



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

EFFECTO DE LA PROTEINA TIROSINA FOSFATASA DE
ENTAMOEBA HISTOLYTICA EN EL ESTALLIDO OXIDATIVO
DE NEUTROFILOS ACTIVADOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MARIA DEL ROCIO CABRERA ARRIAGA

ASESORA: DRA. MARIA MAGDALENA AGUIRRE GARCIA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2005

m. 344920



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES 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:

Efecto de la proteína tirosina fosfatasa de Entamoeba histolytica
en el estallido oxidativo de neutrófilos activados.

que presenta la pasante: María del Rocio Cabrera Arriaga
con número de cuenta: 9656537-7 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 3 de Febrero de 2005.

| | | |
|------------------|--|--|
| PRESIDENTE | <u>QFB. Ma. Esther Revuelta Miranda</u> | |
| VOCAL | <u>QFB. Martha Patricia Zuñiga Cruz</u> | |
| SECRETARIO | <u>Dra. María Magdalena Aguirre García</u> | |
| PRIMER SUPLENTE | <u>QFB. Rene Damian Santos</u> | |
| SEGUNDO SUPLENTE | <u>QFI. Guadalupe Koizumi Castro</u> | |

La educación es el vestido de gala para asistir a
la fiesta de la vida.



Nunca consideres el estudio como una obligación
sino como una oportunidad para penetrar en el
bello y maravilloso mundo del saber.

Albert Einstein

Dedicatorias

A Dios

Por permitirme concluir mis estudios profesionales y acompañarme durante toda la vida. Por regalarme días de alegría y salud.

Porque todo lo puedo con la ayuda de Dios que es mi fortaleza.

A mis Padres

Por los sacrificios realizados para darme una educación, la cual es la única herencia para una vida llena de éxitos y satisfacciones.

Por enseñarme los valores de una familia, a no desistir cuando pensé que era inútil seguir adelante.

Porque en los momentos más difíciles me demostraron su amor.

A Claudia y Beto

A ustedes que ocupan un lugar muy especial en mi corazón, porque aunque no siempre estemos de acuerdo, cuentan conmigo para todo.

A las familias Cabrera y Arriaga

Porque su apoyo y palabras de aliento me hicieron ligero en camino de la superación personal y académica.

Porque el contar con una familia unida es el mayor tesoro que podemos tener en la vida.

A Raúl

Por tu apoyo durante la realización de este trabajo, por confiar en mí y por no dejarme sola cuando te pedía ayuda, por tu cariño y comprensión.

A mis amigas

A Miriam, Alma, Verónica, Jessica y Beatriz, por escudarme y tratar de comprenderme, animarme cuando me sentí triste. Por los buenos y malos momentos.

La amistad no es estar siempre juntos sino estar siempre presentes.

Gracias por ser de esas personas especiales a las que podemos llamar amigos para toda la vida

Agradecimientos

A DGAPA con número en Programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN210602 por el apoyo económico para la realización de este proyecto.

A la Dra. Patricia Talamás Rohana por la donación de la cepa de *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS y el apoyo en la revisión del trabajo escrito.

Al Dr. José Delgado Domínguez, Amelia Angel y Luz María Rocha, por la asesoría técnica en los ensayos de quimioluminiscencia, colecta y fraccionamiento de amibas y purificación de neutrófilos respectivamente.

A la Dra. María Magdalena Aguirre por su asesoría en la parte experimental y el trabajo escrito. Por su apoyo y amistad durante mi estancia en el laboratorio.

A la Dra. Ingerborg Becker Fauser y su equipo de trabajo del Laboratorio de Inmunoparasitología, del Departamento de Medicina Experimental, por permitirme realizar la tesis en sus instalaciones.

A los Profesores de la FES-Cuautitlán que formaron parte de mi instrucción profesional y por enseñarme también que no todo es estudio y disciplina.

ÍNDICE

| | |
|--|------|
| ABREVIATURAS | IV |
| ÍNDICE DE FIGURAS | VI |
| RESUMEN | VIII |
| | |
| 1. Antecedentes | |
| 1.1. Definición de amibiasis | 1 |
| 1.2. Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i> | 1 |
| 1.3. Mecanismos de patogenicidad de <i>Entamoeba histolytica</i> | 4 |
| 1.3.1. Lectina Gal/Gal Nac | 4 |
| 1.3.2. Ameboporo | 4 |
| 1.3.3. Cisteína proteinasa | 4 |
| 1.4. Absceso hepático amibiano | 5 |
| 1.4.1. Inflamación en el absceso hepático amibiano | 6 |
| 1.5. Evasión del sistema inmunológico por <i>Entamoeba histolytica</i> | 7 |
| 1.6. Estallido oxidativo | 8 |
| 1.6.1. Enzima NADPH oxidasa | 11 |
| 1.6.2. Vía de señalización para la activación de la NADPH oxidasa | 11 |
| 1.6.3. Quimioluminiscencia | 12 |
| 1.7. Inhibición del estallido oxidativo por microorganismos patógenos | 14 |
| 1.8. Inhibición del estallido oxidativo por <i>Entamoeba histolytica</i> | 15 |
| | |
| 2. Justificación | 17 |
| | |
| 3. Hipótesis | 19 |

| | |
|---|----|
| 4. Objetivos | |
| 4.1. Objetivo general | 19 |
| 4.2. Objetivos particulares | 19 |
| 5. Metodología | |
| 5.1. Diagrama de flujo | 20 |
| 5.2. Cosecha de trofozoítos | 21 |
| 5.3. Lisis de trofozoítos y obtención de la fracción solubilizada | 21 |
| 5.4. Purificación de la PTPasa de <i>Entamoeba histolytica</i> por columna de afinidad | 21 |
| 5.5. Purificación de la PTPasa de <i>Entamoeba histolytica</i> por columna de intercambio iónico | 22 |
| 5.6. Seguimiento de la actividad enzimática | |
| 5.6.1. Actividad de fosfatasa ácida | 22 |
| 5.6.2. Actividad de proteína tirosina fosfatasa | 22 |
| 5.7. Determinación de proteína por el método de BIO-RAD DC | 23 |
| 5.8. Purificación de neutrófilos polimorfonucleares | 23 |
| 5.9. Efecto de la PTPasa en el estallido oxidativo de neutrófilos activados | 24 |
| 5.10. Ensayo de fosforilación | 24 |
| 5.11. Identificación de la proteína cinasa activada por mitógeno | 25 |
| 6. Resultados | |
| 6.1. Actividad específica de FA en las fracciones subcelulares de trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> | 26 |
| 6.2. Purificación de la PTPasa por cromatografía en columna | 27 |
| 6.3. Copurificación de la actividad de FA y de PTPasa | 28 |
| 6.4. Efecto de la PTPasa en el estallido oxidativo de PMNs estimulados con PMA | 29 |
| 6.5. Curva dosis respuesta del efecto de la PTPasa en el estallido de PMNs estimulados con PMA | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 6.6. Efecto de la PTPasa en el estallido oxidativo de PMNs estimulados con zymosan | 31 |
| 6.7. Curva dosis respuesta del efecto de la PTPasa en el estallido oxidativo de PMNs estimulados con zymosan | 32 |
| 6.8. Análisis densitométrico del efecto de la PTPasa amibiana en el patrón de proteínas fosforiladas en tirosina de los PMNs | 33 |
| 6.9. Determinación de la presencia de una MAPcinasa en las fracciones celulares conteniendo a la PTPasa amibiana. | 36 |
| 7. Discusión | 37 |
| 8. Conclusiones | 40 |
| 9. Perspectivas | 41 |
| 10. Bibliografía | 42 |
| Apéndice | 46 |

ABREVIATURAS

| | |
|---------------|---------------------------------------|
| °C | Grados centígrados |
| Con-A | Concanavalina A |
| DEAE-celulosa | Dimetilaminoetil-celulosa |
| ER | Estallido respiratorio |
| ERO | Especies reactivas de oxígeno |
| EDTA | Acido Etilén-diamino-tetraacético |
| ET | Extracto total |
| Fig | Figura |
| FA | Fosfatasa ácida |
| fMLP | f-metil leucina fenilalanina |
| GSH | Glutación oxidasa |
| KDa | kilodaltones |
| MAPK | Proteína cinasa mitógeno activado |
| α MM | metil- α -D-manopiranosido |
| μ M | micromolar |
| μ l | microlitros |
| μ g | microgramos |
| μ m | micrometros |
| ml | mililitros |
| MOP | Mieloperoxidasa |
| min | minutos |
| nm | nanómetros |
| NADPH | Nicotina Adenina Dinucleótido fosfato |
| NaCl | Cloruro de sodio |
| PTPasa | Proteína tirosina fosfatasa |
| PMNs | Neutrófilos polimorfonucleares |
| PMA | Acetato de forbol miristato |
| PBS | Amortiguador salino de fosfatos |

| | |
|---------------|---|
| PCK | Proteína cinasa C |
| PLC | Fosfolipasa C |
| P1 | Pastilla1 |
| P2 | Pastilla 2 |
| PAGE-SDS | Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS |
| <i>p</i> -NPP | para-Nitrofenil fosfato |
| SSF | Solución salina fisiológica |
| SN1 | Sobrenadante 1 |
| SN2 | Sobrenadante 2 |
| URL | Unidades relativas de luz |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Fig. 1 Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i> . | 3 |
| Fig. 2. Corte de absceso hepático amibiano. | 6 |
| Fig. 3. Formación de Intermediarios de oxígeno. | 10 |
| Fig. 4. Vías de señalización para la activación de la NADPH oxidasa. | 13 |
| Fig. 5. Efecto de la PTPasa amibiana en el ER de PMNs estimulados con fMLP | 18 |
| Fig. 6. Efecto dosis-respuesta de la PTPasa amibiana en el ER de PMNs estimulados con fMPL. | 18 |
| Fig. 7. Actividad específica de FA en las fracciones subcelulares de trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> | 26 |
| Fig. 8. (A), Purificación de la PTPasa amibiana a través de una columna cromatográfica de afinidad; (B), Purificación de la PTPasa amibiana a través de una columna cromatográfica de intercambio iónico. | 27 |
| Fig. 9. Copurificación de la actividad de FA y de PTPasa. | 28 |
| Fig. 10. Efecto de la PTPasa amibiana en el estallido oxidativo de PMNs estimulados con PMA. (A), En tres distintos experimentos; (B), Porcentaje de la actividad oxidativa. | 29 |
| Fig. 11. Curva dosis respuesta del efecto de la PTPasa en el estallido respiratorio de PMNs estimulados con PMA. | 30 |
| Fig. 12. Efecto de la PTPasa amibiana en el estallido oxidativo de PMNs estimulados con zymosan. (A), En tres distintos experimentos; (B), Porcentaje de actividad oxidativa. | 31 |
| Fig. 13. Curva dosis respuesta del efecto de la PTPasa en el estallido respiratorio de PMNs estimulados con zymosan. | 32 |
| Fig. 14. Análisis del efecto de la PTPasa amibiana en el patrón de fosforilación en tirosina de PMNs. Proteína de 42 kDa. | 33 |
| Fig. 15. Análisis del efecto de la PTPasa amibiana en el patrón de fosforilación en tirosina de PMNs. Proteína de 48 kDa. | 34 |
| Fig. 16. Análisis del efecto de la PTPasa amibiana en el patrón de fosforilación en tirosina de PMNs. Proteína de 55 kDa. | 34 |

- Fig. 17. Análisis del efecto de la PTPasa amibiana en el patrón de fosforilación en tirosina de PMNs. Proteína de 68 kDa. 35
- Fig. 18. Análisis del efecto de la PTPasa amibiana en el patrón de fosforilación en tirosina de PMNs. Proteína de 70 kDa. 35
- Fig. 19. Reconocimiento del anticuerpo ERK (dirigido a la región carboxilo de la ERK 2 MAP cinasa p42 de origen humano) en purificaciones de la PTPasa de *Entamoeba histolytica*. 36

RESUMEN

En la respuesta inmune la fosforilación en residuos tirosina es de gran importancia para procesos como: fagocitosis, producción de citocinas y activación celular. Esta fosforilación esta regulada por proteínas tirosinas cinasas (PTC) y por proteínas tirosinas fosfatasas (PTPasa).

Recientemente ha surgido el interés por el estudio del papel que desempeñan las PTPasas en la patogénesis microbiana. Estudios con PTPasas purificadas de bacterias como *Yersinia* y *Coxiella burnetii* sugieren que estas enzimas pueden estar participando en la supervivencia de estos microorganismos infecciosos por inhibición de los procesos oxidativos de las células fagocíticas.

El estallido oxidativo (EO) es un potente mecanismo de defensa de las células fagocíticas. Para su activación es indispensable la fosforilación de proteínas que activan la enzima NADPH oxidasa, responsable de generar las especies reactivas del oxígeno.

Se ha demostrado que la PTPasa de *Yersinia* y *Coxiella* desfosforilan residuos fosforilados en tirosina, importantes en la vía de transducción de señales del EO. Esta defosforilación provoca la inhibición de la NADPH oxidasa.

Entamoeba histolytica es un parásito protozoario responsable de la amibiasis, el cual posee dos tipos de PTPasas: una PTPasa asociada a membranas y otra que es secretada al medio de cultivo. Trabajo previo con La PTPasa de membrana de *E. histolytica* demostró que esta enzima inhibe de manera dosis dependiente el EO de polimorfonucleares (PMN) estimulados con el péptido f-MLP.

En este trabajo se analizó el efecto de la PTPasa amibiana en el EO de neutrófilos activados con PMA y zymosan. Se observó que dicha enzima no tiene efecto cuando los neutrófilos son estimulados con el PMA, pero que incrementa ligeramente el EO de los neutrófilos activados con zymosan. Además en un análisis densitométrico del patrón proteínas fosforiladas en tirosina de los PMNs se observó un incremento en la fosforilación de 5 proteínas de bajo PM mediante el empleo de un anticuerpo anti-fosfotirososina (PY20). Para determinar si esta hiperfosforilación se debía a cinasas internas se analizaron muestras de eluidos

de Con-A y DEAE en PAGE-SDS utilizando el anticuerpo ERK 2 (dirigido a la región carboxilo terminal de la ERK 2 MAP cinasa p42 de origen humano) y sorpresivamente reconoció un componente con un peso molecular aproximado alrededor de 42 kDa. Estos resultados indican que la PTPasa de *Entamoeba histolytica* puede tener un papel importante en la modulación del EO de los PMNs contribuyendo a la patogénesis amibiana.

