T
1191

UAM XOCHIMILCO CENTRO DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

124228

124228

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Casa Abierta al Tiempo

IDENTIFICACIÓN Y CLONACIÓN MOLECULAR DE UNA PROTEÍNA DE 51 kDa SEMEJANTE A LA CALRETICULINA EN *Entamoeba histolytica.*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A

M. en C. ENRIQUE GONZÁLEZ RIVAS

COMITÉ TUTORIAL:
CO-TUTORA: DRA. CECILIA XIMÉNEZ GARCÍA
CO-TUTORA: DRA. MARISOL LÓPEZ LÓPEZ
ASESOR: DR. ALEJANDRO ALAGÓN CANO

MÉXICO, D.F. JULIO 2008

ARCHIVO HISTORICO

" El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo consejo, con el convenio PFP-20-93. "

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunología del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM: Bajo la Dirección de la Dra. Cecilia Ximenéz García.

El Jurado designado por la División De Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó.

M en C. Enrique González Rivas

Jurado:

Cotutora: Dra. Marisol López López

Cotutora: Dra. Cecilia Teresa Ximenéz García

Asesor: Dr. Alejandro Alagón Cano.

Sinodal: Dra. Teresita del Rosario Sainz Espuñes.

Sinodal: Dr. Ángel Hipólito Manjarrez Hernández.

A mis padres:

† Maria de los Angeles Rivas H.

Donaciano González M.

Gracias por la vida y el ejemplo.

A mis mujeres:

Hermy

Abi

Por darle sentido y luz a mi existencia.

Agradecimientos

De manera muy especial a la Dra. Cecilia Ximénez G.
Por su confianza, motivación y apoyo durante todos estos años.

A la Dra. Marisol López López. Por darme la oportunidad de iniciar este trabajo en la UAM y por sus valiosos comentarios.

Al jurado gracias por su apoyo y acertados comentarios.

Al Dr. Alejandro Alagón por su asesoramiento en la realización de este trabajo así como la donación de las bibliotecas recombinantes de *E. histolytica* λgt11 y λZapII, y el abrirnos incondicionalmente las puertas de su laboratorio para la secuenciación de las clonas.

Al Dr. Nicolás Villegas S. y al Biólogo Raúl Bonilla M. Por brindarme el asesoramiento y apoyo incondicional en la clonación y expresión de la EhCRT recombinante.

A Marco Gudiño por el apoyo en la realización del material gráfico de este trabajo.

Y de manera muy especial a todas estas *personas* que comparten y disfrutan conmigo esas horas en el laboratorio. Cecilia, Emma, Paty, Fer, Gaby, Alis, Male, Angélica, Liliana, Martha, Angeles, Efraín y Carlos.

ÍNDICE

TEMA:	PÁGINAS:
RESUMEN EN ESPAÑOL.	1-2
RESUMEN EN INGLËS.	3-4
INTRODUCCIÓN.	5-21
ANTECEDENTES.	22-27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	28
JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.	29
OBJETIVOS.	30
MATERIAL Y MÉTODOS.	31-44
RESULTADOS.	45-66
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.	67-74
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	75-90
APÉNDICE. (PUBLICACIONES)	91-103

ABREVIATURAS:

CRT Calreticulina

PDI Proteína disulfuro isomerasa

ER Retículo endoplásmico

PCR Reacción en cadena de la polimerasa.

DNA Ácido desoxinucléico

RNA Ácido ribonucléico.

ELISA Ensayo enzimático inmunoadsorbente

AHA Absceso hepático amibiano

kDA Kilodaltones

PBS Solución amortiguadora de fosfatos

BSA Albúmina sérica bovina

h Horas

min Minutos

TA Temperatura ambiente

Xg fuerza centrífuga relativa

M Molar

mM Milimolar

µl Microlitros

IDENTIFICACIÓN Y CLONACIÓN MOLECULAR DE UNA PROTEÍNA DE 51 kDa SEMEJANTE A LA CALRETICULINA EN *Entamoeba histolytica.*

RESUMEN

En trabajos previos, nuestro grupo detectó una proteína de membrana de 51 kDa de *E. histolytica* como un antígeno inmunodominante, con un alto grado de reconocimiento por anticuerpos de pacientes con amibiasis invasora intestinal (AI) y extraintestinal absceso hepático amibiano (AHA).[1,2] La secuenciación parcial del extremo amino terminal de esta proteína de 51 kDa mostró que corresponde a una proteína semejante a las calreticulinas (CRT) [3]

No se ha determinado con exactitud la existencia de la CRT en la *E. histolytica*, por lo tanto la identificación de una proteína semejante a la CRT, su expresión y la evaluación del papel que desempeña en la fisiología del parásito, sobre todo en eventos de patogenicidad, son de gran utilidad para entender mejor la interacción de este parásito con su hospedero.

Con base en lo anterior el objetivo del presente trabajo fue; la identificación y clonación molecular del gene que codifica para la calreticulina amibiana.

Para lograr esta meta se utilizaron diferentes estrategias moleculares; por un lado se realizó un tamizaje sobre diferentes bibliotecas recombinantes de *E. histolytica*, una de cDNA (λgt11) y otra genómica (λZAPII). También se utilizó la técnica de PCR, para obtener amplificados del gen de la CRT, con la utilización de oligonucleótidos degenerados y específicos. Posteriormente se clonaron dichos productos en el vector pBluescript KS+ y finalmente se produjeron las proteínas recombinantes utilizando el vector de expresión pProEx-HT-b.

Los resultados obtenidos nos permitieron identificar un producto de PCR de 1167 pb en el DNA genómico de *E. histolytica* obtenido de la fracción nuclear. Se determinó la secuencia de nucleótidos, encontrando un marco de lectura abierto que codifica para 389 aminoácidos y corresponden a la secuencia completa de la proteína. El análisis comparativo de esta secuencia con las registradas en la base

de datos del genoma de la *E. histolytica* (www.tigr.org/tdb/e2k1/eha1) y en la del GenBank (NCBI[R]), mostró una identidad del 100% con el gene de *E. histolytica* con referencia (EAL49855.1) que codifica para una probable CRT, reportado recientemente (2005).

Además, se localizaron las seis secuencias motivo que caracterizan a esta familia de proteínas (CRT-I,II,III,IV, V y VI), por otra parte, al analizar y comparar esta secuencia con la de otras CRT reportadas en el Gen Bank, se observó una alta identidad principalmente con CRT de *Dictiostelium discoideum* y de mamíferos 70 y 60% respectivamente, y una identidad menor con las CRT de otros parásitos (de 50 a 40 %), sin embargo el grado de homología observado entre todas las secuencias analizadas fue de 67-77% lo que nos demuestra el alto grado de conservación de este gen a través de las diferentes especies.

La obtención de estos amplificados de PCR permitió la clonación del gene *Ehcrt* en el vector de expresión procariótico pProEx-HT-b y la subsecuente producción de proteínas recombinantes denominadas; EhCRT-6H, EhCRT-N-6H y EhCRT-C-6H, estas proteínas fueron reconocidas por anticuerpos heterológos contra la CRT humana, y contra sueros de pacientes de AHA, por otro lado, la secuenciación parcial de las proteínas recombinantes por espectrofotometría de masas nos confirman que los productos obtenidos por PCR y clonados corresponden al gene que codifica para la CRT amibiana.

Finalmente estas proteínas recombinantes resultaron ser buenos inmunógenos e indujeron un buen titulo de Ac IgGs en los ratones inmunizados y la utilización de estas IgGs nos permitieron la identificación física de la EhCRT en los trofozoítos amibianos.

En el futuro continuaremos con la producción de la proteína recombinante EhCRT para evaluar su potencial diagnóstico y seroepidemiológico, así como para realizar la caracterización biológica de esta proteína y evaluar su interacción en los mecanismos patogénicos en la compleja relación huésped-parásito.

ABSTRACT

Previously our group identified a membrane protein of 51 kDa of *E. histolytica,* this protein resulted in an inmunodominant antigen, highly recognized by antibodies of patients with invasive amoebiasis amebic liver abscess (ALA).[1, 2] The partial sequencing of the amino terminal end of this protein corresponds to a calreticulin like protein (CRT).[3] This protein has not been previously detected in *E. histolytica*,

The objective of the present study was the identification and cloning, of *Ehcrt* gene. To achieve this we used two different molecular strategies; the screening of different libraries of *E. histolytica* DNA, one of cDNA (λgt11) and a genomic library (λZAPII). The *Ehcrt* gene was amplified by PCR using degenerated and specific oligonucleotides. The obtained PCR fragments were cloned into the vector pBluescript KS+. For the expression of CRT, the recombinant plasmid was sub-cloned in the expression vector pProEx-HT-b. Results allowed us to identify a PCR product of 1167 pb on genomic DNA of *E. histolytica* obtained from the nuclear fraction. The PCR fragment was sequenced, finding an open reading frame (ORF) which encoded 389 amino acids that correspond to the complete sequence of the protein. The comparative analysis of these sequences with the already registered sequences in the data base of the *E. histolytica* genome project (www.tigr.org/tdb/e2k1/eha1), and in the GenBank (NCBI) showed a 100% identity with *E. histolytica* gene reported in 2005 (accession number EAL49855.1) which encodes for a CRT like-protein. We also located the six motifs sequences characteristics of this protein family (CRT-I, II, III, IV, V and VI).

When we analyzed and compared this sequence with those in other CRTs reported in the GeneBank, we observed a high identity with the CRT in *Dictiostelium discoideum* and in mammals 70 and 60% respectively, and a lower identity with CRT from other parasites (from 50 to 40 %). However the homology in all sequences analyzed were between 67-77%, demonstrating the high conservation degree of this gene in the different species.

ARCHIVO HISTORICO

Reactivity of recombinant proteins; *Eh*CRT6H, *Eh*CRT-N-6H and *Eh*CRT-C-6H with anti-*E. histolytica* serum antibodies from ALA patients tested in an ELISA system, showed clear recognition of recombinant proteins, in contrast with the low reactivity of serum from non-infected healthy individuals. Finally the amino acids sequence of the *Eh*CRT recombinant proteins determined by mass spectroscopy confirmed the identity of *Eh*CRT molecule.

Finally these recombinant proteins were good immunogenic molecules and they induced a high title of antibodies IgGs in the immunized mice and the use of this IgGs allowed the physical identification of the EhCRT in the *E. histolytica* trofozoites.

In the future we will continue with the production of the recombinant protein *Eh*CRT to evaluate its potential diagnostic and seroepidemiological usefulness, and with both, the analysis of the biological functions and the role of this protein in the pathogenic mechanisms in the hosts.

INTRODUCCIÓN

El término de amibiasis se ha definido como la condición en la cual un individuo es portador de *Entamoeba histolytica* con o sin manifestaciones clínicas.[4]

Biología de la *Entamoeba histolytica*.

Este protozoario parásito se considera uno de los organismos eucariontes más simples, presenta dos formas biológicas; el trofozoíto unicelular es la forma de vida libre del parásito que invade y se alimenta en el lumen del intestino grueso donde se multiplica y diferencia hacia la forma de resistencia, o de infección que es el quiste. La etapa quística es la forma infectiva para el hombre y sólo se encuentra en las heces. Los quistes son esféricos y tienen una pared delgada, miden de 10 a 16 μm y usualmente tienen cuatro núcleos. Los quistes pueden ser adquiridos tanto por ingestión de agua o alimentos contaminados, como por manos sucias (fecalismo). Una vez ingerido el quiste pasa a través del estómago y se desenquista en la parte inferior del íleon, surgiendo de cada quiste una sola amiba metaquística tetranucleada, que produce a su vez por división citoplásmica 8 trofozoítos uninucleados que constituyen la forma vegetativa del parásito.

Estos trofozoítos son móviles, pleomórficos, tienen un diámetro de 20-40 μm y pueden colonizar la porción más distal del intestino delgado, pero es principalmente en las áreas de estasis del colon donde se alimentan y proliferan por división binaria y no pueden sobrevivir fuera del hospedero humano.[5]

Los trofozoítos arrastrados en la materia fecal son estimulados a enquistarse, completando su ciclo de vida cuando los quistes infecciosos son excretados en las heces, e ingeridos por su hospedero.

Las señales que dirigen los procesos de enquistamiento o desenquistamiento no se han caracterizado todavía, ya que no se ha logrado inducir el enquistamiento *in vitro* en *E. histolytica* y *E. dispar*. Sin embargo, utilizando el parásito de reptiles *E. invadens*, se ha sugerido que la ligación de la lectina que une a galactosa en la superficie del parásito puede ser uno de los activadores del enquistamiento.[6]

Los trofozoítos se multiplican por un mecanismo todavía incierto de reproducción asexual, que por mucho tiempo fue clasificado como "amitosis." Sin embargo, recientemente se han descubierto secuencias de genes homólogos del ciclo celular eucariótico sugiriendo que la maquinaria molecular requerida para la mitosis está presente en la *Entamoeba*. [5]

Los trofozoítos amibianos han sido caracterizados por microscopía electrónica como una célula eucarionte primitiva, [7,8] por su aparente ausencia de muchos de los organelos típicos que se encuentran en las células eucariontes típicas como son: mitocondrias, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y un citoesqueleto microtubular. Así también, la *E. histolytica* no contiene mitocondrias como tales, (probablemente por una pérdida secundaria) pero presenta algunas enzimas metabólicas que se encuentran en organismos procariontes, posiblemente adquiridas por transferencia lateral de genes de las bacterias [9, 10,11]

Sin embargo, las amibas desarrollan funciones propias de estos organelos como son: modificación y maduración de proteínas, así como el transporte específico de sus proteínas hacia los diferentes compartimentos celulares; la síntesis de lípidos de membrana y secreción de proteinas.[12, 13, 14,15]

Por lo anterior, existen varias evidencias de que el parásito desarrolla dichas funciones en vesículas o vacuolas citoplásmicas, que pueden ser caracterizadas citoquímicamente como estructuras semejantes al retículo endoplásmico y al aparato de Golgi en los trofozoítos de *E. histolytica*.[16,17,18] En este sentido, la identificación de marcadores moleculares de estos organelos o de complejos proteínicos que intervienen en la vía clásica de transporte, es una herramienta muy importante que permitirá evidenciar la existencia de estos organelos en la amiba

Características generales de la amibiasis.

La *E. histolytica* debe su nombre a su actividad lítica sobre los tejidos. El resultado de la interacción del parásito con el huésped varía desde una infección asintomática, hasta una enfermedad intestinal invasora que puede diseminarse a otros órganos.

