosforilación-desfosforilación de proteínas necesarios para la sobrevivencia intracelular, propagación y patogenicidad dentro de la célula hospedera.

En este trabajo identificamos y caracterizamos una proteína tirosina fosfatasa asociada a la membrana de promastigotes de la fase procíclica y metacíclica de *Leishmania major*.

Se fraccionaron promastigotes de ambas fases de crecimiento. De este proceso se obtuvieron las siguientes fracciones (ET, SN1, P1, SN2, P2) las cuales fueron capaces de hidrolizar el p-nitrofenilfosfato 0.1M, encontrándose mayor actividad específica de fosfatasa ácida en la fracción solubilizada (SN2). Las condiciones óptimas de pH para la actividad de fosfatasa fueron 5.0 para procíclica y 6.0 para metacíclica. Al analizar por electroforesis en geles SDS-PAGE el fraccionamiento (ET, SN1, P1, SN2, P2) se encontró el enriquecimiento de una molécula de aproximadamente 55 kDa.

Se observó la actividad de tirosina fosfatasa en ambas fases de crecimiento del parásito ya que fue capaz de desfosforilar un péptido END (PY) INALS (el cual posee un solo sitio fosforilado en tirosina), observándose mayor actividad en la fase procíclica con respecto a la fase metacíclica.

El patrón de inhibición con inhibidores de proteína tirosina fosfatasa fue diferente al patrón de inhibición con los de serina treonina fosfatasa. Con la fase metacíclica se observa un 100 % de inhibición con inhibidores de PTPasas y serina treonina fosfatasas. Con respecto a la fase procíclica se observa una inhibición parcial de ambos tipos de inhibidores.

Mediante el empleo de un anticuerpo monoclonal dirigido hacia el dominio catalítico conservado de las PTPasa de eucariontes superiores, encontramos que promastigotes de la fase metacíclica y procíclica sintetizan una proteína de alrededor de 55 kDa, que es reconocida por anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -PTPasa 1B de placenta humana además existe reacción cruzada con un anticuerpo  $\alpha$ -Tyr ACP 115 (el cual esta dirigido hacia una PTPasa de *Trypanosoma brucei*) el cual

reconoce un componente de alrededor de 55-60 kDa obteniéndose en ambas fases de crecimiento del parásito.

Los resultados obtenidos en ambas fases del crecimiento del parásito indican que posiblemente se traten de dos enzimas diferentes o de una misma enzima con actividad dual. Resulta interesante purificar la enzima y analizar el efecto que ésta tiene en las células de la respuesta inmune y de esta manera poder proponer la enzima como un factor de patogenicidad e iniciar un nuevo campo buscando cual (es) serían los blancos en la célula hospedera y poder investigar que vía de señalización pudieran estar modulando.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Leishmaniosis

La leishmaniosis constituye una de las seis enfermedades tropicales de mayor importancia en el mundo, determinada por la Organización Mundial de la Salud.<sup>(1)</sup> Se estima que 12 millones de personas son afectadas a nivel mundial y 2 millones de nuevos casos ocurren cada año.<sup>(2)</sup>

En México la leishmaniosis se encuentra en regiones como: Campeche, Chiapas, Quintana Roo, Nayarit y Tabasco siendo en este estado de la República Mexicana donde más casos de la enfermedad se han reportado hasta el año 2002 (Tabla No1).

La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria causada por varias especies de protozoarios hemoflagelados que atacan a la piel y vísceras del hombre y de diversos animales. Es transmitida por la picadura de un mosquito hembra pertenecientes a los géneros *Phlebotomus* (viejo mundo) y *Lutzomyia* (nuevo mundo).<sup>(3)</sup> La importancia de la enfermedad radica no sólo en el crecimiento y la magnitud de las lesiones, sino en la trascendencia mediada por las consecuencias socioeconómicas y psicológicas que las caracterizan por ser a menudo enfermedades debilitantes e incapacitantes.<sup>(4)</sup>

**Tabla No 1. Casos de Leishmaniosis cutánea americana por grupo de edad. Estados Unidos Mexicanos 2002**

Grupos de edad

	<1	1-4	5-9	10-14	15-19	20-24	25-44	45-49	50-59	60-64	65+	Igno	Total
Aguascalientes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Baja California	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Baja California Sur	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Campeche	0	5	31	31	57	33	81	5	18	11	10	0	282
Coahuila	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Colima	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chiapas	0	9	0	14	10	11	28	3	4	4	7	0	100
Distrito Federal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Durango	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Guanajuato	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Guerrero	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hidalgo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Jalisco	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
México	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Michoacán	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Morelos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nayarit	0	2	0	6	6	1	7	2	0	1	5	0	30
Nuevo León	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Oaxaca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Puebla	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Queretaro	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Quintana Roo	1	9	24	36	45	42	100	16	13	4	13	0	303
San Luis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Potosí	0	0	0	1	3	2	3	0	0	0	0	0	0
Sinaloa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sonora	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tabasco	0	13	27	47	96	38	144	28	35	19	31	7	485
Tamaulipas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tlaxcala	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Veracruz	0	0	0	2	4	10	0	0	3	3	5	0	18
Yucatán	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Zacatecas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total global	1	38	92	137	221	128	134	54	73	42	71	7	1228

Fuente : Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. Dirección General Epidemiología/SSA

## 1.2 Formas clínicas

Las leishmaniosis pueden tener diferentes formas clínicas clasificadas en:

**1.2.1- Leishmaniosis cutánea localizada, úlcera del chiclero ó botón del Oriente**

**1.2.2- Leishmaniosis cutánea difusa**

**1.2.3- Leishmaniosis mucocutánea ó Espundida**

**1.2.4- Leishmaniosis visceral ó Kala-azar**

**1.2.1 Leishmaniosis cutánea localizada, úlcera del chiclero ó botón del Oriente**

Las especies responsables de las formas cutáneas son: *L. major* y *L. aethiopica*. El vector es la hembra hematófaga del género *Phelebotomus*, especie *papatasi*.

Se caracteriza por la aparición de una úlcera en la piel (Fig.1), los pacientes no muestran dolor y tienden a curar espontáneamente ó con quimioterapia.<sup>(5)</sup>



**Fig.1 Úlcera típica de leishmaniosis cutánea localizada. Fotografía tomada en el laboratorio de inmunoparasitología- Hospital General de México**

### 1.2.2 Leishmaniosis cutánea difusa

Se inicia habitualmente por un nódulo que no se ulcera y se disemina por vía linfática (Fig.2). Esta distribución es muy lenta, los parásitos son transportados a través del líquido tisular, linfa o sangre llegando a colonizar prácticamente todo el tegumento con la excepción del cuero cabelludo, la región axilar, palmas de las manos y plantas de los pies, tienen un desenlace fatal.<sup>(6)</sup>



**Fig. 2 Lesiones nodulares en un paciente con leishmaniosis cutánea difusa. Fotografía tomada en el Laboratorio de inmunoparasitología. Hospital General de México**

### 1.2.3. Leishmaniosis mucocutánea ó Espundida

Está ampliamente distribuida a través de América central y sur de América, es causada por *L. braziliensis*. Es transmitida por el mosquito del género *Lutzomyia*. La primera lesión ocurre en el sitio inicial de la picadura, similar al de las otras especies de *Leishmania* pero la infección también involucra a la mucosa orofaríngea causando degeneración del cartílago. (Fig. 3) <sup>(7)</sup>



Fig.3 Lesiones de la mucosa orofaríngea en leishmaniosis mucocutánea <sup>(8)</sup>

#### 1.2.4 Leishmaniosis visceral ó Kala-azar

También conocida como Kala-azar es causada principalmente por *Leishmania donovani* que ha sido localizada en Europa, Norte de Africa, India y China, transmitida por el piquete del mosquito hembra *Phlebotomus*. El período de incubación es de 2 a 4 meses, los principales órganos afectados son el bazo, hígado, médula ósea y tejido linfático. En los órganos afectados se forman pequeños granulomas que dañan las vísceras al causar hiperplasia e hipertrofia de los mismos, congestión de los vasos sanguíneos y necrosis de los tejidos. <sup>(9)</sup>

### 1.3 Ciclo biológico de *Leishmania*

*Leishmania* es un protozooario patógeno del orden Kinetoplastida y pertenece a la familia Trypanosomatidae,<sup>(10)</sup> tienen un ciclo de vida dimórfico que se manifiesta en el vector y en el hospedero vertebrado (Fig. 6).

#### 1.3.1 En el vector:

Los amastigotes que se encuentran en la sangre infestada son ingeridos por el vector y pasan al intestino medio del mosquito donde el agua es removida y la sangre es retenida en el interior de la membrana peritrópica (MP). La transformación de amastigote a promastigote ocurre entre 12 y 18 hrs, en esta transformación inicial los promastigotes son llamados procíclicos (Fig.5) y morfológicamente se caracterizan por ser cortos, ovoides y tienen ligera motilidad. La intensa multiplicación de esas formas inicia aproximadamente entre 18-24 hrs. Por el día 7 hay una migración de promastigotes a la región del cardias, donde ocurre la transformación a promastigotes metacíclicos que se caracterizan por ser altamente activos y tienen un flagelo que les permite migrar más allá del cardias, como es: faringe y probóscide.<sup>(11)</sup>



**Amastigote**

**Fig.4 Parásito dentro del macrófago**



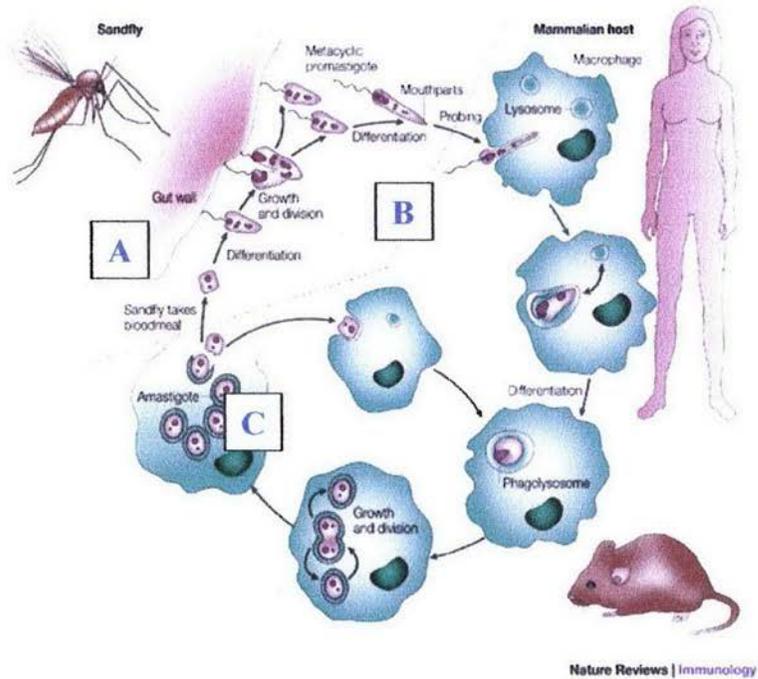
**Promastigote**

**Fig.5 Parásito en el medio de cultivo.**

### **1.3.2 En el hospedero vertebrado**

Inicia cuando el mosquito hembra (*Phlebotomus papatasi*) infectado pica al hospedero susceptible. La saliva del mosquito inhibe la síntesis de proteínas fosfatasa y la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos. El óxido nítrico es una molécula que participa como mensajero intracelular, en la mayoría de los órganos de mamíferos, en el control de la homeostasis vascular, como neurotransmisor así como la defensa contra infecciones, su producción se lleva a cabo mediante la acción de la enzima óxido nítrico sintasa, que cataliza la conversión de L- arginina y oxígeno molecular. El NO es producido por un gran número de células entre las cuales se pueden citar las siguientes: fibroblastos, hepatocitos, queratinocitos. <sup>(12)</sup> La saliva también contiene un potente vasodilatador llamado maxadilan que es un péptido de 70 KDa que disminuye el calcio intracelular, a través del mecanismo dependiente cAMP, (Adenosinmonofosfato cíclico), causando vasodilatación arterial. <sup>(13,14,15)</sup>

Junto con la saliva, el vector también inocular dentro de la piel la fase infectante que es el promastigote de la fase metacíclica. Estas formas son opsonizadas eficazmente por componentes del suero como: C3bi y son fagocitados por macrófagos, donde van a residir en el fagolisosoma y se transforman en amastigotes (Fig. 4), los cuales se dividen por fisión binaria dentro del macrófago llevando a la lisis la célula hospedera. Los amastigotes libres infectan a otras células fagocíticas en donde vuelven a proliferar. También pueden circular por sangre ó líquido tisular hasta que son ingeridas por otro mosquito hembra susceptible. <sup>(16)</sup>



**Fig.6 Ciclo biológico de *Leishmania* <sup>(16)</sup>**

**A)** El parásito se divide en el interior del intestino delgado del mosquito hembra y se transforma en la fase metacíclica (fase infecciosa). **B)** Cuando pica al hospedero susceptible inocula esta última fase la cual va a parasitar al macrófago. **C)** Los parásitos se transforman en amastigotes los cuales se dividen por fisión binaria haciendo que su célula hospedera estalle, liberándose los parásitos e infectando nuevas células.