1. ANTECEDENTES

1.1 Definición de amibiasis

La amibiasis se define como una infección intestinal o extraintestinal por el parásito protozooario *Entamoeba histolytica*. Basado en datos bioquímicos, inmunológicos y genéticos, *E. histolytica* ha sido reclasificada en dos especies morfológicamente idénticas pero genéticamente distintas: *E. histolytica* como la especie patógena, la cual es el microorganismo causante de la amibiasis intestinal y/o abscesos hepáticos y *E. dispar* como la especie no patógena y no invasiva.¹

1.2 Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*

El humano aparece como hospedero primario, pero también se ha documentado que los primates, gatos, perros y ratas han sido ocasionalmente hospederos. *Entamoeba histolytica* tiene un ciclo de vida simple que consiste en una fase infectiva: el quiste. Es esférico, hialino con una membrana lisa y un poco delgada, mide de 10 μm a 16 μm de diámetro y posee cuatro núcleos. En el citoplasma tanto en el quiste maduro como inmaduro generalmente hay dos tipos de inclusiones alimenticias: 1) una masa de glucógeno de bordes borrosos y 2) las barras cromatoidales muy refringentes cortas o largas de extremos romos.²

La fase de multiplicación: el trofozoíto. Tiene dimensiones variables que fluctúan entre 20 μm a 40 μm de diámetro, el ectoplasma y el endoplasma están bien diferenciados, tiene un solo núcleo, esférico y voluminoso con un diámetro de 4 μm a 7 μm , contiene un pequeño cariosoma central rodeado de un halo incoloro y fijo por un gran número de delicadas fibrillas acromáticas en la superficie interna de la membrana nuclear. Los trofozoítos se mueven relativamente rápido por la formación de pseudópodos, la membrana es delgada y el citoplasma es bastante más viscoso que el endoplasma y rico en glucógeno con ribosomas arreglados en forma de hélice. No presenta la clásica mitocondria, retículo endoplásmico rugoso o aparato de Golgi visible.²

El quiste es ingerido en alimentos y agua contaminados con heces fecales y pasa

a través del estómago y el intestino delgado, el trofozoíto surge en el íleon terminal o cuando el quiste entra en el intestino grueso donde se establece la infección.

La eclosión de los quistes da lugar a amibas multinucleadas que pueden comenzar a alimentarse antes de surgir totalmente del quiste. Terminan su ciclo de reproducción dando origen a trofozoítos uninucleados que colonizan la luz del colon reproduciéndose por fisión binaria.

La forma invasiva del parásito, el trofozoíto, puede penetrar la mucosa intestinal y diseminar a otros órganos como hígado, pulmón, vísceras, cerebro y piel. Los quistes no se desarrollan dentro de los tejidos. La invasión del tejido no es parte del ciclo de vida, ya que este organismo que atraviesa la mucosa no es capaz de dar lugar a nuevas infecciones. Los trofozoítos tiene vida corta fuera del cuerpo y no sobreviven el paso a través del tracto gastrointestinal superior. En contraste los quistes pueden permanecer viables e infectivos en un ambiente húmedo durante varios días (Fig. 1).²

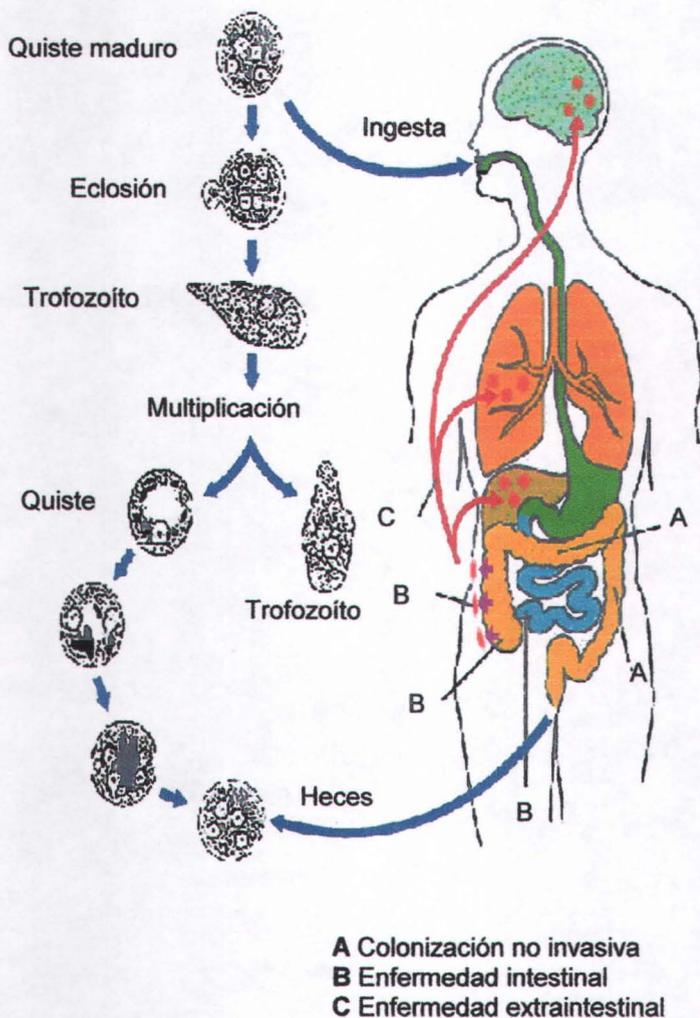


Fig. 1 Ciclo de vida. El quiste es ingerido y pasa a través del intestino donde eclosiona y surgen los trofozoitos, los cuales se encargan de invadir los tejidos. El trofozoito durante su paso por el intestino se enquista para salir al exterior como forma infectante.³⁷

1.3 Mecanismos de patogenicidad de *Entamoeba histolytica*

El proceso de invasión del tejido epitelial del colon es facilitado por la expresión de factores de virulencia, de los cuales pocos están identificados y caracterizados.

Tres factores de patogenicidad se han estudiado y caracterizado a nivel molecular: la lectina Gal/GalNAc, el ameboporo y la cisteína proteinasa.²

1.3.1 Lectina Gal/GalNAc: En la superficie de trofozoíto se localiza esta lectina que interviene en la adherencia hacia glicoproteínas, epitelio del colon, neutrófilos y eritrocitos, una variedad de líneas de cultivos celulares y hacia ciertas bacterias. La mucina del epitelio es altamente polivalente en residuos terminales Gal/GalNAc y se une a la lectina con muy alta afinidad.²

La unión del trofozoíto con la mucina parece ser un proceso dinámico donde se degrada e induce la secreción de nueva mucina. La capa de mucina es tal vez el primer blanco natural para la unión del trofozoíto y protege del contacto que es necesario para la citólisis mediante la neutralización de epítomos en la lectina mientras se provee simultáneamente de un sitio de ataque. La penetración a través de la capa de mucina permite al trofozoíto invadir y atacar el tejido del huésped.²

1.3.2 Ameboporo: Es una familia de pequeñas proteínas contenidas en gránulos citoplasmáticos en el trofozoíto que tienen la capacidad de despolarizar las células blanco por la inserción de estas proteínas formadoras de poros dando lugar a canales iónicos en la membrana lipídica.²

El ameboporo no es secretado en cultivos, se ha propuesto que este puede ser liberado al ser estimulado el trofozoíto, tal como el contacto con las células blanco y de ese modo juega un papel en la lisis de células durante la invasión al tejido.

1.3.3 Cisteína proteinasa: *Entamoeba histolytica* exhibe una fuerte actividad proteolítica y secreta grandes cantidades de cisteína proteinasa, la cual esta implicada en el efecto citopático sobre las células blanco, afectando su adherencia

y provocando su liberación en monocapas, probablemente por degradación de proteínas que las fijan tal como la fibronectina y la laminina.²

1.4 Absceso hepático amibiano

El efecto destructor de las amibas patógenas sobre los tejidos del huésped puede no solo deberse a la acción del parásito, sino ser el resultado de mecanismos de defensa del hospedero, por ejemplo la lisis de células inflamatorias en contacto con las amibas.

El absceso hepático es sin duda la complicación más frecuente de la amibiasis extraintestinal invasiva. Además, las amibas encuentran más fácilmente sembrar metástasis en otros órganos a partir de hígado que del intestino.

Macroscópicamente, un absceso hepático amibiano es un área bien delimitada donde el parénquima del hígado está completamente reemplazado por material necrótico, generalmente rodeado por un anillo de tejido hepático congestivo.

En la amibiasis hepática experimental por trabajos de microscopía, se sabe que los primeros tipos celulares que se encuentran interaccionando con los trofozoítos son los neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) y posteriormente los macrófagos .

Un análisis de la secuencia morfológica completa de los abscesos hepáticos amibianos experimentales en el hámster sugiere que los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* no dañan directamente a los hepatocitos, mas bien la destrucción tisular parece ser el resultado de la acumulación y lisis de los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos que rodean las amibas (Fig. 2).^{3, 4}

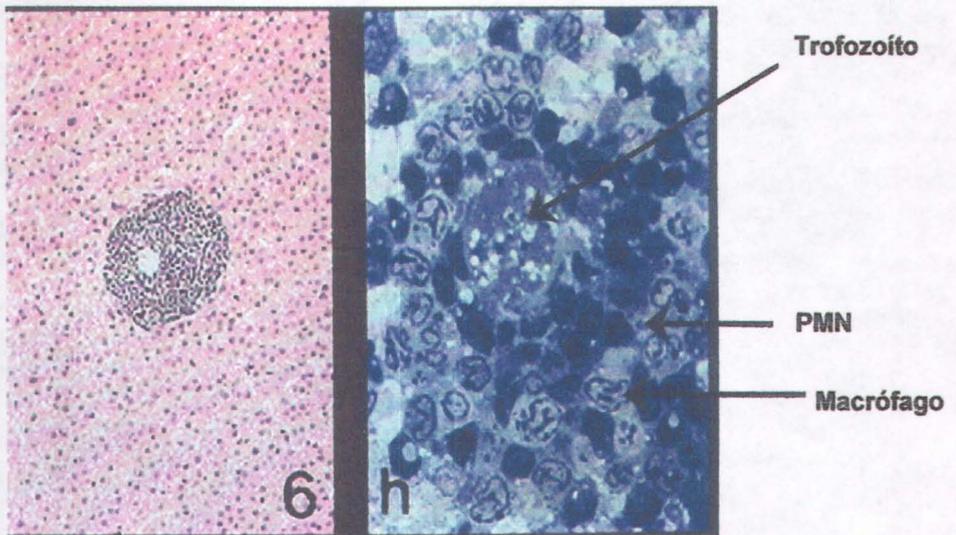


Fig. 2 Corte histológico de absceso hepático amibiano experimental, post-infección. Corte de hígado de hámster infectado con trofozoítos de *E. histolytica*, después de 6 horas de infección, utilizando una tinción de hematoxilina-eosina. Las células que se observan alrededor del trofozoíto son los PMN y los macrófagos.⁴

1.4.1 Inflamación en el absceso hepático amibiano.

La inflamación comprende una serie de eventos complejos que surgen como respuesta del tejido a una agresión local o sistémica. La respuesta local resulta en el reclutamiento de células fagocíticas que se encargan de eliminar el material endógeno o exógeno causante del daño.

La inflamación puede iniciarse a partir de muy diversas vías: traumas en el tejido, la presencia de complejos inmunes, productos derivados de bacterias, virus o parásitos e incluso por la actividad de células tumorales o fagocíticas. La progresión de la inflamación de su fase aguda a crónica es importante, ya que ésta puede dañar el tejido del huésped a través de la producción, por los fagocitos, de proteasas y radicales del oxígeno.⁵

En el caso de la infección hepática por *E. histolytica*, los hallazgos en necropsias señalaron la ausencia relativa de inflamación, motivo por el cual se asoció el daño encontrado en el tejido hepático con la actividad citolítica del parásito. No obstante, las evidencias obtenidas de estudios realizados en animales experimentales susceptibles a la infección hepática amibiana, ya sea por inoculación de trofozoítos vía intraportal o intrahepática, han demostrado que el contacto de los trofozoítos amibianos con el tejido hepático promueve una fuerte reacción inflamatoria.

Adicionalmente, la capacidad de los trofozoítos de *E. histolytica* para inmovilizar y destruir células, sobre todo PMNs, linfocitos y macrófagos, ha sido ampliamente demostrada *in vitro*.⁵

Sin embargo, aunque varios estudios fueron concluyentes en cuanto a la incompetencia de los PMNs para eliminar los trofozoítos amibianos, el papel de los mediadores inflamatorios liberados por estas células y otras presentes en el tejido hepático, así como su efecto en el establecimiento de la respuesta inmune del huésped, no se contempló hasta hace unos años.

En el absceso hepático originado por *E. histolytica* la liberación de estos factores inflamatorios probablemente sea la causa de la enorme concentración de células inflamatorias, sobre todo PMNs en el sitio de infección.⁵

1.5 Evasión del sistema inmunológico

Poco se sabe sobre el mecanismo que les permite a las cepas patogénicas de *E. histolytica* sobrevivir a los ataques del sistema inmune .

En diferentes reportes se ha encontrado que la cepa patógena de *E. histolytica* (HM1-IMSS) tiene la capacidad de evadir la respuesta inmune de los PMNs. Utilizando modelos *in vitro* para estudiar estas interacciones, se ha demostrado que al confrontar cepas amibianas virulentas con PMNs humanos no existe aparente efecto de los PMNs sobre la viabilidad del parásito; sin embargo con cepas axénicas no virulentas, los PMNs son capaces de destruir a la amiba .