Muchos de los individuos infectados con la *E. histolytica*, portadores asintomáticos, no presentan síntomas y pueden eliminar la infección sin ninguna manifestación clínica de la enfermedad. Sin embargo, en algunos casos estos individuos portadores asintomáticos pueden desarrollar la enfermedad después de un periodo que puede ser antes de un año.[19,20]

Las manifestaciones clínicas son variadas dependiendo de la patogenicidad de la cepa, la intensidad de la infección, la flora bacteriana, el sitio y extensión del tejido dañado ya que el trofozoíto invade y ulcera la mucosa colónica, rectosigmoides y/o apéndice cecal; las lesiones ocasionadas por el parásito se localizan a través de las diferentes estructuras de la mucosa intestinal en donde suelen aparecer úlceras en forma de "botón de camisa" las cuales pueden identificarse por examen rectosigmoidoscópico al inicio de la infección, durante el cuadro de diarrea simple, diarrea sanguinolenta o disentería. [21,22]

La manifestación extraintestinal más común de la enfermedad amibiana es el absceso hepático amibiano (AHA), éste fue invariablemente fatal en el siglo pasado, pero después de la introducción de los antiamibianos altamente efectivos emetina y metronidazol y con los métodos de diagnóstico más eficientes las tasas de mortalidad han bajado hasta 1-3%.[21] El AHA, se desarrolla cuando los trofozoítos llegan al hígado, probablemente por la vía de la circulación portal después de que estos, por razones desconocidas superan la mucosa colónica. Así algunos individuos que sufren AHA pueden presentar colitis amibiana, pero la mayoría de los individuos no presentan síntomas intestinales y de hecho la microscopía en heces es generalmente negativa tanto para trofozoítos como quistes de la *E. histolytica*. De ahí la dificultad para el diagnóstico oportuno de esta forma de enfermedad.[23]

La experiencia clínica ha demostrado que la amibiasis invasora es más frecuente en zonas geográficas donde prevalecen algunas cepas virulentas de *E. histolytica.* Entre los factores de riesgo para la infección por *E. histolytica* se han considerado; la situación geográfica, el clima, la raza, el género, la edad, las condiciones nutricionales y las inmunológicas, la dieta y los hábitos sexuales del huésped. [21, 24, 25]

Mecanismos de patogenicidad de la *E. histolytica*.

La descripción clásica de la patología amibiana muestra al parásito como el causante de daño y destrucción del tejido. En los últimos años se han identificado y estudiado un número considerable de moléculas amibianas que son consideradas como factores de virulencia, sin embargo, la experiencia nos ha permitido determinar que la interacción parásito-hospedero es mucho más compleja y al parecer estos daños sobre el tejido del huésped también son provocados por el mismo huésped a través de los efectos de la propia respuesta inmune contra el parásito.[26]

Dentro de las moléculas amibianas que intervienen en los procesos de patogenicidad, algunas son hidrolíticas y otras tienen diferentes actividades biológicas; las más estudiadas son: El amebóporo, [15,27] una proteína de 18 kDa que no presenta actividad enzimática pero que tiene la habilidad de originar canales iónicos en las membranas celulares. La lectina específica de galactosa/D-galactosamina (Gal/GalNAC), que interviene en la adhesión del parásito con las mucinas colónicas;[28,29] la fosfolipasa A,[30] la colagenasa,[31] las enzimas proteolíticas con sustratos bien definidos y al menos 20 proteinasas de cisteina genéticamente diferentes (EhCPs)[32,33] con un espectro de sustratos muy amplio.[34] Las proteinasas son secretadas por los trofozoítos de la *E. histolytica*, se han identificado extracelularmente en abscesos hepáticos amibianos de modelos animales.[35,36] los trofozoítos de la *E. histolytica* pueden secretar 10-100 veces más proteinasas de cisteina que la *E. dispar*, sin embargo, trofozoítos modificados genéticamente para la sobreexpresión de proteinasas de cisteina no le confieren virulencia a la *E. dispar*. Mientras que si se modifican genéticamente trofozoítos de la *E. histolytica* para hacerlos deficientes en la expresión de proteinasas de cisteina, estos presentan una virulencia reducida en un modelo de AHA en roedores,[37] son menos invasivos, y causan significativamente una menor inflamación y daño al tejido en el modelo de xenotransplante de intestino humano en ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID-HU-INT) que es un modelo para el estudio de la colitis amibiana.[36]

El grupo del Dr. Pérez-Tamayo,[26] utilizando como modelo *in vivo,* el absceso de hígado agudo producido experimentalmente en hámster (AEALAH), por inyección intraportal de trofozoítos crecidos axénicamente, evaluó el papel de las EhCPs. La evidencia sugiere que la actividad proteolítica de éstas no está directamente relacionada con el daño al tejido, pero si con la sobrevivencia del parásito, lo cual se requiere para la progresión de la lesión. Por otro lado, el proceso inflamatorio desencadenado por la respuesta inmune del huésped es responsable en cierta medida del daño que sufre el tejido y que además es necesario para la sobrevivencia del parásito, lo cual sugiere un alto grado de complejidad en la interacción huésped-parásito.

La fagocitosis, es un proceso esencial para el crecimiento celular y está directamente involucrado en la patogénesis de la *E. histolytica*. A través de este mecanismo la amiba internaliza bacterias en el intestino y células del huésped tanto inmunes como no inmunes durante la invasión de los tejidos.[38] La fagocitosis consiste de un número de eventos subsecuentes que incluyen; 1) el reconocimiento y la unión de los ligandos a su célula blanco a través de la lectina específica de galactosa/N acetilgalactosamina; 2) la activación de vías de señalización que dirigen la reorganización del citoesqueleto y 3) el tráfico de vesículas.[39]

Recientemente el estudio del análisis del proteoma de la fagocitosis, arrojó una lista de algunas de las proteínas directamente involucradas en la biogénesis del fagosoma, entre las que se señala mas de una docena de proteínas RABs, proteínas que regulan el tráfico vesícular, proteínas de superficie que regulan la adherencia a las células blanco como las lectinas, moléculas asociadas a la maduración de las vesículas como la adaptina, COPI, AP50, clatrina, sintaxina 16, proteínas de citoesqueleto; actina, profilina, Cap, actoforina, Complejo ARP, actobindina, coactosina, talina, y protovilina. Además se encontraron señales de transducción; Pak, P13K, tor, Ser/thr cinasa, pk2, adenilato cinasa, Rac1, Rho1, Rho GAP/GEF, la CRT del retículo endoplásmico y las proteínas de carga en su mayoría enzimas hidrolíticas. De esta manera se observaron cambios considerables de la composición del fagosoma durante el proceso de maduración, indicando un reflujo constante de

los diferentes actores moleculares de la biogénesis del fagosoma, por lo tanto el uso del proteoma del fagosoma, puede ayudarnos a una mejor comprensión del significado biológico y etiológico de la fagocitosis en este parásito.[40]

El estudio de la interacción de la *E. histolytica* con diferentes sustratos biológicos ha sido el principal objetivo para determinar los mecanismos patogénicos que producen las lesiones amibianas. El uso de modelos *in vivo* en animales en los cuales se producen lesiones intestinales y extraintestinales experimentalmente, ha contribuido significativamente en el conocimiento de esta infección a pesar de que no se cuenta con un modelo animal que reproduzca el ciclo completo de la enfermedad, sin embargo, el uso de diferentes animales de laboratorio susceptibles y resistentes nos ha permitido acercarnos más a la comprensión de la interacción huésped-parásito.[41]

En el pasado los ratones no se usaban tan frecuentemente como modelo para la amibiasis ya que se consideraban animales naturalmente resistentes contra la *E. histolytica*. Sin embargo Ghadirian y Kongshavn usando diferentes cepas de ratones reportaron diferencias en la susceptibilidad al desarrollo de la amibiasis invasora después de la inoculación con trofozoítos cultivados axénicamente. Las cepas C3H/HeCv, Balb/c, NZB/BIN, BIO.A, DBA2 y C57B1/6 se consideraron como susceptibles y las cepas A/J,CE, DBA1 y CD-1 se consideraron como resistentes. [42]

Un modelo interesante para la colitis amibiana se desarrolló en los ratones SCID cuando un fragmento de intestino humano fue implantado en la región supraescapular,[43] Este xenotransplante intestinal humano fue después infectado con *E. histolytica*. Después de 12 horas de inoculación dentro del lumen de este xenotransplante aparecen ulceraciones focales con invasión de la submucosa similares a las que se observan en el humano con colitis amibiana.

Algunos aspectos de la patología amibiana no se han resuelto, sin embargo se han desarrollado técnicas nuevas más sofisticadas y precisas, tanto celulares, inmunológicas, bioquímicas y moleculares, así como, el uso de modelos animales de la infección cada vez más cercanos al fenómeno de la invasión o daño tisular

observado en el humano, que nos acercan cada día más a la resolución de estas interrogantes.

Epidemiología de la amibiasis.

Como agente etiológico de la amibiasis humana, *E. histolytica* tiene una amplia distribución en el ámbito mundial, principalmente en países en vías de desarrollo, en los cuales se comporta de manera endémica.[21] Dentro de los países que por su alta prevalecía de amibiasis son considerados como endémicos se encuentran; India, Egipto, Turquía y México.[4]

Nuestro conocimiento en cuanto a la distribución y prevalencia regional y mundial de la *E. histolytica,* está cambiando debido a la reciente diferenciación entre las especies patógena *E. histolytica* y no patógena *E. dispar.*

Los datos epidemiológicos a nivel mundial, antes de que se pudiera diferenciar entre las dos especies de *Entamoeba*, mostraban una prevalencia de alrededor de 500 millones de personas infectadas anualmente, con un índice de morbilidad del 10% y de mortalidad del 1%. Sin embargo, la amibiasis sigue siendo la tercera causa de muerte debida a infecciones parasitarias, a nivel mundial, después de la malaria y la esquistosomiasis. [4]

En 1993, el número de casos de amibiasis hepática registrados en el país fue de 5000 personas afectadas, con un promedio mensual de alrededor de 500 casos repartidos en toda la República,[44] siendo esta forma clínica 10 a 30 veces más frecuente en adultos que en niños. La frecuencia de amibiasis intestinal es mayor en la población infantil (1 a 5 años de edad) que en los adultos,[45] de ahí que ésta se encuentre clasificada dentro de las principales infecciones intestinales, las cuales representan la segunda causa de diarrea en niños.[46]

En 1992 el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) el cual atiende a más de la mitad de la población mexicana registró el tratamiento de 369,440 casos nuevos de amibiasis intestinal invasora (colitis amibiana o disentería) y 1992 casos de AHA.[46] De tal manera que la mortalidad en nuestro país atribuida a *E. histolytica*

antes de 1970 era de 9-13%, [47] pero este nivel de mortalidad como se ha reportado por el IMSS ha disminuido al 1.2% para el año de 1994.

Así datos más recientes sobre la incidencia de AHA reportan un rango de 8.5 casos/100,000 en 1995 a 3.66 casos/100,000 en el 2000.[48]

Por otro lado, en un estudio de evaluación de la incidencia de AHA en el estado de Sonora en México, en cuatro hospitales de la ciudad de Hermosillo, durante los años del 2000 al 2005 reportaron un total de 319 AHA, resultando una incidencia de 1.19 casos/1000 individuos registrados. [49]

En Hué, Vietnam, una ciudad con un millón de habitantes se reportaron 1500 casos de AHA durante un periodo de 5 años en un solo hospital,[50] recientemente la región alrededor de la ciudad de Hué se ha identificado como una área de altísima incidencia de AHA y se considera que una amplia proporción de la población está infectada con la *E. histolytica*, por esto esta ciudad representa un excelente sitio para estudios epidemiológicos y de tratamiento de la amibiasis.

Los estudios de prevalecía de la *E. histolytica* y la *E. dispar* en Sudáfrica y Egipto revelan que la *E. histolytica* es una infección común tanto en el norte como en el sur del continente y que la mayoría de las infecciones son asintomáticas, encontrando también que la mayoría de los quistes identificados en las heces son de la especie no patógena *E. dispar*. También es interesante hacer notar que en Egipto la colitis amibiana es extremadamente común y en contraste, el AHA se presenta muy raramente, mientras que en Sudáfrica ocurre lo contrario, donde la mayoría de las infecciones invasivas se manifestaron como AHA y la colitis invasiva es más rara, las razones para estas discrepancias no se conocen, pero pueden ser atribuidas al grado de desarrollo de las diferentes poblaciones, a factores genéticos del huésped, o variaciones del parásito y a factores ambientales. Así como a la distribución particular de diferentes cepas con diferentes grados de patogenicidad en las diferentes poblaciones. [51]

La existencia de una gran cantidad de casos de amibiasis asintomática en el mundo en relación a un número importante pero considerablemente menor de casos de enfermedad invasora ha sido interpretado como un indicador de la virulencia

variable de las diferentes cepas amibianas, siendo uno de los aspectos más discutidos en esta parasitosis. En 1925 Emile Brump, sugirió que había dos especies morfológicamente indistinguibles; una especie capaz de causar enfermedad invasora y otra que no causaba enfermedad. A esta última la llamó *E. dispar.*[52]

En este sentido, desde los años 70 se fueron acumulando suficientes datos bioquímicos, inmunológicos y genéticos que indican que existen dos especies con características morfológicas idénticas, las que anteriormente eran conocidas como *E. histolytica* patógenas y no patógenas, actualmente la especie no patógena se denomina *E. dispar.* Por lo tanto, ahora se acepta que solo *E. histolytica* es capaz de causar la enfermedad intestinal invasora y extraintestinal, mientras que la *E. dispar* no causa lesiones tisulares.[53]

La confirmación de la existencia de estas dos especies de *Entamoeba,* es uno de los más importantes logros en el campo de la investigación en amibiasis; Sin embargo, lo anterior nos sitúa frente a una nueva perspectiva en el campo epidemiológico, particularmente en cuanto a la evaluación e interpretación de los resultados en la determinación de la prevalecía de la infección por *E. histolytica* o por *E. dispar* y la morbilidad de la enfermedad amibiana, por lo tanto, es necesario reevaluar estos datos epidemiológicos utilizando nuevas tecnologías que permitan discriminar entre infecciones por *E. histolytica* o *E. dispar.* En este sentido la tecnología de DNA recombinante ha permitido mediante la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), poder detectar y amplificar secuencias de DNA específicas de cada una de las especies y se está evaluando su aplicación en estudios, clínicos y epidemiológicos. [54,55,56]

La mayor parte de los individuos infectados con *E. dispar / E. histolytica* son portadores asintomáticos, no existen datos confiables acerca de la relación entre el número de portadores asintomáticos y el número de individuos con infección invasora, sin embargo, se ha determinado que en México existe una relación aproximada de un paciente con amibiasis invasora por cada cinco portadores, siendo uno de los países con índices más altos de amibiasis invasora en el mundo.[4]

México y otros países de Latinoamérica están esforzándose para determinar el estado actual de la epidemiología de la infección por *E. histolytica* usando como herramienta diversas estrategias moleculares.[57, 58] En el año de 1993, Acuña-Soto y col. reportaron exitosamente el uso del PCR en la epidemiología de la infección con *E. histolytica* diferenciando entre las patógenas y las no patógenas en una comunidad rural en el estado de Chiapas, México. Se seleccionaron al azar 201 individuos, 12% fueron positivos por microscopía para *E. histolytica / E. dispar,* de 25 muestras 24 fueron positivas por PCR, el análisis de los resultados por PCR definieron tres grupos diferentes de individuos, el primero (51.5%) de individuos con una coinfección por ambas especies (*E. histolytica y E. dispar*), el segundo corresponde a individuos infectados con *E. histolytica* (33.33%), y un tercer grupo que incluye individuos infectados con la especie *E. dispar* (3.70%), mostrando que en esta comunidad existe una mayor prevalecía de infecciones con *E. histolytica* (85.18%) que de infecciones con la *E. dispar* (55.55%).[59] Esta fue la primera vez que se confirmó la existencia de la coinfección por ambas especies en un mismo individuo.

