



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA
PROTEÍNA FOSFATASA PP2C EN TROFOZOITOS DE
Entamoeba histolytica

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

ANA DANIELA VEGA GARCÍA



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARÍA MAGDALENA AGUIRRE GARCÍA

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Apellido paterno: Vega
Apellido materno: García
Nombre (s): Ana Daniela
Teléfono: 56 09 18 46
Universidad: Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad: Facultad de Ciencias
Carrera: Biología
No. de cuenta: 306328756

2. Datos del Tutor

Grado: Dra.
Nombre (s): María Magdalena
Apellido paterno: Aguirre
Apellido materno: García

3. Datos del Sinodal 1

Grado: Dra.
Nombre (s): Cecilia Teresa
Apellido paterno: Ximénez
Apellido materno: García

4. Datos del Sinodal 2

Grado: Dra.
Nombre (s): María del Carmen
Apellido paterno: Guzmán
Apellido materno: Cornejo

5. Datos del Sinodal 3

Grado: Dr.
Nombre (s): Julio César
Apellido paterno: Carrero
Apellido materno: Sánchez

6. Datos del Sinodal 4

Grado: Dr.
Nombre (s): Javier Rolando
Apellido paterno: Ambrosio
Apellido materno: Hernández

7. Datos del trabajo escrito

Título: Identificación y caracterización de la proteína fosfatasa PP2C en trofozoitos de *Entamoeba histolytica*
Número de páginas: 39
Año: 2014

Agradecimientos

Esta investigación fue realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM proyecto IN218412. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme cumplir mi más anhelado sueño y regalarme tanto. A la Facultad de Ciencias por ser mi segunda casa. Orgullosamente hecha en C. U.

A la Dra. María Magdalena Aguirre García por su apoyo, paciencia y sobretodo por la oportunidad de permitirme realizar mi proyecto de tesis bajo su tutela. A la Dra. Ingerborg Becker Fauser por darme un lugar en su laboratorio y equipo de trabajo.

Al M. en C. Augusto González Canto por toda su colaboración, paciencia, disposición y apoyo en la realización de este trabajo así como por su amistad y las galletas.

A mis sinodales: Dra. Cecilia Ximénez, Dra. María del Carmen Guzmán, Dr. Julio César Carrero y Dr. Javier Ambrosio por aceptar ser parte de mi trabajo y por sus valiosas observaciones y comentarios.

A la Dra. Edith Fernández Figueroa. Gracias por permitirme aprender de ti, por abrirme las puertas de tu casa y de tu vida. Te quiero.

A mis amigos de la Facultad por hacer del camino algo tan placentero.

A mi mamá y a mi hermano Rubén por su eterno apoyo y amor. Los amo con toda mi alma. No podría haber realizado este trabajo sin ustedes.

A mis hermanas de vida, mis amigas: Andrea, Tere, Carolina, Angelica y Marisol. Son las mejores personas, no hay día en que no de gracias por haberlas conocido.

A la familia Ortiz Rivas por todo su cariño, por abrirme las puertas de su casa y de su corazón y hacerme sentir como un miembro más de su familia. Los quiero muchísimo.

A Don Elías Rivas. Sé muy bien que usted me cuida desde el cielo a mi y a esa maravillosa familia que me regalo su nieto. Lo extraño mucho.

Por último a ti, mi amado Jesús Augusto. Tú mejor que nadie sabe todo lo que este trabajo significa para mi y tú más que cualquiera me brindo su apoyo incondicional. Eres lo mejor que me ha pasado, gracias por ser como eres. Te amo.

Índice

| | |
|---|-----------|
| Índice general..... | I |
| Lista de figuras..... | III |
| Resumen..... | IV |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1 Amibiasis..... | 1 |
| 1.2 Agente etiológico..... | 1 |
| 1.3 Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i> | 2 |
| 1.4 Mecanismos de patogenicidad de <i>Entamoeba histolytica</i> | 4 |
| 1.4.1 Lectina GAL/GALNac..... | 4 |
| 1.4.2 Ameboporo..... | 4 |
| 1.4.3 Proteasas de cisteína..... | 5 |
| 1.5 Otras moléculas de <i>Entamoeba histolytica</i> relacionadas con su virulencia..... | 5 |
| 1.5.1 Lipopeptidofosfoglicano (LPPG)..... | 5 |
| 1.5.2 Proteínas fosfatasas..... | 5 |
| 1.5.2.1 PTP's de <i>Entamoeba histolytica</i> | 6 |
| 1.5.2.2 SP/TP de <i>Entamoeba histolytica</i> | 8 |
| 1.5.2.2.1 PPP's..... | 8 |
| 1.5.2.2.2 PPM's (PP2C)..... | 9 |
| 1.6 PTPs y PS/TP en microorganismos infecciosos..... | 10 |
| 1.6.2 Bacterias..... | 10 |
| 1.6.3 Hongos..... | 11 |
| 1.6.4 Parásitos..... | 12 |
| II. JUSTIFICACIÓN..... | 14 |
| III. HIPÓTESIS..... | 15 |
| IV. OBJETIVOS..... | 15 |
| 4.1 Objetivo general..... | 15 |
| 4.2 Objetivos específicos..... | 15 |
| V. MÉTODOS..... | 16 |

| | |
|--|-----------|
| 5.1 Crecimiento de los parásitos..... | 16 |
| 5.2 Colecta de parásitos y obtención de la fracción citosólica..... | 16 |
| 5.3 Cuantificación de proteína por el método DC (compatible con detergente)..... | 16 |
| 5.4 Análisis de la actividad enzimática de fosfatasa..... | 17 |
| 5.5 Ensayos de Western blot (Wb) y revelado por quimioluminiscencia..... | 17 |
| 5.5.1 Ensayo de Western blot para degradación de proteínas..... | 18 |
| 5.6 Actividad de fosfatasa específica de Serina/Treonina..... | 18 |
| 5.7 Efecto del inhibidor específico | 19 |
| 5.8 Purificación de la PP2C de <i>Entamoeba histolytica</i> | 19 |
| 5.9 Tinción con plata..... | 19 |
| VI. RESULTADOS..... | 21 |
| 6.1 Identificación de la proteína fosfatasa PP2C en la fracción citosólica de <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i> | 21 |
| 6.1.2 Análisis de la expresión de la proteína fosfatasa PP2C en la fracción citosólica de trofozoítos de <i>E. dispar</i> | 22 |
| 6.1.3. Identificación de la proteína fosfatasa PP2C en la fracción citosólica de trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> incubados con inhibidores de proteasas..... | 23 |
| 6.2 Análisis de la actividad enzimática de fosfatasa en fracciones citosólicas de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i> | 24 |
| 6.3 Determinación de la actividad enzimática de la proteína fosfatasa PP2C presente en la fracción citosólica de <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i> mediante la utilización de un péptido fosforilado en residuos de treonina..... | 25 |
| 6.4 Efecto de inhibidores de fosfatasas en la actividad enzimática de fracciones citosólicas de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i> | 26 |
| 6.5 Efecto del inhibidor específico (sanguinarina) en la actividad de la fosfatasa PP2C de <i>E. histolytica</i> | 29 |
| 6.6 Purificación de proteínas PP2C de <i>Entamoeba histolytica</i> | 30 |
| VII. DISCUSIÓN..... | 32 |
| VIII. CONCLUSIONES..... | 34 |
| IX. PERSPECTIVAS..... | 34 |
| X. REFERENCIAS..... | 35 |

Lista de tablas y figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> | 3 |
| Tabla 1. Funciones de las fosfatasas representativas de la familia PPP..... | 6 |
| Figura 2. Identificación de la PP2C en la fracción citosólica de <i>E. histolytica</i> y <i>Entamoeba dispar</i> | 21 |
| Figura 3. Búsqueda de la PP2C de 37 kDa en la fracción citosólica de <i>E. dispar</i> | 22 |
| Figura 4. Identificación de PP2C en la fracción citosólica de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> incubados con inhibidores de proteasas..... | 23 |
| Figura 5. Actividad enzimática de fosfatasa en la fracción citosólica de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> (<i>Eh</i>) y <i>E. dispar</i> (<i>Ed</i>)..... | 24 |
| Figura 6. Actividad enzimática específica de fosfatasa de treonina en fracciones citosólicas de <i>E. histolytica</i> (<i>Eh</i>) y <i>E. dispar</i> (<i>Ed</i>)..... | 25 |
| Tabla 2. Porcentaje de la actividad enzimática general de fracciones citosólicas de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i> | 27 |
| Figura 7. Porcentaje de inhibición de fosfatasas PTP y SP/TP en fracciones citosólicas de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar</i> | 28 |
| Figura 8. Efecto del inhibidor específico a diferentes concentraciones sobre la actividad específica de fosfatasas de treonina en la fracción citosólica de <i>E. histolytica</i> (<i>Eh</i>) y <i>E. dispar</i> (<i>Ed</i>)..... | 29 |
| Figura 9. Perfil de purificación de proteínas fosfatasas PP2C de <i>E. histolytica</i> | 31 |

Resumen

La amibiasis es una enfermedad causada por un protozoario llamado *Entamoeba histolytica* que puede provocar diversos cuadros clínicos y que persiste hasta la actualidad como una de las enfermedades parasitarias más importantes.

Los trofozoitos causan daño a la matriz extracelular de las células del hospedero a través de la acción del amebaporo, fosfolipasas y enzimas proteolíticas como endopeptidasas, cisteínproteasas y colagenasas, entre otras. Se conocen algunos factores de virulencia en este parásito como la lectina galactosa/N-acetilgalactosamina (Gal/GalNAc, 260 kDa) involucrada en el proceso de adhesión a mucinas y células epiteliales. Otras moléculas como el lipopeptidofosfoglicano (EhLPPG), localizado en la membrana de los trofozoitos, también se ha asociado con este proceso de adhesión.

Nuestro grupo de trabajo ha reportado en trofozoitos de *E. histolytica* la presencia de una proteína tirosina fosfatasa (PTP) que puede constituir otro factor de virulencia del parásito. Las fosfatasas son proteínas que catalizan la eliminación de grupos fosfato de sus sustratos. Se clasifican de acuerdo al residuo de aminoácidos sobre el cual actúan en fosfatasas de serina-treonina o fosfatasas de tirosina como la mencionada anteriormente.

Se ha reportado el papel de la proteína fosfatasa PP2C (desfosforila residuos de serina y treonina) en el proceso de transducción de señales en *Arabidopsis sp* y otras funciones en plantas superiores. En otros parásitos como *Leishmania major* se ha postulado a esta fosfatasa como posible factor de virulencia y se ha investigado su participación en el proceso de invasión a la célula hospedera y su sobrevivencia en cultivo. Por todo lo anterior, este trabajo se interesó en analizar la presencia de la PP2C en trofozoitos de *E. histolytica* ya que hasta el momento no se conocen antecedentes de esta proteína ni las funciones en las que puede estar involucrada por lo que resulta importante identificar, caracterizar y analizar el papel de esta proteína en este parásito.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Amibiasis

La amibiasis se define como una infección intestinal o extraintestinal provocada por el parásito protozario *Entamoeba histolytica*. De acuerdo a datos bioquímicos, inmunológicos y genéticos, *E. histolytica* ha sido reclasificada en dos especies morfológicamente idénticas pero genéticamente distintas: *E. histolytica* como la especie patógena causante de la amibiasis intestinal y de abscesos hepáticos y *E. dispar* como la especie no patógena y no invasiva [1], sin embargo, en la actualidad, existe el reporte de evidencia genética de *E. dispar* en abscesos hepáticos de pacientes [2]. La morfología de sus quistes y trofozoítos es idéntica a *E. histolytica*, con mínimas diferencias genéticas. Una molécula importante relacionada con la patogenicidad de *E. histolytica*, la lectina GAL/GALNAc, también ha sido identificada en *E. dispar*. Sin embargo, algunas diferencias conformacionales en la lectina de *E. dispar* podrían explicar la reducción en la adherencia, citotoxicidad y menor virulencia que muestra esta especie [3, 4]. En otras moléculas relacionadas con la patogenicidad, las proteasas de cisteína, la producción y liberación es casi 1000 veces mayor en *E. histolytica* que en *E. dispar* [5]. Además, la actividad catalítica de los péptidos formadores de poros (ameboporos) en esta última es de alrededor de un tercio en contraste con *E. histolytica* [6]. Otros estudios recientes, *in Vitro* e *in vivo*, han muestran evidencia de que cepas de *E. dispar* de diferentes orígenes son capaces de producir daño hepático y destruir líneas celulares de cultivo [7]. Por todo lo anterior, es necesario reevaluar la epidemiología de la amibiasis, ya que las cifras mencionadas probablemente no corresponden a la realidad si se consideran las infecciones por *E. dispar* además de *Entamoeba moshkovskii*, morfológicamente idénticas. En México, la amibiasis se encuentra entre las primeras 20 causas de morbilidad [8].