Por otro lado estudios *in vivo* e *in vitro* han encontrado que el contacto directo de la amiba con el PMNs puede despertar tempranamente una respuesta quimiotáctica del PMN. Esta interacción además de perturbar la membrana del neutrófilo, induce la desgranulación y estallido oxidativo, provocando la liberación de productos tóxicos sobre la amiba y tejidos periféricos.⁶

1.6 Estallido oxidativo

Los leucocitos PMNs juegan un papel importante como la primera línea de defensa del huésped contra la invasión de microorganismos. Constituyen el 90% de los granulocitos circulantes, intervienen en la respuesta inmunitaria. Estas células se producen en la médula ósea, provienen de la estirpe mieloide. Presentan un núcleo multilobulado característico y un diámetro de 10-20 μm . Tienen dos tipos de gránulos: gránulos primarios (azurófilos) que contienen hidrolasa ácida, mieloperoxidasa y muramidasa (lisozima), gránulos secundarios (específicos), contienen lactoferrina y lisozimas. Tienen un tiempo de vida corta (2-3 días) y son capaces de adherirse a las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos y extravasarse.⁷ Estas células fagocíticas no muestran ninguna especificidad intrínseca por los antígenos, pero desempeñan un papel importante en la protección frente a los microorganismos, su misión es formar la primera línea de defensa frente a una infección por medio de su función principal que es la fagocitosis y el estallido oxidativo.⁸

La liberación del anión superóxido es uno de los más importantes mecanismos usados por el PMN para matar bacterias, virus y hongos. Este fenómeno es conocido como estallido oxidativo y es debido a la activación de la NADPH oxidasa.⁹

El estallido oxidativo (EO) es un metabolismo asociado con el reconocimiento e ingestión por parte de los neutrófilos de partículas opsonizadas.¹⁰

Este estallido puede ser también inducido por varios mediadores como el acetato de forbol miristato (PMA) y N-formil-metil-leucina-fenilalanina (f-MLP) y puede ser considerado como señal funcional de la activación de neutrófilos.

El PMN expresa sobre su membrana receptores de alta afinidad para el f-MLP. El fMLP es un fuerte quimioatrayente y entre otras cosas, induce adherencia, desgranulación y la producción de radicales libres de oxígeno capaces de destruir el tejido.

La estimulación del receptor para f-MLP activa la fosfolipasa C (PLC) dando como resultado la producción de segundos mensajeros que activan la proteína cinasa C (PCK). El receptor del f-MLP es un receptor acoplado a la proteína G. Si esta proteína G es bloqueada las células no responde al estímulo por el fMLP.^{11, 12}

Al utilizar como estímulo el polisacárido zymosan opsonizado con IgG, la activación de la célula es a través de receptores Fc. El receptor Fc, también es expresado por el neutrófilo; la estimulación del receptor involucra la activación de la familia de tirosina cinasas SRC, la cual fosforila la subunidad γ del receptor Fc. Este receptor también conduce a la activación de segundos mensajeros que activan la vía de señalización del estallido oxidativo.^{13, 14}

Durante la fagocitosis hay un incremento en el consumo de O_2 y en la generación de varias especies reactivas de oxígeno (ERO). En neutrófilos este proceso se inicia entre 30 y 60 segundos después de la estimulación de la superficie celular y no requiere de la fagocitosis o de la liberación de enzimas lisosomales, aunque los tres procesos usualmente ocurren a un mismo tiempo.

Las ERO presentes en los neutrófilos incluyen el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^\cdot), y el singlete de oxígeno (1O_2). Estos productos son capaces de dañar microorganismos o tejidos. En neutrófilos la producción de estos metabolitos del O_2 es aparentemente esencial para la muerte efectiva de microorganismos.¹⁵

La mayoría o todo el oxígeno es convertido inicialmente a O_2^- y con la participación de la enzima superóxido dismutasa (SOD) se origina el H_2O_2 . Este sustrato puede ser reducido por tres mecanismos (Fig. 3) :

1. Por acción de la catalasa y la glutatión peroxidasa (GSH), el H_2O_2 se convierte en $H_2O + O_2$ y a este proceso se le conoce como mecanismo de detoxificación.
2. Por la acción de la mieloperoxidasa (MPO), el H_2O_2 se reducirá en ácido hipocloroso (HClO) y como mecanismo de regulación el $HClO + H_2O_2$ dará origen al $^1O_2 + H_2O$.
3. Por último el H_2O_2 es catalizado por Fe^{2+} con generación de O_2 .^{6,15-17}

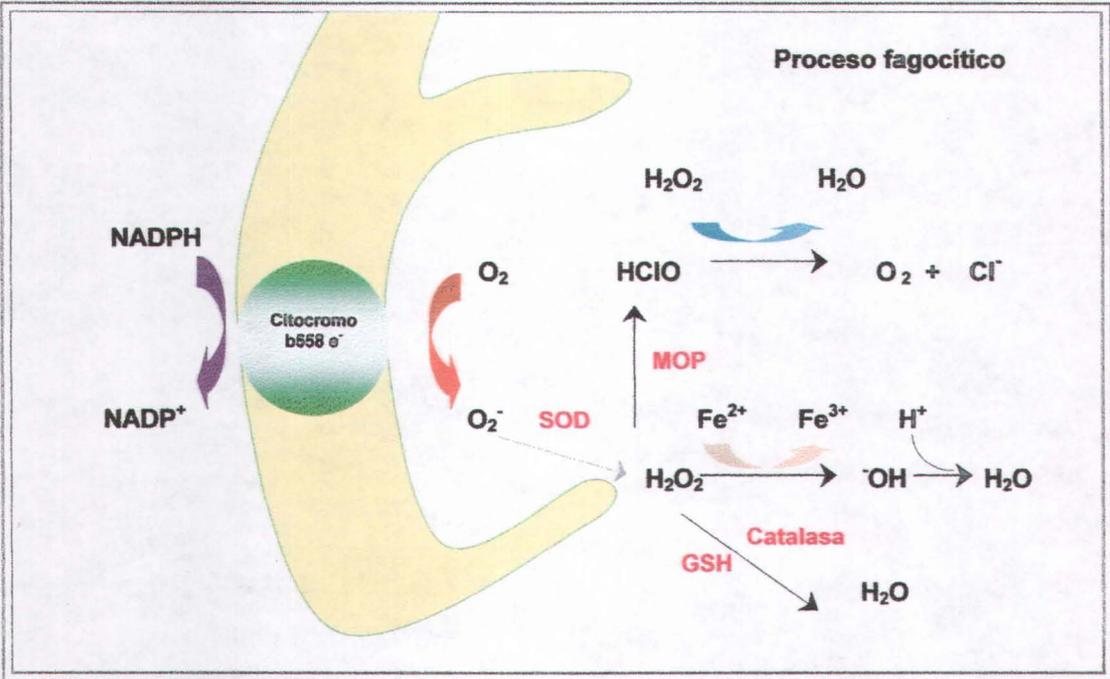


Fig. 3 Formación de Intermediarios de oxígeno durante el estallido oxidativo a través de la activación de la enzima NADPH oxidasa.¹⁶

1.6.1 Enzima NADPH oxidasa.

La enzima involucrada en la formación del O_2^- es la flavoproteína oxidasa, la cual utiliza la NADPH como donadora de electrones.¹⁸ Esta enzima es un sistema multicomponente el cual es inactivo en células en reposo; los componentes están distribuidos entre el citosol y la membrana. El complejo mayor de la membrana es el citocromo b_{558} , que está compuesto por dos subunidades ($gp91^{phox}$ y $p22^{phox}$) y los componentes citosólicos son cuatro proteínas principales ($p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$ y una proteína G pequeña, Rac2).⁹

La NADPH oxidasa se ensambla en el interior de la superficie de la membrana plasmática del neutrófilo después de la estimulación apropiada.¹⁸

Dos procesos acompañan a la activación de la NADPH oxidasa: 1) La fosforilación de componentes en el citosol y 2) La transferencia de todos los componentes a la membrana.¹⁹

La NADPH oxidasa es activada por mecanismos dependientes e independientes de receptores. Entre los estímulos **dependientes de receptor** se encuentran C5a, el péptido quimiotáctico f-MLP, e inmunocomplejos (zymosan opzonizado con IgG). Los estímulos **independientes de receptor** incluyen: largas cadenas de ácidos grasos insaturados y esteres de forbol como el PMA.

Cuando la célula es activada por el estímulo PMA, algunos de los componentes citosólicos son fosforilados y migran hacia la membrana donde se ensambla el complejo induciendo la producción del O_2^- . Uno de los componentes citosólicos fosforilados es $p47^{phox}$ el cual es fosforilado en residuos serina por la PKC.⁹

1.6.2 Vía de señalización para la activación de la NADPH oxidasa.

La señalización intracelular se inicia por la activación de proteínas tirosinas cinasas, enzimas que se encargan de añadir un grupo fosfato en residuos de tirosina, lo cual es relevante para la señalización dentro del sistema inmune.

Al estimular el receptor, las porciones citoplásmicas de algunos de sus componentes se unen a proteínas tirosina cinasa intracelulares. La fosforilación por estas enzimas puede ser fácilmente revertida por la acción de proteínas tirosinas fosfatasas, que eliminan un grupo fosfato.

Varias clases de proteínas participan en este evento, una de ellas es la fosfolipasa C (PLC); esta enzima tiene un papel crucial en propagar y amplificar la señal desde la membrana. La fosforilación en un residuo de tirosina en la PLC activa a esta enzima para cortar moléculas del fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂) presente en la membrana, originando dos componentes: inositol trifosfato (IP₃) y el diacil glicerol (DAG).

La difusión del IP₃ fuera de la membrana produce la liberación de calcio en el citosol aumentando los niveles intracelulares. El otro producto del PIP₂ el DAG, permanece asociado en la superficie interna de la membrana plasmática y activa la PKC.⁷

El tratamiento de neutrófilos con f-MLP, zymosan opsonizado o PMA induce la producción de O₂⁻, activación de PKC y la fosforilación de p47^{phox}. Estos datos apoyan el papel principal de la PKC en la activación de la NADPH oxidasa y la inducción del EO (Fig. 4).⁹

1.6.3 Quimioluminiscencia

El estallido oxidativo puede ser medido por dos métodos, el primero es mediante la determinación química individual de los metabolitos de oxígeno y el segundo mide la quimioluminiscencia que resulta de la producción de los metabolitos reactivos de oxígeno.

Esta producción de luz natural (quimioluminiscencia) puede ser amplificada al adicionar luminol (5-amino-2,3-dihidro,1,4 fetalazonediona) y puede ser medida con la ayuda de un luminómetro a una longitud de onda de 425 nm.²⁰

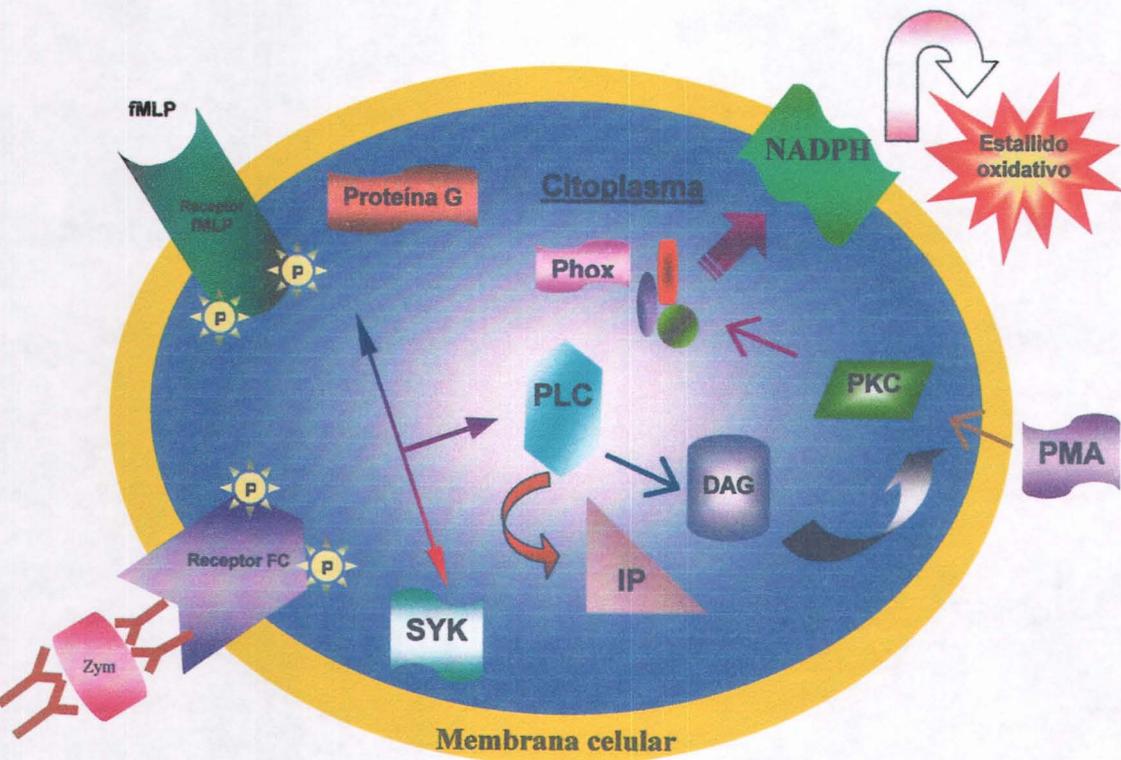


Fig. 4 Vías de señalización que desencadenan el estallido oxidativo mediante la activación de la NADPH oxidasa. ^{7, 11, 13}

1.6.4 Inhibición del estallido oxidativo por microorganismos patógenos

Leishmania donovani: Remaley y colaboradores (1984 y 1985) encontraron que la incubación de la fosfatasa ácida (FA) purificada de la superficie externa de promastigotes de *L. donovani* con neutrófilos humanos estimulados con el péptido fMLP inhibe la producción del anión superóxido. Sin embargo este efecto no se observó al estimular los neutrófilos con PMA. Ellos sugieren que la inhibición causada por la FA es por la desfosforilación de sustratos que activan a la célula afectando las vías involucradas en la generación del O_2^- y H_2O_2 . Al inhibir la actividad de FA por calor o por la preincubación con un inhibidor no se observó este efecto.²²⁻²³

Legionella micdadei contiene dos fosfatasas ácidas, pueden extraerse de la células por procesos de congelación – descongelación y sonicación; una de estas fosfatasas tiene la capacidad de inhibir la producción de anión superóxido en neutrófilos estimulados con f-MLP.²⁴

La FA purificada de Coxiella burnetii causa la inhibición del estallido oxidativo de neutrófilos humanos estimulados con f-MLP. Este resultado indica que la FA de *C. burnetii* juega un papel en la desfosforilación de residuos tirosina importantes en las vías de transducción de señales que participan en el estallido oxidativo.²⁵⁻²⁶

En Francisella tularensis recientemente se ha postulado una fosfatasa ácida como factor de virulencia porque aumenta la sobrevivencia intracelular de la bacteria dentro del neutrófilo por supresión del estallido oxidativo. Esta enzima inhibió el EO en forma dosis dependiente en neutrófilos porcinos estimulados con f-MLP y PMA.²⁷

Así como también Yersinia pseudotuberculosis presenta una PTPasa que tiene la facultad de inhibir el estallido oxidativo de macrófagos activados con zymosan.²⁸

1.6.5 Inhibición del estallido oxidativo por *Entamoeba histolytica*

En el caso particular de *E. histolytica* diversos estudios indican que puede inhibir o incrementar el estallido oxidativo de células fagocíticas, sin embargo hasta la fecha, no se conocen las moléculas responsables de este efecto.