Recientemente Ramos y col 2005. reportaron parte de los resultados de un estudio longitudinal desarrollado en el estado de Morelos, México. La prevalencia de la infección por *E. histolytica/E. dispar* determinada por microscopía fue de 12.8%; muchas de las muestra presentaron más de un parásito. Sin embargo, la prevalecía de infección con *E. histolytica* y *E. dispar* determinada por PCR fue de 13.8% y 9.7% respectivamente.[60]

La aplicación de herramientas moleculares está ayudando a responder muchas interrogantes sobre la amibiasis. Se está en el inicio de una nueva etapa en el estudio de la epidemiología de la infección con *E. histolytica* y *E. dispar* sobre todo en áreas endémicas de la infección donde existe la necesidad de desarrollar estudios longitudinales a gran escala, desarrollados por grupos multidisciplinarios de investigadores, solamente así se contará con datos más reales sobre la prevalecía de la infección y de la enfermedad amibiana.[57]

Inmunología de la amibiasis.

Un aspecto importante en el control de la amibiasis es el estudio de la respuesta inmune que se activa en el individuo infectado.

En términos generales se acepta que la respuesta inmune contra *E. histolytica* ocurre únicamente como resultado de una invasión tisular induciendo tanto una respuesta de tipo celular como humoral.[61] Sin embargo, el estímulo antigénico local sobre linfocitos B localizados en la lámina propia, submucosa y placas de Peyer, muy probablemente no requiere de invasividad para producir anticuerpos con isotipo IgA,[61,62] los cuales son excretados por exocitosis en una forma molecular llamada IgA secretoria (IgAs). Al parecer la producción de IgAs disminuye rápidamente al eliminar el estímulo antigénico,[63] por lo cual se ha sugerido que quizá a través de su identificación y medición se puedan verificar infecciones intestinales recientes.[61] Aunque cabe mencionar que en este sentido existen datos más recientes sobre la inmunidad secretora que hace pensar en una participación mucho más activa en la modulación del estado infeccioso en zonas endémicas, donde se ha demostrado la persistencia de IgAs por periodos tan prolongados como un año.[64]

En función de la respuesta sistémica, una vez que la invasión tisular ha ocurrido, se desencadenan los mecanismos de inmunidad humoral y celular.[61] Se puede decir que todos los pacientes que se recuperan de un AHA, presentan un estado de hipersensibilidad retardada cutánea a antígenos amibianos, al contrario de lo que sucede en pacientes que se encuentran en estadios tempranos de la enfermedad, aparentemente debido a un estado de anergia transitoria.[65] Este período en el que se presenta un estado de inmunosupresión específica en las etapas iniciales del AHA no tratado, ha sido demostrado en pruebas de citotoxicidad de linfocitos provenientes de pacientes, así como por la disminución de la producción del factor inhibidor de la migración de macrófagos *in vitro*.[66] Por otro lado, se ha informado que los linfocitos aislados de sangre periférica de pacientes con AHA responden a la estimulación antígeno-específica en pruebas de transformación blastoide de dichas células,[67] fenómeno que no se presenta en individuos sanos ni en pacientes con amibiasis intestinal, siendo una posible explicación el grado de

invasión tisular y/o de la inmunosupresión de la rama aferente de la respuesta inmune.[68] Por otro lado, algunos productos de *E. histolytica* parecen tener actividad mitogénica, los cuales son responsables de la expansión policlonal observada en individuos con AHA,[69] otras investigaciones señalan la inversión de la relación de células T ayudadoras/ células T supresoras en estos mismos pacientes.[70]

El papel que desempeñan los macrófagos en la amibiasis como mecanismo de defensa, constituye en términos generales una forma de resistencia natural del huésped.[71] En estudios realizados en hámster se ha comprobado que el mecanismo de defensa contra la infección amibiana puede verse favorecido al tratar a los macrófagos con bacilo de Calmmete-Guérin (BCG) o deprimido si son tratados con sílice,[72,73] lo cual además de disminuir la función del macrófago propicia un aumento en la multiplicación de *E. histolytica* a nivel intestinal.[71]

Datos clínicos y experimentales apoyan la hipótesis que los mecanismos de resistencia desarrollados contra la amibiasis invasora son mediados por células. Los procesos que disminuyen la actividad de macrófagos *in vivo* hacen al hospedero más susceptible para la infección amibiana.[74]

En las infecciones parasitarias se ha determinado que la resistencia o susceptibilidad contra ciertos parásitos correlaciona con la subpoblación de células T activadas.[75] Así en la amibiasis invasora se ha determinado un incremento en la población de linfocitos TCD4+ Th2 durante la fase aguda de la invasión, mientras que después de la recuperación se incrementa la subpoblación de linfocitos Th-1 los cuales a su vez producen INF-gama que activa a los macrófagos.[76]

A pesar de que se ha descrito que los macrófagos y linfocitos activados pueden destruir trofozoítos amibianos *in vitro*, también las amibas pueden destruir a estas células. Por lo tanto, no se puede asegurar si la respuesta citotóxica de los macrófagos y linfocitos es moderada o si las células que participan son destruidas por las amibas. Las evidencias sugieren que la respuesta inmune celular podría estar participando en la resistencia a la reinfección por el parásito, esto está apoyado por la observación clínica de que la recurrencia de AHA es muy poco frecuente.[74,77] Sin embargo, existen algunos reportes de reincidencia. Morán y col,[78]

reportaron el caso de un hombre que durante el periodo de 4 años registro 3 eventos independientes de AHA, los resultados mostraron una deficiencia en el estallido respiratorio de sus fagocitos mononucleares (MP). El estallido respiratorio es el principal mecanismo microbicida de los leucocitos PM ésto además ha sido considerado una estrategia de resistencia del hospedero contra la *E. histolytica* éste puede ser al menos un factor de riesgo en este paciente y que haya sido el responsable de la recurrencia del AHA.

Con respecto a la inmunidad humoral se han detectado anticuerpos específicos en el suero, predominantemente IgG una semana después del inicio de la sintomatología en el caso de la amibiasis invasora,[61,79] por lo que la identificación de estos anticuerpos se ha propuesto como una herramienta útil en el diagnóstico de la amibiasis invasora, tanto a nivel individual, sobre todo en el absceso hepático, como a nivel colectivo a través de la seroepidemiología como indicador de invasividad.

En realidad no es claro el papel que desempeñan los anticuerpos antiamibianos, se ignora si tienen un papel protector o si sólo son el resultado de la invasión tisular o exposición al parásito, ya que títulos altos de anticuerpos antiamibianos coexisten durante la fase aguda de la enfermedad y persisten durante largo tiempo. A pesar de ello la reinfección por este parásito es frecuente.[61,80]

La IgAs anti-*E. histolytica* ha sido reportada en la bilis de ratas inmunizadas intracecalmente,[63] en la leche humana [81] y en calostro,[82] los anticuerpos IgA e IgM se han encontrado en secreciones de ileon y colon así como en las heces de pacientes con AHA. La presencia de anticuerpos de la clase IgM sugiere que esta inmunoglobulina puede ser importante en los mecanismos de defensa contra *E. histolytica*, en virtud de su capacidad para activar el sistema del complemento.[83]

Ximénez y col. (1990) reportaron la presencia de coproanticuerpos anti-*E. histolytica* tanto en pacientes con amibiasis intestinal como en el grupo control estudiado, en ambos grupos los títulos más altos correspondieron a los anticuerpos de la clase IgA, IgM e IgG. Los resultados demostraron que los títulos de coproanticuerpos de los diferentes isotipos no permiten distinguir entre individuos

adultos con amibiasis intestinal aguda y la población normal en zonas donde la amibiasis se comporta como una enfermedad endémica.[84]

Estudios clínicos recientes sugieren que la inmunidad de las mucosas pueden proveer de alguna protección ante la infección intestinal recurrente con la *E. histolytica*. Un estudio realizado en Sudáfrica mostró que los individuos que sufrían recurrencias de AHA y que presentaban anticuerpos IgA secretores anti-amibianos en sus mucosas dirigidos contra la lectina Gal/GalNAC de *E. histolytica*, fueron menos susceptibles a reinfectarse con otras *Entamoebas* y con *E. dispar* durante el periodo de seguimiento.[85] En contraste un estudio epidemiológico en Vietnam demostró que individuos con episodios posteriores de AHA mostraron el mismo o ligeramente mayor riesgo de sufrir un segundo caso de AHA.[86] Interesantemente, un considerable número de pacientes presentaron AHA recurrentes durante el periodo de estudio (8 años). Sugiriendo que el AHA no induce inmunidad de larga duración, no obstante también se observó que el 10 % de estos pacientes exitosamente tratados no resuelven completamente la lesión en el hígado y estas lesiones residuales se asocian con una serología amibiana positiva.[87] Estos estudios sugieren que la presencia en las mucosas de anticuerpos anti-lectina correlacionan con el riesgo reducido de una nueva reinfección con *E. histolytica* o *E. dispar,* lo que reduce el riesgo de enfermedad tanto colitis como el absceso hepático. Sin embargo, hasta ahora ha resultado muy difícil determinar si la inmunidad observada en esta infección se desarrolla después de la infección. Esto es un concepto importante porque puede ser difícil de desarrollar una vacuna que provea una respuesta inmune protectora mayor que la que se adquiere por la infección natural.[88,89]

En las últimas décadas, las mejoras en el servicio sanitario ha reducido considerablemente la amibiasis en países del primer mundo, sin embargo, en los países pobres estos beneficios no han llegado a toda la población. De tal manera que se ha planteado la generación de otros recursos para prevenir la amibiasis. Tales como el desarrollo de posibles vacunas. Las vacunas son un gran recurso para prevenir la enfermedad y erradicar la infección, existen vacunas efectivas contra

una gran variedad de bacterias y virus, pero no se han podido desarrollar vacunas eficientes contra parásitos.

Las infecciones parasitarias, son un verdadero reto para el desarrollo de vacunas, ya que presentan complejos ciclos de vida, diversos estados antigénicos, y hospederos intermedianos, así como reservorios animales de la infección y por si fuera poco complejos métodos de evasión de la respuesta inmune.

La *E. histolytica* que presenta un ciclo de vida simple, no tiene hospederos intermedios, presenta una localización extracelular y no se ha reportado variación antigénica en este parásito, aparentemente presenta pocos retos para el desarrollo de una vacuna. Sin embargo, hasta ahora el desarrollo de una vacuna anti-amibiana está en una etapa inicial, un buen número de proteínas amibianas han sido identificadas como potenciales candidatos a vacunas ya que estas fueron capaces de inhibir o prevenir la formación de AHA en roedores experimentalmente infectados[90,91,92] así como; las peroxiredoxinas, lipofosfoglicano LPGs y las proteasas de cisteina EhPCs. Los dos candidatos más prometedores parecen ser; la proteína de 25 kDa rica en serina SRPEh y la lectina de 266 kDa inhibible por galactosa.[93,94,95]

El progreso en el desarrollo de las vacunas ha sido facilitado por los nuevos modelos animales y por la aplicación de la tecnología de DNA recombinante, ya que utilizando este recurso se pueden producir fragmentos de proteínas, péptidos que contienen epítopes protectores y excluir regiones del antígeno blanco no relacionadas con el efecto protector. Esta propiedad es de especial importancia en el caso de la lectina Gal/NacetilGal, donde la inmunización con la molécula nativa puede resultar en una respuesta inmune protectora en algunos animales vacunados, pero puede exacerbar la enfermedad en otros animales.[95,96]

Diagnóstico de la amibiasis.

El diagnóstico de la infección amibiana consiste básicamente en la identificación de *E. histolytica* en las heces y/o en la mucosa colonica de los

pacientes. Por años este diagnóstico se ha hecho por examen microscópico de las heces, sin embargo se ha observado que esta técnica presenta una baja sensibilidad y especificidad y frecuentemente se reportan resultados de falsos positivos además de que es difícil, requiere personal altamente capacitado y es imposible diferenciar morfológicamente entre amibas patógenas y no patógenas.[4]

El cultivo de trofozoítos aislados de las heces de pacientes seguido del análisis de zimodemos ha sido considerado como un buen examen definitivo para el diagnóstico sin embargo esta metodología no es fácil y toma mucho tiempo y últimamente se ha reportado que las diferencias observada en el corrimiento de los zimodemos puede ser ocasionado por la presencia de bacterias indispensables para el cultivo de los trofozoítos amibianos.[97]

La serología representa un proceso cada vez más importante en la confirmación del diagnóstico de invasión extraintestinal o intestinal, pero el principal problema de los estudios serológicos es que detectan anticuerpos contra antígenos amibianos totales y los pacientes que han sufrido un evento invasor por *E. histolytica* permanecen seropositivos por varios años después de haber resuelto satisfactoriamente la enfermedad por lo que no permite diferenciar entre casos de infecciones recientes de casos de infecciones pasadas. [98,99] De ahí la necesidad de contar con métodos prácticos, sensibles y específicos para la detección de antígenos en las heces y en el suero.

Entre las principales técnicas que emplean antígeno de *E. histolytica* para la detección de anticuerpos circulantes, se encuentran la contrainmunoelectroforesis (CIE) y la hemaglutinación indirecta (HAI) y el ensayo inmunoenzimático (ELISA).[100] Así mismo cabe mencionar que el empleo tanto de anticuerpos monoclonales como de sueros hiperinmunes por el método de ELISA permiten la detección de trofozoítos en las heces, lo cual constituye un avance potencial en el diagnóstico de esta enfermedad.[101,102]

El uso de proteínas o péptidos recombinantes para el inmunodiagnóstico amibiano han resultado ser más sensibles y específicos. De esta manera, existen reportes de una proteína recombinante rica en serina de aproximadamente 25 kDa,

la cual se ha utilizado para el serodiagnóstico de la amibiasis invasiva aguda a través de ELISA; esta prueba muestra una sensibilidad de 79% y una especificidad de 87% tanto en sueros de pacientes con AHA como en aquellos que presentan amibiasis intestinal invasiva.[103, 104]

Últimamente se han desarrollado nuevas estrategias para la detección de la *E. histolytica* que se basan en la detección de antígeno específico que son viables comercialmente. Ensayos de ELISA (Thechlab *E. histolytica*) y permiten identificar antígenos de *E. histolytica* en heces y que además pueden distinguir infecciones con *E. histolytica* de infecciones con *E. dispar*, estos ensayos han demostrado ser más sensibles que la microscopía sin embargo, su uso sobre todo en áreas endémicas no se ha generalizado debido a su alto costo por un lado y a las diferencias en cuanto a sensibilidad y especificidad al utilizarse en estas áreas.[105, 106, 107]

Así también, el empleo de estrategias moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es capaz de diferenciar *E. histolytica* de *E. dispar*, esta técnica es más sensible y específica y cada día se incrementa su uso en la clínica y en la investigación. La identificación de la *E. histolytica* en diferentes muestras biológicas por PCR se ha basado sobre la amplificación de proteínas polimórficas como la SRPEh, las quitinasas entre otras muchas y genes de RNAr utilizando iniciadores especie-específicos.[108, 109, 110, 111]Además el empleo de estas técnicas moleculares ha demostrado un alto grado de diversidad genética entre las diferentes cepas o especies de *Entamoeba* aún dentro de áreas geográficas relativamente restringidas (individuos, unidad familiar y/o comunidad).

ANTECEDENTES

Características de la Calreticulina.