### 1.3.3 Inmunología de la leishmaniosis

El establecimiento de la enfermedad tiene lugar cuando los promastigotes metacíclicos de *Leishmania* son fagocitados por los macrófagos de la zona de la picadura. La entrada de los promastigotes activa la cascada del complemento, lo que le permite que la proteína C3bi del complemento se deposite en la superficie del parásito y se una a los receptores del complemento presentes en el macrófago (CR1 Y CR3). La unión de los promastigotes al macrófago puede realizarse a través de la LPG. Una vez que los parásitos se encuentran en el interior de los macrófagos, los amastigotes pueden ser destruidos por los metabolitos de oxígeno y por enzimas hidrolíticas lisosomales. Se lleva a cabo el procesamiento y presentación del antígeno y los péptidos liberados se asocian a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad. Cuando se asocian a moléculas MHC clase I, los antígenos son reconocidos por los linfocitos T tipo CD8<sup>+</sup> (Tc citotóxicas), mientras que cuando se asocian a moléculas de clase II son reconocidos por los linfocitos T tipo CD4<sup>+</sup> (Th ó cooperadoras). La activación de las células Th desempeña un papel importantísimo en la respuesta inmune frente a *Leishmania*, tal como se ha observado en modelo murino de infección con *Leishmania major*, el progreso de la infección, depende de la dicotomía en el desarrollo de las células T CD4<sup>+</sup> que se diferencian en 2 subclases funcionalmente distintas, caracterizadas por el perfil de citocinas que producen. Los Linfocitos TH1 se caracterizan por la producción de IL-2, IFN- $\gamma$  y el factor de necrosis tumoral alfa. La respuesta TH2 hay producción de IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 e

IL-10, esta respuesta promueve la activación de linfocitos B con la formación de anticuerpos. Este tipo de inmunidad en los pacientes con leishmaniosis se desarrolla desde una etapa temprana de la enfermedad y se mantiene durante el curso de la infección. El papel de los anticuerpos en la leishmaniosis no es protector sino que facilitan la opsonización del parásito lo que favorece la fagocitosis por los macrófagos. <sup>(17)</sup>

#### 1.4 Moléculas que presenta *Leishmania* en su superficie

Hay varias clases moléculas con un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) como son: Lipofosfoglicano (LPG), glicoinositolfosfoglicano (GIPLS), glucoproteína 63 (gp63) de 63 kDa, fosfatasas ácidas de secreción (Fig. 7) <sup>(11)</sup>

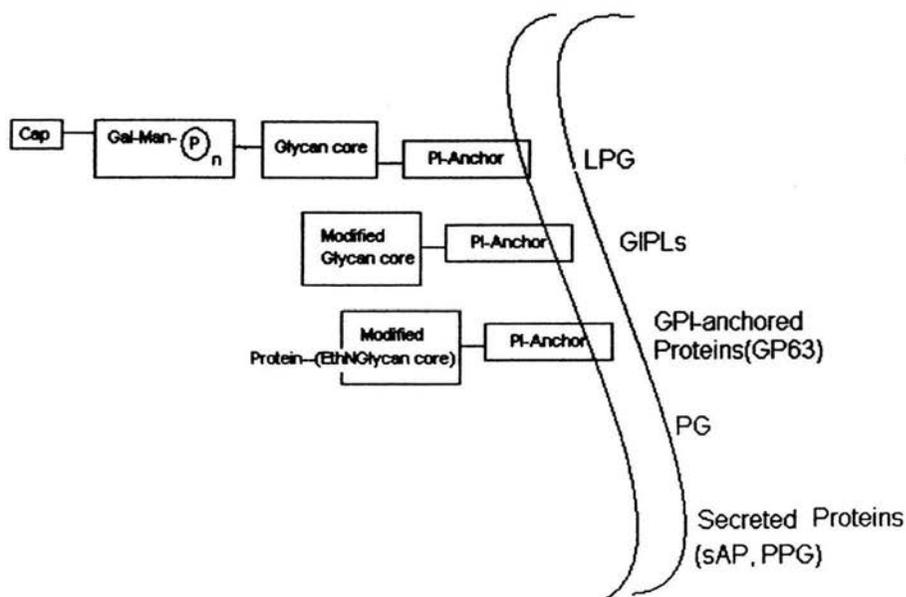


Fig.7 Moléculas que presenta *Leishmania* en su superficie <sup>(11)</sup>

### 1.4.1 LPG (Lipofosfoglicano)

Es sintetizado por todas las especies de *Leishmania*, es el mayor glicoconjugado presente en la superficie del promastigote <sup>(18)</sup>. Esta formado por 4 dominios principales: Fig(8)

- I.- Región de anclaje
- II.- Región central de fosfosacáridos
- III.- Región de disacáridos fosforilados
- IV.- Región de oligosacaridos (CAP)

Existen diversos reportes sobre las funciones que ejerce el LPG:

- ❖ Inhibe iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) provocando la disminución de la síntesis de NO (óxido nítrico) <sup>(19)</sup>
- ❖ Inhibe PKC ( Proteína cinasa C) en un 70% <sup>(20)</sup>
- ❖ Inhibe el estallido oxidativo y quimiotaxis de monocitos y leucocitos polimorfonucleares. <sup>(21)</sup>
- ❖ Inhibe la fusión fagosoma-endosoma.
- ❖ Altera la expresión de moléculas de adhesión en la célula de Langerhans y disminuye la actividad migratoria de estas células. <sup>(22)</sup>

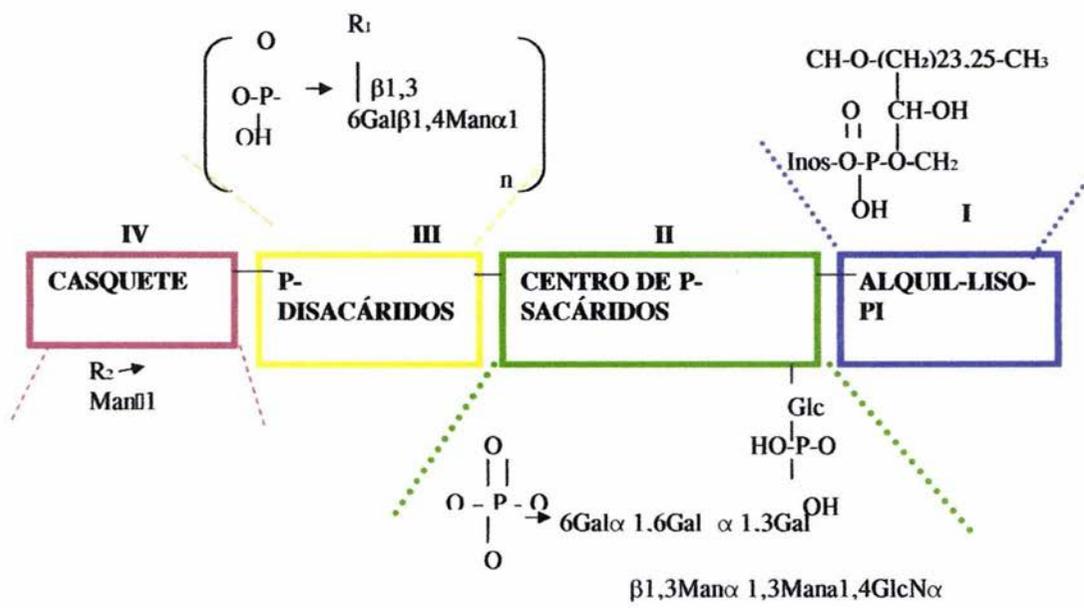


Fig.8. Esquema general de la estructura de LPG de promastigotes de *Leishmania* <sup>(23)</sup>

#### 1.4.2 Glicoproteína (gp 63)

Se encuentra en la membrana de los promastigotes, es también llamada leishmanolisina, es una metaloproteasa de 63 kDa dependiente de zinc.<sup>(24)</sup>

Es una proteína anfífila de superficie con aproximadamente 500,000 copias por promastigote, constituyendo así el 1% del total de las proteínas.<sup>(25,26)</sup>

Esta glicoproteína tiene residuos N- acetilglucosamina, manosa y galactosamina que juegan un papel importante en la interacción parásito-macrófago.<sup>(27,28)</sup>

También se ha demostrado que la actividad proteolítica de la gp63 se ve aumentada en el interior del fagolisosoma, protegiendo al amastigote de la degradación intralisosomal ejercida por enzimas lisosomales, lo cual favorece a la supervivencia intracelular del parásito.<sup>(29)</sup>



## 1.5 Fosforilación-desfosforilación

La fosforilación-desfosforilación es un mecanismo crucial de numerosos eventos celulares, incluyendo: crecimiento celular, diferenciación, señalización y respuesta inmune.<sup>(40)</sup> (Fig .9)

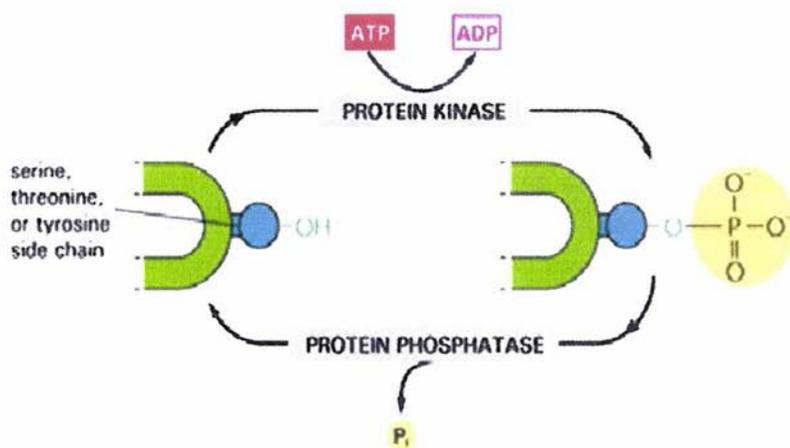


Fig.9 Proceso de fosforilación-desfosforilación<sup>(41)</sup>

La reacción catalizada por una proteína cinasa que pone un grupo fosfato sobre una cadena de aminoácidos, mientras la reacción catalizada por una proteína fosfatasa remueve el fosfato

La fosforilación puede ocurrir en residuos (serina/treonina) ó tirosina de diversas proteínas, en estas últimas es esencial para los eventos de señalización y respuesta inmune. Las enzimas responsables para la fosforilación de residuos tirosinas son proteínas tirosina cinasas (PTKs)<sup>(42)</sup> y las enzimas que desfosforilan residuos de tirosina son llamadas proteínas tirosina fosfatasas (PTPasa).

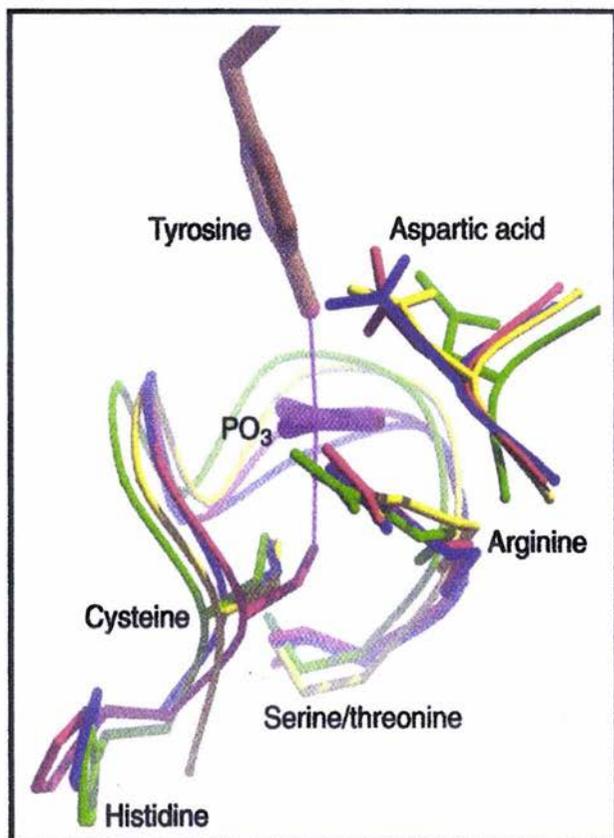
Las PTKs Y PTPasa son las enzimas responsables para la regulación de la fosforilación y desfosforilación de proteínas tirosina. Basado en la información sobre la secuencia genómica, se estima que más de 1000 proteínas tirosina cinasas y aproximadamente 500 proteínas tirosina fosfatasas son codificadas por el genoma humano<sup>(43)</sup>

## 1.6 PTPasas.

Son enzimas hidrolíticas que remueven fosfato de residuos fosforilados en tirosina.

Todas las proteínas tirosinas fosfatasas (PTPasa, EC 3.1.3.48), poseen un dominio catalítico común (Fig.10), que consta de aproximadamente 250 aminoácidos que contienen 21 residuos constantes, mucho de los cuales han sido demostrados a ser necesarios para la actividad de fosfatasa. En el dominio catalítico se encuentra una secuencia conservada constituida por los siguientes aminoácidos (I/V) HCXAGXXR(S/T) G (las letras indican el aminoácido específico y la X cualquier aminoácido). La cisteína en esta secuencia es requerida para la actividad catalítica y esta involucrada en la formación del intermediario de reacción que es la fosforilenzima. <sup>(44)</sup>

Bioquímicamente, estas fosfatasas pueden ser identificadas por su sensibilidad a compuestos químicos como: el vanadato, molibdato, tungstato insensibilidad al ácido okadaico y a la no dependencia de iones metálicos. Una característica esencial es la propiedad a hidrolizar el *p*-nitrofenilfosfato y la pérdida total de la actividad por mutación de la cisteína del sitio activo.



**Fig. 10** Sitio activo de 4 proteínas tirosina fosfatasas. En rojo el sitio activo de la PTPasa *Yersinia*, PTP1B en azul, VHR en verde y en amarillo la fosfatasa de bovino .<sup>(45)</sup>

## 1.7 Clasificación de PTPasas

En base a su función, estructura y secuencia, las PTPasas pueden ser clasificadas en tres grupos principales:

### 1.7.1. Fosfatasas específicas de tirosina

### 1.7.2. Fosfatasas de especificidad dual tipo VH-1

### 1.7.3. Fosfatasas de bajo peso molecular

#### 1.7.1. Fosfatasas específicas de tirosina

Son de peso molecular relativamente alto, también conocidas como proteínas tirosina fosfatasas (PTPasas). Estas pueden ser de dos tipos: <sup>(46)</sup>

##### 1.7.1.1 Tipo receptor

##### 1.7.1.2 Tipo citoplasmáticas.

**1.7.1.1 Tipo receptor:** tienen un dominio extracelular, un dominio único transmembranal y más de 2 dominios catalíticos. Los dominios extracelulares de las PTPasas tienen secuencias repetidas de dominios de inmunoglobulina. <sup>(47)</sup>

Estas PTPasas tipo receptor pueden estar divididas en 5 tipos basado en la cara común con el dominio extracelular (Fig. 11): <sup>(48)</sup>

- 1) Receptor tipo 1: están presentes en células hematopoyéticas restringidas a la familia CD 45.
- 2) Moléculas tipo 2: Son PTPasa tipo LAR (DLAR en *Drosophila* LAR, PTP $\sigma$  y PTP $\gamma$ ) esta clase de PTPasa contienen secuencias repetidas de inmunoglobulinas y dominios parecidos a fibronectina tipo 3
- 3) Repetidos de fibronectina tipo III
- 4) Tipo 4: PTP $\alpha$  y PTP $\epsilon$
- 5) Tipo 5: PTP $\xi$  y PTP $\gamma$

#### 1.7.1.2 Tipo citoplasmáticas

Poseen segmentos extracelulares, los cuales pueden estar involucrados en la regulación de la actividad catalítica.

Los dominios SH2 es un sitio conservado de aproximadamente 100 aminoácidos que reconocen proteínas fosforiladas en tirosina.