1.2 Agente etiológico

E. histolytica presenta dos estadios: el quiste y el trofozoíto.

El quiste. Es esférico, semitransparente y posee una membrana lisa y delgada. Mide de 10 a 16 μm de diámetro, presenta cuerpos cromatoidales en sus fases inmaduras, una pared de quitina capaz de resistir cambios bruscos de temperatura y pH. Representa la fase infectiva.

El trofozito. Su cuerpo es alargado, mide de 40 a 60 μm y posee la cualidad de producir pseudopodos que le proporcionan capacidad de movimiento. Representa la fase invasiva y no es capaz de sobrevivir fuera del hospedero [9].

1.3 Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*

El ciclo de vida de *E. histolytica* es simple. Comienza cuando la fase infectiva, el quiste, es ingerido a través del consumo de agua o alimentos contaminados con los quistes. Los cambios de pH que experimentan hacen posible que los trofozoítos sean liberados, estos migran al colón donde se reproducen por fisión binaria al tiempo que producen los quistes que se eliminan con las heces. Los trofozoítos que logran permanecer en el intestino provocan la amibiasis intestinal al invadir la mucosa que recubre al intestino y, en algunos casos, los trofozoítos logran penetrar al torrente sanguíneo y pueden llegar a invadir órganos como el hígado, pulmones o incluso el cerebro, causando la amibiasis extraintestinal (Fig. 1) [10]. En condiciones de higiene deficiente, las heces portadoras de quistes tienen contacto con el agua o alimentos que, al ser ingeridos, propagan la infección y permiten que el parásito continúe su ciclo vital. A pesar de que se conoce bien el funcionamiento de este ciclo de vida aún no se sabe con certeza que sistema posibilita el cambio de fase en el parásito [11].

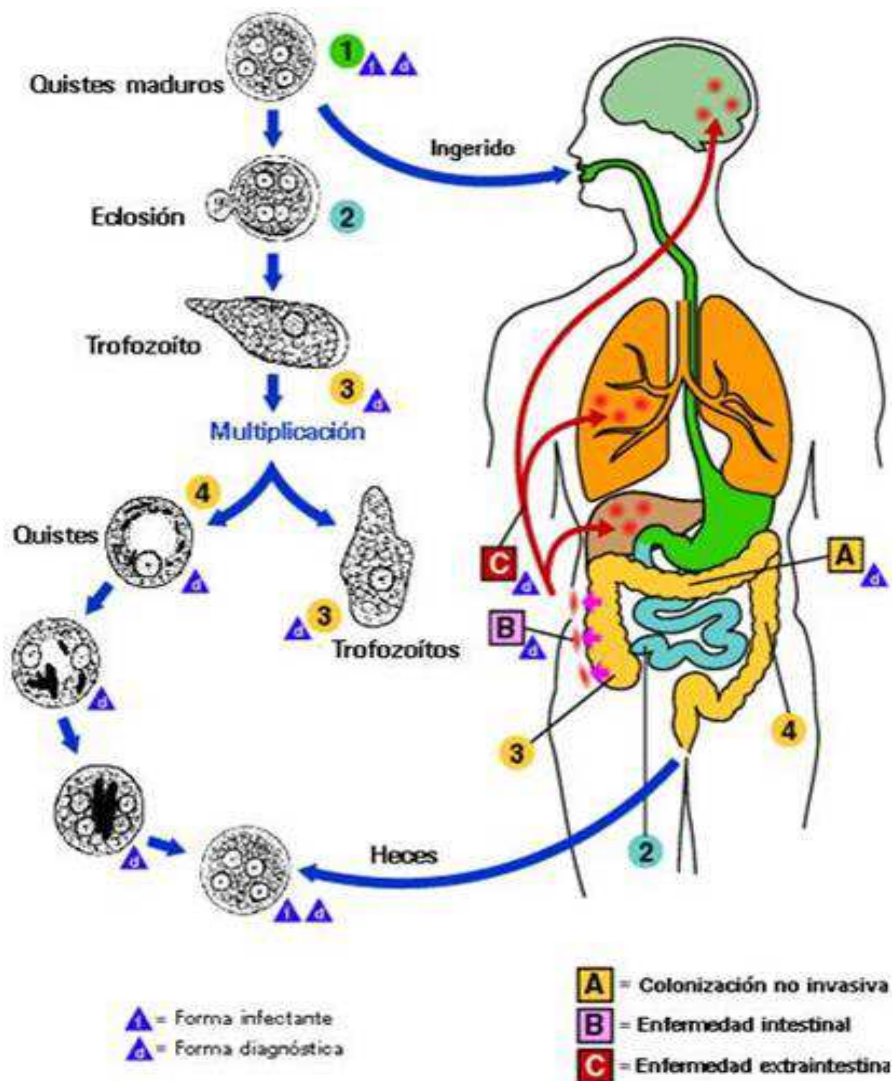


Fig. 1 Ciclo de vida de *E. histolytica*. El quiste maduro es ingerido a través de alimentos o agua contaminada y pasa a través del tracto digestivo hasta el intestino delgado donde los trofozoítos se liberan y migran hasta el colón. Ahí los trofozoítos se reproducen por fisión binaria y algunos producen los quistes que se eliminan con las heces [12]

1.4 Mecanismos de patogenicidad de *E. histolytica*

El proceso de invasión del tejido epitelial del colón es facilitado por la expresión de factores de virulencia, de los cuales, pocos están identificados y caracterizados. Tres de ellos han sido estudiados y caracterizados a nivel molecular: La lectina Gal/GalNAc, el ameboporo y las proteasas de cisteína. En infecciones experimentales en modelo murino, se observó la expresión diferencial de 523 genes durante el desarrollo de la enfermedad [13]. Entre los genes que mostraron una mayor expresión estuvieron los genes que codifican para lectinas Gal/GalNAc y para proteasas de cisteína [14].

1.4.1 Lectina GAL/GALNAc.

Esta lectina se localiza en la superficie del trofozoíto, consta de una subunidad pesada (170 kDa) de Glicosil fosfatidil inositol (GPI) anclada a una subunidad ligera (30 kDa) y a un dominio CXXC (20 kDa), el cual contiene subunidades intermedias de GPI en la proteína. Es un factor importante en el proceso de adherencia a glicoproteínas, epitelio del colón, mucinas, eritrocitos y algunas bacterias. La mucina del epitelio es altamente polivalente en residuos terminales Gal/GalNAc y se une a esta lectina con muy alta afinidad, por ello es tal vez el primer blanco natural para la unión del trofozoíto. La penetración a través de la capa de mucina permite al trofozoíto invadir y atacar el tejido del hospedero [6]. Ankri y colaboradores observaron que la disminución en la expresión de la subunidad ligera de la Gal/GalNAc en la cepa Rahman de *E. histolytica* comparada con su expresión en la cepa HM1: IMSS estaba directamente relacionada con su capacidad de virulencia [15].

1.4.2 Ameboporo.

Es una familia de proteínas formadoras de poros que forman parte de la membrana del trofozoíto y que tienen la capacidad de formar canales iónicos o poros en la membrana mediante un proceso de oligomerización, desestabilizando la célula blanco y ocasionando posteriormente la lisis celular del tejido. Se han reportado hasta el momento tres isoformas: A, B y C, formadas por 77 residuos polipeptídicos que poseen una conformación alfa hélice, con un residuo de histidina conservado en el extremo carboxilo terminal [16]

1.4.3 Proteasas de cisteína

E. histolytica posee una fuerte capacidad proteolítica. La secreción de proteasas de cisteína afecta la matriz extracelular de las células blanco y son importantes para la sobrevivencia del parásito [17]. La proteasa de cisteína más importante es la CP5, tiene un peso molecular de 56 KDa y sólo esta presente en *E. histolytica*. Esta proteasa esta asociada a membrana y se ha comprobado que la mala transcripción de su gen específico reduce la actividad de proteasa de cisteína y el parásito no tiene la capacidad de generar absceso hepático [18].

1.5 Otras moléculas de *Entamoeba histolytica* relacionadas con su virulencia

En la actualidad, se conocen diversas proteínas de este parásito que han sido postuladas como posibles factores de virulencia como el lipopeptidofosfoglicano (LPPG) y algunas proteínas fosfatasas encontradas en *E. histolytica*, que aunque no han sido lo suficientemente estudiadas, se han relacionado con el proceso de invasión de este parásito en el hospedero.

1.5.1 Lipopeptidofosfoglicano (LPPG)

Es una molécula localizada en la membrana del parásito y que ha sido postulada como factor de virulencia debido a que se ha identificado su comportamiento como patrón molecular asociado a patógenos (PAMP) en los últimos años. Se observó que al utilizar un anticuerpo monoclonal dirigido al LPPG de *E. histolytica* se afectó la producción de absceso hepático [19]. Así mismo se postuló que la respuesta inmune dada ante la presencia de este parásito se da a través del reconocimiento del EhLPPG por el receptor TLR 4 y la activación del factor nuclear NF-κB en macrófagos humanos [20].

1.5.2 Proteínas fosfatasas

En *E. histolytica* se han descrito diversas proteínas pertenecientes a esta clasificación, las cuales han sido postuladas como posibles factores de virulencia. Las fosfatasas son enzimas encargadas de desfosforilar proteínas. La fosforilación y desfosforilación de proteínas es uno de los mecanismos más importantes en la regulación de una gran variedad de eventos

intracelulares en eucariontes. De acuerdo al fosfoaminoácido en el que actúan pueden clasificarse en proteínas tirosina fosfatasas (PTP), las cuales desfosforilan residuos de tirosina y las serina/treonina fosfatasas (SP/TP) que actúan en residuos de serina o de treonina, representadas por la familia de fosfoproteínas fosfatasas (PPP) y la familia de las fosfoproteínas fosfatasas monoméricas (PPM). Dentro de la familia PPP se encuentran la PP1, PP2A y PP2B, las cuales poseen un dominio catalítico común de 280 residuos y se distinguen por presentar subunidades reguladoras asociadas y formar una variedad de holoenzimas; representan la familia más abundante en eucariontes [21]. Su variedad de funciones se muestran en la tabla 1 [22].

Tabla 1. Funciones de las fosfatasas representativas de la familia PPP

| Proteína | Función |
|-----------------|---|
| PP1 | Metabolismo del glucógeno, contracción muscular, progresión del ciclo celular y actividad neuronal. [23] |
| PP2A | Metabolismo, señalización celular, control del ciclo celular, control de actividad de la telomerasa, dinámica del citoesqueleto. [24] |
| PP2B | Depende de Ca ⁺⁺ para su actividad enzimática. Señalización de calcio en células T activadas. Neurodesarrollo y memoria, desarrollo y contracción muscular. [25] |

1.5.2.1 PTP's de *Entamoeba histolytica*

En 1977 se descubrió una fosfatasa ácida (AP) de *E. histolytica* que fue descrita como asociada a la membrana del parásito [26]. Posteriormente, se encontró que esta AP también se secretaba al medio de cultivo y que su periodo de máxima secreción se daba entre las 10 y 12 horas [27]. Se comparó la actividad enzimática de ambas proteínas (MAP y SAP) presentes en diferentes cepas de *E. histolytica* que tenían distinto grado de virulencia, así como en

Entamoeba dispar, una especie no patogénica. Al analizar los niveles de secreción se observó que había diferencia en la actividad de ambas isoformas entre las diferentes cepas de *E. histolytica* y entre ambas especies (*E. histolytica* y *E. dispar*), pero interesantemente, la diferencia más significativa se dio en la comparación de la actividad de la SAP entre las dos especies, ya que en *E. dispar* la actividad de SAP disminuía drásticamente. Debido a esta diferencia entre la especie patogénica y la no patogénica, se postuló la idea de que esta AP secretada podía ser un elemento importante en los mecanismos de patogenicidad de este parásito [28].

La MAP antes descrita de *E. histolytica* se purificó y caracterizó de la cepa HM-1: IMSS. La enzima presentó actividad enzimática a un pH de 5.5, la cual disminuyó considerablemente en presencia de molibdato de amonio y orthovanadato de sodio. De acuerdo a estas características, se sugirió que se trataba de una fosfatasa tipo PTP [29, 30]. Posteriormente se comprobó que la MAP purificada de *E. histolytica* desfosforilaba específicamente O-fosfo L-tirosina (P-Tyr) a un pH de 5 y era inhibida por los compuestos mencionados, por lo que se confirmó que se trataba de una PTP. El anticuerpo monoclonal para la PTP de placenta humana (PTP1B) presentó una reacción cruzada con la PTP purificada de 55 kDa y además en estudios funcionales con células HeLa se observó una desintegración completa del citoesqueleto de actina de estas células después de ocho horas de interacción con la PTP amibiana. Estos resultados sugieren que la PTP amibiana puede alterar los procesos de transducción de señales involucradas en el arreglo del citoesqueleto de actina y, por lo tanto, ser determinante en el proceso de infección [30].