La caltericulina (CRT) es una proteína multifuncional altamente conservada evolutivamente que se encuentra principalmente en el lumen del retículo endoplásmico de casi todas las células eucariontes excepto los eritrocitos. La CRT fue primero aislada en 1974 de músculo de conejo y clonada hasta 1989 y desde entonces la CRT se ha aislado y clonado en vertebrados, invertebrados, parásitos y en las plantas superiores, el gen de esta proteína no se ha identificado en procariontes ni en levaduras.[112]

El dogma para la molécula de CRT es: un gen un RNAm y una proteína, en la mayoría de las especies, sin embargo, recientemente se han identificado isoformas en el humano, el ratón y también en algunas especies de plantas.[113, 114]

La secuencia de aminoácidos de esta proteína muestra una identidad del 90% entre las especies de mamíferos, 80-90% entre las plantas y entre los animales y las plantas de alrededor del 50%. Además, se ha determinado un alto nivel de homología con secuencias de cDNA de la CRT aislada de especies tan diferentes como *Onchocerca volvus, Schistosoma mansoni, Leishmania, Euglena y Drosophila,* lo que indica una fuerte conservación evolutiva del gene, así como de las funciones biológicas tan importantes en las que interviene esta proteína.[112]

La CRT es una proteína con rango de pesos moleculares que van de 46 a 60 kDa dependiendo de la especie, la secuencia primaria en esta proteína en las diferentes especies donde se ha identificado inicia con un péptido señal y termina con una secuencia C-terminal KDEL//HDEL-ER que constituye una señal de retención de las proteínas constitutivas del RE, la cual además es responsable de la retención de la CRT en el lumen del RE. [112,115]

La CRT puede ser dividida en tres dominios estructurales y funcionales sobre la base del análisis de su secuencia de aminoácidos: El dominio amino terminal N (residuos 1-180), constituye aproximadamente la mitad de la molécula y es una estructura globular, la secuencia de aminoácidos de este dominio está muy

conservada en todas las CRT. Este dominio tiene la propiedad de unirse a Zn^{++}, presenta un sitio de fosforilación potencial y un sitio potencial de glicosilación, tiene actividad de autoquinasa, presenta sitios de unión a dominios de DNA principalmente a receptores de esteroides y al RNA del virus de la rubéola así como a la subunidad alfa de las integrinas. Interactúa con la proteína disulfido-isomerasa (PDI), y la proteína 57 del RE (ERp57) este dominio además inhibe la angiogénesis.[112, 116, 117]

El dominio P (residuos 181-290), comprende una secuencia rica en prolinas, esta región de la proteína puede unir iones de Ca^{++} con alta afinidad pero con una baja capacidad de unión (1mol de Ca^{++}/ mol de molécula). Muestra actividad de chaperona semejante a una lectina, además este dominio interactúa fuertemente con la PDI y con la perforina, también presenta secuencias de aminoácidos muy similares con otras proteínas que unen calcio.[112, 117, 118, 119]

El dominio C (residuos 291-400) está formado por la región carboxilo terminal (C-terminal) de la proteína y es altamente ácido y termina con la secuencia de recuperación KDEL/HDEL- ER. Este domino también presenta sitios de unión a Ca^{++} de mayor capacidad (20-30 mol de Ca^{++}/mol de proteína), esto le confiere a la molécula completa la propiedad de almacenar Ca^{++} que a su vez le permite desempeñar un papel crítico en la regulación de la concentración del Ca^{++} intracelular. La unión del Ca^{++} a este dominio de la proteína regula la interacción de la CRT con la PDI, ERp57 y otras chaperonas, este dominio presenta actividad antitrombótica.[112, 117,120]

La CRT fue identificada principalmente como una proteína residente del lumen del RE, sin embargo, investigaciones recientes han demostrado su presencia en una gran variedad de compartimentos celulares[112,121] donde participa en múltiples funciones celulares. Se ha detectado la CRT en los gránulos citotóxicos de linfocitos T, [122,123] en el citoplasma,[124,125] en la superficie celular,[126,127] y extracelularmente como consecuencia de procesos invasivos, estrés y/o muerte celular en la saliva de mosquitos,[128] garrapatas,[129] en sangre y suero[130] de diferentes mamíferos incluido el hombre y en el espacio extracellular de diferentes tipos celulares estimulados *in vitro*.[131,132]

La detección de la CRT en el acrosoma de los espermatozoides,[133] una estructura considerada como parte del sistema secretor, sugiere que esta chaperona puede asociarse con otras proteínas sintetizadas en el RE y transportadas hacia el Golgi y subsecuentemente liberadas hacia las diferentes localizaciones celulares.[141] También existe la posibilidad de que esta proteína residente del RE sea sintetizada en este organelo y pueda ser retrotranslocada hacia el espacio intracelular utilizando los mecanismos de transporte que normalmente utilizan las proteínas de secreción a las cuales se une la CRT.[135]

En el parásito *T. cruzi* se ha identificado a esta CRT en RE, AG, vesículas asociadas al citosoma, una invaginación especializada de la superficie del parásito involucrada en la captación de macromoléculas, en la cromatina nuclear, en el cinetoplasto y sobre la superficie celular del amastigote. [136]

En las plantas la CRT ha sido localizada principalmente en el RE, en la envoltura nuclear, pero ha sido además detectada en los arreglos de los microtubulos del fragmoplasto y asociada con el huso mitótico de las células en división. [137,138] En general la CRT es muy abundante en muchos tejidos vegetales pero principalmente se ha localizado en: raíces, hojas jóvenes, diferentes órganos florales y semillas en proceso de germinación. Por lo que existen indicios de que la expresión del gene para la CRT puede estar correlacionado con la proliferación celular, el desarrollo embrionario y eventos de fertilización. [139]

De esta manera a la CRT se le atribuyen cuatro funciones principales, dos dentro del lumen del RE: 1) chaperonina y 2) regulación de la homoestasis del Ca^{++}, y dos fuera del RE: 3) la CRT modula la adhesión celular y 4) regula la expresión de algunos genes sensibles a esteroides.[112,117,118,140]

En eucariontes superiores el control de calidad del procesamiento y maduración de los polipéptidos recién sintetizados en el RE es regulado por las chaperonas moleculares, incluyendo la CRT, glucosidasas y glicosiltransferasas. La CRT desarrolla un papel importante en dicho proceso, promoviendo el plegamiento y ensamblaje de las glicoproteínas recién sintetizadas y participa en la retención de las

ARCHIVO HISTÓRICO

glicoproteínas erróneamente ensambladas o incompletas que son blancos de la degradación hacia el proteosoma. [119,141,142]

La función altamente conservada de la CRT de unir Ca^{++} indica que ésta participa en la regulación de la concentración del Ca^{++} intracelular que interviene en una gran variedad de vías metabólicas. Se ha demostrado que la CRT de parásitos como *Leishmania y Schistosoma* conservan esta propiedad de unir Ca^{++} *in vitro.*[143,144] Así mismo, la CRT regula la actividad de chaperona de las proteínas PDI y ERP57 por la modificación de su interacción con estas proteínas en respuesta a las fluctuaciones de la concentraciones de Ca^{++} dentro del lumen del RE. [118, 120, 145]

La CRT y la respuesta inmune.

La CRT nativa de diferentes parásitos ha demostrado ser inmunogénica, tanto en humanos como en animales de experimentación, conejos y ratones.[144,146,147] Muchos de los individuos seropositivos para *T. cruzi* muestran cantidades considerables de IgG anti Tc-CRT, este hecho implica que la infección natural o experimental con *T. cruzi* provee Tc-CRT a las células B inmunocompetentes, vía de la expresión de la CRT en la superficie del parásito, secreción o liberación por muerte del parásito o combinación de ambas.

La CRT ha sido identificada en las enfermedades reumáticas como un autoantígeno asociado con el complejo ribonucleoproteína Ro/SS-A,[148,149,150] sin embargo, existe controversia sobre la relación entre la CRT y el autoantígeno Ro/SS-A, ya que se han detectado autoanticuerpos contra péptidos sintéticos de CRT, CRT recombinante o formas nativas en pacientes con enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico y síndrome de Sjogren's.[121,151]

Sin embargo, también se han detectado anticuerpos anti-CRT específicos de algunos parásitos en pacientes infectados y en general, se ha observado que esta proteína es altamente inmunogénica, como en el caso de: RAL-1 una proteína homóloga de la CRT detectada en parásitos filariales en los cuales se ha caracterizado como un antígeno inmunodominante en humanos con oncocercosis.[152,153] También se han detectado anticuerpos contra la CRT de *S.*

mansoni en pacientes con esquistosomiasis,[144] así como también en pacientes con tripanosomiasis.[146] De tal manera que las investigaciones sobre la localización y blanco de la CRT en la superficie de los diferentes parásitos es de gran importancia para entender la interacción de la CRT con complejos moleculares del hospedero y en el entendimiento de la prevalecía de los anticuerpos anti-CRT que se inducen por infecciones con diferentes tipos de parásitos.

Por otra parte la CRT también interviene en diversas funciones moduladoras de la respuesta inmune en el humano, se sabe que interviene en los procesos de maduración del complejo mayor de histocompatibilidad clase 1 (MHC-1),[112,117,154] así como en la inhibición de la activación de la vía clásica del complemento al unirse e inhibir al complejo C1q,[155,156,157] esta estrategia se cree que es aprovechada por algunos parásitos que liberan su CRT al medio dentro del hospedero, para evadir de esta forma la respuesta inmune del huésped como es el caso de *Necator americanus* y *T. Cruzi.* [158,159]

También es un componente importante de los gránulos líticos de los linfocitos T citotóxicos (Tc) y de las células NKs, interactuando con la perforina regulando su actividad. [122]

En la superficie celular la CRT puede desempeñar un papel importante en el reconocimiento y remoción de las células apoptóticas, desechos celulares y constituyentes intracelulares, a través de su acción con las colectinas. Estas son una familia de moléculas del sistema inmune que reconocen y se unen a material extraño.[155,160]

En la fagocitosis la CRT se une al CD91 al encontrarse en la superficie celular interactúa con las colectinas iniciando así el proceso de la fagocitosis.[161] Alternativamente también la CRT de algunos parásitos, al inhibir la angiogenesis, pueden proteger al hospedero de las agresiones neoplásicas en desarrollo, sin embargo todavía quedan muchas cuestiones por resolver sobre las consecuencias de estas interacciones *in vivo* tanto para el huésped como para el parásito.[157,162,163]

La CRT en *E. histolytica*

En trabajos previos nuestro grupo reportó que una proteína de 51 kDa de *E. histolytica* era un antígeno inmunodominante, con una gran reactividad contra anticuerpos séricos y secretores (IgG e IgA) de pacientes con amibiasis invasora, AHA y AII.[1] También se observó que los niveles de anticuerpos dirigidos contra esta proteína se reducían considerablemente a los 6 y 12 meses después de haberse resuelto la enfermedad, lo cual sugiere que dicha proteína podría tener utilidad diagnóstica y/o epidemiológica en áreas endémicas de amibiasis.[2]

La secuenciación parcial del extremo amino terminal de está proteína de 51 kDa demostró que se trataba de una proteína semejante a las CRT descritas hasta el momento. Además la secuencia analizada presentaba una identidad del 77% con la CRT aislada de hojas de espinaca y del 70% con el precursor de la CRT de *Dictyostelium discoideum*.[3]

Por otro lado, en algunos trabajos de proteómica se han reportado evidencias de la existencia de esta molécula en la amiba, por un lado se identificó a la CRT amibiana asociada a la lectina Gal/GalNAc en dicho trabajo se sugiere que la CRT está involucrada en la unión y/o señalizaciones de Ca^{++} al interactuar con dicha lectina.[164] En otro reporte de proteómica en el cual identificaron proteínas asociadas a vesículas de transporte, se identificó también la CRT amibiana asociada a estos complejos membranales, lo que sugiere que participa a su vez activamente en los procesos de tráfico vesicular en este parásito.[165,166]

Sin embargo, no hay reportes de su purificación ni caracterización por lo que no se conoce la función de esta proteína en el trofozoíto, lo cual apoya la importancia y la relevancia de poder identificar y clonar el o los genes que codifican para esta proteína en la *E. histolytica*.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La calreticulina (CRT) es una proteína que tiene una distribución ubicua en todas las células eucariontes, con excepción de las levaduras y los eritrocitos; la CRT es una proteína asociada al RE pero también se ha localizado intracelularmente en diferentes compartimentos por lo que se considera como una proteína con propiedades multifuncionales que participa en eventos tanto intracelulares como extracelulares.[112]

En este sentido, nuestro grupo detectó previamente la presencia de una proteína de 51 kDa de *E. histolytica* como un antígeno inmunodominante en el huésped humano mostrando una gran reactividad con anticuerpos séricos y secretores (IgG e IgA) de pacientes con amibiasis invasora, AHA y AII).[2] La secuenciación parcial del extremo amino terminal de está proteína de 51 kDa demostró que se trataba de una proteína semejante a las CRT descritas hasta el momento. [3]

En base a lo anterior se plantea determinar si existía o no una CRT o una molécula semejante a ella en *E. histolytica.* Para esto se propuso identificar y clonar el gene o los genes que la codifican para posteriormente expresar la proteína recombinante en un sistema de expresión procariótico con el objeto de producir la proteína recombinante y estudiar su función en la *E. histolytica.*

JUSTIFICACIÓN

Al iniciar este trabajo no se había reportado la existencia de una molécula semejante o igual a la CRT en *E. histolytica*, y hasta ahora no se ha reportado su expresión ni purificación.

Por otro lado, tampoco se ha descrito la existencia de un RE como tal en este parásito, por lo tanto la identificación de una proteína semejante a la CRT, permitiría contar con un marcador molecular más que a su vez puede ser de utilidad pará definir la existencia o no de dicho organelo en la amiba. Así mismo, la expresión de la proteína CRT y la evaluación del papel que desempeña en la fisiología del parásito sobre todo en eventos de patogenicidad, son de gran utilidad para entender mejor la interacción de este parásito con su hospedero.

HIPOTESIS:

La secuenciación parcial de una proteína de 51 kDa en trofozoítos de *E. histolytica*, reconocida por anticuerpos circulantes y secretores de pacientes con amibiasis invasora, mostró que tiene una alta homología (77-70%) con la CRT descrita en hojas de espinaca y *D. discoideum,* lo que suguiere que tal proteína se encuentra en el trofozoíto de *E. histolytica*. De ser así la CRT se podrá detectar y clonar el o los genes que codifiquen para ella en la *E. histolytica* lo que permitirá la caracterización tanto del gene como de la proteína para este parásito en particular.

OBJETIVOS:

Objetivo general: Detectar en el trofozoíto de *E. histolytica* la presencia de la CRT o una molécula semejante a ella a través de la búsqueda y clonación del gene o los genes que codifican para la CRT, así como la identificación física de esta proteína en los trofozoítos amibianos.

Objetivos específicos:

Clonación del gene o los genes que codifican para la proteína de 51 kDa semejante a la CRT en *E. histolytica.*

Obtención de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de esta proteína y compararlas con las de otras CRT conocidas.

Determinación de su grado de identidad, y el grado de conservación de esta proteína en relación con las otras CRT reportadas en otras especies.

Producción de la proteína recombinante.

Producción de anticuerpos policlonales.

Inmunodetección de la proteína en los trofozoítos de *E. histolytica.*

MATERIAL Y MÉTODOS.

Cultivo de amibas y preparación de antígeno.