Los antecedentes que se tienen son:

Arbo y col. (1990) evaluaron *in vitro* la capacidad de *E. histolytica* de desencadenar el estallido oxidativo en PMNs humanos y observaron que la respuesta oxidativa de los PMNs estimulados con zymosan decreció progresivamente cuando la concentración de las amibas aumentaba. Estos resultados indican que *E. histolytica* inhibe el estallido oxidativo de los PMNs.⁸

Rico y col. (1992) purificaron del medio de cultivo de trofozoítos de *E. histolytica* un factor de bajo peso molecular denominado factor inhibidor de la locomoción de los monocitos (MLIF). Al poner este factor en contacto con macrófagos activados con zymosan se observó una inhibición del estallido oxidativo y la quimiotaxis de estas células, mientras que en los PMNs únicamente se inhibió el estallido oxidativo.²⁹

García y col. (1992) reportaron que trofozoítos de una cepa axénica virulenta de *E. histolytica* (HM1:IMSS) inducían el estallido oxidativo en monocitos humanos estimulados con MCSF (factor estimulador de colonias de macrófagos).³⁰

Lin y col. (1993) reportaron que un extracto crudo y proteínas purificadas de bajo peso molecular de *E. histolytica* estimulaban la producción de radicales libres de oxígeno en macrófagos peritoneales estimulados con PMA.³¹

Como ya se mencionó el EO puede ser inhibido por FA y PTPasas. Las fosfatasa ácidas son enzimas que catalizan la hidrólisis de fosfomonoésteres a un pH ácido. En adición a la movilización de fosfato, algunos de sus miembros de esta clase de enzimas cumplen alguna función biológica esencial, incluyendo la regulación del metabolismo, conversión de energía y transducción de señales. Estas enzimas

comprenden distintos subgrupos basados en la especificidad del sustrato, peso molecular y sensibilidad a inhibidores conocidos.²⁷

La primera evidencia que sugirió que una fosfatasa ácida puede funcionar como una proteína tirosina fosfatasa (PTPasa), fue demostrada por la copurificación de actividades de fosfatasa ácida con actividad de fosfotirosil histona fosfatasa de membranas plasmáticas de astrocytoma humano. Estudios posteriores sugieren que estas dos actividades de fosfatasa podrían corresponder a la misma proteína.³² La mayoría de las FA reconocen como sustrato proteínas fosforiladas en tirosina y son llamadas PTPasas.

Las PTPasas pueden encontrarse como proteínas integrales de membrana con características estructurales de receptor de moléculas, y pueden tener una participación importante en el inicio de la vía de transducción de señales. Son una familia de enzimas que poseen un dominio catalítico común y contienen diversas secuencias conservadas necesarias para la regulación de la actividad y el reconocimiento del sustrato o localización en compartimientos subcelulares.^{33,34}

2. JUSTIFICACIÓN

Varios microorganismos como *Yersinia*, *Leishmania*, y *Mycobacterium spp* interfieren en los mecanismos de señalización de las células del huésped y de esta manera evaden o inhiben los mecanismos de defensa de estas células. Se ha comprobado que estos patógenos tienen en común la habilidad de modular eventos que involucran la fosforilación de tirosinas de proteínas en la célula huésped por la participación de las proteínas tirosinas cinasas (PTC) y proteínas tirosinas fosfatasas (PTPasas). Diversos estudios han demostrado que la activación de estas PTPasas lleva a la desfosforilación de proteínas en tirosina, lo que está asociada con la desactivación y muerte celular.

Existen reportes que las PTPasas y la FA purificadas de microorganismos infecciosos inhiben el estallido oxidativo de macrófagos y neutrófilos activados. Hasta el momento no se conoce el mecanismo de inhibición del estallido oxidativo. Se sugiere que la inhibición del estallido oxidativo de macrófagos por la FA purificada de *Leishmania* es a través de la desfosforilación de proteínas fosforiladas en residuos tirosina, ya que únicamente se observa inhibición del EO por la FA cuando los neutrófilos fueron activados con el f-MLP y no con el PMA.

En el caso particular de *Entamoeba histolytica* se sabe que un extracto total de este parásito puede inhibir el EO de neutrófilos activados con zymosan. Además *E. histolytica* contiene y secreta FA y recientemente se sabe que también presenta actividad de PTPasa y que ambas actividades copurifican en la misma fracción.³⁵

Por otro lado en la amibiasis hepática experimental, se sabe que los primeros tipos celulares que interactúan con las amibas son los neutrófilos en una respuesta temprana y los macrófagos en una tardía.⁴ Siendo importante la participación de los neutrófilos en esta respuesta celular por parte del parásito.

Antecedentes particulares en nuestro laboratorio demostraron que la PTPasa amibiana es capaz de inhibir el EO de neutrófilos activados con f-MLP (Fig. 5) y esta inhibición fue dosis-dependiente (Fig. 6).³⁶

Hasta el momento se desconoce si la inhibición del estallido oxidativo por la PTPasa amibiana es dependiente de receptor o independiente de receptor.

Debido a lo anterior nuestro objetivo fue estudiar el efecto de la PTPasa ambiental en PMNs activados con PMA y zymosa (vía independiente y dependiente de receptor respectivamente) y analizar el patrón de fosforilación en tirosina de proteínas de PMNs después de interactuar con la PTPasa ambiental.

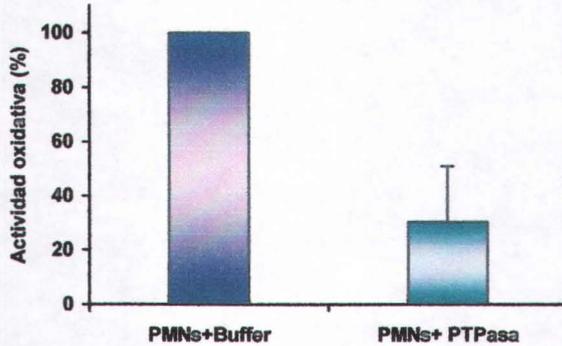


Fig. 5 Efecto de la PTPasa de *Entamoeba histolytica* en el EO de neutrófilos polimorfonucleares activados con f-MLP

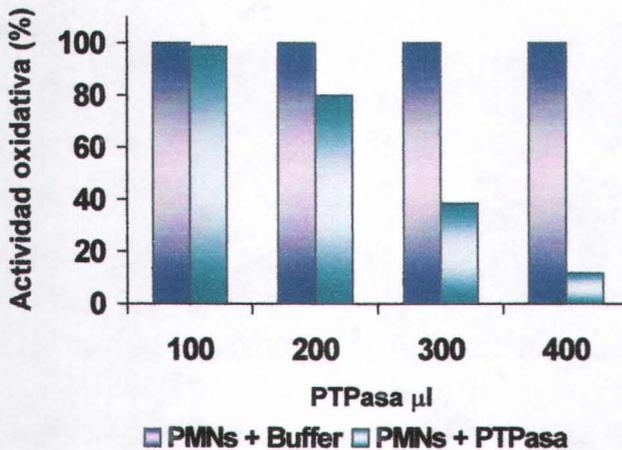


Fig. 6 Efecto dosis-dependiente de la PTPasa de *Entamoeba histolytica* en el EO de neutrófilos polimorfonucleares activados con f-MLP.

3. HIPÓTESIS

- ❖ La PTPasa de *Entamoeba histolytica* modula el estallido oxidativo de neutrófilos activados

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

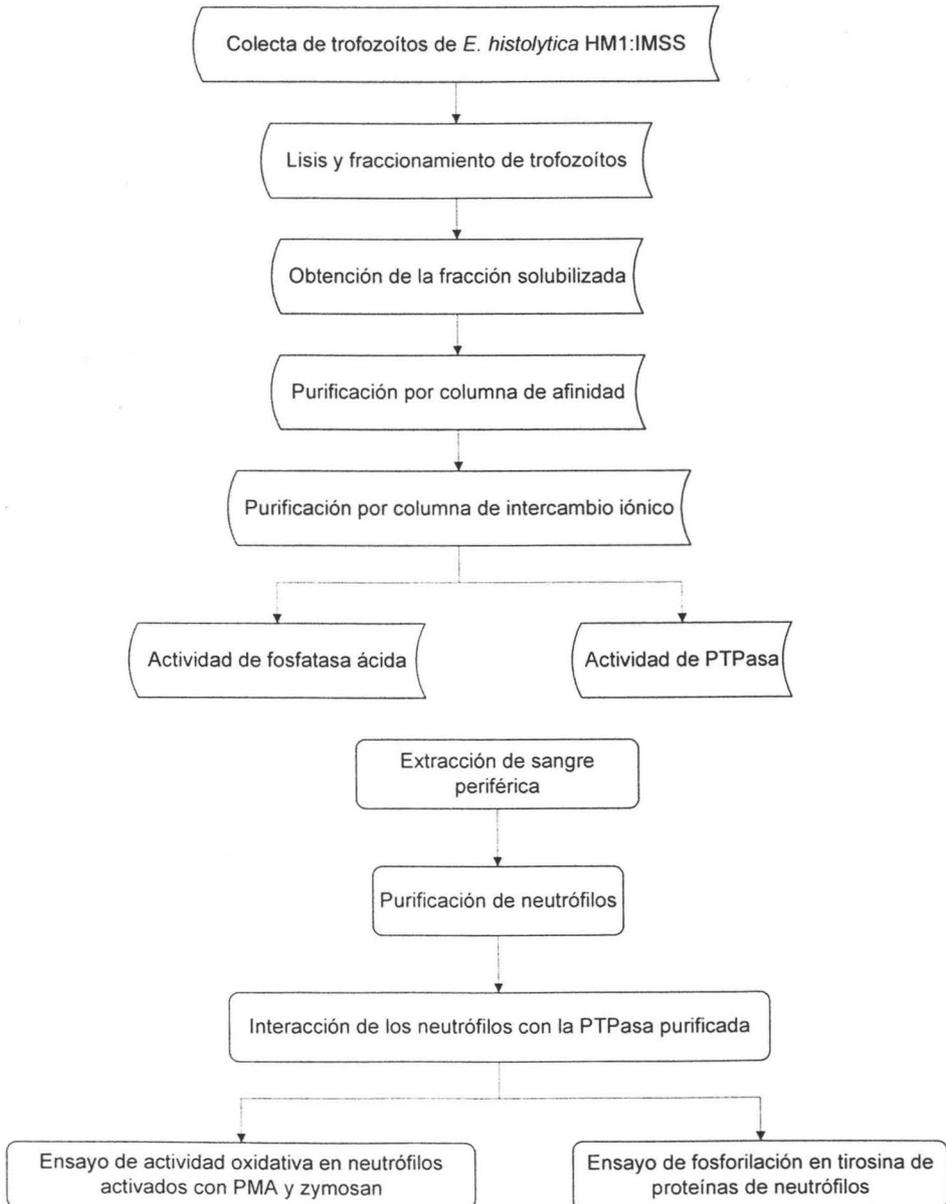
- ❖ Analizar el efecto de la proteína tirosina fosfatasa (PTPasa) de *Entamoeba histolytica* en el estallido oxidativo de neutrófilos activados con zymosan y acetato de forbol miristato (PMA)

4.2 Objetivos particulares

- ❖ Lisis y fraccionamiento trofozoítos de *Entamoeba histolytica*
- ❖ Purificar la PTPasa de *Entamoeba histolytica* a través de cromatografía de afinidad e intercambio iónico.
- ❖ Analizar el efecto de la PTPasa de *Entamoeba histolytica* en el estallido oxidativo de neutrófilos activados con zymosan y PMA
- ❖ Analizar el efecto de la PTPasa de *Entamoeba histolytica* en el patrón de proteínas fosforiladas en tirosina de neutrófilos

5. METODOLOGÍA

5.1 Diagrama de flujo



5.2 Cosecha de trofozoítos

Los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* cepa HM1-IMSS, fueron gentilmente donados por la Dra. Patricia Talamás del departamento de Patología Experimental de Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional.

Las cajas de cultivo se colocaron en hielo para desprender los trofozoítos, se centrifugaron a 1100 rpm/ 5min/ 4°C. La pastilla se resuspendió en PBS pH 7.4 y se realizaron dos lavados con PBS. Al final de los lavados se tomó una alícuota de la muestra para contar los parásitos. La pastilla de trofozoítos se guardó a -70°C hasta su fraccionamiento.