Varias PTPasas contienen dominio SH2, dos de estas fosfatasas han sido ampliamente estudiadas: La PTPasa SH-PTP1, que es expresada predominantemente en células hematopoyéticas también conocida como (PTP1C, HCP y SHP1) regulan la vía de transducción de señales de una variedad de receptores hematopoyéticos los cuales son inmunoreceptores que poseen un dominio conservado conocido como sitio inhibitorio de tirosina (ITIM) <sup>(49)</sup>

La SH-PTP2 es una proteína crítica en las vías de señalización. A través de este dominio SH2 las proteínas son activadas en las vías de transducción de señales.

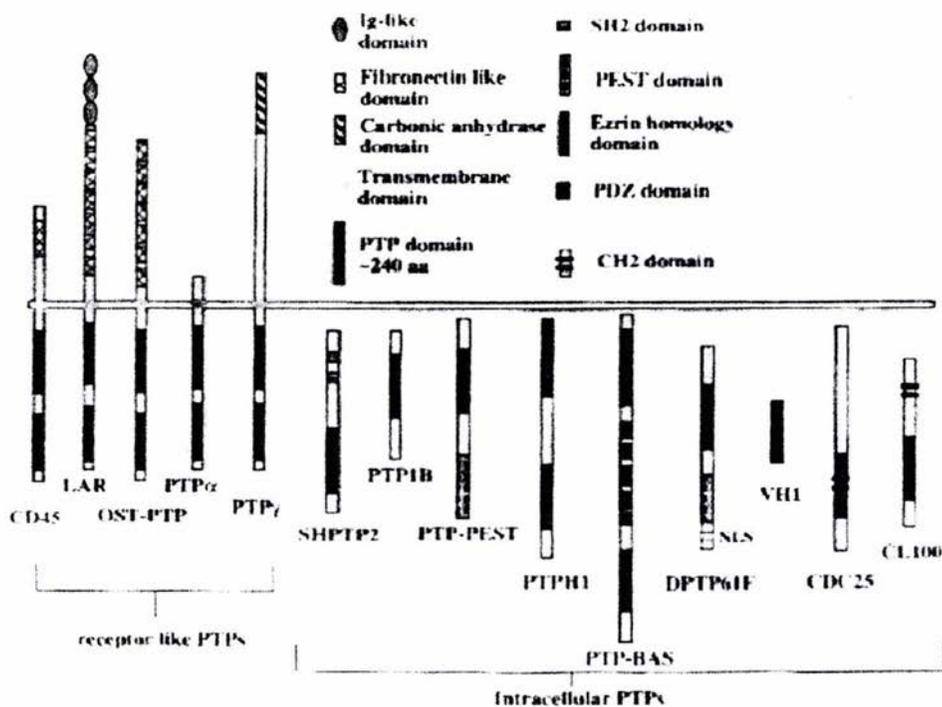


Fig. 11 Estructura esquemática de la proteína tirosina fosfatasa <sup>(50)</sup>

### 1.7.2. Fosfatasa de especificidad dual tipo VH-1

La primera PTPasa de especificidad dual que fue identificada en el virus Vaccinia. Esta fosfatasa VH1 es una fosfatasa pequeña (20 kDa) que desfosforila ambos sustratos: fosfotirosina y fosfoserina/fosfotreonina. Esta enzima específicamente desfosforila una proteína viral tipo histona requerida para la encapsidación, y que es necesaria para la replicación del virus<sup>(51)</sup>

#### 1.7.2.1 Proteínas serina/ treonina fosfatasa

Las proteínas serina-treonina fosfatasa son las que se encargan de desfosforilar residuos serina treonina y están localizadas en el citoplasma. En esta familia se encuentran fosfatasa dependientes de  $Mg^{+2}$  (PPMS) y fosfatasa independientes de  $Mg^{+2}$  (PPP) <sup>(52)</sup>

Un ejemplo de la familia PPMS es la proteína fosfatasa 2C (PP2C). Varios miembros de la familia PPP comparten un dominio altamente conservado responsable de la actividad de fosfatasa. Dependiendo de su sensibilidad a inhibidores de fosfatasa (ácido okadaico) pueden subdividirse en 3 familias:

- a) proteínas fosfatasa 2A(PP2A) las cuales son inhibidas por cantidades nanomolares (nM) de ácido okadaico
- b) proteína fosfatasa 1 (PP1) que requiere una concentración 10 veces más alta de ácido okadaico para la inhibición y

- c) proteína fosfatasa 2B (PP2B ó Calcineurin A) es poco resistente a el ácido okadaíco <sup>(53)</sup>

### **1.7.3. Fosfatasa de bajo peso molecular**

Han sido encontradas en bacterias y mamíferos y contienen un dominio único catalítico. Se desconoce la función biológica.

## 1.8 PTPasas en microorganismos infecciosos

La actividad de PTPasa ha sido reportada como factor patogénico en varios microorganismos infecciosos tales como:

### 1.8.1 Virus

### 1.8.2 Bacterias

### 1.8.3 Parásitos

#### 1.8.1 Virus

El virus vaccinia pertenece al género Orthopoxvirus, es un virus de DNA de doble cadena con 192000 pares de bases, contiene aproximadamente 200 genes que se replican en la célula hospedera.

El virus vaccinia codifica una pequeña PTPasa (20 kDa) llamada VH1, que es producida en la última etapa de la infección. VH1 es el prototipo de la familia de PTPasa que puede desfosforilar ambos sustratos que contienen fosfoserina/fosfotreonina.<sup>(54)</sup>

#### 1.8.2 Bacterias

Tres especies de bacterias del género *Yersinia* son responsables de enfermedades humanas. *Yersinia pestis* es el agente causal de la peste bubónica, mientras que la *Yersinia enterocolitica* y *Yersinia pseudotuberculosis* causan enfermedades entéricas y septicemia respectivamente. La bacteria evade

la destrucción por macrófagos y linfocitos y se multiplica en el sistema reticuloendotelial. <sup>(55)</sup> *Yersinia* neutraliza la actividad de los macrófagos por un mecanismo que aún es desconocido y secreta determinantes virulentos llamados: “Yops” en la célula hospedera. La Yop H también conocida como Yop 2b ó Yop 51 es una PTPasa, los blancos de la Yop H son desconocidos, pero pueden incluir proteínas fosforiladas en tirosina que están involucradas en la reorganización del citoesqueleto que permiten la fagocitosis y que participan en mecanismo de transducción de señales.

El efecto que ejerce la PTPasa de *Yersinia* (Yop H) en los macrófagos es inhibiendo la fagocitosis, <sup>(56)</sup> a través de la destrucción de fibras de actina por desfosforilación de proteínas específicas tales como P<sup>130 cas</sup> y P<sup>125 FAK</sup> <sup>(57)</sup>.

### 1.8.3 Parásitos

#### 1.8.3.1 *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi*.

Se ha demostrado una actividad de tirosina fosfatasa localizada en fracciones solubles y particuladas de ambos parásitos, que desfosforila al péptido Tyr-(p) Ratyde. Por ensayos de inmunolectrotransferencia, utilizando un anticuerpo monoclonal  $\alpha$  PTPasa, se detectó una molécula de alrededor de 55 kDa en extractos de parásitos (forma sanguínea y procíclica). Inhibidores específicos de PTPasa como el vanadato de sodio inhibieron la actividad de PTPasa. <sup>(58,59)</sup>

En *Trypanosoma brucei* se ha caracterizado una proteína tirosina fosfatasa unida a membrana y con actividad de PTPasa, la cual está ausente en fase procíclica, además la reconstitución experimental de proteínas de membrana demostró que 3 polipéptidos de 148, 115 y 72 kDa presentaron actividad de PTPasa la cual fue inhibida por vanadato de sodio <sup>(60)</sup>

En este mismo parásito purificarón y clonaron una proteína fosfatasa de membrana con una secuencia homóloga con otras fosfatasas. Los valores obtenidos en cinética, especificidad de sustrato y propiedades modulatorias fueron similares a esas proteínas fosfatasas. Mediante ensayos de inmunoelectrotransferencia, se demostró que la fosfatasa ácida es regulada en el ciclo de vida de *T. brucei*, ya que fue expresada en la forma sanguínea y no en la forma procíclica del parásito. <sup>(61)</sup>

### **1.8.3.2 *Ascaris suum***

*Ascaris* presenta 2 formas de proteína tirosina fosfatasas diferentes que fueron parcialmente purificadas: PTPA-1 con un peso molecular de 50-55 kDa y PTPA-2 180 kDa, ambas proteínas presentan reacción cruzada con el anticuerpo anti-PTPasa 1B de placenta humana. Mediante una inmunoreacción observada por microscopía de luz se determinó la presencia de la enzima en la lámina muscular del parásito. <sup>(62)</sup>

### 1.8.3.3 *Entamoeba histolytica*

*Entamoeba histolytica* presenta una proteína fosfatasa unida a membrana con actividad de PTPasa, la cual ha sido purificada en trofozoítos. Esta enzima desfosforila específicamente a O-fosfo L-tirosina (P-Tyr) a un pH de 5.0 y tiene poca actividad hacia O-fosfo L-serina, O- fosfo-L- treonina y ATP. Esta enzima fue inhibida por molibdato de amonio, tungstato de sodio y trifluoperazina. El anticuerpo anti PTPasa 1B de placenta humana presentó una reacción cruzada con una molécula de 55 kDa presente en la fracción solubilizada de *Entamoeba histolytica*. Se observó una desintegración completa del citoesqueleto de actina en células HeLa después de 8 hrs de interacción con la PTPasa amibiana. Estos resultados sugieren fuertemente que la PTPasa amibiana participa en los procesos de transducción de señales que están involucrados en el rearreglo del citoesqueleto de actina. <sup>(63)</sup>

### 1.8.3.4 *Leishmania donovani*

El primer reporte de PTPasa en la familia *trypanosomatidae* fue realizada en *L donovani*, en la cual se demuestra la actividad de tirosina fosfatasa en extractos crudos y en fracciones que fueron purificadas a través de cromatografía de afinidad en superosa 12. También se observó que la actividad de fosfatasa ácida se incrementa lentamente con la edad de cultivo mientras que la actividad de PTPasa disminuye con el tiempo de cultivo. Sin embargo no se demuestra el peso molecular de la enzima responsable de la actividad. <sup>(64)</sup>

**II. J U S T I F I C A C I Ó N  
E  
H I P Ó T E S I S**

## II JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

### 2.1 Justificación

En nuestro país la " leishmaniosis " es una de las enfermedades parasitarias que en los últimos años ha tomado importancia. Esta enfermedad es causada por el parásito protozoario del género *Leishmania* y el estudio de este parásito ha sido abordado con diferentes enfoques: inmunológico, bioquímico, biología molecular, clínico, epidemiológico.

Nosotros abordamos el estudio desde el punto de vista bioquímico, basado en la identificación y caracterización de una PTPasa de *Leishmania major*.

Las PTPasas son enzimas que están involucradas en la señalización, regulando funciones celulares como: metabolismo, transcripción de genes y respuesta inmune. <sup>(40)</sup>

Una regulación inapropiada de estas enzimas puede participar en la patogenia de enfermedades tales como: diabetes mellitus, cáncer, arteriosclerosis. <sup>(54)</sup> También han sido reportadas como factores de virulencia en microorganismos infecciosos como bacterias del género *Yersinia*. <sup>(56)</sup>

En el caso particular de *Leishmania* se sabe que la invasión a macrófagos por el parásito induce la desfosforilación de proteínas. Se ha demostrado que en este proceso son inducidas las PTPasas del macrófago, sin embargo poco se sabe acerca de la proteína tirosina fosfatasa del parásito, ya que únicamente se ha descrito la actividad de proteína tirosina fosfatasa en el extracto crudo y en fracciones purificadas, pero no han sido reportadas las características y propiedades

bioquímicas de la PTPasa. Debido a lo anterior y a la necesidad de conocer la posible participación de esta enzima en el proceso de invasión por el parásito es de nuestro interés la purificación de la enzima y realizar con ella algunos ensayos funcionales del macrófago como son: estallido oxidativo, la producción de óxido nítrico y secreción de citocinas.

## 2.2 Hipótesis

Si promastigotes de *Leishmania major* poseen una proteína tirosina fosfatasa entonces, está comparte epítomos con las PTPasas de eucariontes superiores.

### III. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar la proteína tirosina fosfatasa en promastigotes de *Leishmania major*.

#### 3.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

◆ Realizar el fraccionamiento subcelular de promastigotes de *Leishmania major* en la fase metacíclica y procíclica.

◆ Determinar la actividad específica de fosfatasa en el fraccionamiento subcelular de promastigotes en la fase metacíclica y procíclica de *Leishmania major*.

◆ Determinación del pH óptimo de la actividad de fosfatasa en la fracción solubilizada de promastigotes en la fase metacíclica y procíclica de *Leishmania major*.

◆ Determinar la actividad de proteína tirosina fosfatasa en la fracción solubilizada de promastigotes en la fase metacíclica y procíclica de *Leishmania major*.

▲ Caracterización de la actividad de PTPasa en la fracción solubilizada de promastigotes de *Leishmania major* con inhibidores específicos de PTPasas e inhibidores de serina-treonina fosfatasa.

▲ Identificar la enzima PTPasa en fracción solubilizada de promastigotes de *Leishmania major* en ambas fases de crecimiento del parásito con anticuerpos específicos para PTPasa

# M E T O D O L O G Í A

#### 4.2 Crecimiento del parásito y su cultivo *in vitro*.

Se trabajó con la cepa MHOM/SV/7315-ASKH de *Leishmania major*, la cual fue cultivada en medio bifásico (RPMI y agar sangre). Se cultivaron cajas con 500 mil parásitos en condiciones de esterilidad a 26°C y 96 % de humedad durante 4 días. Se realizó una prueba de aglutinación con lectina de cacahuete para determinar la fase de crecimiento del parásito; para esta prueba se utilizaron  $2 \times 10^8$  parásitos, se lavaron con PBS 1X y se resuspendieron en 900  $\mu$ l de PBS 1X, posteriormente se agregaron 100  $\mu$ l de PNA. Se incubaron durante 30 min. y se centrifugaron a 800 rpm 3 minutos. Los parásitos aglutinados correspondieron a la fase procíclica y los no aglutinados correspondieron a la fase metacíclica.

Se capturaron los parásitos y se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 min a 4°C. Se lavaron con PBS 1X y se contaron en una cámara de Neubauer, se congeló la pastilla a -70 °C.