Se utilizaron trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HM1: IMSS, que se cultivaron en medio axénico TYI-S33.[167] Los trofozoítos se cosecharon en la fase logarítmica de crecimiento después de 48 h y se procesaron de acuerdo al método descrito por Aley y col.[168] con algunas modificaciones para obtener las fracciones microsomales, [169] almacenándose en alícuotas de 0.1 ml a -70ºC. La determinación de proteínas se realizó de acuerdo al método de Bradford.[170]

Cultivo de células bacterianas y preparación de células competentes.

Se utilizaron bacterias *E.coli* de las cepas; Y1090, XL1Blue y BL21 cultivadas en medio líquido Luria (LB) complementado con ampicilina (100 µg/ml).

Las células se hicieron competentes utilizando la técnica del RbCl,[171] se creció una colonia de la bacteria en 2 ml LB sin antibiótico por 12 h a 37°C y al día siguiente se hizo un subcultivo, 1ml del cultivo de toda la noche se creció en 250 ml de LB y se incubó aproximadamente 4 h más hasta alcanzar una DO_{250nm} de 0.5. Todos los siguientes procedimientos se hicieron en baño de hielo, se cosecharon las células y se resuspendieron en 4ml de la solución (TFB1) incubándose por 55 min; después se eliminó la solución centrifugándose 5 min a 250 X **g**. El botón se resuspendió en la solución (TBF2) 1.25 ml, se prepararon alícuotas de 50 µl y se congelaron en nitrógeno liquido para su posterior almacenamiento a –70°C.

Electroforesis del antígeno insoluble de *E. histolytica* y electroelución de la proteína de 51 kDa.

El patrón electroforético del Ag insoluble de *E. histolytica* se analizó en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras y no reductoras, identificando las proteínas con la tinción de azul de Coomassie. La electroelución se hizo a partir de geles preparativos de poliacrilamida-SDS al 10% de 16 cm de largo. Las bandas se tiñeron de forma permanente con azul de Coomassie y de manera temporal con

$CuCl_2$ 0.3M.[172] Una vez identificada la banda se cortó y se electroeluyó en una cámara de electroelución (Bio-Rad, Laboratorios, Hercules Ca, USA.) utilizando una solución amortiguadora de Tris-HCl 0.025 M, glicina 0.19 M y SDS al 1%. La electroelución se realizó a 4°C por 3 h a 10 mA, después se recuperó la proteína electroeluida y se dializó para su posterior concentración.

Inmunoreactividad de la fracción de 51 kDa.

Se probó la reactividad de la fracción, de 51 kDa por ELISA e inmunoelectrotransferencia, contra los anticuerpos heterólogos preparados contra CRT humana y de conejo respectivamente, anti-CRT (C-17) y CRT-283, así como con sueros de pacientes de amibiasis invasora AHA, o de individuos asintomáticos de *E. histolytica* .

El anticuerpo comercial CRT C17 (Santa Cruz Biotegnology, Ca, USA.), es un anticuerpo policlonal de cabra dirigido contra un péptido de la región carboxilo terminal de la CRT de origen humano. El anticuerpo CRT-283 es un anticuerpo de cabra contra la CRT de conejo que esta dirigido contra el péptido sintético QAKDEL que representan la secuencia 386-401 de la CRT del conejo.[122]

Para probar la reactividad de la proteína electroeluida en el sistema de ELISA se utilizaron placas de poliestireno para microtitulación (Costar, Cambridge, MA. USA.). Los pozos se sensibilizaron colocando 1 μg/ pozo de la fracción de 51 kDa o del anfígeno insoluble de *E. histolytica* en 50 μl de una solución amortiguadora de carbonatos 0.1 M, pH. 9.6 toda la noche a 4°C. Posteriormente, las placas se lavaron tres veces durante 5 min, un primer lavado con PBS-Tween al 0.5% y BSA al 0.5% y dos más con PBS-Tween al 0.5% y se bloquearon con BSA al 3% en PBS durante toda la noche a 4°C. Los pozos se lavaron nuevamente como en el paso anterior y se incubaron con los sueros de los pacientes de absceso hepático amibiano (AHA), sueros de personas no infectadas (controles) diluidos 1:1000, los anticuerpos; de cabra contra CRT humana (C17), y cabra anti-CRT de conejo (CRT-283) diluidos 1:300 durante 12 h a TA y en agitación. Los pozos se lavaron nuevamente y a continuación las placas se incubaron con un suero de cabra anti-IgG

humana y otro de conejo anti-IgG de cabra conjugados con peroxidasa (Zymed Laboratories, San Francisco, Ca. USA.) diluidos 1:1000, incubando durante 2 h a temperatura ambiente y en agitación. Como solución reveladora se utilizaron 50 μl/pozo de una solución con 10 mg de orto-fenilendiamina en 10 ml de solución amortiguadora de citratos 0.1 M, pH 4.5 y 4 μl de H_2O_2 al 30 %: la reacción se paró aproximadamente a los 5 min con 200 μl/pozo de H_2SO_4 1M y la densidad óptica (D.O.) se midió directamente en la placa a 490 nm en un microlector de ELISA (EL-312e, BIO-TEC Instruments, Co. Winooski, VT).

Inmunoelectrotransferencia.

La fracción de 51 kDa obtenida por electroelución se corrió en un gel de acrilamida/bisacrilamida 30/0.8% aln10% y fueron transferidas a papel de nitrocelulosa (NC) de acuerdo al método de Towbin.[173] La NC se cortó en tiras de 4mm que se bloquearon en PBS Gelatina 3% por 2 h a 37°C, posteriormente se incubaron con los anticuerpos, CRT-C17 y CRT-283. diluidos 1:300 por 12 h a 4°C. La reacción antígeno-anticuerpo fue detectada mediante un anticuerpo conjugado de conejo anti-IgG de cabra unido a fosfatasa diluido 1:1000 (Zymed Laboratories, San Francisco, Ca. USA) utilizando NBT/BCIP (Roche, Applied Science, Mannheim, Germany) como indicador de la reacción.

Obtención de DNA genómico y de RNA de Trofozoítos de *E. histolytica*.

Los trofozoítos de la *E. histolytica* fueron cultivados como se mencionó anteriormente y el DNA fue obtenido utilizando el estuche comercial (*DNA mini Kit*, Qiagen, Valencia Ca. USA.) siguiendo las instrucciones del proveedor.

Para obtener el DNA nuclear se utilizó la estrategia de centrifugación diferencial para separar las fracciones nucleares de las fracciones microsomales.[169] El DNA se purificó utilizando el estuche comercial mencionado anteriormente. A la fracción nuclear se le agrego la enzima RNAasa1 (Gibco, Life Technology, NY.USA.) con la finalidad de obtener un DNA sin contaminación con RNA.

La extracción del RNA se hizo utilizando el reactivo de Triazol, (*Trizol Reagent,* Gibco, Life Technology, NY.USA.) y todo el material fue tratado con dietilpirocarbonato (DPC) 0.1% V/V para eliminar las RNAasas. Partiendo de 1ml de un cultivo de trofozoítos previamente lavados y cuantificados ($5X10^6$ trofozoítos/ml), se resuspendieron en 1 ml del reactivo de triazol, se homogenizaron con un ultrasonicador (Ultrasonic Processor 130 wats model, Daigger and Company Inc. Vernon Hills USA); posteriormente se les agregaron 0.2 ml de cloroformo y se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó a 12000 **Xg** durante 15 min a 4°C y se recuperó la fase acuosa. Se precipitó el RNA con 0.5 ml de isopropanol incubándo durante 12 hrs a 4°C, se centrifugó nuevamente y se lavó el botón con etanol al 75% por centrifugación a 7500 **Xg** durante 5 min a 4°C. A continuación se evaporó el etanol (5-10 min a temperatura ambiente) y el RNA se resuspendió en 100 µl de agua milliQ libre de RNAasas.

Producción de oligonucleótidos sintéticos para el gene que codifica para la CRT de *E. histolytica.*

En base a los resultados de la secuenciación de la proteína de 51 kDa y al análisis de las secuencias de las CRT conocidas y reportadas en la base de datos del GenBank (NCBI), se seleccionaron las secuencias más conservadas para estas proteínas, y se sintetizaron oligonucleótidos degenerados; de inicio F- LCRT1 (5' AAR GTY TAT TTC GAA GAA ACH TTC 3'), y reverso R-LCRT2 (5' WCC WGA YTT RAC TTC 3') y reverso R-LCRT3 (5' ATC TGG ATC YTT AAT-3'), tomando en cuenta la preferencia de uso de codones de *E. histolytica,*[174]

Analizando la base de datos del Proyecto del Genoma de *E. histolytica* (www.tigr.org/tdb/e2kl/eh1) se seleccionó un *contig* con número de referencia (316997), en el cual se identificó un marco de lectura abierto (ORF) que codifica para una proteína denominada Ral1, homóloga de la CRT y un gene que codifica para una probable CRT (gb/EAL49855.1) reportado recientemente (2005). El análisis de estas secuencias nos permitió el diseño de oligunucleótidos específicos. Para la Ral1 los iniciadores fueron; de inicio EhRalF1, ($_{34}$5'-ACG AGC GCG AAA GTC TAT

TT-3') y reverso EhRalR2 ($_{947}$5' TTC ACC TGC CAC ACA TCA AT-3'), de inicio EhRalF3 ($_{590}$ 5'-CGC CGA AAG AAA TTG ATG AT-3') y reverso EhRalR4 ($_{609}$ 5'-ATC ATC AAT TTC TTT CGG CG-3').

Para la probable CRT se diseñaron los siguientes; de inicio,1) Ehcrt-F*Bam*H1 (5'-GGA TCC ATG TTT ACT CTT TTC CTT CTC-3'), reverso 2) Ehcrt-R*Xho*o1 (5'-CTC GAG TTA AAG CTC TTC TTT GTT TTC 3'), de inicio 3) Ehcrt-F*Bam*H1-550, (5'-GGA TCC CAA GAA AAG TTT GAT GAA-3'), y reverso 4) Ehcrt-RXhoo1-550, (5'-CTC GAG TTC ATC AAA CTT ACC TTC TTG-3') en base a la secuencia reportada para un probable gene para la CRT con número de referencia gb|EAL49855.1 reportado en la base de datos del Genoma de la *E. histolytica*,[175] a los cuales se les adicionó un sitio especifico para las enzimas de restricción *Bam*H1 y *Xho*o1 para facilitar los procesos de clonación.

Estos oligonucleótidos fueron sintetizados por el método de fosfitotriéster en un sintetizador automático de DNA modelo 391 (Aplied Biosystems, Foster City, Ca. USA.) en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Los oligonucleótidos se disolvieron en H_2O milliQ, se llevaron a una concentración de 100 μM, y se almacenaron a -70°C hasta su utilización.

Clonación del gene que codifica para la proteína de 51 kDa semejante a la CRT de *E. histolytica.*

Para identificar el gene o los genes que codifican para la CRT de *E. histolytica* procedimos a realizar una búsqueda de clonas recombinantes en bibliotecas de *E. histolytica* que fueron amablemente donadas por el Dr. Alejandro Alagón.

1.- Se utilizó una biblioteca de cDNA de *E. histolytica* HM1:IMSS,[176] construida en el bacteriófago λgt11 con insertos de 4-7 Kb clonados en el sitio de restricción de la enzima *Eco* R1, para este vector pueden utilizarse tanto anticuerpos como sondas como estrategia de búsqueda. Los fagos recombinantes se expresaron en la bacteria *E. coli* cepa y–1090. Las colonias que expresaron la CRT se identificaron por inmunodeteccion sobre réplicas de las colonias transferidas a

membranas de nitrocelulosa, mediante la utilización de una mezcla de sueros o salivas de los pacientes con AI o AHA, así como un anticuerpo de conejo anti CRT humana C17 (Santa Cruz Biotechnology, Sta. Cruz Ca. USA.) diluidos 1:100 y tratados previamente para eliminar anticuerpos anti-*E. coli*. Un anticuerpo de cabra anti-humano o anti-conejo fosfatados se utilizaron para detectar las clonas positivas con NBT/BCIP (Roche, Applied Science, Mannheim, Germany) como sustrato.

Las clonas positivas fueron purificadas por un segundo y tercer tamizaje hasta obtener una reactividad del 100 %, los fagos recombinantes fueron purificados utilizando el *Kit* (*LAMBDA MINI KIT*, Qiagen, Valencia Ca. USA.) Siguiendo las instrucciones del proveedor. Los bacteriófagos puros se almacenaron a –20°C para su posterior secuenciación.

2.- Para aislar el gene o los genes completos para la CRT se utilizó una biblioteca genómica de *E. histolytica* HM1-IMSS construida en el bacteriófago λZapII.[177] Con insertos clonados de 4-7 kb insertados en el sitio de restricción de las enzimas *Hind*III y *Eco*R1. La búsqueda se realizó por hibridación en placa. En un primer tamizaje se probaron 350,000 unidades formadoras de placa (ufp), utilizándo 50,000 ufp/caja de agar H. Estos bacteriófagos recombinantes se introdujeron en bacterias *E. coli* cepa XL1–Blue, incubando durante 12 h a 42° C. Después de que se observaron las placas líticas, se procedió a la realización de réplicas de las placas líticas sobre membranas de nylon cargadas positivamente (HYBON N+, Roche, Applied Science, Mannheim, Germany Pharmacia).

Para la desnaturalización y fijación de los bacteriófagos y del DNA, las membranas de nylon se trataron primero con una solución desnaturalizante de NaOH 0.2 M y NaCl 1.5 M; posteriormente con una solución neutralizante de Tris–HCl 0.4 M pH 7.6 y se dejaron secar en un horno a 80°C durante 2 h. (Horno de Hibridación modelo 136400, Boekel Scientific).

Posteriormente las membranas se lavaron con una solución de SSC 3X adicionada con SDS al 0.1% y se incubaron en la solución de prehibridación a 37°C durante 1 h. Inmediatamente después se retiró esta solución y se procedió a la

hibridización colocando 10 ml de la solución de hibridación adicionada con 20 pmoles del oligonucleótido marcado con digoxigenina (LCR1–DIG) por membrana y se incubó durante12 h a 62°C en el horno de hibridación.

Al finalizar la hibridación se procedió con la detección inmunológica de la marca, para esto se utilizó el estuche comercial DIG Nucleic Acid Detection Kit, (Roche, Applied Science, Mannheim, Germany.) siguiendo las indicaciones del proveedor. Para ello, se bloquearon los sitios no ocupados de la membrana con Tris-HCl 1mM pH 7.5 y gelatina al 3% durante 30 min a 37°C en agitación. Después se incubó con un anticuerpo de cabra contra digoxigenina conjugado a fosfatasa (Roche, Applied Science, Mannheim, Germany) durante 1 h en las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

Finalmente, se agregó el sustrato para la fosfatasa (5-bromo-4 cloro-3-indolilfosfato BCIP y azul de nitrotetrazolium NBT). Las clonas positivas, se picaron y se aislaron a partir de las cajas de cultivo originales; los bacteriófagos se eluyeron en medio de suspensión (MS) y se les realizó un segundo y tercer tamizaje hasta obtener clonas puras.

A partir de las clonas positivas se purificaron el bacteriófago y el segmento de DNA recombinante utilizando el *Kit* Lambda system (Qiagen, Valencia Ca. USA.) el inserto se purificó, para su secuenciación como se mencionó anteriormente.