Nuestro grupo de trabajo encontró que la PTPasa de membrana purificada de *E. histolytica* inhibió el estallido respiratorio de neutrófilos activados con N-formil-metil-leucina-fenilalanina (f-MLP) [31]. Además se estudió el efecto de esta proteína en la secreción de citocinas en macrófagos murinos y se encontró que induce la producción de citocinas como TNF, IL-10 e IL-12 [32].

Una PTP de *E. histolytica* fue caracterizada e inmunolocalizada por microscopia electrónica de transmisión. Esta enzima hidrolizó el p-NPP y fue hipersensible a orthovanadato de sodio y molibdato de amonio. Además, se encontró que en presencia de Zn^{2+} , un agente oxidante, la

actividad de esta enzima disminuía en un 50 % en contraste con la interacción con agentes reductores como DTT y GSH, los cuales incrementaron su actividad enzimática [33].

Un análisis bioinformático del genoma de *E. histolytica* reveló la presencia de 42 genes que codifican PTPasas, de los cuales solamente 2 codifican para PTPasas clásicas. Las proteínas recombinantes *rEhPTPA* y *rEhPTPB* obtenidas a partir de estos dos genes amibianos presentan su actividad máxima de fosfatasa ácida a un pH de 6.0 y 5.5 respectivamente. Al analizar la expresión de estos genes a nivel de RNAm, se encontró que el gene *EhPTPA* se expresa en forma mas abundante en los trofozoítos recuperados de absceso hepático amibiano que en con los trofozoítos en cultivo, mientras que el gene *EhPTPB* se expresa al mismo nivel en las dos condiciones. El aumento en la expresión del gene *EhPTPA* sugiere que la enzima *EhPTPA* puede estar jugando un papel importante en la respuesta adaptativa o de estrés de los trofozoitos durante el desarrollo del absceso hepático amibiano [34].

Otra de las PTPasas de *E. histolytica* estudiada es la de especificidad dual PRL (fosfatasas de regeneración de hígado). La proteína EhPRL presenta una homología de 34-36% con las PRLs de humanos. Estas PRLs constituyen una nueva clase de pequeñas PTPasas involucradas en la modulación del crecimiento celular. Para estudiar la posible función de *EhPRL*, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para encontrar su localización subcelular y obtener indicios de su posible función fisiológica. Para analizar el papel de EhPRL en la migración de los trofozoítos se realizaron ensayos de migración y se evaluó en un modelo *in vivo* el posible efecto en la patogenicidad de los trofozoítos con una mayor capacidad migratoria. Los resultados obtenidos en los experimentos realizados indican que la enzima EhPRL participa en los procesos de migración e invasión de los trofozoítos [35].

1.5.2.2 SP/TP de *Entamoeba histolytica*

1.5.2.2.1 PPP's

La calcineurina o fosfatasa PP2B ha sido fuertemente ligada a la regulación del flujo de calcio en el parásito [36]. Se realizó un estudio con Ciclosporina A (CsA), un potente inmunosupresor y se encontró que también inhibe la proliferación de algunos parásitos incluyendo a *E.*

histolytica [37]. Posteriormente se determinó que la CsA causaba un decremento en la proliferación de trofozoítos de *E. histolytica* debido a que este compuesto interfiere en la actividad enzimática de la fosfatasa PP2B [38].

1.5.2.2.2 PPM's (PP2C)

La familia de proteínas PP2C esta ampliamente distribuida en una gran variedad de organismos, desde bacterias hasta mamíferos [39], sin embargo, no se tienen reportes de proteínas de esta familia en *E. histolytica* hasta la fecha.

La proteína fosfatasa PP2C es la proteína representativa de la familia PPM. Las proteínas de esta familia dependen de cationes de metales divalentes como Mg^{2+} o Mn^{2+} para ser catalíticamente activas. La PP2C es una proteína monomérica que posee un dominio catalítico amino terminal con 6 alfa helices y 11 hojas beta. El dominio carboxilo terminal presenta 3 alfa helices y esta formado por 90 residuos de aminoácidos [40]. Es insensible a los inhibidores clásicos de fosfatasas como el ácido okadáico o microcisteína [22]. Recientemente se determinó que existe un compuesto alcaloide llamado sanguinarina que es extraído de la planta *Sanguinaria canadensis*, el cual ha demostrado ser un potente inhibidor específico de la PP2C e inductor de apoptosis en células HL60 [41].

En el genoma humano se han reportado 16 genes que codifican para al menos 22 isoformas de la PP2C, entre ellas la PP2C α , PP2C β y la PP2C δ o Wip 1 [23]. La PP2C α y la PP2C β son proteínas que han sido postuladas como supresoras de tumores. Por otro lado la PP2C δ está involucrada de manera importante en la regulación de la respuesta a estrés celular ya que en condiciones de estrés como exposición a radiación ionizante, radiación ultravioleta, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y citocinas proinflamatorias producidas por algún estímulo, la PP2C δ se une y desfosforila proteínas clave en las vías de señalización de respuesta a estrés como MAPk p38 y p53 que juegan un papel relevante en la apoptosis y en la reparación de ADN [42, 43]. En plantas se conoce que en *Arabidopsis thaliana* más de 80 genes que codifican para PP2C están involucradas en la regulación de diversas vías de señalización [44]. En casi todas sus isoformas, la función primaria de la PP2C parece ser la regulación del ciclo y crecimiento

celular, de la respuesta a estrés, regulación de procesos de apoptosis y de algunas vías metabólicas en mamíferos y otros organismos [39, 45].

Por el papel tan importante que juegan estas fosfatasas en la regulación de diferentes procesos celulares es importante describir su función en diversos microorganismos como bacterias, hongos y parásitos.

1.6 PTPs y PS/TP en microorganismos infecciosos

1.6.2 Bacterias

1.6.2.1 *Bacillus subtilis*

Esta bacteria posee al menos cinco genes que codifican para PP2C. Uno de ellos, llamado SpoII E, regula la esporulación, ya que promueve la desfosforilación de un factor de transcripción SPOII [46].

1.6.2.2 *Salmonella enterica*

En *Salmonella enterica* se encontraron proteínas del tipo PP2C parecidas a las de eucariontes que están relacionadas con la supervivencia de la bacteria en humanos. Se observó que en una mutante para el gen *prpZ* hubo una disminución significativa del nivel de supervivencia en macrófagos humanos a las 48 horas post-infección. Por esto se sugirió que estos genes están relacionados con la virulencia de *S. enterica* y que pueden ser parte de una vía de señalización que controla su supervivencia en el hospedero a largo plazo [47].

1.6.2.3 *Bacillus Anthracis*

Se examinaron las interacciones regulatorias entre BA-Stp1 y BA-StK1, fosfatasa y cinasa respectivamente. Cuando se hicieron mutaciones en las secuencias de estas proteínas se observó que la habilidad de las bacterias para sobrevivir dentro de los macrófagos se veía afectada de manera importante, perjudicando también su virulencia en el modelo murino de

ántrax pulmonar. Un análisis bioquímico confirmó a la BA-Stp 1 como una fosfatasa tipo PP2C ya que sólo era activa en presencia de iones divalentes de Mg^{2+} y Mn^{2+} y no era inhibida por el ácido okadaico o la Caliculina A [48]

1.6.3 Hongos

1.6.3.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Se ha reportado que por lo menos tres genes que codifican PP2C de *Saccharomyces cerevisiae* están involucradas en la regulación de la vía de síntesis del glicerol, ya que esta fosfatasa inactiva la vía al desfosforilar de forma específica a la MAPK Hog 1[49].

1.6.3.2 *Fusarium graminearum*

Este hongo es el agente causal de la fusariosis o fiebre tizon. Se ha identificado que posee al menos 7 genes que codifican para proteínas tipo PP2C. Se realizaron mutantes con deleciones para cada uno de los siete genes y se observó que en la mutante para el gen FgPTC3 se reducía la formación de hifas aéreas y, aunque el número de conidios aumentó, estos contenían mayor cantidad de granulos lipídicos que la cepa original, por lo que se concluyó que esta PP2C es fundamental para el metabolismo de lípidos. Al mismo tiempo disminuyó la síntesis de Deoxinivalenol (DON), un importante factor de virulencia y se registro daño en la integridad de la pared celular, la velocidad de crecimiento se redujo considerablemente y el hongo ya no era capaz de infectar el trigo [50].

1.6.3.3 *Candida albicans*

En el hongo causante de la candidiasis en humanos, *C. albicans*, se encontraron al menos 7 genes que codifican para proteínas PP2C. Al realizar mutaciones en estos genes se demostró que la PP2C tiene un papel preponderante en la tolerancia e hipersensibilidad a antifúngicos y en el desarrollo de las hifas [51].

1.6.4 Parásitos

1.6.4.1 *Toxoplasma gondii*

En este parásito, causante de la toxoplasmosis, se demostró que durante el proceso de invasión se secretaba una fosfatasa tipo PP2C que interactúa con una proteína de unión a actina en la célula hospedera [52]. Otro estudio similar reveló que existe una proteína PP2C que controla la actividad de una molécula con afinidad a G-actina, la toxifilina, al fosforilar su serina53 [53]. En el 2009, Jan y colaboradores caracterizaron una molécula PP2C de 37kDa de *T. gondii* y observaron que se encontraba de manera abundante tanto en citoplasma como en el núcleo. Adicionalmente, mostraron que un incremento en la actividad de esta PP2C afecta el crecimiento del parásito al detener la citocinesis mientras la división nuclear aún se lleva a cabo [54].

1.6.4.2 *Plasmodium falciparum*

P. falciparum es el agente causal de la Malaria. Presenta un gran número de proteínas fosfatasas pertenecientes a todas las familias, tanto de PTP como de PS/TP [55]. Se identificó y caracterizó una proteína PP2C de aproximadamente 103 kDa. Al ser casi del doble del peso usual para las PP2C se determinó que ambos extremos de la proteína (extremo amino y extremo carboxilo terminal) por separado presentaban homología con otras PP2C. Al purificar y probar la actividad enzimática de ambas proteínas y el híbrido de ambas se observó que su actividad dependía de cationes de Mg^{2+} y Mn^{2+} y no era inhibida por ácido okadaico. Al analizar los resultados se encontró que la actividad enzimática era mayor cuando las proteínas actuaban simultáneamente, por lo tanto, se concluyó que la presencia de ambas fosfatasas era necesaria para una actividad enzimática óptima [56].

1.6.4.3 *Leishmania chagasi*

En *Leishmania chagasi*, parásito responsable de la leishmaniasis, se clonó una proteína fosfatasa PP2C cuya actividad enzimática fue dependiente de iones de Mg^{2+} y resistente al

ácido okadaico. Esta proteína estimuló la respuesta de células T de pacientes infectados con *L. amazonensis*, *L. brasiliensis* y *L. chagasi* [57]. Recientemente nuestro grupo de investigación clonó, caracterizó y se obtuvieron anticuerpos policlonales para la PP2C de *Leishmania major* [58].

1.6.4.4 *Caenorhabditis elegans*

En este parásito se encontraron evidencias de que PPM-1, una proteína fosfatasa tipo PP2C era homóloga a la PP2C α y PP2C β humanas. Se demostró que esta PPM-1 ayuda a regular la formación de la terminación del axón neuronal y la formación de sinapsis en conjunto con otras vías de señalización. Además, se determinó que la PPM-1 regulaba a la Dlk-1, una cinasa involucrada en el desarrollo neuronal [59].

II. JUSTIFICACIÓN

Las proteínas fosfatasas se encuentran ampliamente distribuidas en casi todas las formas de vida. Se ha demostrado que su presencia es esencial para la virulencia de muchos organismos patógenos, ya que pueden intervenir en la modulación de la respuesta inmune del hospedero. Por otro lado, las proteínas fosfatasas SP/TP tienen un papel trascendental en procesos de regulación tan importantes como el control del ciclo celular y mecanismos de respuesta a estrés celular. En particular, las fosfatasas de la familia PP2C que han sido referenciadas en una gran cantidad de microorganismos patógenos; intervienen en la etapa de la infección y proliferación y en muchos casos su presencia es crucial para la supervivencia del organismo. Tal es el caso de bacterias como *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica* y *Bacillus anthracis* y en parásitos como *Toxoplasma gondii* y *Caenorhabditis elegans*.