## Crecimiento del parásito y su cultivo *in vitro*

Cepa MHOM/SV/7315-ASKM de *Leishmania major*

Cultivo en medio bifásico  
500,000 parásitos/ml de medio  
de cultivo

Parásitos para la prueba de aglutinación

Parásitos para la lisis

Se necesitan  $2 \times 10^8$  Parásitos

Resuspender la pastilla en  
900  $\mu$ l de PBS IX

Agregar 100  $\mu$ l de PNA

Incubar 30 min. a temperatura  
ambiente

Centrifugar 800rpm/3 min

Aglutinado/ fase procíclica

Sobrenadante/fase metacíclica

Colocar el medio de cultivo  
en un vaso de precipitado

Centrifugar a 3500 rpm/15 min

Lavar 2 veces con PBS 1 X

Contar los parásitos en la  
camara de Neubauer

Congelar la pastilla a  
-70°C

### 4.3 Fraccionamiento de parásitos

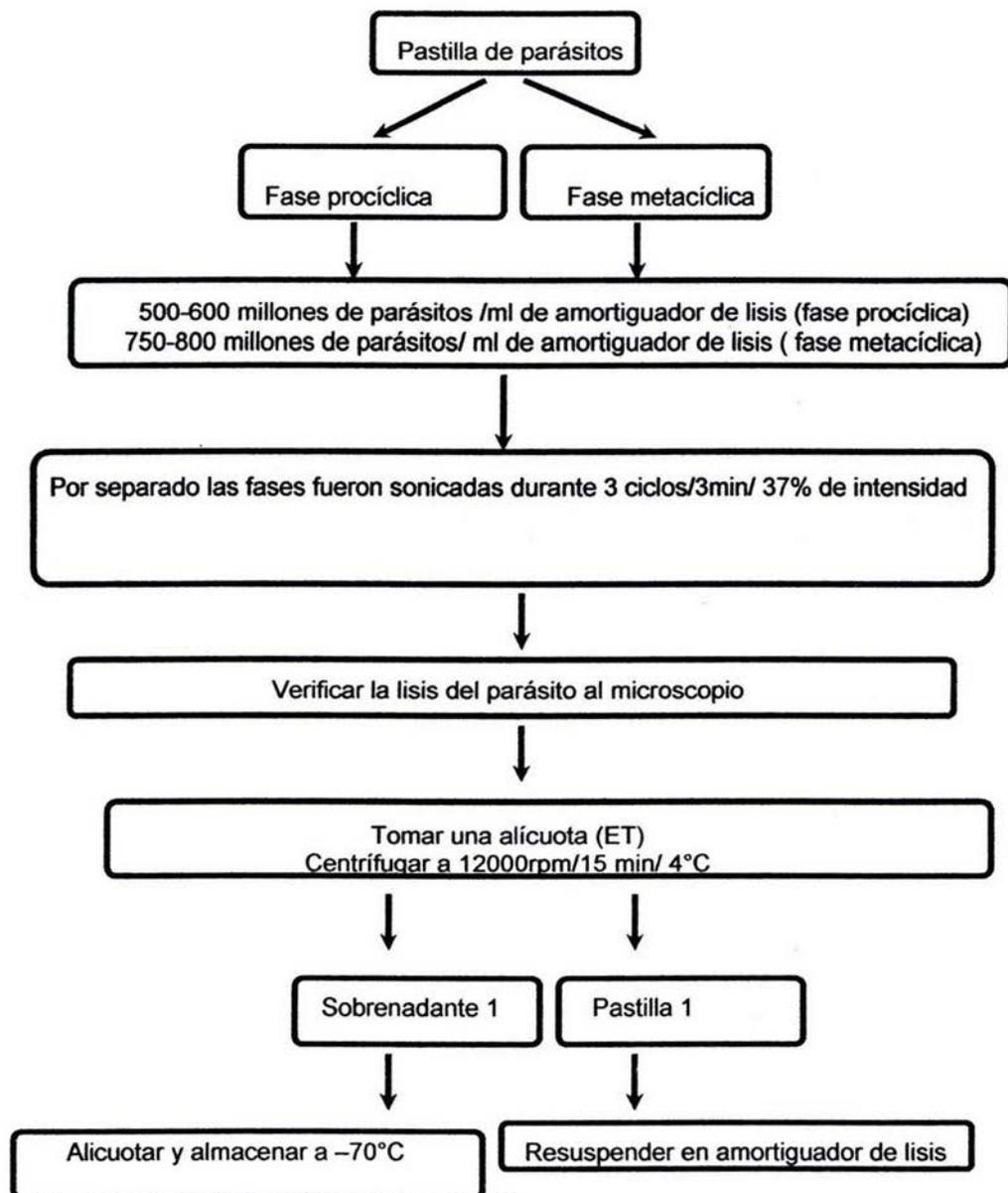
Se realizó siguiendo el método reportado por Aguirre y cols <sup>(67)</sup> modificado, el cual se describe:

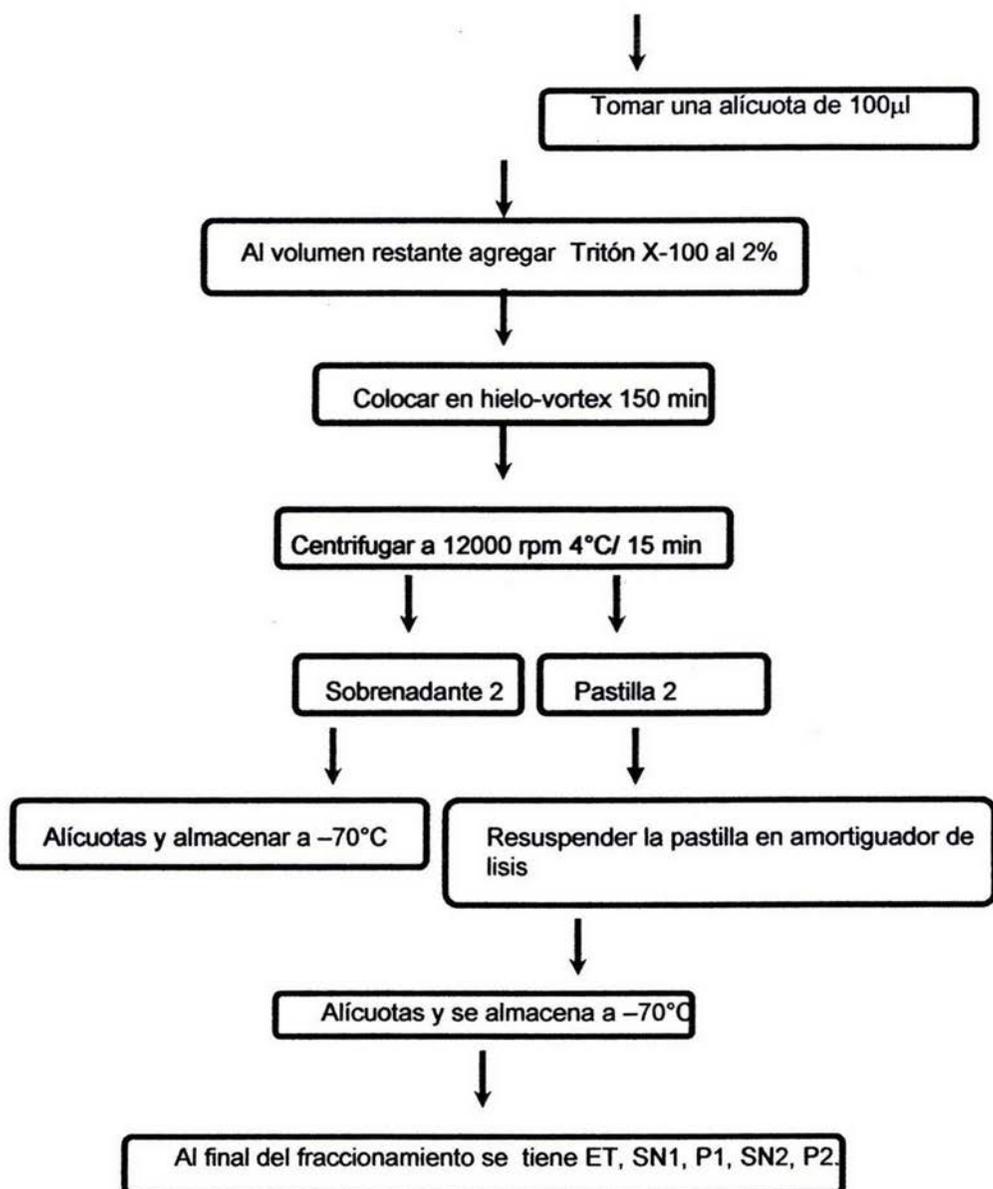
Se preparó el amortiguador de lisis (imidazol 10 mM pH 7.2, EDTA 5 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.1%, leupeptina 2  $\mu$ g/ml, aprotinina 10  $\mu$ g/ml, benzamidina 1 mM, Tritón X-100 al 2%).

Por cada 750- 800 millones de promastigotes de *Leishmania major* en la fase metacíclica se utilizó 1 ml de amortiguador de lisis. Para el caso de parásitos en fase procíclica se colocaron 500-600 millones de parásitos en 1 ml de amortiguador de lisis. Fueron sonicados durante 3 ciclos, de 3 min, 37% de intensidad a 4°C en el sonicador marca sonics, se verificó la lisis del parásito al microscopio. Se tomó una alícuota del extracto total (ET), se centrifugó el volumen restante a 12000 rpm por 5 min a 4°C. Se alícuota el sobrenadante (SN1)( 100  $\mu$ l). La pastilla formada ( pastilla 1) se resuspendió en amortiguador de lisis. Se tomó una alícuota de 100  $\mu$ l aproximadamente y se agregó Tritón X-100 al 2%.

Se realizó el proceso de extracción que consistió en: colocar la muestra anterior en hielo/ vortex 150 min, pasado el tiempo se centrifugó a 12000 rpm a 4°C. por 15 min. Al sobrenadante obtenido se denominó SN2, el cual se congeló. Se resuspendió la pastilla denominada (P2), la cual también se hicieron alícuotas y se congeló a -70 °C hasta su uso. Al final tenemos ET, SN, P1, SN2, P2.

## Fraccionamiento de parásitos





#### 4.4 Determinación de proteína por el método de Bradford <sup>(66)</sup>

Stock: BSA 5mg/ml

Blanco: Amortiguador de lisis

##### Curva estándar

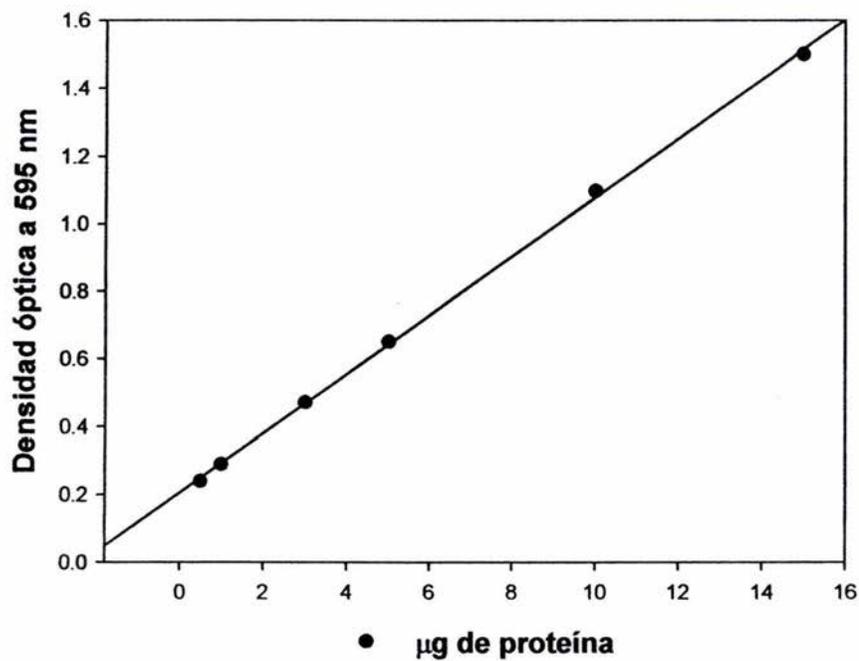
Concentración ( $\mu\text{g}$ )	Stock 5mg/ml	Amortiguador de lisis cbp 10 $\mu\text{l}$	Agua	Bradford concentrado
*0.5 (1 :10)	1 $\mu\text{l}$	9 $\mu\text{l}$	150 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$
*1 (1 :10)	2 $\mu\text{l}$	8 $\mu\text{l}$	150 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$
*3 : (1 :10)	6 $\mu\text{l}$	4 $\mu\text{l}$	150 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$
*5	1 $\mu\text{l}$	9 $\mu\text{l}$	150 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$
*10	2 $\mu\text{l}$	8 $\mu\text{l}$	150 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$
*15	3 $\mu\text{l}$	7 $\mu\text{l}$	150 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$
*BCO	—	10 $\mu\text{l}$	150 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$

\* Cada condición se realiza por triplicado

\*Leer a 595nm en el lector de ELISA

Se realizó por el método de Bradford <sup>(66)</sup> el cual consistió en: colocar 10  $\mu\text{l}$  de las muestras del fraccionamiento ( ET, SN1, P1, SN2, P2) en 40  $\mu\text{l}$  del reactivo de Bradford + 150  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O desionizada. Los datos obtenidos se analizaron en el programa KC4 v 2.7.

### Curva estándar de proteína



$$r^2 = 0.994$$

#### 4.5 Determinación de la actividad de fosfatasa

La actividad de fosfatasa se realizó en diferentes muestras (ET, SN1, P1, SN2, P2) en solución amortiguadora con pH de 5.0 para la fase procíclica y pH 6.0 para la fase metacíclica en una placa de ELISA de 96 pozos.

La mezcla de reacción consistió en:

Muestra	Volumen	Amortiguador de acetato de sodio (0.5 M)	Sustrato p- NPP (0.1 M)	Tiempo de incubación (Estufa 37°C)	Stop de la reacción NaOH 2 N
*ET	5µl	85µl	10µl	60 min	20µl
*SN1	5µl	85µl	10µl	60 min	20µl
*P1	5µl	85µl	10µl	60 min	20µl
*SN2	5µl	85µl	10µl	60 min	20µl
*P2	5µl	85µl	10µl	60 min	20µl
*BCO	5µl de amortiguador de lisis	85µl	10µl	60 min	20µl

\*Cada condición se realiza por duplicado.

La reacción se inició con la adición del sustrato. Posteriormente se incubó a 37°C por 1 hr en una estufa y la reacción fue terminada con la adición de NaOH 2N. El p-Nitrofenol generado, se leyó a 405 nm.