3.- También se utilizó como estrategia la técnica de PCR utilizando como templado DNA genómico de *E. histolytica* para amplificar el gen de la CRT. Se utilizaron los oligonucleótidos tanto degenerados como específicos mencionados anteriormente sobre DNA genómico y sobre DNA obtenido de la fracción nuclear. La reacción de PCR se corrió utilizando la *Taq gold polimerasa* (Qiagen, Valencia, Ca. USA.) bajo las siguientes condiciones. 1 ciclo de 95 °C durante 10 min; 35 ciclos de: 94°C durante 30 seg, 65°C durante 30 seg y 72°C durante 2 min; y un ciclo final de 72°C durante 7min terminando en 4°C. El análisis de los fragmentos se hizo por electroforesis en geles de agarosa al 1% los cuales se tiñeron con bromuro de etidio.

Los fragmentos del tamaño esperado fueron almacenados a –20°C para su posterior secuenciación y/o clonación.

Clonación de los productos de PCR.

Los amplificados obtenidos de las PCR se clonaron en el vector pBluescript KS+ (Strategene, la Jolla, Ca. USA.). Para esto el vector pBluescript fue digerido con la enzima de restricción *Eco*RV y se le adicionó un residuo de timidina (T) en los extremos del vector cortado. Posteriormente se ligó el vector cortado (50ng) con el producto de PCR (inserto) incubándo durante 12 h a 22°C con la enzima DNA ligasa T4 (Gibco, Life Technology, Grand Island NY.USA). A continuación se transformaron las bacterias competentes *E. coli* XL1Blue ($1X10^7$células/ml) 50 µl por cada 5 µl de la reacción de ligación, introduciendo el plásmido en la bacteria por choque térmico a 42°C durante 45 seg. Las bacterias recombinantes se incubaron durante 1 h a 37°C en medio LB sin antibiótico, para finalmente sembrarlas en cajas de agar LB/ampicilina (100µg/ml)/ Xgal (100 mg/ml) /IPTG (50mg/ml) (Roche, Applied Science, Mannheim, Germany) y se crecieron durante 12 h a 37°C.

Las colonias blancas que son las recombinantes, se picaron y se sembraron en medio líquido *Terrific broat* (TB) complementado con ampicilina para proceder con la purificación de los plásmidos utilizando la técnica tradicional de Minipreps,[171] o en su caso por extracción con el estuche comercial *Plasmid mini kit*, (Biorad, Hercules, Ca. USA.) siguiendo las indicaciones del proveedor.

Posteriormente se liberó el inserto utilizando las enzimas de restricción *Bam* H1 y *Xho*1 (Roche, Applied Science, Mannheim, Germany) para continuar con el proceso de secuenciación de los insertos.

Secuenciación del DNA y análisis de homologías.

Se determinó la secuencia de nucleótidos por la técnica de PCR usando terminadores de cadena marcados con fluorescencia (Big Dye primer cycle sequencing ready reaction Kit, Perkin Elmer, Branchburg NJ, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Para ello se usaron los iniciadores específicos que

delimitan el sitio de clonación del vector, si el DNA blanco provenía de clonas, si el DNA provenía de productos de PCR se utilizaron los oligonucleótidos con los cuales se obtuvo el fragmento amplificado. Se hizó una reacción por cada uno de los iniciadores. Las reacciones de secuenciación fueron purificadas por columnas SENTRI SEP, (Aplied Biosistem, Foster city, Ca. USA.) y leídas en un secuenciador automático ABI-prism 310 (Perkin-Elmer, Branchburg, NJ. USA.).

Las secuencias de nucleótidos obtenidas y las secuencias de aminoácidos deducidas, se analizaron para determinar la homología de las secuencias con las que previamente se han reportado en la base de datos del genoma de la amiba y del GenBank.[MR] Para ello se utilizaron los programas PC/GENE y BLAST [MR] (Software Systems), en el servidor de internet de la NCBI. [178,179]

Subclonación de los plásmidos recombinantes y producción de las proteínas recombinantes EhCRT-1-6H, EhCRT-C-6H y EhCRT-N-6H.

Los plásmidos recombinantes pBluescript-KS+ en los cuales se clonaron los productos de la PCR denominados pB-*Ehcrt* y pb-*Ehcrt*-C y pb-*Ehcrt*-N que a su vez fueron verificados por secuenciación y que corresponden al gen completo y a la mitad del gen que codifica para la CRT en la *E. histolytica* respectivamente fueron subclonados en el vector procariótico de expresión pProExHT-b (Gibco, Life Technologies, Grand Island NY.) unidos a 6 residuos de histidina en su región NH_2-terminal, dirigiendo la clonación con los sitios de restricción *Bam*H1/*Xoo*1. Las bacterias competentes BL21 se transformaron con estos plásmidos recombinantes.

La expresión de las proteínas recombinantes, se realizó a través de la inducción del promotor utilizando una solución de IPTG a una concentración final de 1mM. Se partió de un cultivo de toda la noche en medio líquido 2XYT complementado con ampicilina 100µg/ml, de cada una de las clonas antes mencionadas, al siguiente día se hizo un subcultivo de 2 h más a 37°C hasta que se obtuvo una DO_{600nm} de 0.5 posteriormente se le agrego una solución 1M de IPTG y se continuó la incubación por 4 h más para inducir la expresión de las proteínas recombinantes. Posteriormente el cultivo se centrifugó a 3000 X**g** por 12 min y se

resuspendieron las células bacterianas en 4 ml de solución de lisis (solución B). El lisado bacteriano se centrifugó por 30 min a 12000 **Xg** recuperándose el sobrenadante, al cual se le adicionó una suspensión de agarosa Ni-NTA 50%, incubándo a TA por 1 h en agitación. La mezcla se pasó a través de una columna de filtración y la proteína recombinante se eluyó con una solución amortiguadora de urea 8M pH 4.5 (solución E) utilizando el protocolo del *kit* de expresión y purificación de proteínas recombinantes (*QIAexpressionist*, Qiagen. Valencia, Ca. USA). Las fracciones seleccionadas se probaron por electroforesis en geles de acrilamida al 10%.

Inmunoreactividad de las proteínas recombinantes EhCRT-6H, EhCRT-C-6H, y **EhCRT-N-6H por ELISA**

Las fracciones seleccionadas se dializaron contra una solución 19 mM de PBS para eliminar la urea y se utilizaron para probar su reactividad contra anticuerpos IgG de pacientes de AHA tanto por ELISA como por *Western blot*. Estos inmunoensayos se diseñaron básicamente como se mencionó previamente. Solo que para el caso del ELISA, los pozos se acoplaron con 15 ng de la proteína recombinante, probándo su reactividad contra anticuerpos heterólogos y contra mezclas de sueros de 5 pacientes de AHA y 5 individuos no parasitados con *E. histolytica*. En el caso del *Western blot* se corrieron 10 µg de cada una de las proteínas recombinantes por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de NC como se mencionó anteriormente.

Secuenciación de las proteinas recombinantes por espectrofotometría de masas (LC/ESI-MS/MS).

Las bandas de cada una de las proteínas recombinantes fueron cortadas de un gel teñido con azul de Coomassie, desteñidos y reducidos, lavados y digeridos con tripsina (Sigma Co. St. Louis Mo. USA.) de acuerdo a la metodología previamente publicada.[180]

El volumen recuperado de la extracción se concentró por evaporación en una centrifuga de vacio a TA y después se ajustó a un volumen final de 20 µl con ácido fórmico al 1%.

El análisis espectrofotométrico de los péptidos obtenidos se desarrolló en un sistema 3200 QTRAP (Applied Biosistems, MDS Scienx, Ontario Canada), equipado con un recurso de nano electroespray y un nano flujo LC System (agilent 110 Nano Pump, Waldbronn, Germany). Las muestras digeridas fueron desaladas usando Zip Tip-18, y separadas sobre una columna Zorbax 300SB C-18 (3.5 µm Di X 75 µm De X 50 mm, Agilent Germany) equilibrada con acetonitrilo 2%, acido fórmico 0.1%, usando un gradiente lineal de acetonitrilo del 2 al 70 %, ácido fórmico 0.1% por un periodo de 80 min con un rango de flujo de 300 nL /min, el voltaje del spray fue de 2.4 kV, el espectro fue obtenido de forma automática usando un sistema de Información Dependiente de Adquisición (IDA). Los iones precursores fueron seleccionados en Q1 usando el modo aumentado MS. El rango del Scan para EMS seleccionado fue m/z 400-1500 y 4000amu/s. La búsqueda e identificación de las proteínas de la Base de Datos NCBI se hicieron usando el software Mascot (htt://www.matrixscience.com)

Producción de anticuerpos policlonales.

Se utilizaron 60 ratones Balb/c (machos) de 9 semanas de edad, divididos en tres grupos; el G1 se inmunizó contra Ag de *E. histolytica*, G2 con la proteína recombinante *Eh*CRT-6H y el G3 con la *Eh*CRT-C-6H. Antes de iniciar el esquema de inmunización se les hizó un sangrado preinmune por vena retroorbitaria una semana después se inicio el esquema de inmunización. La primera inoculación se realizó por vía subcutánea utilizando 0.1 ml de adyuvante incompleto de Freund (Gibco) más 50µg de proteína/ratón. Las siguientes inoculaciones se realizaron cada 15 días por tres meses, utilizando la misma cantidad de proteína recombinante pero sin adyuvante y por vía intramuscular. Ocho días después de la última inmunización se extrajo la sangre de cada ratón por insición de la vena axilar derecha hasta desangrarlos, de la cual se obtuvo el suero y se guardó a -20°C hasta su utilización.

Los títulos de los anticuerpos se evaluaron por la técnica de ELISA siguiendo el mismo procedimiento descrito previamente pero con algunas modificaciones; en este caso los pozos para microtitulación se sensibilizaron colocando 1µg/pozo de Ag de *E. histolytica* o 15 ng de las proteínas recombinantes *Eh*CRT y *Eh*CRT-C respectivamente y se hicieron diluciones seriadas desde 1:100 hasta 1:10,000 de los sueros de los ratones preinmunes e hiperinmunes.

También se evaluó la reactividad de estos anticuerpos por Inmunoelectro-transferencia. Las proteínas recombinantes y el Ag amibiano se corrieron en un gel de acrilamida al 10% y fueron transferidas a papel de nitrocelulosa (NC) como se menciono anteriormente.

Purificación de inmunoglobulinas (IgGs) de ratón.

De los sueros preinmunes e hiperinmunes se purificaron las gammaglobulinas por precipitación con sulfato de amonio al 30%. A un volumen de suero se le agregó un volumen igual de una solución saturada $(NH_4)_2SO_4$ pH 8 y se incubó a 4°C por 30 min, posteriormente se centrifugó esta solución a 8,000 **Xg** por 20 min a 4°C el sedimento se resuspendió en la mitad del volumen original con agua destilada; se agregaron un tercio del volumen de sulfato de amonio y se dejó en agitación por 30 min a 4 °C se centrifugó nuevamente y se resuspendió el botón en 1ml de PBS, el cual se dializó con esta solución por 12 h. Se le determinó la concentración de proteína por Bradford, se almacenó a -20°C hasta su utilización.

Purificación de IgG por columna de afinidad.

Se montó una columna de (Proteína–A–sefarosa), de 1.5 x 2.5 cm, equilibrada con PBS. Una muestra de 1ml inmunoglobulinas precipitadas con sulfato de amonio, con una concentración de 10 mg/ml, se colocó en la columna y se incubó a temperatura ambiente por 30 min la columna se lavó con PBS y se recuperaron alícuotas de 1ml a las que se les determinó su DO a 280 nm en un espectrofotómetro. La columna se lavó hasta que la D.O de las fracciones fue

cercana a (< 0.01). Después, se pasaron por la columna 4.5 ml de una solución de glicina–HCl 0.1 M pH 2.3; el pH del eluido se neutralizó con una solución Tris- Base 0.5 M, la columna se lavo nuevamente con PBS. Las fracciones del eluído con glicina–HCl que contenían la IgG se mezclaron y se concentraron por ultrafiltración, en celdas de ultrafiltración, usando una membrana X-100 DIAFLO al concentrado se le determinó la cantidad de proteína por el método de Bradford, se hicieron alícuotas de 200 µl las que se guardaron a -20 °C hasta su utilización.

Inmunodetección de la CRT en los tofozoítos amibianos.

Trofozoítos cultivados en medio axénico y en fase de crecimiento exponencial, se adhieren a cubreobjetos previamente tratados con etanol 100% incubándose durante 2 h a 37° C; las células se fijaron con PBS /formaldehído al 2.5% durante 30 min a 4°C. A continuación, los cubreobjetos con los trofozoítos fijados se lavaron en tres ocasiones con PBS; se permeabilizaron y se bloquearon las células incubando con PBS-gelatina al 2% Tritón-X100 0.2% durante 12 hrs a 37°C, después se incubaron con 50 µl de la solución del las IgGs de ratón -anti-EhCRT, anti-EhCRT-C y anti-AgEh (1:50) durante 12 h a TA y se lavaron con PBS, después se les agregó el segundo anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa (1:500) y se incubaron durante 1h a TA, se lavaron posteriormente dos veces y se les agregó el sustrato para la fosfatasa NBT/BCIP, la reacción se paró lavando con agua destilada, los ensayos se hicieron por duplicado. Las células se contratiñeron con eosina acuosa y se montaron sobre portaobjetos con glicerolgelosa (Dako, Cytomation, Ca, USA). Las preparaciones fueron observadas en un microscopio óptico (Olympus).

Al mismo tiempo se decidió realizar la inmunodetección de la EhCRT en trofozoítos de *E. histolytica* localizados en abscesos hepáticos amibianos previamente producidos en hámsters de acuerdo a la metodología descrita por el grupo del Dr. Pérez-Tamayo.[26] Por cirugía se extrajeron los hígados de los animales después de 6 días de haberse inoculado con 250,000 trofozoítos de *E. histolytica*, se procesaron usando técnicas de Inmunohistoquímica clásicas, es decir los hígados se

fijaron con paraformaldehido al 2%, se incluyeron en parafina y se hicieron microcortes de 5µm, posteriormente se realizó la inmunodetección de la EhCRT en los trofozoítos presentes en estos microcortes siguiendo la técnica descrita para la inmunodetección de la EhCRT en los trofozoítos, con algunas modificaciones, las preparaciones se bloquearon con una solución de TBS- suero de cabra al 3% y las concentraciones de los Acs también se cambiaron; el 1er Ac se utilizó a una dilución de 1:25, y el segundo a una dilución de 1:150, los cuales se adsorbieron previamente con una preparación de polvo de hígado de hámster normal.

ACERVO BIBLIOGRÁFICO DE INFORMACIÓN
ARCHIVO HISTÓRICO

RESULTADOS.

Búsqueda del gene que codifica para la probable *EhCrt* en una biblioteca recombinante de DNAc de *E. histolytica*.

Come se mencionó anteriormente se reportó la identificación de una proteína de 51 kDa como una probable CRT para la *E. histolytica* después de la secuenciación de la región N terminal, en este trabajo también se evaluó la reactividad de la fracción de 5l kDa contra los sueros de pacientes de AHA y anticuerpos heterólogos CRT-C17 y CRT-283 por inmunoelectro-transferencia y ELISA.[3]

Estos resultados se muestran en la tabla 1, donde se puede observar en base a estas reactividades que ambos anticuerpos heterólogos reconocen la fracción de 51 kDa así como, también, los sueros de los pacientes de AHA por tal motivo se decidió utilizar estos anticuerpos para la inmunodetección sobre las librerías recombinantes.