En *E. histolytica* se han realizado numerosos estudios que dejan de manifiesto que la mayor parte de las fosfatasas tipo PTP hasta ahora reportadas en el parásito son candidatas a tomarse en cuenta como posibles factores de virulencia, debido a que intervienen en procesos de la respuesta inmune celular. Antecedentes particulares en nuestro laboratorio demostraron que la PTPasa amibiana es capaz de inhibir el estallido oxidativo en neutrófilos activados con f-MLP y que esta fosfatasa también interviene en la secreción de citocinas por macrófagos murinos. Sin embargo, el conocimiento acerca de la presencia o el papel que pueden desempeñar proteínas fosfatasas que desfosforilan residuos de serina o treonina (SP/TP) en este parásito es muy escaso y, hasta el momento, no se conocen reportes acerca de proteínas de la familia PP2C en *E. histolytica*. Por esta razón y por los antecedentes que existen acerca de esta proteína y sus isoformas en muchos otros microorganismos patógenos, resulta muy interesante e importante identificar si existen proteínas fosfatasas tipo PP2C en el parásito para así explorar nuevas posibilidades de estudio de esta proteína y su posible función en *E. histolytica*.

III. HIPÓTESIS

La proteína fosfatasa PP2C se encuentra presente en los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* y su actividad enzimática se inhibe en presencia del compuesto sanguinarina.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Identificar y caracterizar una proteína fosfatasa PP2C en trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.

4.2 Objetivos específicos

- 1) Obtener la fracción citosólica de trofozoítos de *E. histolytica*.
- 2) Identificar la proteína fosfatasa PP2C en la fracción citosólica de *E. histolytica* mediante ensayos de Western blot.
- 3) Analizar y comparar la actividad enzimática de fosfatasa en la fracción citosólica de *E. histolytica* y *Entamoeba dispar*.
- 4) Determinar la actividad enzimática específica de la proteína fosfatasa PP2C de *E. histolytica* y *E. dispar* mediante la utilización de un péptido fosforilado en treonina.
- 5) Analizar la actividad enzimática de PP2C en la fracción citosólica de *E. histolytica* y *E. dispar* en presencia de Sanguinarina (inhibidor específico).
- 6) Purificar proteínas PP2C de *E. histolytica* por cromatografía de afinidad utilizando el anticuerpo anti-PP2C de *Leishmania major*.

V. MÉTODOS

5.1 Crecimiento de los parásitos

Se trabajó con la cepa HM1- IMSS de *E. histolytica*. Los trofozoítos fueron mantenidos en medio TYI-S-33 modificado después de su recuperación posterior al pase por hígado de hámster y verificación de su virulencia por la producción de absceso hepático.

Los trofozoítos de *E. dispar* se mantuvieron en medio LY1-S-2. Ambas especies se incubaron a 37° C durante 72 horas.

5.2 Colecta de parásitos y obtención de la fracción citosólica

Los trofozoítos de *E. histolytica* fueron recuperados a las 72 horas de cultivo, durante su fase logarítmica; se obtuvo una población celular de 14×10^6 . Los trofozoítos fueron despegados de las botellas de medio de cultivo depositándolas en hielo durante 20 minutos. Después los parásitos fueron centrifugados a 1200 rpm 5 minutos a 4° C. Se descartó el medio de cultivo amibiano y la pastilla se resuspendió y se lavó dos veces con Solución amortiguadora de fosfatos (PBS). El tercer y último lavado se realizó con Tris 0.02M pH 7.8 y se centrifugó a 1200 rpm 5 minutos a 4° C. Se desechó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en amortiguador de lisis (Tris 0.02M pH 7.8, E-64 50mM). Los parásitos obtenidos se sometieron a 3 ciclos de contraste de temperatura de -70° C y 37° C por 15 minutos respectivamente para lisar los trofozoítos. El extracto total se centrifugó a 13500 rpm a 4° C durante 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante (fracción citosólica) y se congeló a -70° C hasta su uso.

5.3 Cuantificación de proteína por el método DC (compatible con detergente)

Para la determinación de proteína de los sobrenadantes (fracción citosólica) de *E. histolytica* y *E. dispar* se utilizó el método compatible con detergentes (DC) (Biorad) y los datos fueron extrapolados en una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA). Como blanco se utilizó el amortiguador de lisis y se cuantificó proteína con 3µl de una dilución 1:10 de los sobrenadantes en buffer de lisis. Cada una de las condiciones se realizó por triplicado. La placa se dejó reposar

por 15 minutos y se leyó a 650nm en el lector de ELISA. Los datos se analizaron en el programa KC4 v 2.7.

5.4 Análisis de la actividad enzimática de fosfatasa

Una vez obtenida la cuantificación de proteína de los sobrenadantes (fracción citosólica) se ajustó a 10 µg de proteína y se hizo el ensayo de actividad enzimática de fosfatasa en una placa de 96 pozos. Como blanco se usó el amortiguador de lisis y se determinó actividad de fosfatasa utilizando para-Nitrofenilfosfato (*p*-NPP), sustrato de fosfatasas. Cada una de las condiciones se realizó por triplicado. La placa se dejó reposar una hora a 37° C; se detuvo la reacción con 20 µl de NaOH y se leyó la placa a 405nm en el lector de ELISA. Los datos se analizaron en el programa KC4 v 2.7.

5.5 Ensayos de Western- blot (Wb) y revelado por quimioluminiscencia.

Para el análisis de proteínas por Wb se utilizaron geles SDS-PAGE al 10 %. Las muestras (fracción citosólica) se ajustaron a la misma concentración de proteína (40 µg), se les agregó amortiguador de muestra 2x y se hirvieron por 3 minutos a 95° C, tras lo cual, se realizó el corrimiento electroforético en una cámara de electrofóresis con amortiguador de corrida 1x (Tris 25mM, Glicina 190 mM y SDS 0.1%). Las muestras se corrieron a 70 volts por 30 minutos y después a 120 volts durante 60 minutos. Posteriormente se realizó la transferencia.

El proceso de transferencia fue realizado en un sistema semi-seco, el cuál consistió en activar las membranas de PVDF-inmobilón con metanol durante 3 minutos. Posteriormente la membrana se lavó con agua desionizada y se equilibró en amortiguador de transferencia 1x (Tris 25mM, Glicina 192mM y 20% de metanol). Al término de la transferencia la membrana se tiñó con rojo de ponceau para verificar que las proteínas se transfirieron.

La membrana transferida se bloqueó con leche al 5% en TBST 1x (Tris 10mM, NaCl 150mM y Tween-20, 0.05%) durante 1 hora en agitación constante a temperatura ambiente. Después del bloqueo la membrana se lavó 4 veces con TBST 1x. Acto seguido se colocó el anticuerpo policlonal anti PP2C de *Leishmania major* a una dilución 1:5000 en 5 % de leche en TBST 1x en agitación

constante toda la noche a 4° C. Al día siguiente se retiró el anticuerpo y se lavó la membrana 4 veces con TBST 1x. Posteriormente se agregó un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa (HRP-conejo) a una dilución 1:20000 en 5% de leche en TBST 1x en agitación constante durante 1 hora a temperatura ambiente. Se retiró el anticuerpo y se lavó cada 10 minutos con TBST 1x durante 2 horas. Después de lavar se agregó a la membrana una solución de sustrato + luminol por 3 minutos, se expuso a una película fotográfica (Kodak) y se reveló por quimioluminiscencia.

5.5.1 Ensayo de Western blot para degradación de proteínas

Los trofozoítos de *E. histolytica* se colectaron y se incluyeron en el amortiguador de lisis inhibidores de proteasas (benzamidina 1mM, leupeptina 2mg/ml y aprotinina 10 mg/ml). Se realizó el mismo fraccionamiento que en los trofozoítos sin inhibidores y se obtuvo la fracción citosólica para realizar el Wb.

5.6 Actividad de fosfatasa específica de Serina/Treonina

Con los sobrenadentes de *E. histolytica* y *E. dispar* se analizó la actividad de treonina fosfatasa utilizando un kit “Ser/Thr Phosphatase Assay System” (Promega) que contiene un péptido específico con un sitio de fosforilación en treonina (RRA (pT) VA). Este sistema determina la cantidad de fosfato libre generado en la reacción provocada por la fosfatasa. La actividad enzimática se realizó con un amortiguador de acetato de sodio 0.2 M pH 5 y se realizó una curva patrón utilizando un estándar de fosfatos 1mM que fue diluido a diferentes concentraciones: 100, 200, 500, 1000 y 2000 picomoles. Las muestras se pasaron por una columna que retiene fosfato para liberar el fosfato intrínseco. Posteriormente, se tomaron 5 µg de cada muestra y se incubaron con diferentes concentraciones del inhibidor (sanguinarina) y con 5 µL de sustrato en un volumen de reacción total de 100 µL durante 15 minutos respectivamente. La reacción se detuvo con 50 µL de “Molibdato dye additive”. Finalmente se registró la absorbancia a 620 nm en un lector de microplacas (EL 312e Microplate Bio-Tek Instruments) utilizando el programa KC4 v 2.7.

5.7 Efecto del inhibidor específico

Se utilizaron las muestras libres de fosfato intrínseco, el cual se eliminó a través de una columna con resina Sephadex G-25. Se colocó en la placa el amortiguador, 10 µg de cada muestra, el inhibidor sanguinarina a 0, 50, 100 y 200 µg de concentración para cada muestra. Cada condición se realizó por triplicado. Se dejó reposar la placa por 15 minutos a temperatura ambiente. Después se agregaron 5 µl del sustrato, péptido fosforilado en treonina, a cada pozo y se dejó reposar nuevamente la placa 15 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de reposo la reacción se detuvo con 50 µl de solución de molibdato y se leyó la placa a 630 nm en el lector de ELISA. Los datos se analizaron en el programa KC4 v 2.7.

5.8 Purificación de la PP2C de *Entamoeba histolytica*

Se obtuvo la fracción citosólica de trofozoítos de *E. histolytica* y se sometió a un pretratamiento con HPLC para facilitar la purificación de proteínas PP2C por medio de cromatografía de afinidad. Para realizar la purificación se acoplaron las IgG's para la PP2C de *L. major* con la resina Gel 15 a razón de 25 mg de proteína por mL de resina y se dejó interaccionando durante 24 horas. Posteriormente se lavó con amortiguador de acetatos pH 4.5, se agregó la solución de bloqueo (Glicina 0.1 M) y se dejó reposar por una hora. Después se lavó con Tris 10 mM pH7.4 y se montó en la columna. Se pasó aproximadamente 1mL de muestra (fracción citosólica de *E. histolytica* pretratada), se colectó el material eluido para realizar el análisis electroforético con tinción con plata y un Wb para PP2C. Se realizaron 4 purificaciones independientes.

5.9 Tinción con plata

EL gel obtenido de la electroforesis se fijó en solución desteñidora durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación constante, se lavó 4 veces con agua bidestilada cada 10 minutos. Se preparó la solución para teñir (H₂O, SCS [Silver Complex Solution] RMS [Reduction Moderator Solution] e IDR [Image Development Reagent] Kit de Bio-rad), se mezcló bien y se agregaron 5ml de acelerador. Se depositó el gel en una cámara de tinción, se añadió la solución de tinción y se colocó en agitación hasta observar una coloración café en el gel, distinguiendo

pesos moleculares y las bandas de interés. Una vez observada la coloración se detuvo la reacción con ácido acético al 1 %.

VI. RESULTADOS

6.1 Identificación de la proteína fosfatasa PP2C en la fracción citosólica de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*

En la fracción citosólica (fracción soluble) de trofozoítos de *E. histolytica* y *E. dispar* se analizó la presencia de la proteína fosfatasa PP2C por ensayos de Western-blot utilizando un anticuerpo policlonal Anti-PP2C de *Leishmania major* y se utilizó la PP2C recombinante de *L. major* como control positivo (Fig. 2 A). El anticuerpo reconoció en las fracciones citosólica de *E. histolytica* tres moléculas con un peso molecular de aproximadamente 65 kDa, 37 kDa y 15 kDa respectivamente (Fig. 2 A, carriles 2 y 3), sin embargo, en el caso de la fracción citosólica de *E. dispar* solo hubo reconocimiento de 2 proteínas, la de 65 kDa y la de 15 kDa (Figura 2 A, carril 4). La figura 2B muestra el control de carga de β -actina.