#### Determinación del pH óptimo

Se realizó un ensayo de cinética de pH de la actividad de fosfatasa con amortiguador de acetato de sodio a diferentes pHs 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 y 7.0. de igual manera que el paso anterior.

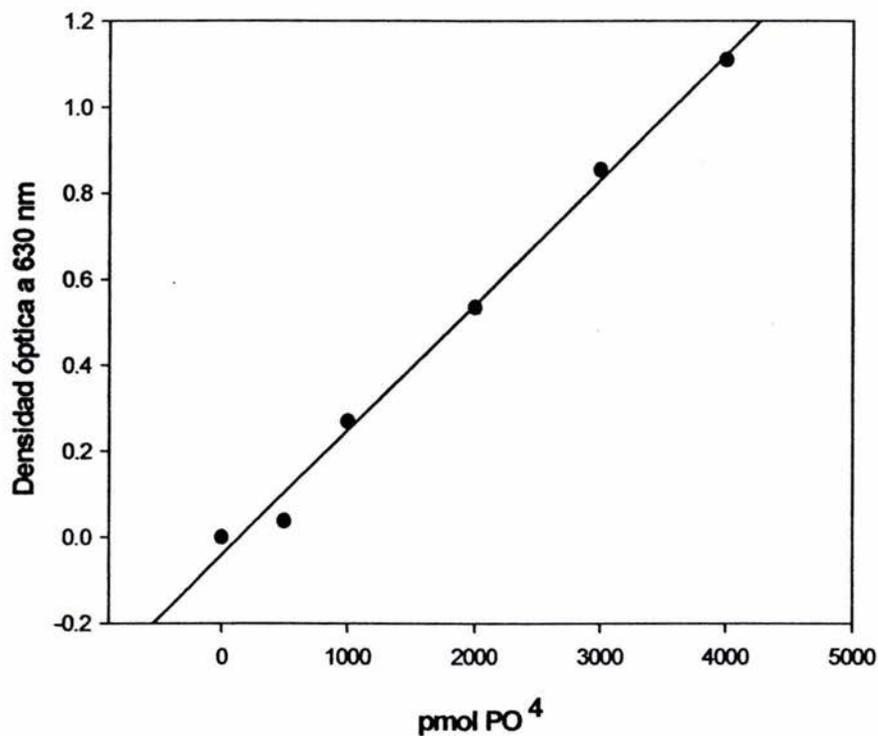
#### **4.6 Determinación de la actividad de PTPasa.**

Se analizó la actividad de PTPasa utilizando un Kit de (PROMEGA) específico para PTPasa, el cual contiene un péptido END(p Y)INASL (1118kDa). Se usó en un amortiguador de acetato de sodio a pH 6.0 para la fase metacíclica y pH 5.0 para la fase procíclica. Las muestras fueron pasadas a través de una columna de sephadex G-25 para liberar el fosfato intrínseco. Se realizó una curva estándar de fosfatos utilizando un stock de fosfato estándar (1mM) a diferentes concentraciones (500, 1000, 2000, 3000, 4000 picomoles). Se incubaron las muestras SN2 de la fase metacíclica y procíclica, libre de fosfatos con 5µl de sustrato en un volumen total de reacción de 100 µl, por 15 min. Se detuvo la reacción con 50 µl de Dyeadditive/Dye solution. Posteriormente se leyó en el lector de ELISA a 630 nm utilizando el programa KC4 v 2.7.

##### **4.6.1 Efecto de algunos agentes químicos en la actividad de PTPasa.**

Se incubaron las muestras SN2 de fases metacíclica y procíclica, libre de fosfatos, a temperatura ambiente con los inhibidores de PTPasas ( molibdato de amonio 200 µM, tungstato de sodio 200 µM, orthovanadato de sodio 200 µM, defostatin 100 µM) y con inhibidores de serina/treonina fosfatasas (calyculin 5nm, ácido okadaíco 1µM, trifluoperazina 100 µM) por 15 min. Se verificó que la inhibición no fuese por pH midiendo éste con papel indicador de pH en cada determinación, la actividad de PTPasa presente, se determinó por el método descrito anteriormente.

### Curva estándar de fosfatos



$$r^2 = 0.9928$$

#### 4.7 INMUNOPRECIPITACIÓN

El material (SN2) de *Leishmania* se sometió a una preabsorción con proteína G agarosa durante 2 horas a 4°C en agitación constante. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm a 4°C 10 min y se determinó la concentración de proteínas en el sobrenadante. Se incubó la muestra con el anticuerpo monoclonal anti-PTP asa 1B de placenta humana bajo agitación constante durante toda la noche a 4°C, al día siguiente se agregaron 40 µl de proteína G agarosa con 2 % de BSA a la muestra y se dejó en agitación durante 2 hrs a 4°C. La muestra se separó en geles de poliacrilamida al 10 % para ser transferidos a membranas de nitrocelulosa. El inmunoprecipitado se identificó por inmunoelectrotransferencia utilizando el anticuerpo anti-PTPasa 1B y se reveló por quimioluminiscencia.

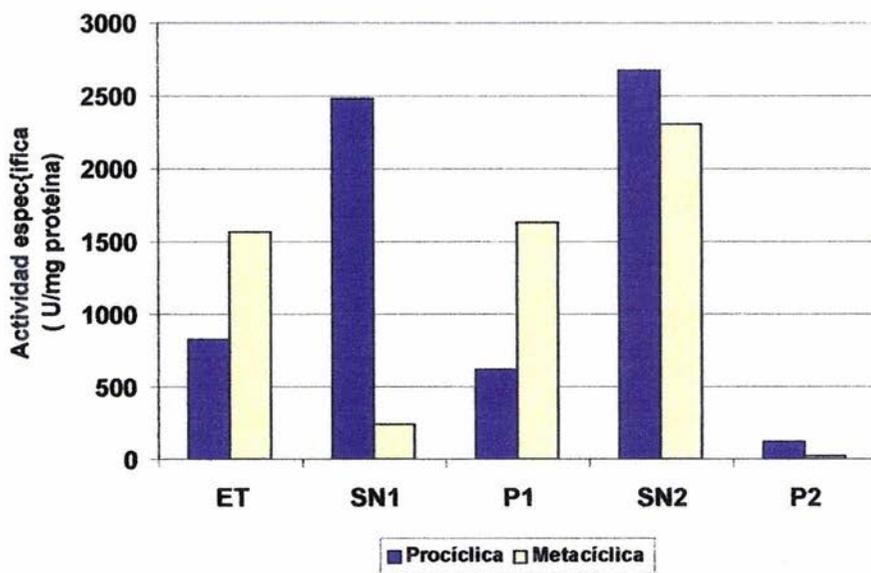
## V. RESULTADOS

### **5.1 Actividad específica de fosfatasa en el fraccionamiento subcelular de *Leishmania major***

Se realizó la determinación de la actividad de fosfatasa utilizando como sustrato el p-NPP 0.1 M en el fraccionamiento subcelular de *Leishmania major* (ET, SN1, P1, SN2, P2) en su fase procíclica y metacíclica. Se observa que hay mayor actividad de fosfatasa en la fracción solubilizada por el detergente (SN2) en ambas fases del ciclo de vida del parásito con respecto a los otros pasos del fraccionamiento. (Fig. 12)

### **5.2. Esquema de solubilización de la PTPasa asociada a membrana de *Leishmania major* en sus dos fases de crecimiento procíclica y metacíclica**

Se observa que existe diferencia en el proceso de semipurificación de la enzima en ambas fases de crecimiento del parásito ya que para procíclica el porcentaje de rendimiento es mayor a 32% con respecto a metacíclica 4.98%. También esta diferencia se observa en las veces de purificación donde obtuvimos un enriquecimiento de la enzima mayor en procíclica que en metacíclica 1.477.(Tabla No 2).



**Fig.12 Actividad específica de fosfatasa en los diferentes pasos del fraccionamiento de *Leishmania major***

U\* (Unidad)= 1  $\mu$ mol de p-NPP hidrolizado por minuto a 37°C

### Procíclica

Pasos del fraccionamiento	Actividad total Unidades X10 <sup>3</sup>	Proteína total (mg)	Actividad específica $\frac{ux10^3}{mg}$	Purificación (veces)	Rendimiento %	Proteína recuperada %
Extracto total (ET)	21.709	24.468	0.830	1.00	100	100
Sobrenadante 1 (SN1)	14.350	5.413	2.482	—	—	22.06
Sobrenadante 2 (SN2) Solubilización con Tritón X-100	6.794	2.375	2.678	3.224	31.29	9.706

### Metacíclica

Pasos del fraccionamiento	Actividad total Unidades X10 <sup>3</sup>	Proteína total (mg)	Actividad específica $\frac{ux10^3}{mg}$	Purificación (veces)	Rendimiento %	Proteína recuperada %
Extracto total (ET)	3.684	2.206	1.563	1.00	100	100
Sobrenadante 1 (SN1)	0.409	1.615	0.237	—	—	22.06
Sobrenadante 2 (SN2) Solubilización con Tritón X-100	0.183	0.074	2.309	1.477	4.98	3.72

**Tabla No 2. Solubilización de la PTPasa asociada a membrana de *Leishmania major* en sus dos fases de crecimiento procíclica y metacíclica**

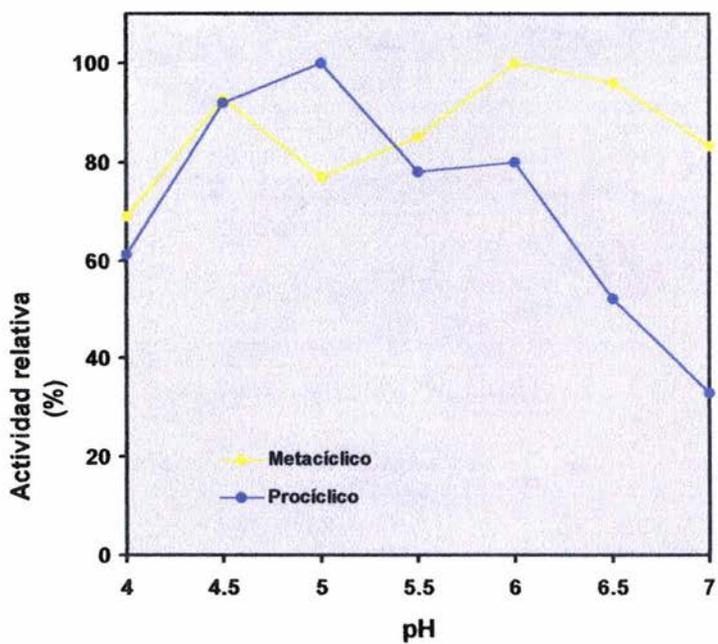
1u= 1 $\mu$ mol/min

### **5.3 Determinación del pH óptimo de la fosfatasa *Leishmania major*.**

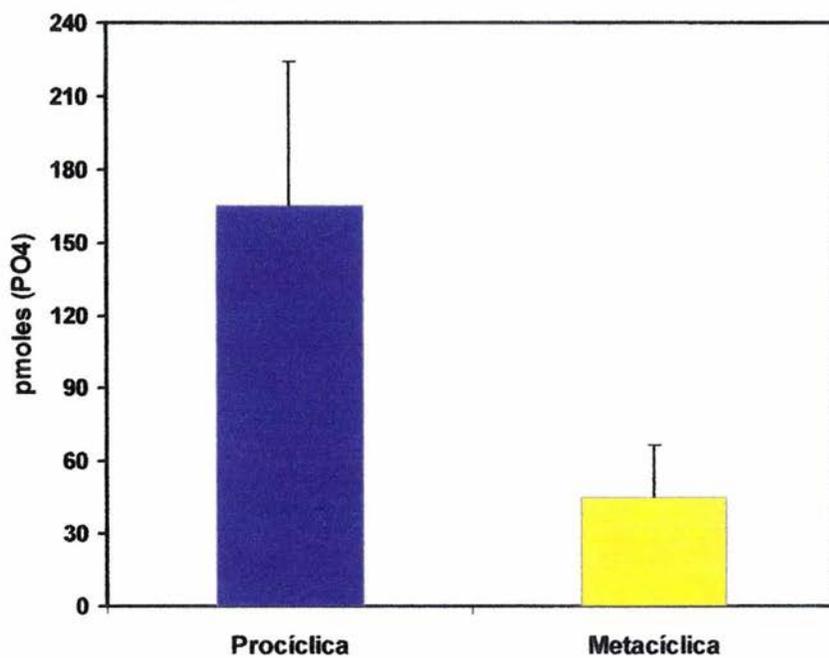
Con el fin de conocer las condiciones óptimas de pH para la actividad de la fosfatasa se realizó una curva con acetato de sodio a diferentes pHs que comprende un rango de pH 4 a pH 7. Para ésta determinación se utilizó la fracción solubilizada por el detergente (SN2) de la fase procíclica y metacíclica. En la (figura 13) se observó que el pH óptimo para la fase procíclica fue pH 5.0 y para la fase metacíclica el pH óptimo fue de 6.0 cuando se utiliza como sustrato el p-NPP a 0.1M.

### **5.4 Actividad de PTPasa en promastigotes de la fase metacíclica y procíclica de *Leishmania major***

Para determinar si promastigotes de *leishmania* poseen actividad de proteína tirosina fosfatasa (PTPasa) se determinó la actividad de PTPasa utilizando un Kit Tyrosine Phosphatase Assay System (Promega) el cual esta constituido por un sustrato específico que tiene un único sitio fosforilado en tirosina llamado Tyr phosphopeptide-1 (END P(y) INASL). Para este ensayo se utilizó la fracción solubilizada (SN2) de ambas fases de crecimiento del parásito a la misma concentración de proteína. Se observó que en ambas fases de crecimiento del parásito se presentó actividad de PTPasa, siendo ésta mayor en la fase procíclica con respecto a la metacíclica (figura 14).