Tabla 1. Reactividad de la fracción de 51 kDa de *E. histolytica* por ELISA.

Grupo/Anticuerpo	Extracto de membranas *E. histolytica*: HM1:IMSS	Fracción de 51 kDa. *E. histolytica*: HM1:IMSS
Negativo	0.461 ± (0.08)	0.386 ± (0.054)
Pacientes de AHA	0.885 ± (0.099)	0.772 ± (0.117)
Anti-CRT (283)	0.415 ± (0.067)	0.531 ± (0.211)
Anti-CRT (C-17)	0.557 ± (0.149)	0.522 ± (0.121)

Reactividad de anticuerpos séricos anti-*E. histolytica* de pacientes con absceso hepático amibiano (AHA) e individuos controles, y anticuerpos heterólogos anti CRT. Como antígeno se utilizó un extracto rico en membranas o la fracción de 51 kDa. Los valores representan el promedio de la densidad óptica (490 nm) ± la desviación estándar (DS) de dos ensayos. Los sueros de pacientes o individuos controles fueron mezclas del suero de 5 individuos.

Por otro lado, en base al tamaño de los fragmentos clonados en el bacteriófago λgt11 y el tamaño del genoma amibiano, se determinó que requeríamos probar por lo menos 850,000 ufp provenientes de la biblioteca λgt11 de cDNA de *E. histolytica*. La búsqueda se hizo por inmunodetección utilizando en el primer escrutinio la mezcla de sueros de los pacientes de AHA en una dilución 1:500. Se obtuvieron 115 clonas positivas para estos anticuerpos, los siguientes tamizados de limpieza de estas 115 clonas preseleccionadas se hicieron utilizando el anticuerpo C-17, después del cuarto tamizaje seleccionamos 3 clonas λgt11 que permanecieron reactivas contra el anticuerpo CRT–C17, las cuales se denominaron; gt11–A, B y C a continuación los bacteriófagos recombinantes de estas clonas se purificaron. Y se determinó la secuencia de nucleótidos mediante la técnica de PCR, en el que se amplificó el inserto recombinante en ambas direcciones por medio de la utilización de iniciadores que delimitan el sitio de policlonación de este vector λgt11, el tamaño de los insertos fue de 800, 2,000 y 1,700 pb respectivamente. Se obtuvieron dos secuencias, una proveniente de la clona gt11–B y la otra de la clona gt11–C. Al realizar el análisis y comparación de estas secuencias contra las secuencias registradas para otras CRT de las diferentes especies reportadas en la base de datos del GenBank, se observó que dichas secuencias codifican para un RNAr de *E. histolytica* con una identidad del 98 y 92% para la clona B y C respectivamente y que dichas secuencias son muy ricas en A y T (datos no mostrados).

Sobre la base de estos resultados se decidió marcar con digoxigenina el oligonucleótido degenerado denominado L-CRT1 (AAR GTY TAT TTC GAA ACH TTC GAA AAY), que corresponde a la secuencia de 9 aminoácidos de la región amino-terminal de la proteína de 51 kDa de *E. histolytica* que previamente se había secuenciado y después se diseñó y sintetizó dicho oligonucleótido. Con esta sonda se probaron las clonas antes mencionadas del bacteriófago λgt11 por hibridación en un *Dot blot* y no se obtuvo ninguna reacción positiva (datos no

mostrados). Por este motivo se decidió no continuar con la secuenciación de las otras clonas obtenidas por inmunoreactividad del banco DNAc de la *E. histolytica*.

Búsqueda del gene que codifica para la probable *Ehcrt* en una biblioteca recombinante genómica de *E. histolytica*.

Se procedió a realizar el tamizaje de la librería genómica de *E. histolytica* construida en el bacteriófago λZAPII. La primera búsqueda sobre esta biblioteca se hizo por la técnica de hibridación en placa, utilizando el oligonucleótido degenerado L-CRT1–DIG, en condiciones de alta astringencia, con el fin de evitar uniones inespecíficas.

Se analizaron 350,000 fagos de la biblioteca genómica (λZAPII), del primer tamizaje obtuvimos 10 clonas positivas contra la sonda LCR1–DIG, las cuales se picaron, se aislaron y se purificaron por un segundo y tercer tamizaje con la misma sonda, obteniéndose finalmente 3 clonas denominadas; Z–6A1, 6A2 y 5B8, estas clonas también se probaron por inmunoreactividad contra el anticuerpo CRT–C17 y se obtuvo una buena reacción positiva, por lo que se procedió a la purificación de los bacteriófagos recombinantes de cada una de las clonas y a la secuenciación del DNA recombinante utilizando en este caso los iniciadores T7 y T3 que delimitan el sitio de policlonación en este vector λZAPII.

El análisis de las secuencias resultantes y su comparación contra la base de datos del GenBank, mostró que las secuencias obtenidas de estas clonas no correspondían con la proteína buscada. La clona Z–6A1 codifica para una carboxilasa de *E. coli,* la Z–6A2 para una proteína de choque térmico de *E. histolytica* y la Z–5B8 para RNAr de *E. histolytica* (datos no mostrados).

Sin embargo, esta última clona Z–5B8 coincidía con los resultados que se habían obtenido del tamizaje de la biblioteca de cDNA en el vector λgt11 (clonas gt11– B y C).

Por este motivo se regresó hacia el análisis de las secuencias de las CRTs reportadas en la base de datos del GenBank y al hacer la comparación de las

secuencias de nucleótidos obtenidas de las clonas gt11– B y C, y Z–5B8, las cuales codifican para secuencias de RNAr de *E. histolytica* se observó que había una homología del 40% contra las secuencias de las CRTs registradas en la base de datos.

En base a estos resultados se decidió probar la reactividad de los anticuerpos heterológos; CRT-C17 y CRT-283, así como, también anticuerpos de pacientes de AHA, y con la sonda L-CRT1-DIG contra el RNA de la *E. histolytica* por ELISA y por *Dot blot* respectivamente.

Los resultados obtenidos mostraron que los anticuerpos utilizados presentan una alta reactividad contra el RNA de la *E. histolytica* por ELISA (tabla 2). Mientras que con la sonda L-CRT1-DIG no se obtuvo hibridación positiva contra el RNA por *Dot blot*.

Tabla 2. Evaluación de la reactividad del RNA de la *E. histolytica* por ELISA contra anticuerpos heterólogos contra la CRT.

Grupos/Anticuerpos	RNA total de *E. histolytica*
Negativos	0.103 ± 0.064
AHA	0.353 ± 0.098
CRT–C17	1.950 ± 0.115
CRT–283	0.208 ± 0.045

Reactividad de diferentes anticuerpos contra; el RNA de *E. histolytica*, por ELISA. Los resultados se muestran como valores de D.O. a 490 nm, ± la desviación estándar (DS) de los ensayos hechos por duplicado. Los sueros de pacientes o individuos controles fueron mezclas del suero de 5 individuos.

Esta alta reactividad indica el porqué de las dificultades que se tuvieron para la identificación de clonas que codifican para la CRT amibiana, en la búsqueda sobre las librerías recombinantes de la *E. histolytica* utilizadas al usar estos anticuerpos sobre todo el CRT-C17 que es el que mayor reactividad dio contra la fracción ribosomal de la *E. histolytica*, por lo tanto, al no contar con

buenos reactivos para la búsqueda del gene para la CRT de *E. histolytica* por escrutinio o búsqueda de las librerías de *E. hisytolytica* utilizadas se decidió no continuar con esta estrategia de búsqueda del gene de nuestro interés.

Amplificación del gene de la CRT de *E. histolytica* por PCR.

Como mencioné en la estrategia metodológica, la otra posibilidad de identificar y clonar el gene de interés era utilizando la técnica de PCR. Por lo tanto en base al análisis comparativo de las CRT reportadas en la base de datos del GenBank, se identificaron las secuencias más conservadas de las CRT reportadas, en base a estas secuencias se diseñaron y sintetizaron diferentes oligonucleótidos degenerados, utilizando la preferencia de uso de codones para la *E. histolytica*, los cuales se denominaron; de inicio F-LCRT1, reverso R-LCRT2 y reverso R-LCRT3.

La utilización de estos iniciadores en una reacción de PCR sobre DNA genómico de *E. histolytica* como molde, nos permitió obtener productos de amplificación que corresponden a los tamaños esperados de 400 y 800 pb respectivamente (datos no mostrados), pero se amplificaron también otras bandas tanto por arriba como por abajo de los tamaños esperados, por lo que fue necesario seleccionar las bandas. El fragmento amplificado de 800 pb se seleccionó para posteriormente cortar la banda correspondiente del gel de agarosa, purificar el DNA de la agarosa y se reamplificó para obtenerlo en cantidades suficientes para su posterior secuenciación.

Las secuencias de estos productos no fue posible analizarlas correctamente porque se obtuvieron repetidamente dos secuencias traslapadas, tal parecería que se hubiesen amplificado los dos alelos del mismo gene, por lo que tuvimos que realizar la clonación de estos fragmentos de PCR en el vector pBluescript.

Se obtuvieron clonas recombinantes de las cuales se purificaron los plásmidos, se liberaron los insertos y se secuenciaron utilizando los iniciadores del vector que delimitan el sitio de policlonación (iniciador universal y reverso), en este

caso la secuencia obtenida corresponde a una proteína de choque térmico de la *E. histolytica* (datos no mostrados).

Nuevamente regresamos a la Base de Datos del GenBank y sobre todo del genoma de la amiba y comparando la secuencia de la CRT de *Dictiostelium discoideum* contra el banco del Genoma de la *E. histolytica* (The Institute for Genomics Research TIGR) que estaba en proceso de concluirse, logramos identificar un *contig* con número de referencia 316997 el cual presentaba un marco de lectura abierto que codifica para una proteína denominada RAL1, la cual es una proteína homologa a la CRT descrita en el parásito *Onchocerca volvulus*. A partir de este análisis se diseñaron los oligonucleótidos específicos denominados de inicio RalF-1 y reverso Ral-R2, de inicio Ral-F3 y reverso RalR-4. Su utilización en ensayos de PCR sobre DNA genómico de la *E. histolytica* permitió amplificar fragmentos de los tamaños esperados (datos no mostrados). La combinación de los oligonucleótidos; RalF-1 y Ral-R2 amplificó un fragmento de 913 pb, la combinación RalF-1 con RalR-4 amplificó un fragmento de 575 pb y combinando Ral-F3 con Ral-R2 se obtuvo un fragmento de 357 pb, Sin embargo las secuencias obtenidas de estos amplificados tampoco fueron útiles, por lo que se regresó al análisis de la Base de Datos del Gemona de la *E. histolytica.*

En esta ocasión se encontró un gene que había sido recientemente reportado (octubre del 2005) con número de referencia EAL49855.1[180] que codifica para una proteína semejante a la CRT. De este análisis se diseñaron y sintetizaron iniciadores específicos que delimitan a este gene denominados; de inicio,1) EhcrtF*Bam*H1, reverso 2) *Ehcrt*R*Xho*1 y de inicio 3) *EhcrtBamH*1 550 y reverso 4) *EhcrtXho*1 550, a los cuales se les adicionó un sitio de restricción específico para las enzimas de restricción *Bam*H1 y *Xho*1 para facilitar los procesos de clonación.

También en base a la reactividad observada contra la fracción ribosomal de la *E. histolytica* con los anticuerpos C17 y CRT-283, la sonda L-CRT1-DIG y además de la homología que estas secuencia de RNAr presentan contra las secuencias de las CRT reportadas, se decidió utilizar como molde en esta ocasión un DNA de la *E. histolytica* libre de RNA al cual denominamos DNA nuclear.

El PCR bajo estas condiciones y con la combinación de los iniciadores 1 y 2 nos amplificó un fragmento de 1200 pb que corresponde a la secuencia completa del gene, la combinación 3 y 2 produjo un fragmento de 650 pb y la combinación 1 y 4 dio lugar a un fragmento de 550 pb. Como se muestra en la figura1, el tamaño de dichos fragmentos corresponde a los tamaños esperados.

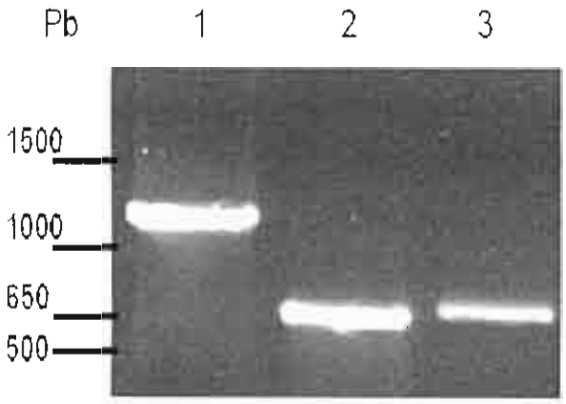


Figura 1. Fragmentos amplificados de la probable CRT de *E. histolytica* por PCR utilizando los oligoucleótidos específicos para el gen que codifica para esta proteína y sobre DNA nuclear de *E. histolytica*. 1) corresponde al amplificado *Ehcrt*-1200 (1200 bp). 2) *Ehcrt*-N (550 bp). 3) *Ehcrt*-C (650 bp). Gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio, los marcadores moleculares son indicados en pares de bases.

Como se mencionó en material y métodos, estos fragmentos se secuenciaron por la técnica de PCR utilizando el reactivo de BygDye, en esta ocasión se emplearon los mismos iniciadores con los que se amplificó el fragmento y se obtuvo una secuencia parcial (figura 2). Al realizar el análisis y comparación de nuestra secuencia por BLAST contra la base de datos del genoma de la *E. histolytica,* observamos que corresponde a la secuencia reportada del gene EAL49855.1 de la cual partimos para el diseño de los oligonucleótidos específicos.

```
97  tca gga aag gca tta gga cca ttt aaa ata gta agt ggg aaa tgg tat gga gat gct aat aat aaa gga ctt
     S  G  K  A  L  G  P  F  K  I  V  S  G  K  W  Y  G  D  A  N  N  K  G  L
73  caa aca tca gaa gac aac aaa ttt tat att gca gca gct aaa ctt gat gaa gag ttt agt aat aaa gat aaa
     Q  T  S  E  D  N  K  F  Y  I  A  A  A  K  L  D  E  E  F  S  N  K  D  K
145 aat ttg att gtt caa tac aat ctt aaa ttt gaa caa gga att gat tgt gga gga gga tat att aaa tta ctt cca
     N  L  I  V  Q  Y  N  L  K  F  E  Q  G  I  D  C  G  G  G  Y  I  K  L  L  P
217 aag aaa tca att gaa agt gaa gag aaa ttt aca cct gaa tct gaa tat aat att atg ttt gga cca gat gta
     K  K  S  I  E  S  E  E  K  F  T  P  E  S  E  Y  N  I  M  F  G  P  D  V
289 tgt gga gga tca aaa aga aca cat gtt att atg aat tat aaa gga aag aat aat tta att aga aaa gaa att
     C  G  G  S  K  R  T  H  V  I  M  N  Y  K  G  K  N  N  L  I  R  K  E  I
361 aaa tgt gaa tca gat gat att tca cat tta tac aca tta att att aga cca aat aat acc tat gta gtt aaa att
     K  C  E  S  D  D  I  S  H  L  Y  T  L  I  I  R  P  N  N  T  Y  V  V  K  I
433 gat gga gta gaa aaa caa gaa gga aag ttt gat gaa gat tgg gat atg tta gca cca aaa gaa att gat
     D  G  V  E  K  Q  E  G  K  F  D  E  D  W  D  M  L  A  P  K  E  I  D
505 gat cca aat gtc tca aaa cca gct gat tgg gtt gat gaa aag gaa att gat gat cca aat gat aag aaa
     D  P  N  V  S  K  P  A  D  W  V  D  E  K  E  I  D  D  P  N  D  K  K
577 cca gaa gga tgg gat gat att cct aaa act att gtt gat cca aat gct aag aaa cca gaa gaa tgg aat
     P  E  G  W  D  D  I  P  K  T  I  V  D  P  N  A  K  K  P  E  E  W  N
649 gat gaa gat gat gga gaa tgg gaa gca cca aca att gaa aat cca gaa tat aaa gga gaa tgg aag aaa
     D  E  D  D  G  E  W  E  A  P  T  I  E  N  P  E  Y  K  G  E  W  K  K
```

Figura 2. Secuencia de los nucleótidos y aminoácidos deducidos del fragmento obtenido por el PCR (*Ehcrt*-1200), se obtuvo una secuencia de 718 nucleótidos, los cuales codifican para 238 aminoácidos, que corresponden aproximadamente a 2/3 de la proteina completa.