5.3 Lisis de trofozoítos y obtención de la fracción solubilizada.

Los trofozoítos de *E. histolytica* colectados se resuspendieron en buffer de lisis de imidazol 10 mM, Leupeptina 2 µg/ml, Aprotinina 10 µg/ml, EDTA 5 mM y Benzamidina 1 mM; ajustando a 1 ml por cada 5 millones de trofozoítos. La muestra se colocó en una bomba de nitrógeno a 300 psi por 10 min y se verificó la lisis al microscopio. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm 15 min a 4°C. El sobrenadante resultante (SN₁) se guardó y la pastilla (P₁) se resuspendió en buffer de lisis al cual se adicionó Tritón X-100 al 2%, la muestra se dejó en hielo por 1 h y se agitó cada 15 min (para favorecer el proceso de extracción con el detergente). Se centrifugó a 12000 rpm 15 minutos a 4°C. Al sobrenadante (SN₂) se le adicionó glicerol al 20% y se guardó en alícuotas de 7 ml aproximadamente, la pastilla (P₂) se resuspendió en buffer de lisis. Se guardaron alícuotas de todo el fraccionamiento a -70°C para posteriormente determinar actividad enzimática y proteína.

5.4 Purificación de la PTPasa de *E. histolytica* por cromatografía de afinidad (Concanavalina – A – sefarosa)

La purificación de la enzima se realizó a una temperatura de 4°C. La columna se equilibró con PBS Ca⁺⁺ Mg⁺⁺ frío. La muestra (SN₂) se pasó por la columna

lentamente y el material no unido se colectó. Posteriormente se lavó la columna con PBS Ca⁺⁺ Mg⁺⁺ se guardaron los primeros 40 ml y lo demás se desechó. Se eluyó con 40 ml de α -metil manopiranosido (α MM) 0.1 M en PBS Ca⁺⁺ Mg⁺⁺.

Se tomaron alícuotas de la muestra inicial (SN₂), del material no unido, lavado y eluidos para determinar actividad enzimática y proteína.

5.5 Purificación de la PTPasa de *E. histolytica* por cromatografía de intercambio iónico (DEAE-Celulosa).

Se eligieron los eluidos de mayor actividad enzimática de la purificación por cromatografía de afinidad, se descongelaron y juntaron.

La columna se equilibró con buffer A (Tris 10 mM pH 7.4, NaCl 50 mM y α MM 10 μ M). Se pasó lentamente la muestra por la columna y se colectó el material no unido. Se lavó la columna con buffer A, se guardaron los primeros 40 ml.

Se eluyó con 15 ml de buffer A y 15 ml de buffer B (Tris 10 mM pH 7.4, NaCl 400 mM y α MM 10 μ M) utilizando un formador de gradiente.

Se tomaron alícuotas de la muestra original Con-A, del material no unido, lavado y eluidos para determinar actividad enzimática y proteína.

5.6 Seguimiento de la actividad enzimática

5.6.1 Actividad de fosfatasa ácida.

Método en placa: Se utilizaron 10 μ l de muestra (en el caso de SN₂ se utiliza 1 μ l de una dilución 1:10), se adicionó 80 μ l de acetato de sodio pH 5.0 (para SN₂ 89 μ l), y 10 μ l de p-NPP 0.1 M la placa se incubó por 1 hr a 37°C. La reacción se detuvo con 20 μ l de NaOH 2 N. Se leyó en el lector de ELISA a una longitud de onda de 405 nm. Cada condición se realizó por duplicado

5.6.2 Actividad de Proteína tirosina fosfatasa

La actividad se determinó utilizando un KIT específico para PTPasa (Tyrosine Phosphatase Assay System de PROMEGA).

Este Kit contiene dos péptidos: END (1118 KD) y DADE (1328 KD) los cuales poseen un solo sitio fosforilado en tirosina, la reacción se lleva a cabo en un

amortiguador de acetato de sodio pH 5. Se colocaron 35 μ l de la muestra con 10 μ l de buffer de acetato de sodio y 5 μ l de péptido fosforilado en tirosina. Se dejó incubando durante 15 min a temperatura ambiente. La reacción fue terminada por la adición de 50 μ l de Dye/additive. Posteriormente se leyó en el lector de ELISA a 630 nm.

La concentración de fosfatos liberada en la reacción enzimática fue determinada utilizando una curva de fosfatos donde se extrapolaron los resultados obtenidos.

5.7 Determinación de proteína por el método de Bio-Rad DC

El ensayo de proteína de Bio-Rad es un ensayo colorimétrico para la determinación de la concentración de proteína en muestras con detergente.

El ensayo se basa en la reacción de la proteína con una solución de tartrato de cobre alcalino y reactivo de Folin. La reacción se lleva a cabo entre la proteína y el cobre en medio alcalino y la subsecuente reducción del reactivo de Folin por el complejo, desarrollando un color azul.

La mezcla se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y se lee a una absorbancia de 750 nm.

Los resultados se extrapolan en una curva de Albúmina sérica bovina.

5.8 Purificación de neutrófilos (Ficoll-Hypaque).

Se obtuvo sangre periférica fresca de sujetos sanos utilizando como anticoagulante EDTA. Se realizó una dilución 1:1 sangre con solución salina fisiológica (SSF) estéril; se adicionó 3 ml de ficoll a la sangre, por cada 5 ml de sangre diluida, colocando el ficoll y posteriormente la sangre, lentamente por las paredes del tubo, se centrifugó a 1500 rpm por 25 min a 20°C; se retiraron la capa de plasma, mononucleares y ficoll, dejando el paquete celular de eritrocitos y neutrófilos.

Se agregó solución lítica recién preparada, estéril y de pH 7.2 al paquete celular en una proporción 3:1 y se agitó suavemente por 10 min; se centrifugó a 1500 rpm, 10 min a 20°C. Se observó la coloración del botón, si este presentaba una

tonalidad rojiza se adicionó nuevamente solución lítica, repitiendo el mismo proceso.

Cuando el botón es de un color claro se lava 2 – 3 veces con SSF estéril. Antes del último lavado se verificó la viabilidad de las células en 10 μ l de neutrófilos y 90 μ l de Azul de Tripan, se observaron al microscopio. También se realizó un conteo celular, se tomaron 10 μ l de células más 90 μ l de solución de Turk se contó en la cámara de Neubauer.

Después del último lavado se retiró todo el sobrenadante y se ajustó el número de células con solución de Krebs (1 x 10⁶ células / 50 μ l).

5.9 Efecto de la PTPasa en el estallido oxidativo de neutrófilos activados .

Después de ensayar diferentes concentraciones de células, se encontró que el efecto se observó mejor en 1 x10⁶ células en 50 μ l. Los PMN purificados se incubaron previamente 30 min a 37°C y 5% CO₂ . Después se colocaron en una placa y se adicionó 100 μ l de la PTPasa amibiana. Se incubó nuevamente bajo las mismas condiciones durante 15 min. Al término de este período se adicionó 100 μ l del luminol y 60 μ l del estímulo (PMA o zymosan); inmediatamente la placa se leyó en el luminómetro durante 30 min.

5.10 Ensayo de fosforilación.

Los PMNs purificados de sangre periférica se ajustaron en 200 μ l de solución de Krebs, se incubaron con diferentes condiciones (400 μ l de la enzima de alta y baja actividad de PTPasa, Tris y Solución de Krebs) durante 30 min a 37 °C y 5% de CO₂ . La viabilidad de las células se observó utilizando Azul Tripan después de la incubación.

Las células se lavaron con SSF. Se adicionó 150 μ l de buffer de lisis y se colocaron en una placa de agitación 30 min a 4°C. Finalmente se verificó la lisis al microscopio. Se centrifugó y se realizó la determinación de proteína por el método de Bio-Rad DC a los sobrenadantes y se analizaron en un gel de poliacrilamida

PAGE-SDS al 10% y se transfirieron a una membrana de inmobilon. La transferencia se realiza a 20 V durante 70 min, posteriormente la membrana se bloqueó con BSA 3% en TBST 1X. Se incubó toda la noche con el anticuerpo anti-PY20 a una dilución 1:1000 (HRP-mouse antiphosphotyrosine, ZYMED) el cual identifica proteínas fosforiladas en residuos tirosina y se reveló por quimioluminiscencia.

Para el análisis densitométrico de las proteínas fosforiladas en tirosina se utilizó el Multimage Light Cabinet (Alpha Innotech Corporation) con el programa Chemilmager 4000. El porcentaje de intensidad se obtuvo tomando como 100 % la intensidad de la banda de los PMNs incubados con buffer

5.11 Identificación de la Proteína cinasa activada por mitógeno (MAP cinasa).

Los eluidos de Con-A y DEAE con alta actividad enzimática de FA, precipitados con acetona, se analizaron en un gel PAGE-SDS al 10%, se tiñó con plata y se transfirió a una membrana de inmobilon. La transferencia se realizó a 20V durante 70 min, posteriormente la membrana se bloqueó con BSA 3%. Se incubó toda la noche con el anticuerpo primario ERK 2 (D-2): sc-1647 que reconoce la región carboxilo terminal de la ERK 2 Map cinasa p42 de origen humano a una dilución de 1:4000, se lavó y la membrana se incubó con el anticuerpo secundario HRP-mouse a una dilución de 1:5000 durante 2 h. Finalmente se reveló por quimioluminiscencia.

6. RESULTADOS

6.1 Actividad específica de Fosfatasa ácida (FA) en las fracciones subcelulares de trofozoitos de *Entamoeba histolytica*.

Los trofozoitos fueron lisados en un buffer hipotónico con inhibidores de proteasas utilizando una bomba de nitrógeno. Las fracciones obtenidas fueron: extracto total (ET); sobrenadante 1 (SN1); pastilla 1 (P1); fracción solubilizada o sobrenadante 2 (SN2); pastilla 2 (P2).

La actividad de fosfatasa se determinó utilizando pNPP 0.1 M y la proteína fue determinada por el método de DC BIO-RAD.

Se observó una mayor actividad específica en la fracción solubilizada con el detergente Tritón X-100 (SN2). (Fig. 7)

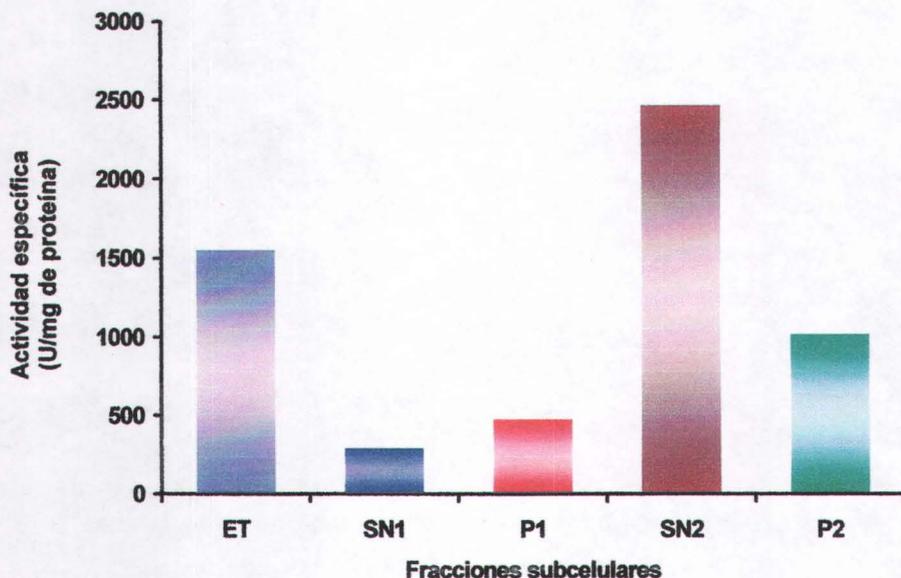


Fig. 7 Actividad específica de FA del fraccionamiento de trofozoitos de *E. histolytica*. Extracto total (ET); Sobrenadante 1 (SN1); Pastilla 1 (P1); Sobrenadante 2 o fracción solubilizada (SN2); Pastilla 2 (P2).

6.2 Purificación de la PTPasa.

Para la purificación se utilizaron dos columnas. Una columna de afinidad (Con-A-sefarosa) por la cual se pasó el SN2, el material unido se eluyó con α MM 0.1 M. Los eluidos con elevada actividad enzimática se juntaron y se pasaron a través de una columna de intercambio iónico (DEAE-celulosa); el material unido se eluyó utilizando un gradiente de NaCl (50-400 μ M). En la purificación por DEAE se observó un pico homogéneo (Fig. 8).

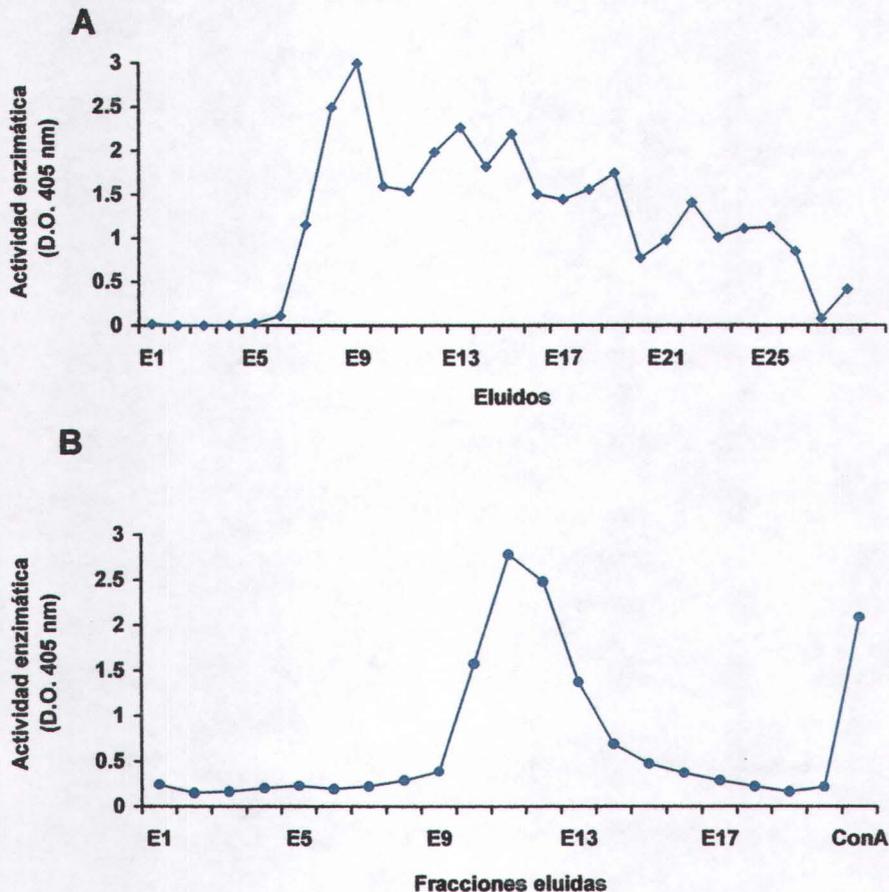


Fig. 8 Purificación de la PTPasa por: (A) Columna de afinidad (Con-A-sefarosa), se eluyó con α MM 0.1 M. (B) Columna de intercambio iónico (DEAE-celulosa), se eluyó utilizando un gradiente de NaCl (50-400 μ M).