**Fig.13** Determinación del pH óptimo de la fosfatasa en la fracción solubilizada de *Leishmania major*



**Fig.14 Actividad de PTPasa en (SN2) de promastigotes de la fase metacíclica y procíclica de *Leishmania major***

### **5.5. Efecto de los inhibidores específicos de PTPasa de *Leishmania major***

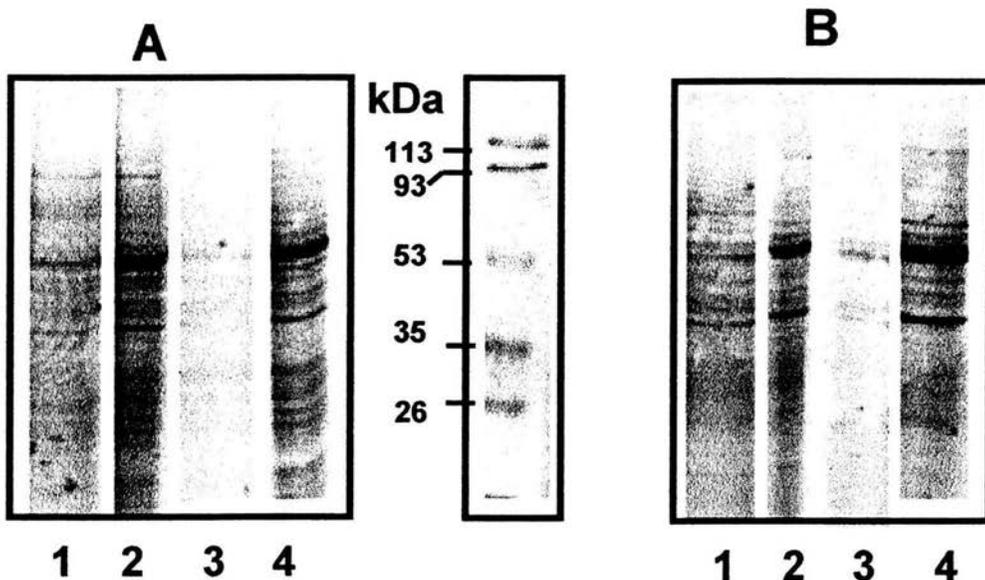
Siguiendo con la caracterización de la enzima se utilizaron inhibidores específicos para proteína tirosina fosfatasa y serina treonina fosfatasa donde se observó un 100% de inhibición de la actividad de PTPasa, presente en el SN2 de promastigotes de la fase metacíclica tanto con los inhibidores específicos de tirosina fosfatasa como son: ortovanadato de sodio 200  $\mu\text{M}$ , molibdato de amonio 200 $\mu\text{M}$ , así como inhibidores de serina-treonina fosfatasa, calyculin 5 nM, ácido okadaico (1 $\mu\text{M}$ ), trifluoperazina 100  $\mu\text{M}$ . En promastigotes de la fase procíclica no se presentó el mismo patrón de inhibición, ya que los inhibidores de tirosina fosfatasa presentaron una inhibición parcial y los inhibidores de serina treonina fosfatasa únicamente inhibieron entre 17 al 33% (Tabla 3).

### **5.6 Análisis electroforético del fraccionamiento de *Leishmania major***

Se analizó el fraccionamiento subcelular de *Leishmania major*, observándose el patrón proteico en geles de poliacrilamida al 10% teñidos con azul de coomassie. En la fracción solubilizada de ambas fases de crecimiento del parásito, se observó el enriquecimiento de una molécula de alrededor de 55 kDa (Fig. 15 A y B línea 4).

Inhibidor	Procíclica Inhibición (%)	Metacíclica Inhibición (%)
Ninguno	0	0
<b>Inhibidores de PTPasas</b>		
Ortovanadato de sodio (200 $\mu$ M)	30 $\pm$ 9.79	100
Molibdato de Amonio (200 $\mu$ M)	87 $\pm$ 12.56	100
Tungstato de sodio (200 $\mu$ M)	51 $\pm$ 10.33	100
Dephostatin (100 $\mu$ M)	25 $\pm$ 12.58	100
<b>Inhibidores de Ser/Treonina fosfatasas</b>		
Calyculin (5 nM)	24. $\pm$ 17.74	100
Ác. Okadaico (1 $\mu$ M)	33 $\pm$ 14.76	100
Trifluoperazina (100 $\mu$ M)	17 $\pm$ 19.7	95 $\pm$ 7.7

**Tabla 3 Efecto de inhibidores específicos de fosfatasas sobre la actividad de PTPasa de promastigotes de la fase procíclica y metacíclica de *Leishmania major***



**Fig.15 Análisis en PAGE-SDS del fraccionamiento de *Leishmania major* teñido con azul de coomassie**

**(A) Procíclica**

Línea 1: Extracto total (ET)

Línea 2: Pastilla 1

Línea 3: Pastilla 2

Línea 4: Sobrenadante 2

**(B) Metacíclica**

Línea 1: Extracto total

Línea 2: Pastilla 1

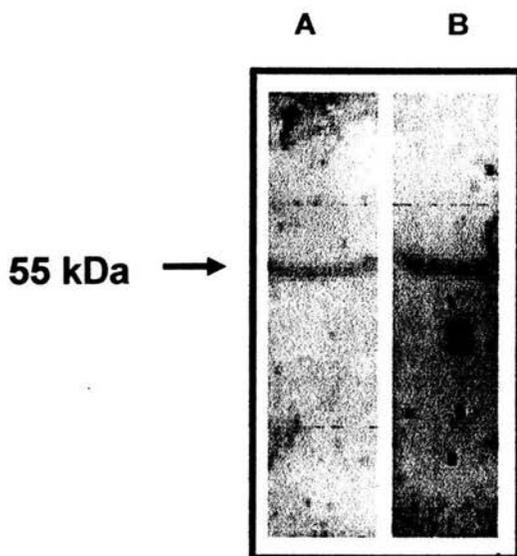
Línea 3: Pastilla 2

Línea 4: Sobrenadante 2

### 5.7. Identificación de la PTPasa de *Leishmania major* por inmunolectrotransferencia con un anticuerpo monoclonal $\alpha$ -PTPasa 1B de placenta humana y con un anticuerpo $\alpha$ -Tyr ACP 115 de *Trypanosoma brucei*

Existen reportes los cuales mencionan que las PTPasas de eucariontes superiores poseen un sitio catalítico altamente conservado. <sup>(60)</sup>Con la finalidad de conocer si en la fracción solubilizada, donde se encontró actividad de PTPasa pudiera encontrarse alguna molécula que compartiera epítomos con la PTPasa de placenta humana y la PTPasa de *Trypanosoma brucei*, se corrieron geles de poliacrilamida con muestra de SN2 precipitadas con acetona de ambas fases de crecimiento del parásito y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa las cuales se revelaron con el anticuerpo  $\alpha$ -Tyr ACP 115 ( PTPasa de *Trypanosoma brucei* ) y el anticuerpo monoclonal PTPasa 1B de placenta.

Los resultados por inmunolectrotransferencia permitieron observar que el anticuerpo monoclonal ( $\alpha$  -PTPasa 1B de placenta humana) Figura 16 carril 1 y 2 reconocieron una molécula de alrededor de 55 kDa y el anticuerpo ( $\alpha$ - Tyr ACP 115 de *Trypanosoma brucei*, ) Figura 17 carril 1(fase procíclica) y 2 (fase metacíclica) reconocieron una molécula de alrededor de 55 kDa. Estos ensayos fueron confirmados con ensayos de inmunoprecipitación, donde se observó que el anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -PTPasa 1B de placenta humana inmunoprecipitó el componente de 55 kDa (Fig.18). Estos resultados confirman que la PTPasa de *Leishmania* comparte epítomos con la organismos eucariontes superiores.

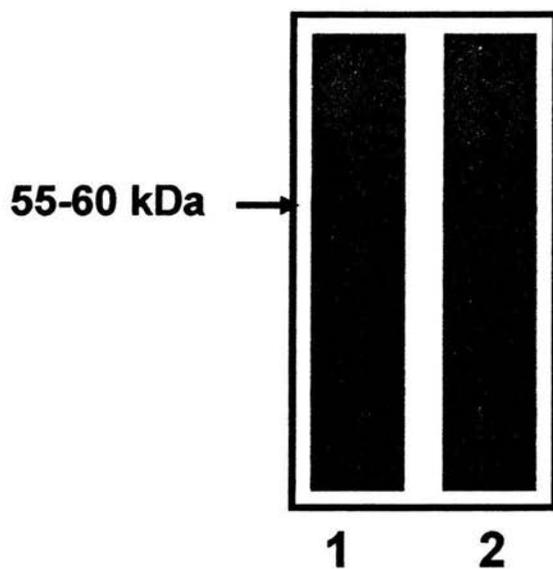


**Fig.16** Identificación de la PTPasa de *Leishmania major* por inmuno-electrotransferencia con un anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -PTPasa 1B de placenta humana en la fracción solubilizada

Wb:  $\alpha$  -PTPase 1B

A: Procíclica (10  $\mu$ g) de proteína

B: Metacíclica (1 $\mu$ g) de proteína

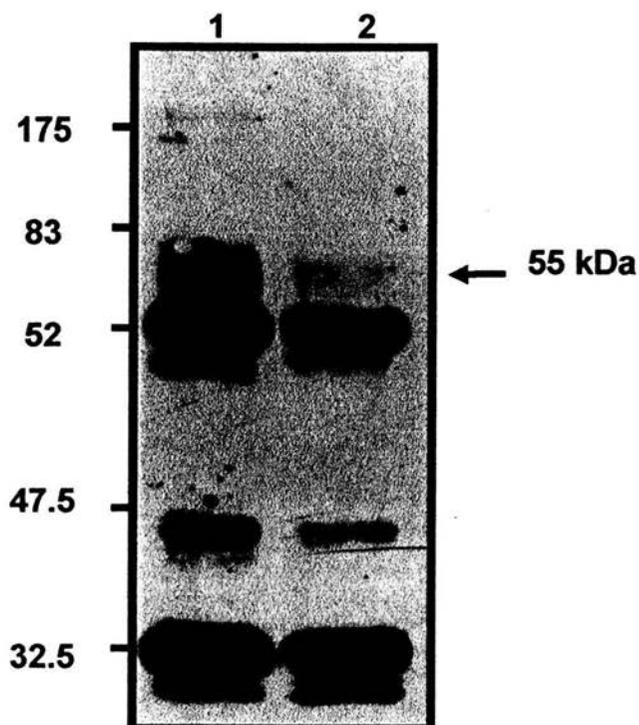


**Fig.17** Identificación de la PTPasa de *Leishmania major* por inmunoelectrotransferencia con un anticuerpo  $\alpha$ -Tyr ACP 115 de *Trypanosoma brucei*

Wb:  $\alpha$ -TryAcP115

1: Procíclica 114  $\mu$ g de proteína

2: Metacíclica 35 $\mu$ g de proteína



**Fig.18** Inmunoprecipitación de la proteína tirosina fosfatasa por anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -PTPasa 1B de placenta humana

**1 SN2** *L. major* metacíclica

**2 SN2** *Entamoeba histolytica* (control)

## **VI. D I S C U S I Ó N**

En la leishmaniasis poco se sabe de los procesos de fosforilación-desfosforilación. Algunos reportes describen que la invasión del parásito *Leishmania* a macrófagos induce las proteínas tirosinas fosfatasas del macrófago provocando una desregulación en los eventos de señalización de estas células fagocíticas.<sup>(67)</sup>

Por otro lado en el parásito también han sido descritas la presencia de fosfatasas de tipo lisosomal las cuales únicamente se han utilizado como marcadores enzimáticos lisosomales.<sup>(38)</sup>

Debido a los pocos antecedentes que se tienen sobre la participación de *Leishmania* en los mecanismos de transducción de señales en la célula hospedera y en especial a la participación de las fosfatasas del parásito en la desfosforilación de proteínas esenciales en estos eventos, nuestro interés principal fue identificar si *Leishmania major* posee una proteína tirosina fosfatasa. Se trabajó con las dos fases de crecimiento del parásito: metacíclica (fase infectiva) y procíclica (fase no infectiva).

El paso inicial fue el proceso de fraccionamiento subcelular el cual fue crucial para la solubilización de esta proteína asociada a membrana.

Debido a la solubilización con el detergente la actividad específica de fosfatasa ácida se incrementó 147.7% para la fase metacíclica y 324.4 % para la fase procíclica y la cantidad de proteína descendió de 2.2 a 0.074 mg en la fase metacíclica y 24.468 a 2.375 en la fase procíclica. En este proceso la enzima fue purificada 2 veces más para procíclica con respecto a metacíclica, estos resultados comparados con otros

procesos del fraccionamiento de la PTPasa de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* <sup>(65)</sup> donde se observa un incremento de purificación hasta 2305% pero sin embargo en este procedimiento el SN2 de *E. histolytica* se paso por una columna de intercambio iónico obteniendo la enzima mas pura.

Cuando estos pasos del fraccionamiento fueron analizados por tinción con azul de coomassie se observó un enriquecimiento de una proteína entre 55-57 kDa, este PM ha sido reportado en la purificación de PTPasas en el parásito como *Ascaris suum* <sup>(62)</sup> y recientemente *E. histolytica* <sup>(65)</sup>. Dentro de las propiedades de las fosfatasas, fue caracterizada como una proteína ácida ya que para la fosfatasa de promastigotes de la fase procíclica el pH óptimo para su actividad fue 5.0 y para metacíclica fue 6.0. Este pH se encuentra dentro del rango de pH óptimo reportado para las fosfatasas de otros microorganismos e inclusive para otras especies de *Leishmania* <sup>(68,69)</sup>.

Se conoce que existen dos tipos principales de fosfatasas, las que desfosforilan (serina/treonina) y las que desfosforilan residuos tirosina. Existen reportes en parásitos como *Trypanosoma* <sup>(61)</sup> y *E. histolytica* <sup>(63)</sup> donde demuestran la actividad de proteína tirosina fosfatasa por desfosforilación de péptidos como Tyr-(p) ratyde y fosfoaminoácido como la O-fosfo-L-tirosina. En nuestro caso se utilizó el Tyr phosphopeptido-1 END(PY) INALS el cual es un péptido con un único sitio fosforilado en tirosina. La PTPasa de *Leishmania* tanto de la fase procíclica como metacíclica fue capaz de desfosforilar este sustrato, presentándose una mayor actividad de PTPasa en la fase procíclica con respecto a metacíclica.

El patrón de sensibilidad a inhibidores de fosfatasa se utiliza como una caracterización preliminar de estas enzimas como PTPasa. Las PTPasas que desfosforilan residuos tirosina y las que desfosforilan residuos serina /treonina presentan un perfil diferencial en cuanto a su sensibilidad/resistencia a diferentes compuestos químicos.

Las fosfatasa específicas de tirosina son inhibidas por concentraciones micromolares de tungstato, vanadato, molibdato y defostatin.<sup>(70,71,72)</sup> Por el contrario las fosfatasa de serina treonina son inhibidas por concentraciones nanomolares de ácido okadaico y concentraciones micromolares de trifluoperazina y calyculina.