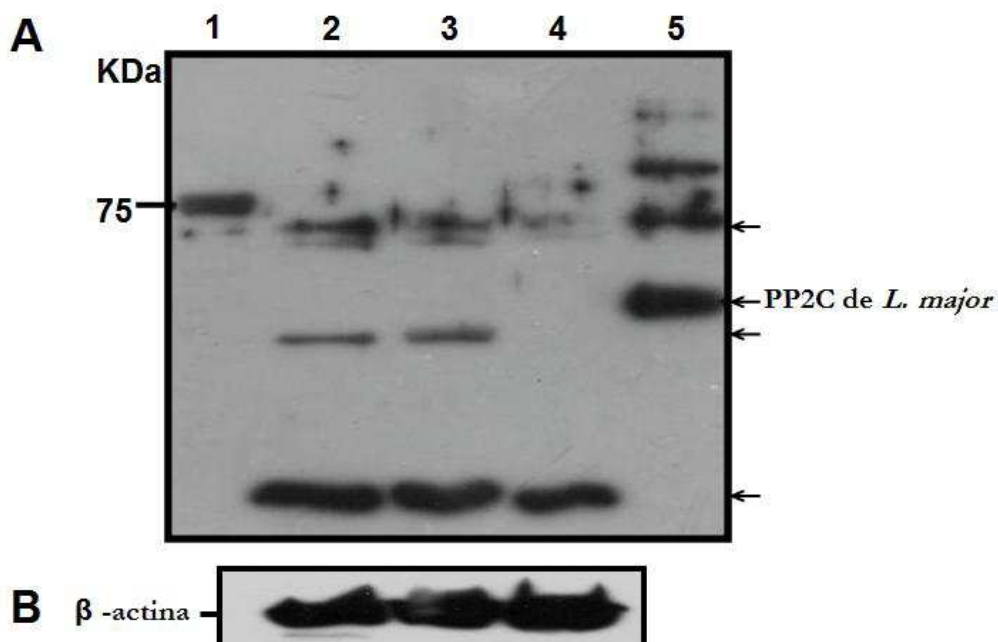


Fig.2 Identificación de la PP2C en la fracción citosólica de *E. histolytica* y *E. dispar*. **(A)** Marcadores de peso molecular (carril 1), fracción citosólica de *E. histolytica* virulenta (carril 2), *E. histolytica* no virulenta (carril 3), *E. dispar* (carril 4) y la proteína PP2C recombinante de *L. major* de 43 kDa (carril 5). **(B)** Control de carga (β -actina).

6.1.2 Análisis de la expresión de la proteína fosfatasa PP2C en la fracción citosólica de trofozoítos de *E. dispar*

Para descartar que la falta de reconocimiento de la molécula de 37 kDa en la fracción citosólica de *E. dispar* dependía de la concentración de proteína, se realizó un ensayo de Western-blot (Wb) colocando diferentes concentraciones de proteína de la fracción citosólica de *E. dispar* y se utilizó el mismo anticuerpo policlonal anti-PP2C de *L. major*. Se colocó un control positivo de *E. histolytica* virulenta (Fig.3, carril 8) y otro de la PP2C recombinante de *L. major* (Fig.3, carril 9). El anticuerpo reconoció la proteína de 37 KDa en el control positivo de *E. histolytica* virulenta y la PP2C recombinante de *L. major* pero no en ninguna de las diferentes concentraciones de *E. dispar*.

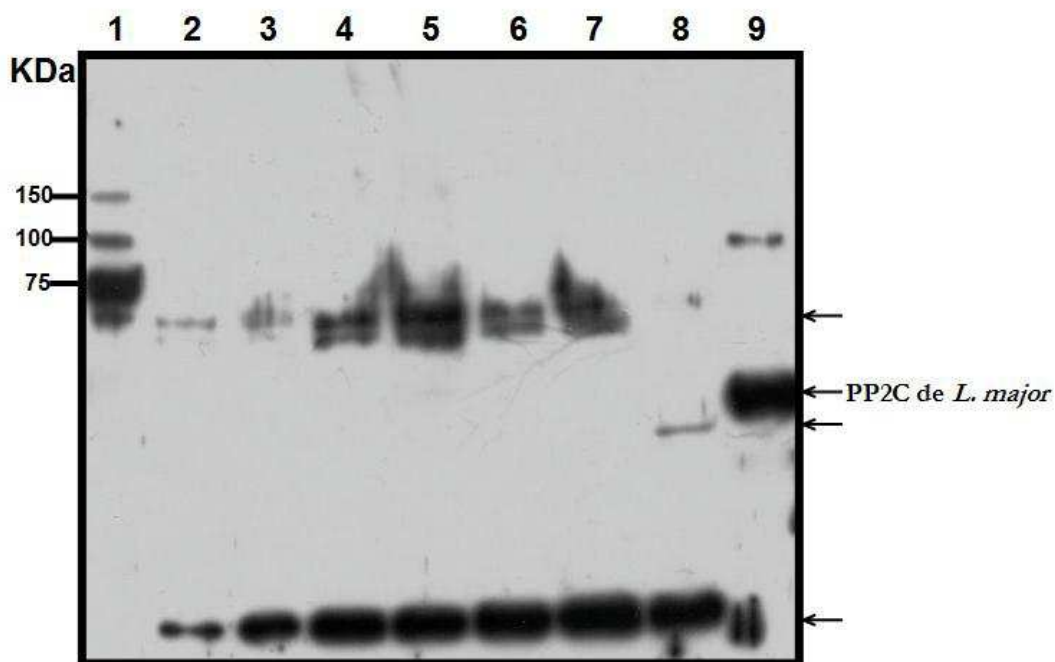


Fig. 3 Búsqueda de la PP2C de 37 kDa en la fracción citosólica de *E. dispar*. Reconocimiento por el anticuerpo anti-PP2C de *L. major* en la fracción citosólica de *E. dispar* en 10 (carril 2), 20 (carril 3), 40 (carril 4), 60 (carril 5), 80 (carril 6) y 100 μ g de proteína (carril 7). El carril 8 corresponde a la fracción citosólica de *E. histolytica* virulenta (Control positivo; 40 μ g de proteína) y en el 9 se encuentra la proteína PP2C recombinante de *L. major*.

6.1.3. Identificación de la proteína fosfatasa PP2C en la fracción citosólica de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* incubados con inhibidores de proteasas.

Se realizó un ensayo de Wb en donde se analizó la fracción citosólica de trofozoítos de *E. histolytica* incubados con inhibidores de proteasas (aprotinina, benzamidina y leupeptina) para de esta manera determinar si las proteínas encontradas eran tres proteínas independientes o si se trataba de productos de degradación de una sola proteína. En todas las concentraciones de fracción citosólica se observaron las mismas tres proteínas identificadas en la muestra control de *E. histolytica* sin inhibidores (Fig. 4, carril 9), por lo tanto, podemos decir que se trata de tres proteínas diferentes. Además, se encontró que la proteína de 65 kDa, a diferencia de la de 37 y 15 kDa se presenta a partir de una concentración de 40 μ g de proteína y se observó la expresión de una proteína adicional de aproximadamente 85 kDa a altas concentraciones.

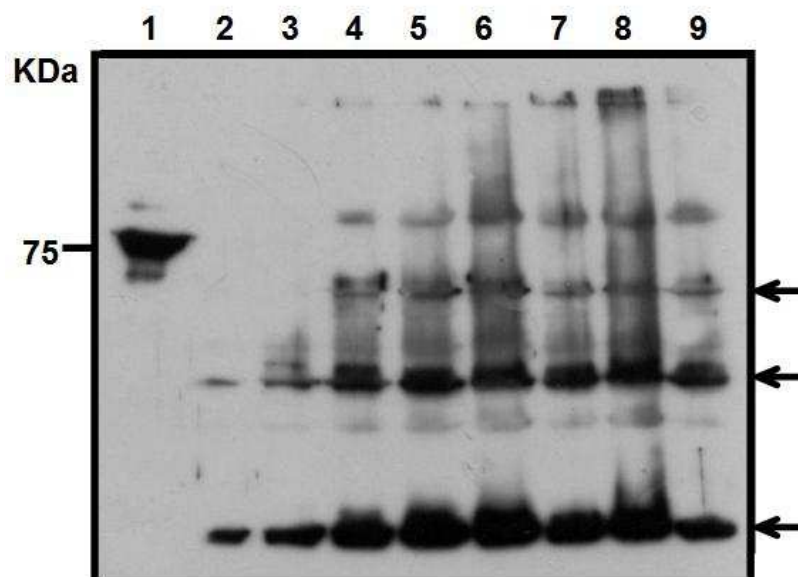


Fig. 4 Identificación de PP2C en la fracción citosólica de trofozoítos de *E. histolytica* incubados con inhibidores de proteasas. Se analizó la presencia de las tres proteínas a diferentes concentraciones de proteína, 10 (carril 2), 20 (carril 3), 40 (carril 4), 50 (carril 5), 75 (carril 6), 80 (carril 7) y 100 μ g de proteína (carril 8). Se utilizó una concentración de 40 μ g de la fracción citosólica de trofozoítos de *E. histolytica* incubados sin inhibidores como control positivo (carril 9).

6.2 Análisis de la actividad enzimática de fosfatasa en fracciones citosólicas de trofozoítos de *E. histolytica* y *E. dispar*

Se analizó la actividad enzimática general de fosfatasa de los sobrenadantes de *E. histolytica* y *E. dispar* ajustando a 10 µg de proteína para cada muestra. Encontramos que la fracción citosólica de *E. histolytica* tiende a desfosforilar en mayor medida el p-NPP que *E. dispar*, esto nos permite sugerir que existe un mayor número de proteínas fosfatasa en *E. histolytica* respecto a *E. dispar* (Fig. 5).

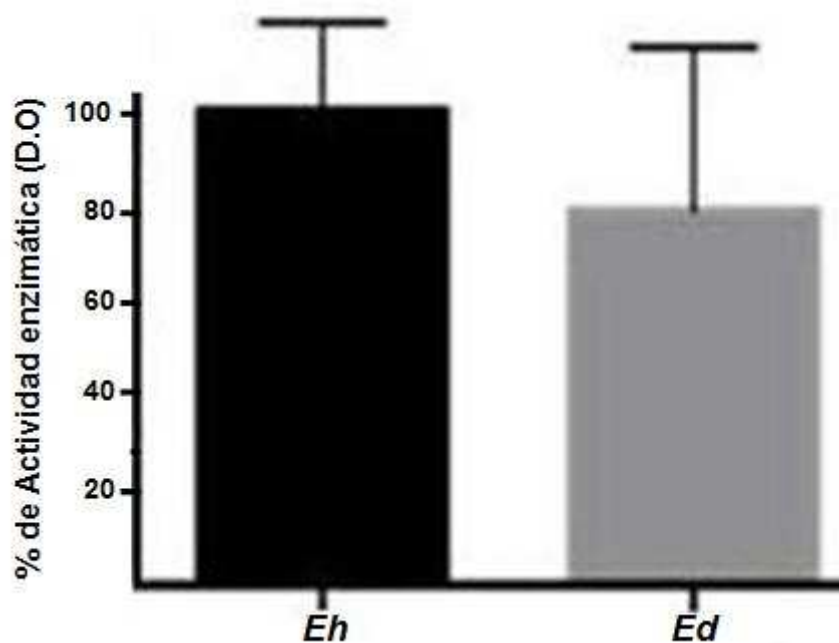


Fig. 5 Actividad enzimática de fosfatasa en la fracción citosólica de trofozoítos de *E. histolytica* (*Eh*) y *E. dispar* (*Ed*). Actividad enzimática general para fosfatasa en 10 µg de proteína. Datos representativos de 6 experimentos independientes ($p > 0.05$)

6.3 Determinación de la actividad enzimática de la proteína fosfatasa PP2C presente en la fracción citosólica de *E. histolytica* y *E. dispar* mediante la utilización de un péptido fosforilado en residuos de treonina.

Este ensayo se realizó para confirmar que las proteínas fosfatasas encontradas en el Wb fueran específicas de treonina. Al analizar la actividad enzimática específica para treonina de cada especie se encontró que el valor que mostró la fracción citosólica de *E. histolytica* era considerablemente mayor que el de *E. dispar* (Fig. 6). Estos datos coinciden con lo observado en el ensayo de Wb (Fig. 2) debido a que, en *E. histolytica*, se identificó un mayor número de proteínas fosfatasas que en *E. dispar*, lo que podría explicar el incremento en los valores de actividad enzimática específica para *E. histolytica* ya que esta última posee una mayor cantidad de proteínas PP2C.