6.3 Copurificación de la actividad de FA y de PTPasa.

La determinación de las actividades enzimáticas se realizó con las fracciones obtenidas de la columna de intercambio iónico. Para la actividad de PTPasa se utilizó un Kit comercial de PROMEGA y para FA se utilizó como sustrato el pNPP 0.1 M. En esta gráfica se observa que ambas actividades copurifican en las mismas fracciones, aunque el pico de PTPasa está ligeramente desplazado del pico de máxima actividad de FA (Fig. 9).

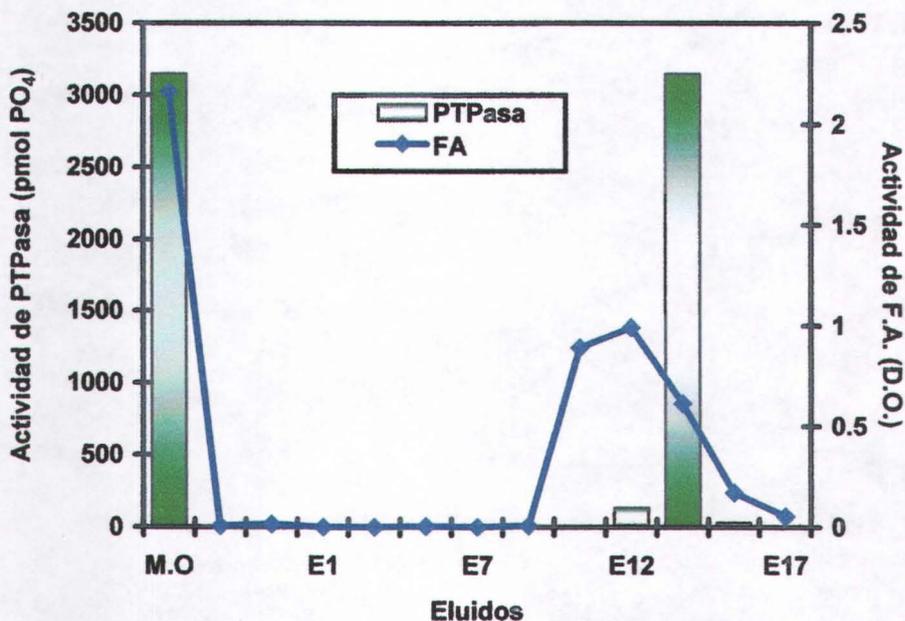


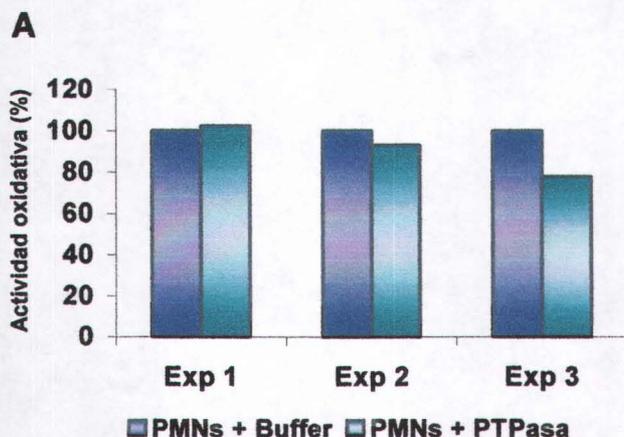
Fig. 9 Copurificación de la actividad de Fosfatasa ácida y de PTPasa de *Entamoeba histolytica*.

6.4 Efecto de la PTPasa en el estallido oxidativo de PMNs estimulados con PMA.

Los PMNs purificados de sangre periférica se incubaron previamente con buffer y PTPasa, finalmente se estimuló el EO, la actividad oxidativa se midió por quimioluminiscencia. (A) Actividad oxidativa de tres distintos experimentos. (B) Porcentaje del efecto de la PTPasa ambiental, se realizó un promedio de los tres experimentos, el porcentaje de actividad oxidativa se obtuvo tomando como 100% las URL de los PMNs incubados con el buffer, se determinó la desviación estándar de los datos. No se observó efecto de la PTPasa en el EO de los PMNs cuando fueron activados con PMA (Fig. 10).

6.5 Curva dosis respuesta del efecto de la PTPasa en el estallido oxidativo de PMNs estimulados con PMA.

Se incubaron los PMNs con distintas dosis de PTPasa (25 μ l, 50 μ l y 100 μ l). No se observó efecto de la PTPasa en el EO de los PMNs activados con PMA al incrementar la dosis de enzima (Fig. 11).



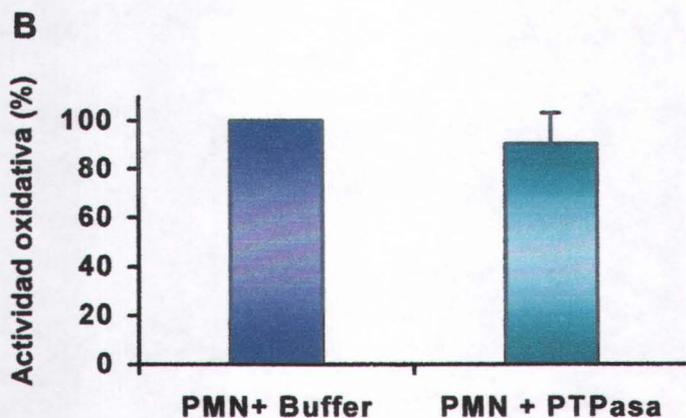


Fig. 10 Efecto de la PTPasa ambiental en el estallido oxidativo de PMNs estimulados con PMA. (A) Los PMNs se incubaron con Buffer y PTPasa en distintos tres experimentos. (B) Porcentaje del efecto de la PTPasa ambiental, promedio de tres experimentos.

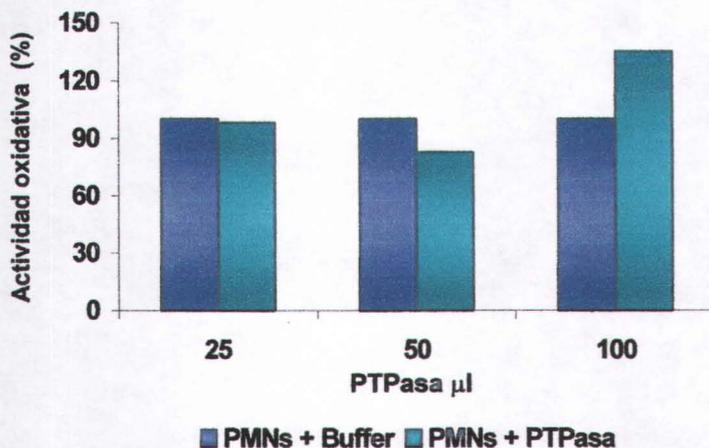


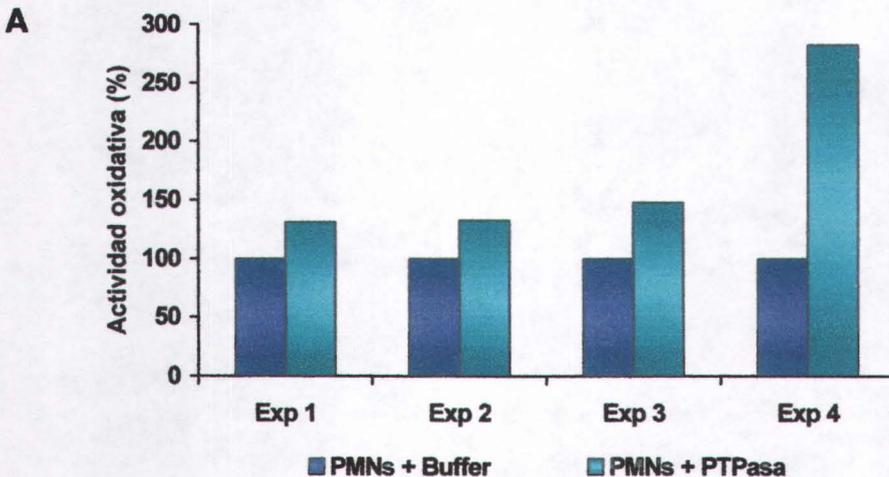
Fig. 11 Curva dosis respuesta del efecto de la PTPasa de *E. histolytica* en el estallido oxidativo de PMN estimulados con PMA en presencia de diferentes dosis de la enzima (25 μ l, 50 μ l y 100 μ l).

6.6 Efecto de la PTPasa en el estallido oxidativo de PMNs estimulados con zymosan.

Los PMNs purificados de sangre periférica se incubaron previamente con buffer y PTPasa, finalmente se estimuló el EO, la actividad oxidativa se midió por quimioluminiscencia. (A) Actividad oxidativa de cuatro distintos experimentos. (B) Porcentaje del efecto de la PTPasa ambiente, se realizó un promedio de los cuatro experimentos, el porcentaje de actividad oxidativa se obtuvo tomando como 100% las URL de los PMNs incubados con el buffer, se determinó la desviación estándar de los datos. En este ensayo se observó que la PTPasa ambiente incrementa el EO de los PMNs cuando fueron activados con zymosan (Fig. 12).

6.7 Curva dosis respuesta del efecto de la PTPasa en el estallido oxidativo de PMNs estimulados con zymosan.

Se incubaron los PMNs con distintas dosis de PTPasa (25 μ l, 50 μ l y 100 μ l). Al incrementar la dosis de enzima, aumentó la actividad oxidativa de los PMNs estimulados con zymosan (Fig. 13).



B

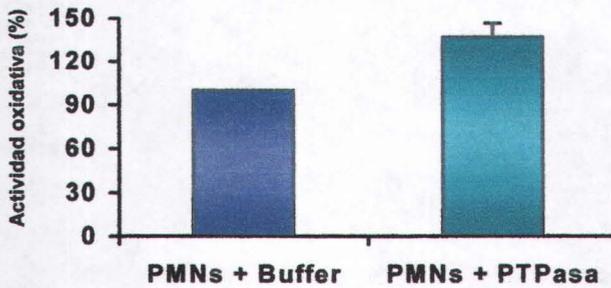


Fig. 12 Efecto de la PTPasa en el estallido oxidativo de PMNs estimulados con zymosan. (A) Los PMNs se incubaron con Buffer y PTPasa ambiental en cuatro distintos experimentos. (B) Porcentaje del efecto de la PTPasa ambiental, promedio de cuatro experimentos.

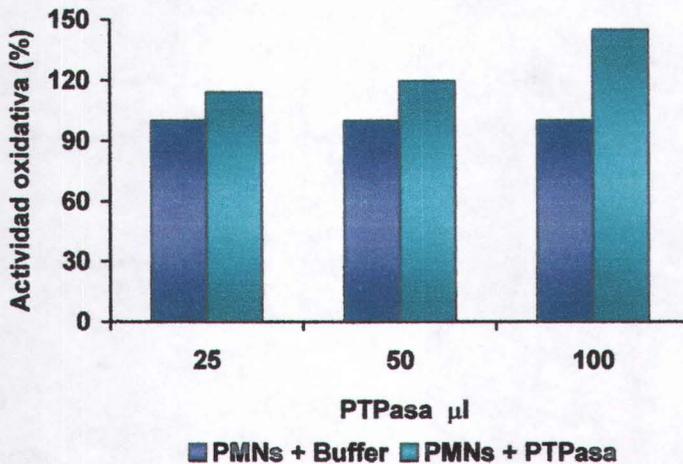


Fig. 13 Curva dosis respuesta del efecto de la PTPasa ambiental en el estallido oxidativo de PMNs estimulados con zymosan en presencia de diferentes dosis de la enzima (25 μ l, 50 μ l y 100 μ l).

6.8 Análisis densitométrico del patrón de proteínas fosforiladas en tirosina de los PMNs incubados en presencia de la de la PTPasa amibiana.

Los PMNs purificado se incubaron bajo diferentes condiciones de trabajo: PMN + Eluido con actividad de PTPasa, PMN + Eluido sin actividad de PTPasa, PMN + Tris y PMN + Buffer. Posteriormente se lisaron los PMNs y los sobrenadantes se corrieron en geles de poliacrilamida al 10 % y se transfirieron a membranas de inmobilon la cual se incubó con un anticuerpo anti-tirosina (PY20). Cuando los PMNs se incubaron con la PTPasa se encontró un incremento en la fosforilación de 5 proteínas de bajo peso molecular: 42, 48, 55, 68 y 70 kDa (Fig. 14 –18).