La actividad de PTPasa de *Leishmania* en la fase metacíclica fue inhibida 100%, por concentraciones micromolares de tungstato, molibdato, orthovanadato y defostatin, además fue inhibida por concentraciones nanomolares de ácido okadaico, un inhibidor de serina/ treonina fosfatasa sin embargo no fue inhibida por trifluoperazina. Estos resultados sugieren la presencia de una PTPasa de actividad de tipo dual, es decir que además de desfosforilar residuos fosforilados en tirosina también desfosforila residuos serina/ treonina. En el caso de la fase procíclica la actividad de PTPasa fue inhibida un 87% por concentraciones micromolares de molibdato, un 50% por tungstato, un 30% por orthovanadato y solo un 25% por defostatin. Para los inhibidores de serina/treonina fosfatasa, calyculina presentó un 24% de inhibición, ácido okadaico un 33% y trifluoperazina un 17%. Estos datos reflejan un tipo de inhibición parcial por ambos grupos de inhibidores, sugiriendo que posiblemente puede tratarse de un tipo de PTPasa atípica.

Un resultado muy interesante fue el obtenido por ensayos de inmunoelectrotransferencia y confirmado por ensayos de inmunoprecipitación, los cuáles revelaron el reconocimiento de una proteína de aproximadamente 55 kDa, por un anticuerpo  $\alpha$ -PTPasa 1B de placenta humana este peso molecular es muy similar al de PTPasas ya caracterizadas en bacterias como *Prevotella* y en parásitos como *Trypanosoma*,<sup>(61)</sup> *Ascaris*<sup>(62)</sup> y *Entamoeba histolytica*.<sup>(65)</sup>

Adicionalmente encontramos la presencia de una proteína de 55-60 kDa, que fue reconocida con un anticuerpo  $\alpha$ -Tyr ACP 115 el cual esta dirigido hacia el sitio catalítico de una PTPasa de *Trypanosoma brucei*, este reconocimiento también fue mayor en la fase metacíclica que procíclica ya que para ser identificada esta proteína se incrementó la concentración de proteína de la fase procíclica con respecto a la fase metacíclica.

Los datos obtenidos sugieren que el parásito *Leishmania* pudiera poseer 2 tipos de PTPasas diferentes. Todos estos datos demuestran la presencia de una PTPasa en mayor contenido en la fase infectiva del parásito apoyan la hipótesis de que la PTPasa de *Leishmania* pudiera constituir un elemento importante en el mecanismo de patogenicidad del parásito. Ya que como se sabe la modulación de la fosforilación en residuos tirosina que participan en las vías de señalización representa un importante mecanismo por medio del cual los patógenos pueden interferir en la biología celular de la célula hospedera. Los reportes de fosfotirosina fosfatasa de otros microorganismos patógenos como: *Yersinia sp*, *Salmonella sp*,

*Mycobacterium*, y muy recientemente *Entamoeba histolytica*,<sup>(65)</sup> señalan que estas enzimas pueden participar como un factor de virulencia ó desregulación de las vías de señalización. Debido a lo anterior nosotros pensamos que *Leishmania major* pueda tener una estrategia similar a los microorganismos antes mencionados debido a que posee también una PTPasa. Por todo lo anterior resulta interesante analizar el efecto de esta enzima en los eventos de señalización de la célula hospedera.

## **VII . CONCLUSIONES**

*Leishmania major* posee actividad de proteína tirosina fosfatasa la cual fue comprobada por:

- ❖ Desfosforilación del péptido END p(Y) INASL(1118 Da) que posee un sitio fosforilado en tirosina
- ❖ Patrón de sensibilidad a inhibidores específicos de PTPasa
- ❖ Comparte epítomos con las PTPasa de placenta humana y del parásito *Trypanosoma brucei*.

## **VIII.PERSPECTIVAS**

El hallazgo de esta enzima abre nuevas perspectivas sobre la interacción hospedero-parásito. Lo cual resulta interesante investigar el efecto de la PTPasa de *Leishmania* de la fase metacíclica en macrófagos a nivel de :

- ❖ Fagocitosis
- ❖ Estallido respiratorio
- ❖ Óxido nítrico
- ❖ Secreción de citocinas

## APÉNDICE

**Acrilamida: Bis- Acrilamida**

Acrilamida	29.2g
Bis-Acrilamida	0.8g

**Azul de Coomassie**

Etanol 95%	500 ml
Ácido acético glacial	100 ml
Agua desionizada	400 ml
Azul brillante R- 250	2.0 g

Nota: disolver toda la noche.

**Amortiguador de Acetato de sodio pH 5.0 y 6.0**

Se prepara una solución de acetato de sodio 0.2 M y se ajusta el pH con ácido acético

**Amortiguador de Corrida 10 X pH 8.3**

Tris( 25 mM)	30.3 g
Glicina(190mM)	144.0 g
SDS (0.1%)	10.0g

**Gel concentrador al 10%**

Tris 0.5 M pH 6.8	700µl
dH <sub>2</sub> O	500µl
Bis-acrilamida	3.3 ml
Persulfato de amonio	40 µl
Temed	5µl

**Gel separador al 10%**

Tris 1.5 M pH 8.8	2.5 ml
dH <sub>2</sub> O	4.2 ml
Bis-acrilamida	3.3 ml
Persulfato de amonio	40µl
Temed	2µl

Persulfato de amonio al 10%

**MEDIO RPMI**

RPMI 450 .....450ml

•Glutamina..... 5ml

♣Hepes.....5 ml

Suero fetal bovino descomplementado a 56 °C 30 min

**Nota:**

♣Hepes se usa (2.3 g/ litro)

•Glutamina se disuelve en 20 ml en agua bidestilada estéril para preparar 100 ml

**PBS 1X**

NaCl 8.0 g

KCl 0.2g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.15gKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g

Agua bidestilada

**Solución desteñidora**

Agua desionizada 1,25 lt

Ácido acético 0.25lt

Metanol 1.0lt

**Solución de transferencia**

Tris-Glicina 10X 100 ml

Metanol 200 ml

dH<sub>2</sub>O 700ml❖ **Solución de lisis**

Imidazol 10 mM pH 7.2

Aprotinina 10 µg/ml

Leupeptina 2 µg/ml

EDTA 5 mM

β-mercaptoetanol 0.1%

Benzamidina 1 mM

Tritón X-100 2%

- ❖ Nota: Esta solución se prepara en el momento de ser utilizada y el tritón se agrega hasta el final.

## MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

Marca	Producto
SIGMA	Tungstato de sodio Orthovanadato de sodio Molibdato de amonio Imidazol Aprotinina Leupeptina Benzamidina 2-mercaptoetanol BSA Triton X-100 Azul Brillante R- 250 p-NPP EDTA
BIORAD	Acrilamida Bis-acrilamida Bradford Marcadores de peso molecular Papel de nitrocelulosa Temed

CALBIOCHEM	Calyculin A Defosfatin Ácido okadaico
KODAK	Revelador Fijador Films
ZYMED	IgG cabra anti ratón (H+L) Conjugado con peroxidasa
ONCOGENE	PTPasa 1B de placenta humana
PIERCE	Sustrato para quimioluminiscencia
PROMEGA	Sistema de análisis de tirosina fosfatasa
MERCK	Acetato de sodio
BAKER	NaOH

$\alpha$  - Tyr ACP 115 gentilmente donado por el Dr Norbert. Bakalara del laboratorio de parasitología de la Universidad Victor Segalen Bordeaux II Francia.

<b>Equipo</b>	<b>Marca</b>
Balanza analítica	OHAUS
Campana de flujo laminar	NUAIRE
Cámara de electroforesis	BIORAD
Fuente de poder	
Centrífuga	BECKMAN
Ultracentrífuga 5417 R	EPPENDORF

Lector de Elisa	BIO-TEK
Incubadora	LAB-LINE
Micropipetas	EPPENDORF
Sonicador	SONICS
Potenciometro	BECKMAN
Agitador magnético	LABINCO
Vortex	THERMOLYNE
Congelador de -70°C	SCIENCE
Microscopio óptico	OZAUS

## TÉCNICAS REALIZADAS.

### Técnica de Inmunolectrotransferencia para $\alpha$ -PTPasa.

#### Procedimiento para la elaboración del gel

- 1.-Se limpiaron: vidrios, peines, separadores con alcohol
- 2.-El vidrio más grande abajo y se le coloca frente el vidrio más pequeño
- 3.-Los separadores van a los extremos de los vidrios
- 4.-Se levantaron ambas placas y se colocaron en la cámara
- 5.-Se agregó agua para verificar que estuviera bien ensamblada
- 6.-Se secó con papel filtro
- 7.-Se mezclaron las cantidades correspondientes de los ingredientes del gel al 10%
- 8.-Se agregó primero y rápidamente el gel separador con la ayuda de una pipeta pasteur
- 9.-Una vez agregado se colocaron unas gotas de alcohol isopropílico
- 10.-Una vez que el gel polimerizó, se lavó con H<sub>2</sub>O bidestilada y se secó
- 11.-Se adicionó el gel concentrador rápidamente y se puso el peine
- 12.-Una vez que ha polimerizado se retira el peine
- 13.-Se lavó con agua bidestilada
- 14.-Se secó

## **Preparación de las muestras**

- ◆ Se descongelaron las muestras
- ◆ Se colocaron las cantidades adecuadas (previo ajuste de proteínas) en tubos eppendorf
- ◆ Se agregó posteriormente amortiguador de muestra 1X, 2x ó 5X según corresponda
- ◆ Las muestras se pusieron a hervir a 96°C por 3 min

## **Montaje de la cámara**

- ◆ Se colocó el gel en la cámara
- ◆ Se agregó el buffer de corrida 1X
- ◆ Se colocaron los marcadores de peso molecular en los primeros carriles
- ◆ Se conectó a la fuente de poder
- ◆ 70 volts hasta que las muestras se alinien en el gel concentrador
- ◆ Después que las muestras pasaron el gel concentrador se subió el voltaje hasta 100-120 volts

## Procedimiento para la transferencia

### Cámara húmeda

◆ Si las membranas que se utilizaron son de nitrocelulosa se realizó lo siguiente:

1. Se cortó papel de Nitrocelulosa de 6X9 cm
2. En una charola se tienen las 2 placas donde se colocó el gel con el papel de nitrocelulosa
3. Las placas se desarmaron sacando las 2 esponjas que contienen cada una
4. Se agregó el amortiguador de transferencia para humedecerlas
5. Se tomó una placa, la cual consta de 2 colores diferentes: negro y rojo
6. La parte negra es la que se colocó hacia abajo, enfrente se colocó una esponja, 2 papeles filtros, el gel, la membrana de nitrocelulosa, el cual previamente se le hizo una muesca para evitar confusiones, papel filtro, esponja, se sacaron las burbujas con un tubo de ensaye y posteriormente se cerró
7. Se colocó dentro de la cámara
8. La otra placa se realiza el mismo procedimiento
9. Se colocó atrás de las placas un bloque pequeño de hielo
10. Se colocó la barra magnética
11. Se agregó el buffer de transferencia hasta cubrir perfectamente las placas
12. Se cerró

13. En una charola que contenga hielo y se encuentre sobre un agitador magnético, se coloca la cámara de transferencia
14. Se conecta a la fuente de poder a una corriente no mayor de 370 mA, por 90 min

### **SEMI-SECO**

1. Se limpió el equipo( Trans-blot semiseco)
2. Se humedeció el papel filtro que viene incluido en equipo, en amortiguador de transferencia y se colocó en el equipo
3. Se humedeció la membrana de nitrocelulosa y se colocó sobre el papel filtro
4. Se puso el gel y otro papel filtro
5. Se eliminaron las burbujas con la ayuda de un tubo de ensaye
6. Se conectó a la fuente de poder
7. Programar la fuente a amperaje constante que va a depender del tamaño de la membrana<sup>1</sup>. 90 min. (<sup>1</sup> 0.3 miliampers X cm<sup>2</sup> )

## Inmunodetección

1. Una vez terminado el tiempo se sacó la membrana
2. Con la ayuda de un lápiz con punta fina se colocaron puntos sobre las bandas de los marcadores de peso molecular
3. Se cortaron con una navaja las partes sobrantes del papel transferido
4. La membrana se colocó en un recipiente pequeño de plástico, específico para el anticuerpo  $\alpha$ -PTPasa
5. Se agregó la solución bloqueadora (leche al 5% en TBST 1X) y se colocó el recipiente en una placa de agitación por 1 hr
6. Después se lavó 3 veces con TBST 1X de 10 a 15 min. cada lavado
  - ♦ Se agregó el anticuerpo  $\alpha$ -PTPasa 1B de placenta humana 5:1000 en 3% de leche en TBST 1X
7. Se dejó incubar toda la noche
8. Al día siguiente se recuperó el anticuerpo colocándose en tubo, cubierto con papel aluminio y perfectamente etiquetado
9. Se lavó 2 hrs. con TBST 1X
10. Se agregó el segundo anticuerpo cabra anti ratón conjugado con peroxidasa 1:5000 en TBST 1X al 3% leche
11. Se incubó 2 hrs
12. Se lavó 1 día con TBST 1X

## Revelado de las membranas por quimioluminiscencia

1. Se cortaron acetatos y se colocaron en la placa de exposición
2. El procedimiento siguiente se realizó en el cuarto oscuro
3. Mezclar 1 ml de sustrato + 1 ml de luminol. (Esta mezcla se hace en un recipiente nuevo)
4. Se colocó la membrana
5. Se humedeció la membrana con la misma solución por ambos lados.
6. Se colocó la membrana en el acetato
7. Se colocaron los films kodak
8. Cerrar la placa
9. Se inició con tiempos cortos
10. Pasado el tiempo, tomar el film con las pinzas y se colocó en el revelador
11. Se puso en agua
12. Después en el fijador
13. Se encendió la luz
14. Se observó la aparición de la banda

Nota; Si la membrana que se va a utilizar es PDVF, antes de utilizarse se activa con metanol 3 min, en agitación. y para bloquear el 1° anticuerpo y el segundo se utiliza BSA al 3% en TBST 1X. Todo lo demás se realiza de la misma manera

## **IX . BIBLIOGRAFÍA**

1. WHO. Tropical diseases. WHO. Div Control Trop Dis. WND/ World Bank/Who Sp. Prog Research tran. Trop. Dis TDR 1992.
2. CHANG, K. P., FONG, D. (1985). Biology of *Leishmania* and leishmaniasis In: Leishmaniasis, human parasitic diseases. Vol. I. Eds Elsevier Science publishers, USA, 30.
3. VELASCO, OSCAR C. La magnitud de una infección endémica: las leishmaniasis. En: La seroepidemiología en México. 1991. Vol. I Pub. Tec. No. 9 Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Dirección General de epidemiología en México. Secretaria de Salud México. pp 67-76.
4. VELASCO, OSCAR C. La leishmaniasis con especial referencia a México. Colección de cuadernos técnicos del INDRE. 1994. SSA México.
5. KANE, M. M., & MOSSER, D. M. (2000). *Leishmania* parasites and their plays to disrupt macrophage activation. Curr. Opin. Hematol. 7, 26-31.
6. SAMADY, J. A., SCHWARTZ, R. A. (1977). Old World cutaneous leishmaniasis . International Journal of Dermatology 36(3), 161-165.
7. LOHOUIS, P. J., LIPOVSKY, M. M., HOEPELMAN, A. L.. (1997). *Leishmania braziliensis* presenting as a granulomatous lesion of the nasal septum mucosa . J Laryngol Otol 111(10), 973-975.
8. [http:// www.mpibc.gw.de/abteil\\_lugen/145](http://www.mpibc.gw.de/abteil_lugen/145)
9. BORA, D. (1999). Epidemiology of visceral leishmaniasis in India. Natl Med J India 12(2), 62-68.