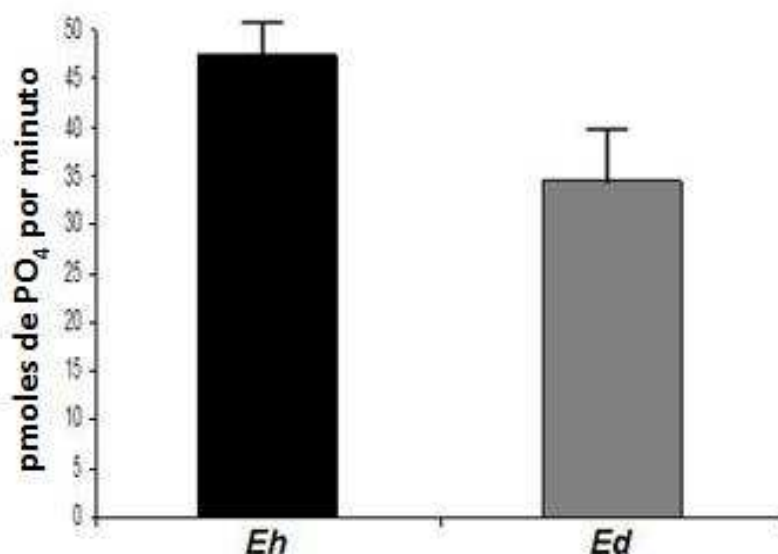


Fig. 6. Actividad enzimática específica de fosfatasa de treonina en fracciones citosólicas de *E. histolytica* (Eh) y *E. dispar* (Ed). Actividad enzimática específica promedio de fosfatasas de serina/treonina en sobrenadantes de *E. histolytica* y *E. dispar*. Datos representativos de 5 experimentos independientes ($p > 0.05$)

6.4 Efecto de inhibidores de fosfatasas en la actividad enzimática de fracciones citosólicas de trofozoítos de *E. histolytica* y *E. dispar*

Después de analizar la actividad enzimática para fosfatasas y específica para fosfatasas de serina/treonina (SP/TP) se revisó la capacidad de inhibición de compuestos analizados como inhibidores de fosfatasas; pervanadato de sodio, orthovanadato de sodio, molibdato de amonio y tungstato de sodio en el caso de proteínas fosfatasas tipo PTP; ácido okadaico y trifluoperazina para proteínas tipo SP/TP, así como la sanguinarina, que es un inhibidor específico de PP2C, todos en concentraciones ya probadas. Cada inhibidor se probó contra 10 µg de proteína de la fracción citosólica de *E. histolytica* y *E. dispar* y se realizó por triplicado.

Se observó que en presencia de los inhibidores de PTP's la actividad enzimática disminuyó drásticamente en comparación con el control de fracción citosólica sin inhibidores de *E. histolytica* y *E. dispar*. El pervanadato de sodio fue el compuesto que causó un mayor efecto de inhibición en la actividad enzimática de ambas especies. El ácido okadaico y la trifluoperazina, inhibidores de SP/TP, tuvieron un mayor efecto inhibitorio en la actividad enzimática de la fracción citosólica de *E. dispar* que en la de *E. histolytica*, sin embargo, en ambos casos la inhibición de la actividad enzimática fue menor que la mostrada por los inhibidores de PTP's. La sanguinarina, inhibidor específico de PP2C, mostró un efecto de inhibición mucho mayor respecto al mostrado por los inhibidores de SP/TP y muy similar al encontrado en los inhibidores de PTP's (Tabla 2). En todos los casos, la actividad enzimática se redujo más en la fracción citosólica de *E. dispar*, lo cual, puede deberse a que en *E. histolytica* hay un mayor número de proteínas fosfatasas y por esa razón el efecto de inhibición no fue tan elevado.

| Inhibidor | Concentración | Actividad enzimática relativa de fosfatasa de <i>E. histolytica</i> (%) | Actividad enzimática relativa de fosfatasa de <i>E. dispar</i> (%) |
|-----------------------------|---------------|---|--|
| Inhibidores de PTP | | | |
| -Sin inhibidor | | 100 | 100 |
| Pervanadato de sodio | 50 μ M | 13.48 | 11.01 |
| Orthovanadato de sodio | 200 μ M | 28.32 | 25.03 |
| Molibdato de amonio | 200 μ M | 15.48 | 12.31 |
| Tugstato de sodio | 100 μ M | 26.91 | 21.59 |
| Inhibidores de SP/TP | | | |
| -Sin inhibidor | | 100 | 100 |
| Ácido okadaico | 1 μ M | 87.40 | 40.32 |
| Trifluoperazina | 100 μ M | 66.09 | 43.12 |
| Sanguinarina | 200 μ M | 33.55 | 29.77 |

Tabla 2. Porcentaje de la actividad enzimática general de fracciones citosólicas de trofozoítos de *E. histolytica* y *E. dispar*. Actividad enzimática relativa de fracciones citosólicas de *E. histolytica* y *E. dispar* en presencia de inhibidores de PTP's, SP/TP y sanguinarina, inhibidor específico de PP2C. Datos representativos de tres experimentos independientes.

Posteriormente se obtuvo el porcentaje de inhibición de cada compuesto sobre las fracciones citosólicas de trofozoítos de *E. histolytica* y *E. dispar*. Los inhibidores de PTP reducen drásticamente los valores de actividad enzimática en ambas especies pero de mayor manera en *E. dispar*. La actividad enzimática disminuyó de forma importante en presencia de sanguinarina en comparación con los inhibidores de SP/TP (Fig. 7). La sanguinarina, al ser un inhibidor específico de PP2C, indica la presencia de este tipo de proteínas en las fracciones citosólicas de trofozoítos de *E. histolytica* y *E. dispar*.

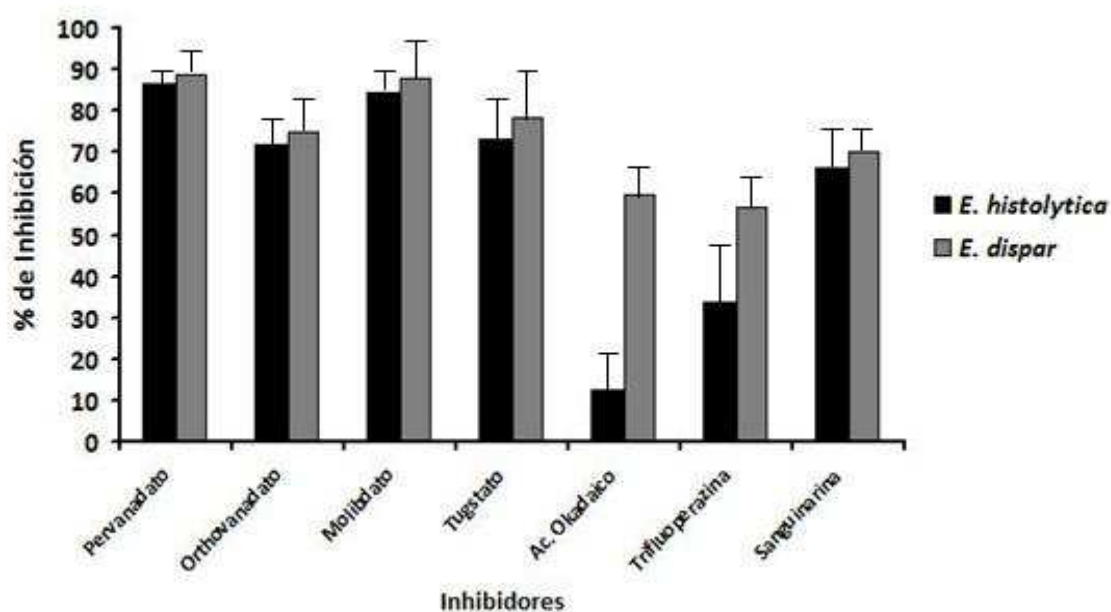


Fig. 7 Porcentaje de inhibición de fosfatasa PTP y SP/TP en fracciones citosólicas de trofozoítos de *E. histolytica* y *E. dispar*. Datos representativos de tres experimentos independientes ($p > 0.05$).

6.5 Efecto del inhibidor específico (sanguinarina) en la actividad de la fosfatasa PP2C de *E. histolytica*.

Se evaluó la actividad enzimática de las proteínas fosfatasa encontradas en la fracción citosólica de *E. histolytica* y *E. dispar* en presencia del sustrato específico (péptido fosforilado en treonina) para fosfatasa de treonina y con el inhibidor específico para proteínas fosfatasa PP2C (sanguinarina). El efecto del inhibidor aumenta de manera dosis-dependiente en ambas muestras, sin embargo, en *E. dispar* el efecto no es tan evidente como en *E. histolytica*. En ambas especies la diferencia es significativa en las concentraciones de 50, 100 y 200 μM de sanguinarina en contraste con la condición inicial sin inhibidor, además, la diferencia también es significativa al comparar los valores de inhibición obtenidos para cada concentración de sanguinarina en ambas especies (Fig.8). Con estos datos se demuestra que hay al menos una proteína que responde a la inhibición específica de la sanguinarina en altas concentraciones de este inhibidor.

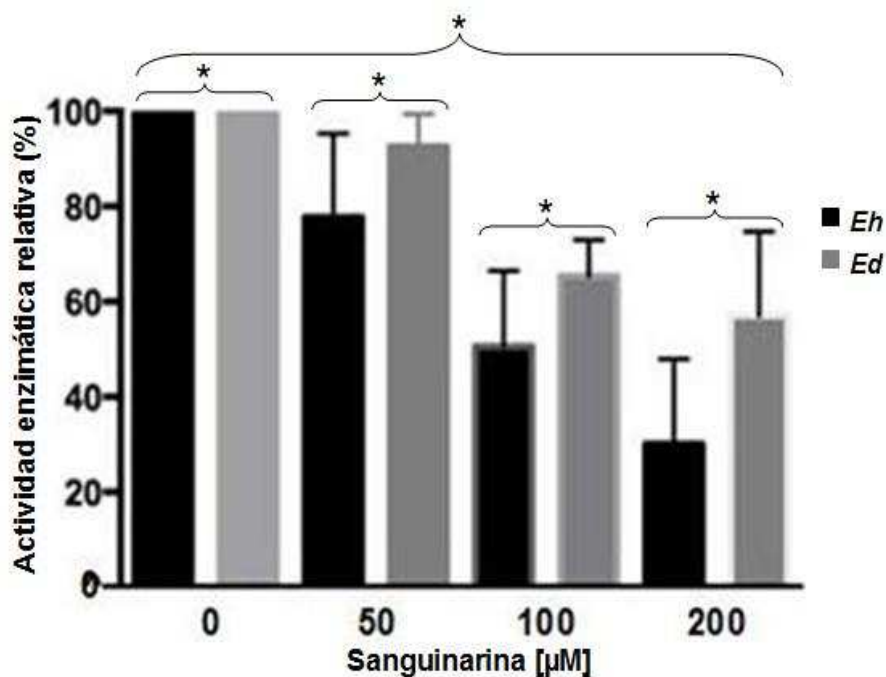


Fig. 8 Efecto del inhibidor específico a diferentes concentraciones sobre la actividad específica de fosfatasa de treonina en la fracción citosólica de *E. histolytica* (*Eh*) y *E. dispar* (*Ed*). Datos representativos de 3 experimentos independientes ($p < 0.05$).

6.6 Purificación de proteínas PP2C de *Entamoeba histolytica*

Para realizar la purificación por cromatografía de afinidad con anticuerpos anti-PP2C se utilizó la fracción citosólica de *E. histolytica* debido a que en esta especie se observó una proteína de aproximadamente 37 kDa que no se encontró en *E. dispar*

(Fig. 2) y que fue de nuestro interés. Posteriormente se revisó la actividad enzimática de los eluidos obtenidos de cada purificación con el sustrato *p-NPP* para verificar que las proteínas presentes estuvieran activas. Se realizó el análisis de la actividad enzimática en la fracción citosólica original (FC), en el material no unido (NU), los lavados y en los eluidos obtenidos en cada purificación. La FC y el material NU mostraron una actividad enzimática más elevada que los eluidos obtenidos de las purificaciones, sin embargo, estos últimos conservaban un valor de actividad enzimática óptimo (Fig. 9 A). Se realizó un análisis electroforético con todas las muestras y se hizo una tinción con plata. El análisis reveló que el proceso de purificación no fue satisfactorio debido a que en los eluidos obtenidos en la purificación aún se podían observar otras proteínas que no correspondían al perfil encontrado en la figura 2 (Fig.9 B). En el análisis de Wb realizado con el anticuerpo anti-PP2C de *L. major* en las mismas muestras hubo reconocimiento de una proteína de aproximadamente 65kDa tanto en la fracción citosólica original, material no unido y lavados así como en los eluidos obtenidos en la 4 purificaciones (Fig.9 C). En el material NU hubo un leve reconocimiento de la proteína de 37 kDa encontrada en la fracción citosólica original, lo que reafirma que la purificación no fue exitosa. Juntos, estos resultados demuestran que aunque la actividad de los eluidos obtenidos en la purificación no se mostró afectada, no se logró aislar la proteína de 37 kDa y aún estaban presentes proteínas no deseadas.