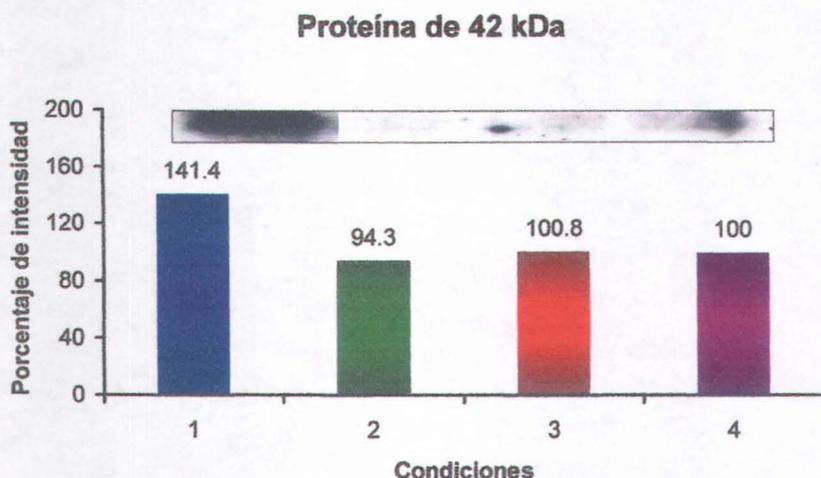


Fig. 14 Análisis densitométrico del patrón de proteínas fosforiladas en tirosina de PMNs incubados en presencia de la PTPasa amibiana. (1) PMN + Eluido con actividad de PTPasa. (2) PMN + Eluido sin actividad de PTPasa. (3) PMN + Tris. (4) PMN + Buffer.

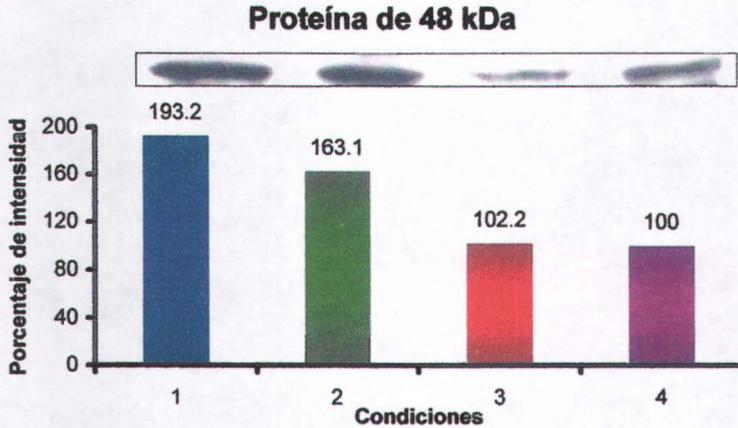


Fig. 15 Análisis densitométrico del patrón de proteínas fosforiladas en tirosina de PMNs incubados en presencia de la PTPasa amibiana. (1) PMN + Eluido con actividad de PTPasa. (2) PMN + Eluido sin actividad de PTPasa. (3) PMN + Tris. (4) PMN + Buffer.

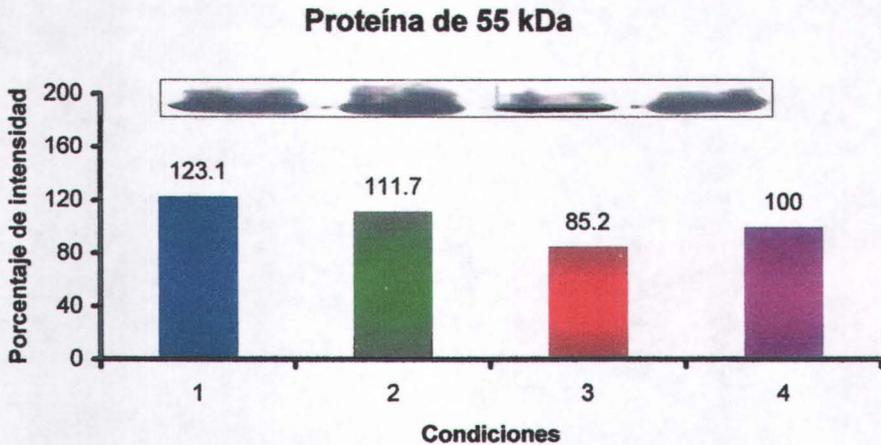


Fig. 16 Análisis densitométrico del patrón de proteínas fosforiladas en tirosina de PMNs incubados en presencia de la PTPasa amibiana. (1) PMN + Eluido con actividad de PTPasa. (2) PMN + Eluido sin actividad de PTPasa. (3) PMN + Tris. (4) PMN + Buffer.

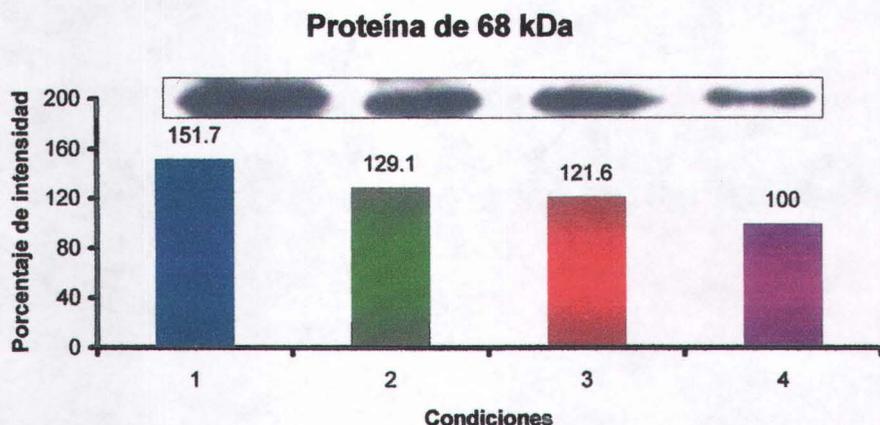


Fig. 17 Análisis densitométrico del patrón de proteínas fosforiladas en tirosina de PMNs incubados en presencia de la PTPasa amibiana. (1) PMN + Eluido con actividad de PTPasa. (2) PMN + Eluido sin actividad de PTPasa. (3) PMN + Tris. (4) PMN + Buffer.

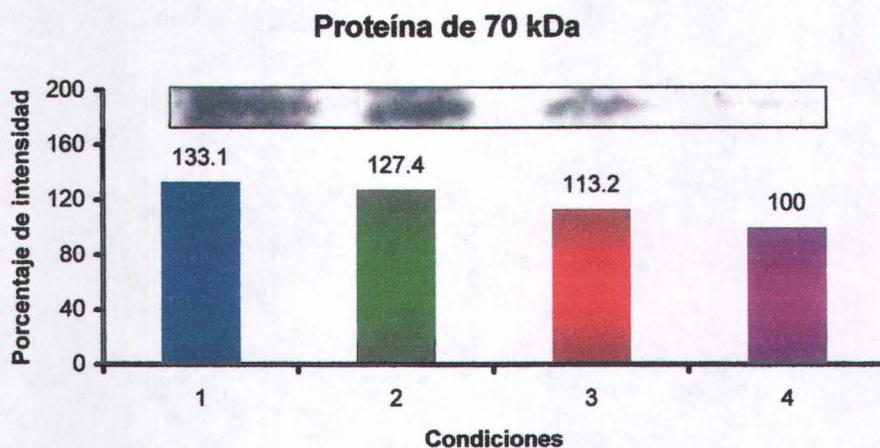


Fig. 18 Análisis densitométrico del patrón de proteínas fosforiladas en tirosina de PMNs incubados en presencia de la PTPasa amibiana. (1) PMN + Eluido con actividad de PTPasa. (2) PMN + Eluido sin actividad de PTPasa. (3) PMN + Tris. (4) PMN + Buffer.

6.9 Determinación de la presencia de una MAP cinasa en las fracciones conteniendo a la PTPasa amibiana.

Línea 1 Fracción de Con-A-sefarosa y Línea 2 Fracción de DEAE-celulosa.(A) Tinción con plata. (B) Western-blot. Se transfirieron a una membrana de inmobilon y se incubaron con el anticuerpo primario anti-ERK 2 (D-2): sc-1647 y con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a HRP, se revelo por quimioluminiscencia. En la tinción con plata se observa un patrón de proteínas de diferente peso molecular y en el western-blot se observa el reconocimiento de dos proteínas MAP cinasas de 44 y 42 kDa de PM. (Fig. 19)

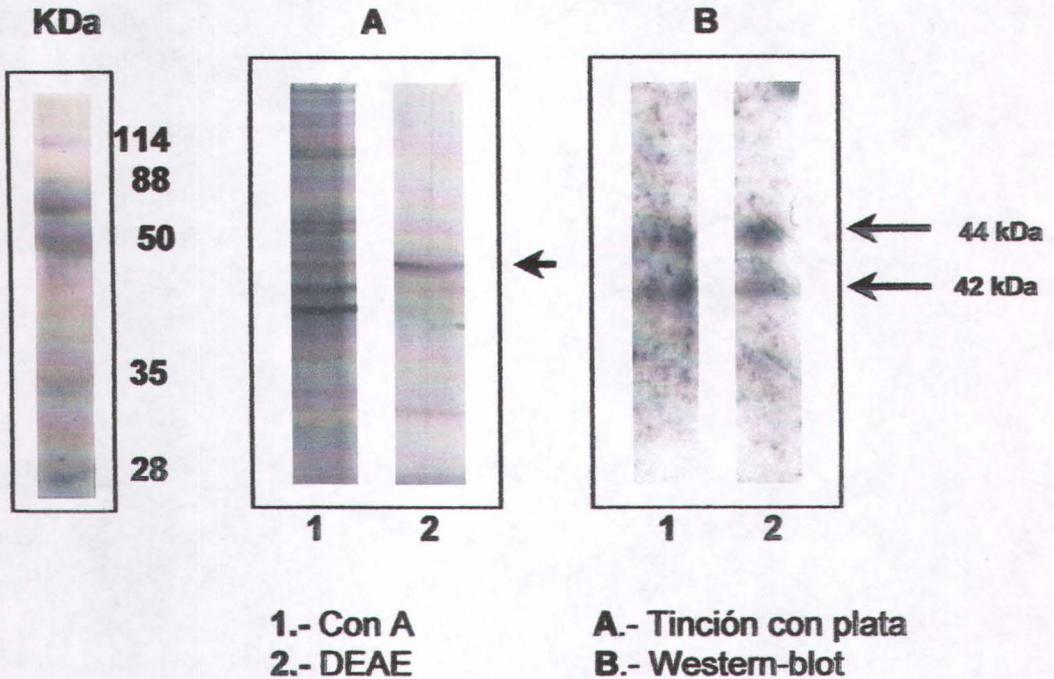


Fig. 19 Análisis en PAGE-SDS de la PTPasa de *Entamoeba histolytica* purificada por columna de afinidad e intercambio iónico. Línea 1 Fracción de Con-A-sepharosa y Línea 2 fracción de DEAE-celulosa.(A) Tinción con plata. (B) Western-blot. Reconocimiento de la MAP cinasa por el anticuerpo anti-MAPcinasa ERK2 en muestras de PTPasa purificada de *E. histolytica*.

7. DISCUSIÓN

El estallido oxidativo (EO) es un mecanismo de defensa que presentan las células fagocíticas tales como PMNs y macrófagos, durante este proceso se generan sustancias tóxicas como el ión superóxido y el peróxido de hidrógeno capaces de dañar y matar agentes infecciosos.

La producción de radicales libres de oxígeno durante el EO en células fagocíticas juega un papel importante en el proceso inflamatorio. El principal efecto que puede contribuir en la patogénesis en estados tempranos de infección es el aumento del estallido oxidativo, lo cual conduce hacia una aguda respuesta inflamatoria con daño tisular. La fosforilación juega un papel importante para la activación celular.

Recientemente se ha descrito en diversos microorganismos patógenos una PTPasa capaz de modular el estallido oxidativo a través de la desfosforilación de proteínas principalmente en residuos tirosina (PTPasa).

En este trabajo se analizó el efecto de la PTPasa asociada a membrana de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* en el EO de PMNs activados con PMA y zymosan.

Nosotros observamos que cuando estimulamos los PMNs con PMA no hay ningún efecto sobre el EO, sin embargo en ensayos realizados en el laboratorio se observó una inhibición dosis dependiente en el EO de PMNs estimulados con f-MLP. Este mismo efecto se observó cuando se incubaron PMNs con la FA purificada de promastigotes de *Leishmania mexicana*. Disminuyó la producción de metabolitos tóxicos de oxígeno al estimular con f-MLP, mientras que al estimular con PMA la FA no tuvo efecto sobre el metabolismo oxidativo de los PMNs. Remaley y colaboradores sugieren que inhibición del EO por la FA se debe a la desfosforilación de sustratos específicos (residuos tirosina) que capacitan a célula para ser activada en las vías involucradas en la generación del O_2^- y el H_2O_2 .

Debido a esto estimulamos los PMNs opsonizado con IgG, de esta manera se activa el EO por una vía dependiente de receptor (receptor Fc) fosforilados en tirosina. En este experimento no observamos inhibición sino un incremento en el EO de los PMNs.

Esto podría explicar que el blanco para la PTPasa amibiana no son todos los residuos tirosina asociados al receptor Fc o que el estímulo fue tan fuerte que no se pudo evidenciar el efecto de inhibición sobre los PMNs.

Cabe mencionar que estos ensayos se realizaron utilizando diferentes dosis de enzima y aun así no se observó un efecto inhibitorio.

Se ha demostrado que la fosforilación en tirosina es requerida para la activación del EO por lo cual también se analizó el patrón de proteínas fosforiladas en tirosina de PMNs utilizando el anticuerpo PY-20 que reconoce proteínas fosforiladas en tirosina; se encontró un incremento en la fosforilación de 5 proteínas (42 kDa, 48 kDa, 55 kDa, 68 kDa y 70 kDa) en la condición donde fueron incubados con la PTPasa amibiana.

Estudios previos con microorganismos patógenos mostraron dos distintos patrones de fosforilación. En el caso de *Yersinia enterocolitica* un análisis densitométrico reveló que el nivel de inhibición de fosforilación de tirosina inducida por zymosan era paralela al nivel de supresión del EO.

Se ha reportado que el tratamiento de neutrófilos humanos con la PTPasa de *Coxiella burnetii* dio como resultado un aumento en la fosforilación de proteínas con residuos tirosina. A primera vista es una aparente contradicción con lo antes referido, sin embargo se propone que este efecto puede ser resultado de la activación de cinasas internas por la desfosforilación de la superficie celular por la PTPasa.