10. ASHFORD, R. W. (1997). The leishmaniasis as model zoonoses. *Annals of Tropical Medicine Parasitology*. 91(7), 693-701.
11. SACKS, DAVID., & KAMHAWI, SHADEN. (2001). Molecular Aspects of Parasite-Vector and Vector-Host Interactions in Leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 453-483.
12. DON Z., QI X., XIE K., K, FIDLER I J. (1993). Protein tyrosine kinase inhibitors decrease induction of nitric oxide synthase activity in lipopolysaccharide. *Journal of Immunology* 151, 2717-2724.
13. WAITUMBI, J. WARBURG, A.(1998). *Phlebotomus papatasi* saliva inhibits protein phosphatase activity and nitric oxide production by murine macrophages. *Infection and Immunity*. 66(4), 1534-1537.
14. JACKSON, T. S., LERNER, E. WEISBROD, R. M.(1996). Vasodilatory properties of recombinant maxadilan. *Am J Physiol*. 271(32), 924-930.
15. LIMA, C. Hermenio., TITUS, G. R.(1996). Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/C mice . *Infection and Immunity*. 64(12), 5442-5445.
16. SACKS, DAVID., & NOBEN, NANCY.(2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Review*.2, 845-857.
17. E, ALLEN. JUDITH., AND M, MAIZEL. S M. (1997). TH1-TH2: realible paradigm or dangerous dogma? *Immunology today*. 18.(8); 387-341.
18. ANURA, J. SHANKAR., TONYA, K. MITCHEN., LAURIE R. HALL., SALVATORE J. TURCO AND RICARD G. TITUS. (1993). Reversion to virulence in *Leishmania*

- major* correlates with expression of surface lipophosphoglycan. *Molecular and Biochemical parasitology*. 61, 207-216.
19. PROUDFOOT, L.O., DONNELL, C.A., LIEW, F.Y. (1995). Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur J Immunol*. 25, 745-750.
  20. M, C. NEELY TB., TURCO S J. (1987). Inhibition of Protein Kinase C activity by the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *Biochem Biophys Res Commun*. 148, 653-657
  21. FRANKENBURG, S., LEIBOVIVI V., MANSBACH N., TURCO S.J, ROSEN G. (1990). Effect of glycolipids of *Leishmania* parasites on human monocyte activity. Inhibition by lipophosphoglycan. *Journal of Immunology* .145, 4284-4289.
  22. PONTE, SUCRE ALICIA., HEISE DIRK, MOLL HEIDRUN. (2001). *Leishmania major* lipophosphoglycan modulates the phenotype and inhibits migration of murine Langerhans cells. *Immunology*. 104, 462-467.
  23. L, JOHN. HO., KIM. KYUNG, SASS., M. PHILIP., HE. SUHUI., JIAYUAN, GENG, HONG X., ZHU, BAIXIN, SALVATORE J. TURCO.(1993). LPG structure function on análisis of *Leishmania* lipophosphoglycan. Distinct domains that mediate binding and inhibition of endothelial cell function. *The American Association*, 3013-3020.
  24. SCHLAGENHAU, F. E., ETGES, R. METCALF. P. (1998). The crystal structure of the *Leishmania major* surface proteinase leishmanolysin (gp 63) structure. 6(8), 1035- 1046.

25. ACOSTA, MEDINA. ENRIQUE., E, ROGER. G., RUSSELL, G. DAVID. (1993). Structurally distinct genes for the surface protease of *Leishmania mexicana* are developmentally regulated. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 57, 31-46.
26. P, B. JOSHI., D, L. SACKS. (1998). Targeted gene deletion of *Leishmania major* genes encoding development stage-specific leishmanolysin (gp63). *Mol microbial*.27, 519-530.
27. G, DAVID. RUSELL., & HEIKE, WILHEM. (1986). The involvement of the major surface glycoprotein (gp 63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. *The Journal of Immunology*. 136(7), 2613-2620.
28. W, ROBERT., OLAFSON., R, JERRY. THOMAS., A. J. MICHAEL., FERGUSON, RAYMOND A. DWEK, M. CHAUDHURI, KWANG-POO THOMAS & RADEMACHER. (1990). Structure of the N- Linked oligosaccharides of Gp 63, the major surface glycoprotein, from *Leishmania mexicana amazonensis*. *The Journal of Biological Chemistry*. 265(21),12240-12247.
29. PASCAL, SCHNEIDE., JEAN PIERRE ROSAT, JACQUES LOUIS & CLÉMENT BORDIER.(1992). *Leishmania major*. differential regulation of the surface metalloproteasa in amastigotes and promastigotes stages. *Experimental Parasitology*. 75, 196-206.
30. GOTTLIEB, M., DWYER, D. M. (1982). Identification and partial characterization of an extracellular acid phosphatase activity of *Leishmania donovani* promastigotes. *Molecular Cellular Biology*. 2, 76-81.

31. LOVELACE, J.K., DWYER, D.M., GOTTLIEB, M. (1986). Purification and characterization of the *Leishmania donovani*. *Molecular Biochemistry Parasitology* . 20, 243-251.
32. GOTTLIEB, M. DWYER, D. M. (1981). *Leishmania donovani*: Surface membrane acid phosphatase activity of promastigotes. *Experimental Parasitology*. 52, 117-128.
33. MENZ, B .WINTER G. IIG T. (1991). Purification and characterization of a membrane bound acid phosphatase of *Leishmania mexicana*. *Molecular Biochemistry Parasitology*. 47, 101-81.
34. REMALEY, A. T., DAS, S. CAMPBELL. P. I., LA ROCEA, G.M, POPE, M.T, GLEW RH. (1985). Characterization of *Leishmania donovani* acid phosphatases. *Journal Biological Chemistry*. 260, 880-886.
35. REILLY, T. J., BARON, G. S., NANO, F. E &. KUHLENSCHMIDT, M. S. (1996). Characterization and sequencing of a respiratory burst-inhibiting acid phosphatase from *Francisella tularensis* *Journal Biological Chemistry*. 271, 10973-10983.
36. BACA, O. G., M, J. ROMAN., R, H. GLEW., R, F. CHRISTNER., J, E. BUHLER., A.S. & ARAGON. (1993). Acid phosphatase activity in *Coxiella burnetti*: a possible virulence factor. *Infection and. Immunity*. 61, 4232-4239.
37. SAHA, A. K., J, N. DOWLING., K, L. LAMARCO., S, DAS. A.T., REMALEY, N. OLOMU. M.T. POPE., AND R, H. GLEW. (1985). Properties of an acid

- phosphatase from *Legionella micdadei* which blocks superoxide anion production by human neutrophils. Arch Biochem Biophys. 243, 150-160.
38. SINALA, N., G. K. KHULLER, & V. K. VINAYAK. (1992). Acid phosphatase activity of promastigotes of *Leishmania donovani*: a marker of virulence. FEMS Microbiol Lett. 94, 221-228.
39. NAGAKURA, K., TACHIOLOANA, & Y. KANEDA. (1985). Alteration of the cell surface acid phosphatase concomitant with the morphological transformation in *trypanosoma cruzi*. Com. Bioch. Physiol. 81 B(4), 815-817.
40. WALTON, K., DIXON, J. E. (1993) Protein Tyrosine Phosphatase. Annu Rev Biochem 62, 101-120.
41. BRUCE. ALBERST., BRAY. DENNIS. JULIAN.(1994). Molecular biology of the cell, 3<sup>rd</sup> edition.
42. STEWART, A. A. (1993). Purificación of Protein tyrosine kinases. In Protein Phosphorylation: A practical A pproach ( ed. Hardie, D.G.), pp. 145-171.
43. HOOFT, VAN. HUIJSDUIJEN, R. (1998) .Protein tyrosine phosphatase Counting the tree in the forest. Gene: 225,1-8.
44. ZHANG, Z.(1997). Structure, mechanism, and specificity of protein tyrosine phosphatase. Current topics in cellular regulation. 3, 21-65.
45. Protein phosphatases structure and function. (1996). Elsevier. Trends. Journals. 251, vol 21. No.11 pág 407-453.
46. Lau, K.H.W., J.R. Farley, and D.J. Baylink. (1989).Phosphotyrosyl protein phosphatases. Biochem. 138, 45-51.

47. DIXON, E, JACK. (1996). Protein tyrosine phosphatase. Their Roles in Signal Transduction. Department of Biological Chemistry. The University of Michigan. Ann. Arbor Michigan. 51,405-415.
48. MOUREY, R. J. & DIXON, J.E. (1994). Protein tyrosine phosphatases: Characterization of extracellular and intracellular domains. *Curr Opin Genet Dev* 4, 31-39.
49. NEEL, B. G. (1997). Role of Phosphatases in Lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* 9, 405-420.
50. LIT. LIWU AND DIXON E. JACK. ( 2000). Form function and regulation of protein tyrosine phosphatases and their involvement in human disease. *Seminars in Immunology*.12, 75-84.
51. SCHUBERT, H. L.(1995). *Protein Sci.* 4,1904-1913.
52. WERA, S. HEMMING, B.A. (1995). Serine/threonine phosphatases *Biochem J*; 311 (part1), 17-29.
53. COHEN, P.T. NOVEL .(1997). Protein Serine/threonine phosphatase: variety is the spice of life. *Trends Biochem.* 22, 245-251.
54. NINFA, E. G. & DIXON, J.E. (1994). Protein tyrosine phosphatase in disease processes. *Trends in Cell Biology.* 4, 427-430.
55. GUAN, K. & DIXON, J.E. (1990). Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. *Science* 249, 553-556.
56. ROSQVIST, R. BOLIN, I. & WOLF-WATZ, H. (1988). Inhibition of phagocytosis in *Yersinia pseudotuberculosis* : a Virulence plasmid-encoded ability involving the Yop 2b protein. *Infection and Immunity* 56, 2139-2141.

57. BLISKA, J. B & BLACK, D. S. (1995). Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in macrophages by the *Yersinia pseudotuberculosis* tyrosine phosphatase. *Infection and Immunity*. 63, 681-685.
58. BAKALARA, N., SEYFANG, A., T. BALTZ, & DAVIS, C. (1995). *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*; life cycle-regulated protein tyrosine phosphatase activity. *Experimental Parasitology* 81, 302-312.
59. FURUYA, T., ZHONG, L., MEYER-FERNANDES, J. R., HONG-GANG, L., MORENO, S. N. J. & DOCAMPO, R. (1998). Ecto-protein tyrosine phosphatase activity in *Trypanosoma cruzi* infective stages. *Molecular and Biochemical Parasitology* 92, 339-348.
60. BAKALARA, N., SEYFANG, A., BALTZ, & DAVIS, C. (1995). Characterization of a life-cycle-stage-regulated membrana protein tyrosine phosphatase in *Trypanosoma brucei*. *Eur. J. Biochem.* 234, 871-878.
61. BAKALARA, NORBERT., SANTARELLI, XAVIER., DAVIS, CHARLES & BALTZ, THÉO., (2000). Purification, cloning, and characterization of an Acid Ectoprotein phosphatase Differentially Expressed in the Infectious Bloodstream from of *trypanosoma brucei*. *The Journal of Biological chemistry*. 12, 8863-8871.
62. SCHMID, B., WIMMER, M., TAG, C., R. HOFFMANN, & HOFER, H. W. (1996). Protein Phosphotyrosine phosphatase in *Ascaris Suum* muscle. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 77, 183-192.
63. AGUIRRE-GARCÍA, M.M., ANAYA-RUIZ, M. & TALAMÁS-ROHANA, P. (2003). Membrana-bound acid phosphatase (MAP) from *Entamoeba histolytica* has

- phosphotyrosine phosphatase activity and disrupts the actin cytoskeleton of host cells. *Parasitology*. 126, 195-202.
64. COOL, D.,E, & J, J., BLUM. (1993). Protein tyrosine phosphatase activity in *Leishmania donovani*. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 127/128, 143-149.
65. AGUIRRE-GARCÍA, M.M., CERBON, J. & TALAMÁS-ROHANA, P. (2000). Purification and properties of an acid phosphatase from *Entamoeba histolytica* HM-1 IMSS. *International Journal for Parasitology*. 30, 585-591.
66. BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding- *Anal Biochem*. 72, 248-54.
67. Forget, Genevieve., A, Katherine., Brochu Sebastien., Rivest, Serge., Radzioch, Danuta., Olivier, Martin.(2001). Role of host phosphotyrosine phosphatase SHP-1 in the development of murine leishmaniasis. *Eur J. Immunol*. 31, 3185-3196.
68. SHIBATA, K.I., M. NODA, Y. SAWA, T. & WATANABE. (1994). Acid Phosphatase Purified from *Mycoplasma fermentans* has protein tyrosine phosphatase –like activity. *Infection and Immunity*. 62(1), 313-315.
69. MEYER-FERNANDES, J. R., VANNIER-SANTOS, M.A., LOPES, C. S. (2002). Characterization of an ecto-phosphatase activity in the human parasite *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology*. 88, 991-997.
70. GORDON, J. A. (1991). Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. En : Hunter T. Sefton, B.M, (editors). *Meth Enzymol*. Academic Press, New York. 201, 477- 482.

71. SWARUP , G., S. COHEN, & D.L. GARBERS. (1982). Inhibition of membrane phosphotyrosylprotein phosphatase activity by vanadate. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 107, 1104-1109.
72. HARDIE, D. G. (1993). Use of protein phosphatase inhibitors in intact cells. En: Hardie, D.G(ED) *protein phosphorylation: A practical approach.* Oxford: IRL Press., 109-119.