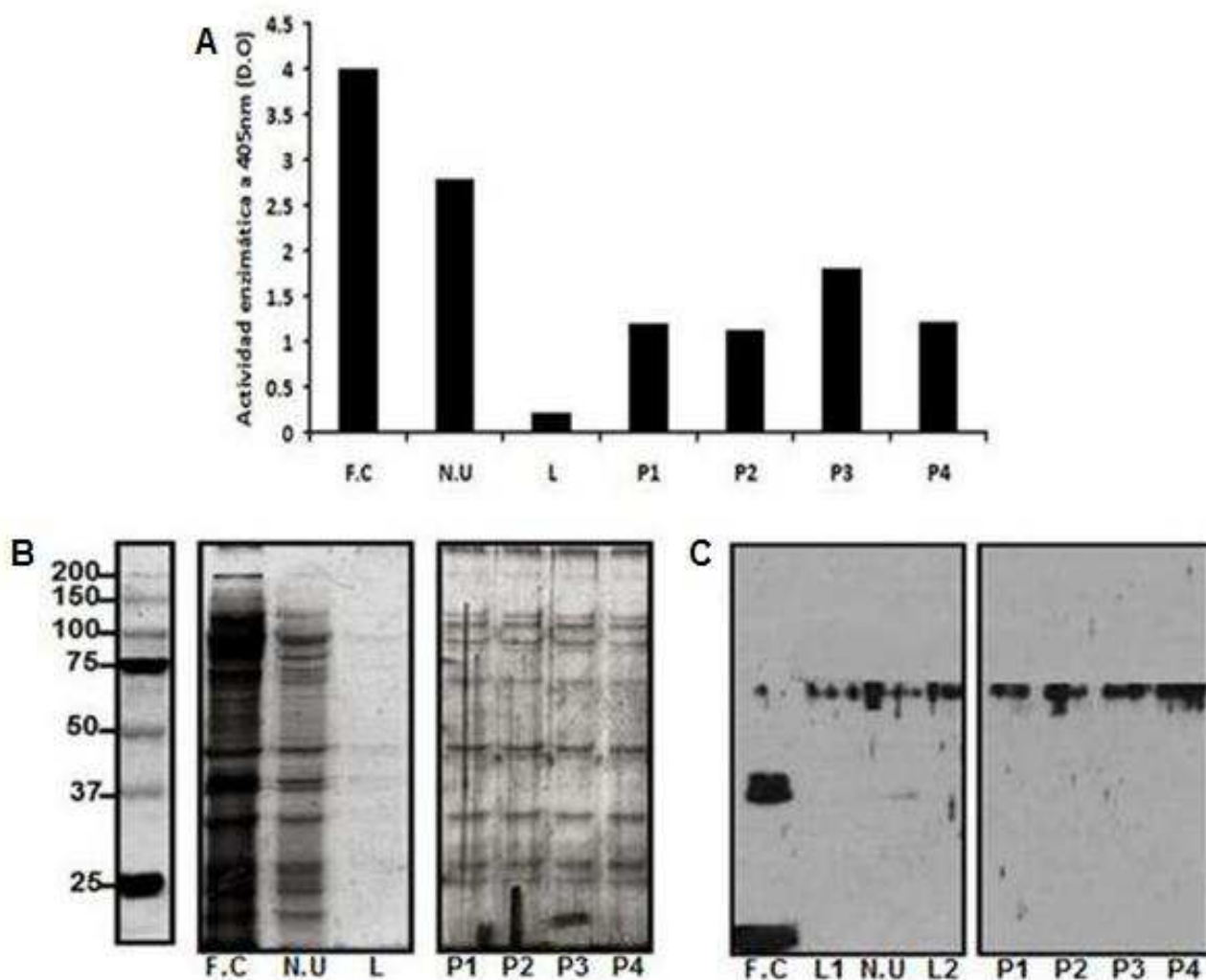


Fig. 9 Perfil de purificación de proteínas fosfatasas PP2C de *E. histolytica*. **(A)** Actividad enzimática de la fracción citosólica original (FC), el material no unido (NU), el material de lavado (L) y el eluido resultante de cada purificación (P1, P2, P3 y P4). Se realizaron 4 purificaciones independientes. **(B)** Análisis electroforético de la fracción citosólica original (FC), el material no unido (NU), el material de lavado y de las 4 purificaciones de proteínas PP2C teñido con plata. **(C)** Identificación de proteínas PP2C en la fracción citosólica original de *E. histolytica*, el material no unido (NU), el material de lavado y de las 4 purificaciones de proteínas PP2C.

VII. DISCUSIÓN

La presencia de cinasas y fosfatasas en diferentes microorganismos patógenos sugiere que estas moléculas de señalización tienen una relevancia específica en múltiples funciones celulares como activación, crecimiento y diferenciación. Estas proteínas han sido identificadas y caracterizadas en otros microorganismos patógenos y se ha encontrado que participan en eventos celulares sobresalientes dentro del microorganismo y en algunos casos, tienen un papel fundamental en el desarrollo de la infección en el hospedero [21]. Existen algunas fosfatasas tipo SP/TP registradas en *E. histolytica*, sin embargo, hasta el momento no se conoce ninguna tipo PP2C en este parásito. Este trabajo representa el primer reporte acerca de la presencia de proteínas fosfatasas de tipo PP2C en trofozoítos de *E. histolytica*.

E. histolytica y *E. dispar* poseen los mismos factores de virulencia, sin embargo, se conoce bien que estos se manifiestan de manera diferente en ambas especies. La especie más patógena, *E. histolytica*, presenta un mayor número de complejos proteínicos formadores de ameboporos [16], y la acción catalítica de sus proteasas de cisteína es tres veces más fuerte que en *E. dispar* [5]. De forma muy interesante, los datos encontrados en nuestros experimentos coinciden con esta tendencia para ambas especies. Primeramente en los ensayos de Wb, se identificaron al menos 3 proteínas tipo PP2C diferentes en trofozoítos de *E. histolytica* en contraste con *E. dispar* donde sólo se encontraron 2. También, los resultados obtenidos en las pruebas de actividad enzimática, sobretodo en la actividad enzimática específica para proteínas que desfosforilan treonina, mostraron que las PP2C encontradas en *E. histolytica* tienen una mayor actividad catalítica que *E. dispar*. Si bien aún se necesitan mucho más estudios acerca de estas proteínas, su localización y su función en el parásito, la diferencia encontrada en estas proteínas en ambas especies puede ser un dato muy útil ya que esta diferencia podría estar relacionada con su capacidad de virulencia, tal como las otras moléculas antes mencionadas.

Los compuestos utilizados para inhibir estas proteínas mostraron una tendencia parecida. La mayor eficacia al momento de actuar sobre las proteínas fosfatasas tipo PTP como SP/TP fue observada en fracciones citosólicas de *E. dispar*, ya que los valores de actividad enzimática se redujeron considerablemente; sin embargo, se redujeron solo un poco por encima de los encontrados para *E. histolytica*. Esto podría explicarse si se observa que en esta última hay una

mayor cantidad de proteínas fosfatas y por esto, probablemente se necesite una mayor concentración del inhibidor para cada caso. El dato más interesante se presentó cuando se probó el inhibidor específico para proteínas PP2C, la sanguinarina, en presencia del péptido fosforilado en treonina. La sanguinarina mostró la capacidad de inhibir las proteínas encontradas en ambas especies de manera dosis-dependiente pero la diferencia en el efecto de inhibición entre ambas especies es mucho más marcada que la observada en los otros inhibidores. Esta diferencia resultó significativa al comparar los valores de actividad enzimática posterior a la interacción con la sanguinarina de ambas especies en cada concentración utilizada del inhibidor específico así como al comparar el valor de actividad enzimática dado en cada concentración de inhibidor utilizado en contraste con la condición inicial sin inhibidor, esto para cada especie, es decir, se reafirmó el efecto de inhibición dosis dependiente. Este dato es de mucha relevancia ya que al ser un inhibidor específico confirma que existen proteínas PP2C en la fracción soluble de trofozoítos de *E. histolytica* y *E. dispar*.

Con este dato confirmatorio, se intento purificar la proteína de 37 kDa, ya que fue la que mostró una expresión diferencial entre ambas especies. Se observó que en una de las purificaciones que tenían un pretratamiento aparece la proteína de 37kDa, sin embargo, esta se pierde una vez que se realiza la purificación por cromatografía de afinidad. Entonces, de acuerdo con esto, nos dimos cuenta de que hay algo en el proceso de purificación que provoca que esta proteína se pierda. A pesar de esto, cabe destacar que, como ya se mencionó, la actividad enzimática de los eluidos obtenidos en cada purificación fue óptima y que el tratamiento de purificación no degradó todas las fosfatasas presentes en la fracción citosólica. En *T. gondii*, se encontró una proteína tipo PP2C de 37 kDa que participa en el proceso de crecimiento del parásito en la célula hospedera y que coincide con el mismo peso molecular que la proteína de nuestro interés [54]. Nováková y colaboradores en el 2005 realizaron la clonación y purificación de una proteína PP2C de *Streptococcus pneumoniae* por medio de cromatografía de afinidad, como se buscó realizar en este trabajo. Además, también se utilizó el kit “Ser/Thr Phosphatase Assay System” de Promega para caracterizar la proteína encontrada como PP2C y del mismo modo que en esta investigación, se analizaron distintos compuestos inhibidores de fosfatasas SP/TP, en donde se observó que esta proteína PP2C no era sensible a inhibidores como el ácido okadaico, mismo resultado que nosotros obtuvimos [60]. En el 2001, Jiang y colaboradores lograron identificar y purificar la primera proteína PP2C

reportada en *Candida albicans* [61], pero del mismo modo que Nováková y colaboradores, se trató de una proteína recombinante.

La diferencia principal entre ambos estudios y el realizado en esta investigación es que en los dos casos la purificación y caracterización se realizó sobre proteínas PP2C recombinantes y en nuestro estudio se utilizó siempre una fracción citosólica. Estos ejemplos sugieren que utilizar la clonación para purificar la proteína recombinante podría ser una alternativa muy útil para finalmente obtener la proteína de nuestro interés, o tal vez algunas modificaciones en el método aquí realizado pueden mejorar el resultado de la purificación hasta llegar a obtener la o las proteínas puras para su estudio más especializado.

VIII. CONCLUSION

Los resultados expuestos en este trabajo muestran que las proteínas fosfatasa PP2C están presentes en dos especies del género *Entamoeba* y que estas podrían estar involucradas en la patogénesis del parásito, ya que, al comparar el perfil de proteínas entre ambas especies, la especie no patógena, *E. dispar*, muestra una menor cantidad de proteínas identificadas, su actividad enzimática general y específica es menor y la inhibición específica de las PP2C afectó más la actividad enzimática de *E. histolytica* en ambos casos.

Es la primera vez que se identifican y se intentan purificar proteínas de tipo PP2C en *E. histolytica* y se requieren estudios más precisos en estas proteínas para confirmar su papel en el parásito, sin embargo, los resultados aquí mostrados marcan un buen punto de inicio para investigaciones posteriores.

IX. PERSPECTIVAS

No se tiene ningún antecedente acerca de proteínas PP2C en *E. histolytica*. Por esta razón, resulta interesante conseguir, en primer lugar, purificar las proteínas identificadas para, posteriormente, seguir estudiándolas con mayor precisión y así lograr establecer su localización y posible función en el parásito.