La posibilidad de que la PTPasa de *Coxiella burnetii* presentara actividad de tirosina cinasa la cual participara en el aumento de la fosforilación fue analizada con un Kit de tirosina cinasa. Ni los lisados y ni la PTPasa purificada de *C. Burnetii* presentaron actividad de tirosina cinasa detectable.²⁶

Para analizar si en las purificaciones de la Papaza amibiana pudiera copurificar una cinasa o posiblemente que esta PTPasa amibiana posea una actividad dual como ya se ha reportado la presencia de proteína cinasa fosfatasa (MAPKP) se realizó una inmunotransferencia utilizando el anticuerpo monoclonal ERK 2 (D2): sc-167 que reconoce la terminal carboxilo de la MAP cinasa ERK2 de humano.

Encontramos que el anticuerpo reconoció 2 proteínas en la muestra de la PTPasa amibiana purificada, una proteína de 42kda y 46kDa de PM.

En *Entamoeba histolytica* ya se había reportado la presencia de esta MAP cinasa de 42 kDa en extractos totales del parásito. Hasta el momento desconocemos el mecanismo por el cual la PTPasa ambiental pueda tener actividad dual o en que momento se activa esta actividad de cinasa.

8. CONCLUSIONES

La interacción de la PTPasa purificada de *Entamoeba histolytica* no presentó efecto sobre el estallido oxidativo de neutrófilos activados con PMA, por otro lado, al ser incubada con los neutrófilos polimorfonucleares estimulados con zymosan, la PTPasa amibiana incrementa el estallido oxidativo.

La PTPasa amibiana incrementa la fosforilación en tirosina de proteínas de 42, 48, 55, 68 y 70 kDa de los neutrófilos.

Adicionalmente la PTPasa amibiana comparte epítomos con la proteína MAP cinasa ERK-2 de humano.

9. PERSPECTIVAS

La perspectiva de este trabajo es analizar si la PTPasa purificada presenta actividad de cinasa, así como también resulta interesante estudiar en que vía de señalización de células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos) pueda participar.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Anaya-Ruiz M., M. Pérez-Santos J.L. and Talamás-Rohana P. 2003 Anecto-protein tyrosine phosphatase of *E. histolytica* induces cellular detachment by disruption of actin filaments in HeLa cells. *Int. J. for Parasitol.* 33: 663-670.
2. Ravdin J. I. 2000. Amebiasis. Series on Tropical medicine: Science and practice. Vol. 2, Imperial Collage Press. Pag. 6-16, 99-104.
3. Martinez Palomo A. 1986. Amibiasis. Editorial Panamericana. México. Pag. 32, 52-54, 69.
4. Tsutsumi V., Mena-López R., Anaya-Velazquez F. and Martínez-Palomo A. 1984. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am. J. Pathol.* 117:81-91.
5. Sánchez-Ramírez B., y Talamás-Rohana P. 2002. Importancia de la prostaglandinas en la amibiasis hepática. *Salud Pública de México.* 44: 247-257.
6. Arbo A., Hoefsloot M., Ramírez A. and Santos J.I. 1990. *Entamoeba histolytica* inhibits the respiratory burst of polymorphonuclear leukocytes. *Arch. Invest. Med. (Mex)*, 21:(Supl.1):57-61.
7. Roitt I., Brostoff J., Male D. *Inmunología* 4ª ed. Harcourt Brace, España, 1998. Pag. 2.14-2.15.
8. Janeway C. A. *Inmunobiología* 4ª ed. Masson, España, 2000. Pag. 165-169.
9. Fontayne, A., My-Chan Dang P., Gougerot-Ponciale M., and El Benna J. 2002. Phosphorylation of p47^{phox} Sites by PKC α , β II, δ , and ξ : Effect on Binding to p22^{phox} and on NADPH Oxidase Activation. *Biochemistry.* 41: 7743-7750.
10. Fernandez-Botran, R. *Methods in Cellular Immunology.* CRC, USA, 1995. Pag. 40
11. Sodhi A. and Biswas S. 2002. fMLP-induced *in vitro* nitric oxide production and its regulation in murine peritoneal macrophages. *J Leuko Biol.* 71: 262-270.

12. Reiner N. 1994. Altered cell signaling and mononuclear phagocyte deactivation during intracellular infection. *Immunol Today*. 15 (8): 374-381.
13. García García E. and Rosales C. 2002. Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leuk Biol*. 72: 1092-1108.
14. Sánchez-Mejorada G. and Rosales C. 1998. Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *J Leuk Biol*. 63: 521-533.
15. Paul W.E., *Fundamental Immunology*. Raven Press, USA, 1984. Pag. 722,723,1057-1059.
16. Root, R.K. and Cohen M. 1981. The microbicidal mechanisms of human neutrophils and eosinophils. *Rev. Infect Dis*. 3 (3):565-598.
17. Richard M. L. and Seymour J. K. 1983. Oxygen dependent microbial systems of phagocytosis and host defense against intracellular protozoa. *J Cell Bioche*. 22:173 – 185.
18. Garcia, B.E. 2001. NADPH-oxidasa fagocítica : componentes, ensamblaje y mecanismo de acción. *Rev Cubana Invest Biomed*. 20 (1): 59-63.
19. Chanock S., El Benna J., Smith R., and Babior B. 1994. The Respiratory Burst Oxidase. *J Biol Chem*. 269 (40):24519-24522.
20. Albrech and Jungi. 1993. Luminol – enhanced chemiluminiscence induced in peripheral blood – derived human phagocytes: obligatory requirement of myeloperoxidase exocytosis by monocytes. *J Leuk Biol*. 54: 300-306
21. Delgado Dominguez, J.S. 1999. Correlación entre la inhibición del estallido oxidativo ejercido por *Leishmania mexicana mexicana* y la severidad de la leishmaniasis en el humano y modelo murino. Tesis de maestría, UNAM, México, D.F.
22. Remaley A.T., Douglas B.K., Basford R.E., Glew R.H., and Kaplan S. 1984. Leishmanial phosphatase blocks neutrophil O₂⁻ production. *J Biol Chem*. 25:11173-11175.
23. Remaley, A.T., Glew R., Kuhns D., and Basford R. 1985. *Leishmania donovani*: surface membrane acid phosphatase blocks neutrophil oxidative metabolite production. *Exp Parasitol*. 60: 331-341.
24. Saha K. A., Dowling J., LaMarco K., L., Remaley A., Olomu N., Pope M. and Glew R. 1985. Properties of an acid phosphatase from *Legionella*

- micdadei* which blocks superoxide anion production by human neutrophils. Arch Biochem Biophys. 15:150-160.
25. Baca O. G., Miriam J. R., Robert H. G., Robert F. C., John E. B. and Adam S. A. 1993. Acid phosphatase activity in *Coxiella burnetii*: a possible virulence factor. Infec Inmun. 10:4232-4239.
 26. Li Y.P., Curley G., López M., Chávez M., Glew R., Aragón A., Kumar H., and Baca O.G. 1996. Protein-Tyrosine phosphatase activity of *Coxiella burnetii* that inhibits human neutrophils. Acta Virol. 40:263-272.
 27. Reilly T. J., Baron G., Nano F. and Kuhlenschmidt M. 1996. Characterization and sequencing of a respiratory burst-inhibiting acid phosphatase from *Francisella tularensis*. J of Biol Chem. 18:10973-10983.
 28. Bliska, J.B. and Black D. 1995. Inhibition of the Fc receptor mediated oxidative burst in macrophages by *Yersinia pseudotuberculosis* tyrosine phosphatase. Infec Immu. 2:681-685.
 29. Rico G., Díaz-Guerra O., Giménez-Scherer J.A., and Kretschmer R. 1992. Effect of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* upon the respiratory burst of human leukocytes. Arch Med Res. 23 (2): 157-159.
 30. García Loret M.I., Rocha Ramírez L.M., and Santos Preciado J.I. 1992. Macrophage colony-stimulating factor enhances the respiratory burst of human monocytes in response to *Entamoeba histolytica*. Arch Med Res. 23(2):139-141.
 31. Lin J.Y., K. Keller, and K. Chadee. 1993. *Entamoeba histolytica* proteins modulate the respiratory burst potential by murine macrophages. Immunology. 78:291-297.
 32. Lau K.H.W., Farley J.R., and Baylink D.J. 1989. Phosphotyrosyl protein phosphatase. Biochem J. 257: 23-36.
 33. Zhong-Yin, Z., and J.E. Dixon. 1994. Protein Tyrosine Phosphatases: mechanism of catalysis and substrate specificity. En: Adv. Enzymol. Meister A. (Ed.) John Wiley & Sons, Inc. New York.
 34. Fauman, E.B. and Saper M. 1996. Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. TIBS. 21: 413-417.

35. Aguirre-García M.M., Cerbón J. and Talamas-Rohana P. 2000. Purification and properties of an acid phosphatase from *Entamoeba histolytica* HM-1:IMSS. *International Journal for Parasitology*. 30:585-591.
36. Aguirre García, M.M. 2000. Purificación y caracterización de la fosfatasa ácida de *Entamoeba histolytica* con actividad de tirosina fosfatasa y su efecto en el estallido respiratorio de neutrófilos activados. Tesis de Doctorado, CINVESTAV, México D.F.
37. Centers for disease Control & Prevention. National Center for Infectious Diseases. Division of parasitic Diseases. Parasite Image Library. Amebiasis Life Cycle. www.dpd.cdc.gov/ (Vi: 18-03-05).

APÉNDICE

Buffer de lisis

| | |
|-------------|----------|
| Imidazol | 10 mM |
| EDTA | 5 mM |
| Benzamidina | 1 mM |
| Leupeptina | 2 µg/ml |
| Aprotinina | 10 µg/ml |

Por cada 5 millones de amibas se utiliza 1 ml de buffer de lisis.

PBS 1x

| | |
|----------------------------------|----------------|
| NaCl | 8 gr |
| KCl | 0.2 gr |
| Na ₂ HPO ₄ | 1.44 gr |
| KH ₂ PO ₄ | 0.24 gr |
| H ₂ O | c.b.p. 1000 ml |
| pH 7.4 (no se ajusta) | |

PBS Ca⁺⁺ Mg⁺⁺

| | |
|-------------------------------------|----------------|
| CaCl ₂ | 0.1 gr |
| MgCl ₂ 6H ₂ O | 0.1 gr |
| KCl | 0.2 gr |
| NaCl | 8 gr |
| KH ₂ PO ₄ | 0.2 gr |
| Na ₂ HPO ₄ | 0.917 gr |
| H ₂ O | c.b.p. 1000 ml |
| pH 7.4 (no se ajusta) | |

Buffer A

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

Buffer B

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

Solución de Krebs

| | |
|--|----------------|
| NaCl | 121 mM |
| KCl | 5 mM |
| CaCl ₂ | 1.3 mM |
| MgSO ₄ | 1.2 mM |
| NaH ₂ PO ₄ | 3.1 mM |
| Na ₂ HPO ₄ | 12.5 mM |
| Dextrosa | 11 mM |
| H ₂ O | c.b.p. 1000 ml |
| pH 7.2 (ajustar con NaOH 1M) | |
| Esterilizar por filtración con membrana de 0.22 µm | |

Solución de Hanks

| | |
|--|----------------|
| NaCl | 8 gr |
| KCl | 0.4 gr |
| CaCl ₂ | 0.14 gr |
| MgSO ₄ | 0.4 gr |
| NaHCO ₃ | 0.208 gr |
| Na ₂ HPO ₄ | 0.06 gr |
| Glucosa | 1.0 gr |
| KH ₂ PO ₄ | 0.06 gr |
| H ₂ O | c.b.p. 1000 ml |
| pH 7.2 (ajustar con NaOH 1M) | |
| Esterilizar por filtración con membrana de 0.22 µm | |

Solución lítica

Solución madre

| | |
|-----------------------|------------|
| I NH ₄ Cl | 16.58 gr/L |
| II NaHCO ₃ | 8.4 gr/L |
| III EDTA | 0.146 g/L |

Las soluciones madre se preparan con agua desionizada y se guardan a 4°C.

Para la solución de trabajo se realiza lo siguiente:

| | |
|-----------------------|------|
| I NH ₄ Cl | 50ml |
| II NaHCO ₃ | 20ml |
| III EDTA | 10ml |
| H ₂ O | 20ml |

Ajustar el pH a 7.2 con NaOH 1M y esterilizar por filtración con membrana de 0.22µm. La solución de trabajo se prepara el mismo día de la lisis.

Luminol (SIGMA)

Se pesan 3.56 mg, se disuelven en 100 μl de DMSO y se lleva a 1 ml con solución de Hanks. Para el ensayo se toman 200 μl y se lleva a 3 ml. Por cada condición se utilizan 100 μl .

Zyosan (SIGMA)

Se pesan 200 mg para 20 ml de solución salina al 0.85%, se pone en un tubo de 50 ml y se deja en baño maría por 30 min. Enfriar a temperatura ambiente y lavar dos veces centrifugando a 5000 rpm con solución salina durante 10 min; preparar alícuotas de 1 ml y congelar inmediatamente a -20°C . La opsonización de esta partícula se realiza el mismo día del ensayo de quimioluminiscencia, para lo cual se realiza lo siguiente:

Se descongela una alícuota de 1 ml y se lava dos veces con solución salina a 5000 rpm durante 5 min. Después se resuspende con 200 μl de suero AB fresco más 700 μl de solución de Hanks, incubando por 30 min en agitación a 37°C . Posteriormente se lava 2 veces con solución salina y finalmente se resuspende en 1 ml de solución de Hanks. De esta suspensión se toman 60 μl por cada condición

PMA (SIGMA)

La ampolleta de 1g se disuelve en DMSO (Stock 1mg/ml), y se guarda en alícuotas de 200 μl . La solución de trabajo se prepara de la siguiente manera: se toma lo 200 μl y se lleva a 1200 μl con solución de Hanks.