X. REFERENCIAS

1. Anaya-Ruíz M., M. Pérez- Santos J.L. and Talamás-Rohana P. 2003. An ecto-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. Ximénez C., Cerritos R., Rojas L., Dolabella S., Morán P., Shibayama M., González E., Valadez A., Hernández E., Valenzuela O., Limón A., Partida O., Silva E., F. 2010. Human amebiasis: Breaking the paradigm? *Int Jour Environ Res Public Health.* 3: 1105-1120.
3. Mann B.J., Dodson J. M., Schroeder J. W., Lockhart L.A., Leo B., Clark C. G. 1997. Structure and functions of the galactose/N-acetyl D-galactosamine inhibitable adhesion of *Entamoeba dispar*. *Arch Med Res* 28: 168-9.
4. Petri W. A. Jr., Smith R.D., Schlesinger P.H., Murphy C.F. Ravdin J.I. 1987. Isolation of the galactose –binding lectin that mediates the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest.* 80: 1238-44
5. North M. J., Mottram J. C., Coombs G. H. 1990. Cysteine proteinases of parasitic protozoa. *Parasitol Today* 6: 270-5
6. Leippe M. 1997. Amoebapores. *Parasitol Today* 13: 178-83
7. Dolabella S., S., Serrano-Luna J., Navarro-García F., Cerritos R., Ximénez C., Galván-Moroyoqui J. M., Silva E. F., Tsutsumi V., Shibayama M. 2012. Amoebic liver abscess production by *Entamoeba dispar*. *Ann Hepatol.* 11: 107- 117.
8. Ximénez C., Morán P., Rojas L., Valadez A., Gómez A. 2009. Reassessment of the epidemiology of amebiasis: State of the art. *Infection, Genetics and Evolution.* 9(6): 1023-1032.
9. Stanley, S.L., Jr., *Lancet.*, 2003. Amoebiasis. 361: 1025-34
10. Frederick, J. R. and W. A. Petri, Jr. 2005. Roles for the galactose-N-acetylgalactosamine-binding lectin of *Entamoeba* in parasite virulence and differentiation. *Glycobiology,* 15(12): 53-59.
11. Faust D. M., Guillen N. 2012. Virulence and virulence factors in *Entamoeba histolytica*, the agent of human amoebiasis. . *Microbes and Infection* 14: 1428-1441
12. DPDx, L.I.o.P.o.P.H.C Parasites and Healt Amebiasis 2006. CDC.
13. Gilchrist C. A., Hought E., Trapaidze N. 2006. Impact of intestinal colonization and invasion on the *Entamoeba histolytica* transcriptome. *Mol Biochem Parasitol* 147: 163–176.
14. Petri W. A., Haque R., Mann B.J. 2002. The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annu Rev Microbiol* 56: 39–64.

15. Ankri, S., Padilla-Vaca, F., Stolarsky, T., Koole, L., Katz, U., Mirelman, D. 1999. Antisense inhibition of expression of the light subunit (35 kDa) of the Gal/GalNAc lectin complex inhibits *Entamoeba histolytica* virulence. *Molecular Microbiology* 33: 327–337.
16. Leippe, M.B., H. Hecht, O. Grotzinger, J. 2005. Ancient weapons: The Three dimensional structure of amoebapore. *Trends in Parasitol.* 21(1): 5-7.
17. Gilchrist, C. A. and Petri W.A. 1999. Virulence factor of *Entamoeba histolytica*. *Curr Opin Microbiol.* 2 (4): p. 433-7
18. Espinosa-Castellano, M. and A. Martinez Palomo. 2000. Pathogenesis of intestinal Amoebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev.* 13(2): 318-31
19. Marinets A, ZhangT., Guillen N. 1997. Protection against invasive amebiasis by a single monoclonal antibody directed against a lipophosphoglycan antigen localized on the surface of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp Med.* 186: 1557-1565.
20. Maldonado C., Trejo W., Ramírez A., Carrera M., Sánchez J., López-Macias C. e Isibasi A. 2000. Lipophosphopeptidoglycan of *Entamoeba histolytica* induces an antiinflammatory innate immune response and downregulation of toll-like receptor 2 (TLR-2) gene expression in human monocytes. *Arch Med Res.* 31: 71-73
21. Bardford, D., Das, A. K and Egloff, M. P. 1998. The structure and mechanism of protein phosphatase: insight into catalysis and regulation. *Annual Reviews Biophys Biomol Structure.* (27): 133-64.
22. Shi Yigong. 2009. Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. *Cell press.* (139): 468-484
23. Cohen, P.T. 2004. Overview of protein serine/threonine phosphatases. In *Protein Phosphatases.* Springer pp. 1–20.
24. Janssens, V., and Goris, J. 2001. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem. J.* 353: 417–439.
25. Rusnak, F., and Mertz, P. (2000). Calcineurin: form and function. *Physiol. Rev.*
26. Serrano, R., Deas, J. E., and Warren, L. G. 1977. *Entamoeba histolytica*: Membrane fractions. *Experimental Parasitology* (41): 370-384.
27. Aguirre-García, M. M., Rosales-Encina, J.L. and Talamás-Rohana, P. 1997. Secreted *Entamoeba histolytica* acid phosphatase (SAP). *Archives of Medical Research* (28): 184-185.

28. Talamás-Rohana, P., Aguirre-García, M. M., Anaya, M. and Rosales-Encina J. L. 1999. *Entamoeba dispar* contains but does not secrete acid phosphatase as does *Entamoeba histolytica*. *Experimental Parasitology*.
29. Aguirre-García, M. M., Cerbon J. And Talamás-Rohana, P. 2000. Purification and properties of an acid phosphatase from *Entamoeba histolytica* HM-1: IMSS. *International Journal of Parasitology* (30): 585-591.
30. Aguirre-García M. M., Anaya-Ruiz, M. and Talamás-Rohana, P. 2003. Membrane-bound acid phosphatase (MAP) from *Entamoeba histolytica* has phosphotyrosine phosphatase activity and disrupts the actin cytoskeleton of host cells. *Parasitology* (126): 195-202.
31. Cabrera A.M.R. 2005. Efecto de la proteína tirosina fosfatasa de *Entamoeba histolytica* en el estallido oxidativo de neutrófilos activados. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. P, 45.
32. Espejel Z. J. 2009. Efecto de la tirosina fosfatasa de *Entamoeba histolytica* en la secreción de citocinas por macrófagos activados. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. P. 48.
33. Pinheiro A., A., Natal-Amazonas, J., De Souza-Barros F., De Meneses L., Batista E., J., Felix-Silva E., De Souza W. And Meyer-Fernandez J. R. 2006. *Entamoeba histolytica*: An ecto-phosphatase activity regulates by oxidation-reduction reactions. *Experimental Parasitology*, (115): 352-358.
34. Herrera-Rodríguez , S. E., Baylón-Pacheco, L., Talamás-Rohana, P. and Rosales-Encina, J.L. 2006. Cloning and partial characterization of *Entamoeba histolytica* PTPases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (342): 1014-1021.
35. Ramírez Tapia A. L., Pérez Saldaña J., Sierra López F., Baylón Pacheco L., Espiritu Gordillo P., Guaderrama Diaz M., Rosales Encina J. L. 2013. MENSAJE BIOQUÍMICO, VOL. XXXVII Proteínas tirosina fosfatasas de *E. histolytica*. Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.
36. Ralston, K., S. and Petri W., A. Jr. 2011. Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends Parasitol.* 254–263.
37. Carrero, J.C., Petrossian, P., Olivos, A., Sánchez-Zerpa, M., Ostoa-Saloma, P. and Laclette, J.P. 2000. Effect of Cyclosporin A on *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* 31
38. Carrero, J.C., Lugo, H., Pérez, D.V., Ortiz-Martínez, C. and Laclette, J.P. 2004. Cyclosporin A inhibits calcineurin (phosphatase PP2B) and P-glycoprotein activity in *Entamoeba histolytica*. *International Journal of Parasitology* (34): 1091-1097.
39. Lammers T., Lavi S. 2007. Role of Type 2C protein phosphatases in growth, regulation and in cellular stress signaling. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* (42): 437-461

40. Das, A. K., Helps, N.R., Cohen, P. T. W., and Brandford, D. 1996. Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.9 Å resolution. *The EMBO Journal*. (24): 6798-6809.
41. Aburai N., Yoshida M., Ohnishi M., Kimura, K. H. 2010. Sanguinarine as a Potent and specific inhibitor of protein phosphatase 2C in vitro and induces apoptosis via phosphorylation of p38 in HL 60 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74(3) 548-552.
42. Julie Lowe., Hyukjin Cha., Mi-Ok Lee., Sharlyn J. Mazur., Ettore Appella and Albert J. Fornace Jr. 2013. Regulation of the Wip1 phosphatase and its effects on the stress response. *Front Biosci.* (17): 1480–1498
43. Moorhead Greg B. G., Trinkle-Mulcahy L. and Ulke-Lemée Annegret. 2007. Emerging roles of nuclear protein Phosphatases. *Nature*. Vol. 8
44. Xue TT, Wang D, Zhang SZ, Ehltng J, Ni F, et al. 2008. Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and *Arabidopsis*. *BMC Genomics* (9): 550.
45. Lu, G., and Wang, Y. 2008. Functional diversity of mammalian type 2C protein phosphatase isoforms: new tales from an old family. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* (35) 107–112.
46. Obuchowski, M., Madec, E., Delattre, D., Boel, G., Iwanicki, A., Foulger, D. and Seror, S. J. 2000. Characterization of PrpC from *Bacillus subtilis*, a member of PPM phosphatase family. *Journal of Bacteriology*. 5634-5638.
47. Faucher SP, Viau C, Gros PP, Daigle F, Le Moual H. 2008. The prpZ gene cluster encoding eukaryotic-type Ser/Thr protein kinases and phosphatases is repressed by oxidative stress and involved in *Salmonella enterica* serovar Typhi survival in human macrophages. *FEMS Microbiol Lett* (281): 160–166
48. Salika M. Shakir, Katie M. Bryant, Jason L. Larabee, Elaine E. Hamm, Julie Lovchik, C. Rick Lyons and Jimmy D. Ballard. 2010. Regulatory Interactions of a Virulence-Associated Serine/Threonine Phosphatase-Kinase Pair in *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology*, p. 400–409
49. Young C, Mapes J, Hanneman J, Al-Zarban S, Ota I. 2002. Role of Ptc2 type 2C Ser/Thr phosphatase in yeast high-osmolarity glycerol pathway inactivation. *Eukaryot Cell* (1): 1032–40.
50. Jinhua Jiang, Yingzi Yun, Qianqian Yang, Won-Bo Shim, Zhengyi Wang, Zhonghua Ma. 2011. A Type 2C Protein Phosphatase FgPtc3 Is Involved in Cell Wall Integrity, Lipid Metabolism, and Virulence in *Fusarium graminearum*. *Plos One*. Volume 6.
51. Jinrong Feng, Jingwen Zhao, Jing Li, Lilin Zhang and Linghuo Jiang. 2010. Functional characterization of the PP2C phosphatase CaPtc2p in the human fungal pathogen *Candida Albicans*. *Wiley Online Library. Yeast* 2010. (27): 753–764.

52. Gilbert Luke A. Ravindran Sandeep, Turetzky Jay M., Boothroyd John C., and Bradley Peter J. 2007. *Toxoplasma gondii* Targets a Protein Phosphatase 2C to the Nuclei of Infected Host Cells. *Eukaryotic Cell*, p. 73–83
53. Gaelle J., Violaine D., Violaine D., Celine R., Rebollo A., Cayla X. and TARDIEUX I. 2007. The toxofilin–actin–PP2C complex of *Toxoplasma*: identification of interacting domains. *Biochem. J.* 401: 711–719.
54. Gaelle J., Violaine D., Nehmé S., Abrivard M., Gonzalez V., Cayla X., Tardieux I. 2009. *Toxoplasma* type 2C serine-threonine phosphatase is involved in parasite growth in the mammalian host cell. *Microbes and Infection* 11(12):935-45.
55. Wilkes J., M. and Doerig, C. 2008. The protein-phosphatome of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *BMC Genomics.* (97) 86-97.
56. Mamoun, C.B., Sullivan, D.J., Jr, Banerjee, R., and Goldberg, D.E. 1998. Identification and characterization of an unusual double serine/threonine protein phosphatase 2C in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J BiolChem* (273): 1241-1247.
57. Burns, M. J., Parsons, Marilyn., Rosman, D. E. and Reed, S. G. 1993. Molecular cloning and characterization of a 42 kDa protein phosphatase of *Leishmania chagasi*. *The Journal Biological Chemistry* 23: 17155- 17161.
58. Escalona- Montaña A., R. 2009. Clonación y caracterización de la proteína fosfatasa PP2C de *Leishmania major*. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
59. Tulgren, E., D., T. Baker, S., T., Rapp, L., Gurney, A., M., and Grill, B. 2011. PPM-1, a PP2Ca/b phosphatase, Regulates axon termination and synapse formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, Vol. 189, 1297–1307.
60. Nováková, L., Saskova, L., Pallova, P., Janecek, J., Novotna, J., Ulrych, A., Echenique, J., Trombe, M, C. y Branny, P. 2005. Characterization of a eukaryotic type serine/threonine protein kinase and protein phosphatase of *Streptococcus pneumoniae* and identification of
61. Jiang, L., Whiteway, M., Shena, S. H. 2001. A novel type 2C protein phosphatase from the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Journal* (509): 142-144.