El análisis de esta secuencia sólo se utilizó para asegurarnos de que los amplificados correspondían al gene de interés, ya que no se tenía la secuencia completa, por lo que se procedió a la clonación de los productos amplificados por PCR utilizando el vector pBluescript-KS+. De esta clonación se obtuvieron finalmente 3 clonas recombinantes denominadas pB-*Ehcrt*-1200, pB-*Ehcrt*-C, y pB-*Ehcrt*-N, a partir de las cuales se purificaron los plásmidos correspondientes y se secuenciaron utilizando en este caso los iniciadores universales que delimitan el sitio de policlonación para este vector. Se obtuvieron las secuencias completas para cada una de las clonas y se procedió a realizar el análisis de homología con las secuencias reportadas en la base de datos del genoma de la amiba.

El resultado de este análisis resultó en una homología del 98% a nivel de nucleótidos con el probable gene de la CRT (AEL49855.1) de la *E. histolytica* que

fue reportado recientemente, mientras que a nivel de aminoácidos la homología es de 100%. Por otro lado, se encontró también homología con un segundo gene o pseudo gene con número de referencia (gi|67466599) que aparentemente codifica para una probable CRT pero de menor tamaño (139 aa) como se muestra en la figura 3.

En cuanto a la caracterización del gene *Ehcrt* clonado en este trabajo, se determinó que presentaba un marco de lectura abierto de 1178 pb, no presenta intrones y codifica para una proteína de 389 aminoácidos con un peso teórico de 45.8 kDa. Además la composición de bases de este gene presenta un alto contenido de bases (A-T) por arriba del 70% lo cual es característico de los genes amibianos. Por otro lado, se encontraron en las secuencias obtenidas, los motivos altamente conservados CRT-I a CRT-VI los cuales caracterizan a esta familia de proteínas, así como también otras secuencias características propias de estas proteínas como son los probables sitios de glicosilación, motivos probables de unión al componente C1q del sistema del complemento sérico, sitios de unión a Ca^{++} y la secuencia carboxilo–terminal KEEL que para el caso de la *E. histolytica* parece ser una secuencia diferente a las que se han reportado para las proteinas asociadas al RE -KDEL/HDEL (figura 3).

Figura 3.

```
                1
gi|5701263          *          KVYPeET eEhgwKxIwS kw
PCR-EhCRT-N     MFTLFLLIAL SSAKVYFHET FENRDKWIDS TSSGKALGPF KIVSGKWYGD ANNKGLQTSE DNKFYIAAAK LI
PCR-EhCRT1200   MFTLFLLIAL SSAKVYFHET FENRDKWIDS TSSGKALGPF KIVSGKWYGD ANNKGLQTSE DNKFYIAAAK LI
PCR-EhCRT-C
gi|6747971      MFTLFLLIAL SSAKVYFHET FENRDKWIDS TSSGKALGPF KIVSGKWYGD ANNKGLQTSE DNKFYIAAAK LI
gi|67466599     MFTLFLLIAL SSAKVYFHET FENRDKWIDS TSSGKALGPF KIVSGKWYGD ANNKGLQTSE DNKFYIAAAK LI
                ──────────────────────────────►
                        N-Dominio
                81
                                                                                  *
PCR-EhCRT-N     NLIVQYNLKF EQGIDCGGGY IKLLPKKSIE SEEKFTPESE YNIMFGPDVC GGSKRTHVIM NYKGKNMLIR KI
PCR-EhCRT-1200  NLIVQYNLKF EQGIDCGGGY IKLLPKKSIE SEEKFTPESE YNIMFGPDVC GGSKRTHVIM NYKGKNNLIR KI
PCR-EhCRT-C
gi|6747971      NLIVQYNLKF EQGIDCGGGY IKLLPKKSIE SEEKFTPESE YNIMFGPDVC GGSKRTHVIM NYKGKNNLIR KI
gi|67466599     NLIVQYNLKF EQGIDCGGGY IKLLPKKSIE SEEKlhlnln iilcldqmyv edqKehlll
                               CRT-I                          CTR-II
                161          *          *
PCR-EhCRT-N     SHLYTLIIRP NNTYVVKIDG VEKQEGKFDE
PCR-EhCRT-1200  SHLYTLIIRP NNTYVVKIDG VEKQEGKFDE DWDMLAPKEI DDPNVSKPAD WVDEKEIDDP NDKKPEGWDD II
PCR-EhCRT-C                           QEGKFDE DWDMLAPKEI DDPNVSKPAD WVDEKEIDDP NDKKPEGWDD II
gi|6747971      SHLYTLIIRP NNTYVVKIDG VEKQEGKFDE DWDMLAPKEI DDPNVSKPAD WVDEKEIDDP NDKKPEGWDD II
                                                                          CRT-III
                          ──────────────────────►
                                P-Dominio
                241
PCR-EhCRT-N                                                                                CRT
PCR-EhCRT-1200  KKPEEWNDED DGEWEAPTIE NPEYKGEWKP KRIPNPAYKG EWVHPQIANP DYVYDPELYK YDSFAYIGID VV
PCR-EhCRT-C     KKPEEWNDED DGEWEAPTIE NPEYKGEWKP KRIPNPAYKG EWVHPQIANP DYVYDPELYK YDSFAYIGID VV
gi|6747971      KKPEEWNDED DGEWEAPTIE NPEYKGEWKP KRIPNPAYKG EWVHPQIANP DYVYDPELYK YDSFAYIGID VV
                     CRT-IV                     CRT-V
                                                                          C-Dominio
                321                                                                     389
PCR-EhCRT-N                                                                              *
PCR-EhCRT-1200  DDILITDDIE EAEKEAKVIL ERNAAEKKMR DEIKEAEKQK EEEAKKEAEK QKEEETKEEI KKEENKEEL
PCR-EhCRT-C     DDILITDDIE EAEKEAKVIL ERNAAEKKMR DEIKEAEKQK EEEAKKEAEK QKEEETKEEI KKEENKEEL
gi|6747971      DDILITDDIE EAEKEAKVIL ERNAAEKKMR DEIKEAEKQK EEEAKKEAEK QKEEETKEEI KKEENAEEL
```

Figura 3. Multialineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida de la secuenciación de los productos obtenidos por PCR comparadas con la base de datos del genoma de la amiba. (*) Señala la secuencia de aa usadas para diseñar los iniciadores sentido y antisentido; las flechas indican el inicio de los principales dominios en los que se dividen la familia de CRT. dominio-N (1-170 residuos de aa), dominio-P (171-290 residuos) y dominio-C (290-389 residuos). En negritas se indican los motivos conservados (CRT I – IV). (+) Representa los probables sitios de glicosilación. Las secuencias encerradas en cajas indican probables motivos de unión al C1q y las secuencias subrayadas indican los sitios de unión a Ca^{++}. gi|5701263 representa la secuencia del péptido de la proteína de 51 kDa previamente reportada por nosotros.[4] gi|6747971 secuencia del probable gene para la CRT de *E. histolytica* en el cual nos basamos para el diseño de los iniciadores. gi|67466599 secuencia de un segundo probable gene para la CRT de *E. histolytica* pero de menor tamaño reportados en la base de datos del genoma de la amiba.[181]

Todas estas características confirmaron que el gene que se clonó corresponde al mismo que se reportó como una probable CRT para la *E. histolytica* y que este gene está presente en los trofozoítos de la *E. histolytica*.

Por otro lado al realizar el análisis de la comparación entre la secuencia de aminoácidos de la clona pb-EhCRT-1200 contra las secuencias de aminoácidos reportadas en la base de datos del GenBank (NCBI), se observa una identidad del 64% con la CRT de *D. discoideum*, interesantemente también se determinó una alta identidad con las secuencias de CRT de mamíferos, ratón 53% y humano 54%, mientras que las secuencias de las CRT de otros protozoarios como son *E. gracilis*, *C. reinhardtii*, mostraron un menor grado de conservación del 54%, mientras que los protozoarios parásitos intracelulares *L. donovani* y *T. cruzi* presentaron una identidad menor del 42%. Para el caso de algunos parásitos multicelulares como son *T. solium* y *S. mansoni* mostraron una identidad del 46 y 50% respectivamente y en el caso de algunas garrapatas se obtuvo una identidad del 53 al 56%, también para las CRTs de plantas se observó una identidad del 50 al 52%, sin embargo, se observa que el grado de homología de la secuencia de nuestra proteína EhCRT contra las secuencias analizadas corresponde en un rango desde el 57 al 76% para todas las especies analizadas (Tabla 3). Esto confirma el alto grado de conservación de esta proteína CRT a través de los diferentes grupos de organismos.

Tabla 3. Grado de identidad de la EhCRT recombinante contra secuencias de aminoácidos reportadas en la base de datos del GenBank.

Organismo	Numero de acceso	Identidad (%)	Homologia (%)
E.histolytica	gi|67479719	389/389 **100**	389/389 **100**
D.discoideum	gi|2654397	145/225 **64**	172/225 **76**
H.sapiens	gi|4757900	187/352 53	248/358 70
M. musculus	gi|13097432	183/352 54	244/352 71
E.gracilis	Sp|Q9ZNY3	184/324 56	234/324 72
C. reinhardtii	Embl|EAB545261	186/343 54	245/343 71
L. donovani	gi|1545976	140/333 **42**	191/333 **57**
T. cruzi	gb|EAN82340.1	134/319 **42**	194/319 60
T. solium	gi|14029537	185/390 46	257/390 65
A.americanum	gb|AAC79094.1	184/324 56	234/324 72
D.immitis	gb|AAD03405.1	179/335 53	243/335 74
B.microplus	gb|AAR29940.1	188/336 55	240/336 71
P.taeda	gb|AAG01147.1	177/339 52	243/339 71
N.tabacum	gb|CAA59694.1	170/329 50	236/329 71

Esta tabla se diseñó basándonos en el multialineamiento de nuestra secuencia contra la base de datos del GenBank en el servidor de la NCBI. Se muestran las especies más representativas de algunos grupos taxonómicos.

Expresión y purificación de la proteína recombinante EhCRT.

Los plásmidos recombinantes denominados pB *Ehcrt*-1200, pB *Ehcrt*-C y pB *Ehcrt*-N fueron subclonados en el vector de expresión pProEx-HT-b.

Se obtuvieron los plásmidos recombinantes llamados pProEx-HT-b-*Ehcrt*-1200, -*Ehcrt*-C y –*Ehcrt*-N respectivamente, la construcción de estos plásmidos se muestra en la figura 4.

Los plásmidos fueron: pProEx-HT-b-*Ehcrt*-1200 con una longitud resultante de 5956 pb, el cual expresa un inserto recombinante de 1178 pb que representa el gene completo de la EhCRT que a su vez codifica para una proteína recombinante con un PM calculado de 47.5 kDa que corresponde a la secuencia completa de la CRT amibiana mas la cola de 6 histidinas unidas a su extremo amino–terminal, a esta proteína recombinante se le denominó EhCRT-6H. El plásmido pProEx-HT-b-*Ehcrt*-C tiene un tamaño de 5404 nucleótidos y expresa un inserto recombinante de 626 pb dando lugar a una proteína recombinante con un PM esperado de 27.5 kDa a la cual denominamos EhCRT-C-6H por corresponder a la región carboxilo-terminal de la proteína. La clona pProEx-HT-b-*Ehcrt*-N que tiene un tamaño de 5354 pb y que a su vez expresa el inserto recombinante de 576 pb este codifica para una proteína recombinante de 23.5 kDa, a la que denominamos EhCRT-N-6H por corresponder a la región amino-terminal de la CRT.

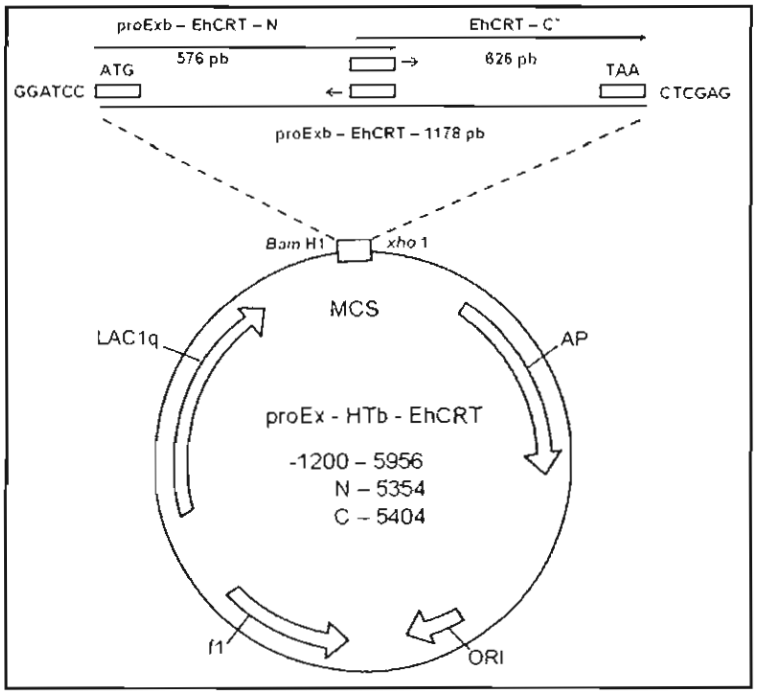


Figura 4. Mapa del vector de expresión y las construcciones hechas para producir las tres diferentes clonas recombinantes pProExHt-b-*Ehcrt*-1200, pProExHT-b-*Ehcrt*-C y pProEx-HT-b-*Ehcrt*-N. Se indican los sitios de restricción agregados a los amplificados para facilitar los procesos de clonación.

Con la finalidad de asegurarnos que las clonas seleccionadas presentaban el inserto de interés se purificaron los plásmidos recombinantes de cada una de las clonas y los insertos clonados fueron liberados con las enzimas de restricción *Bam*H1 y *Xho*1 obteniendo los insertos con el tamaño esperado como se observa en la figura 5.

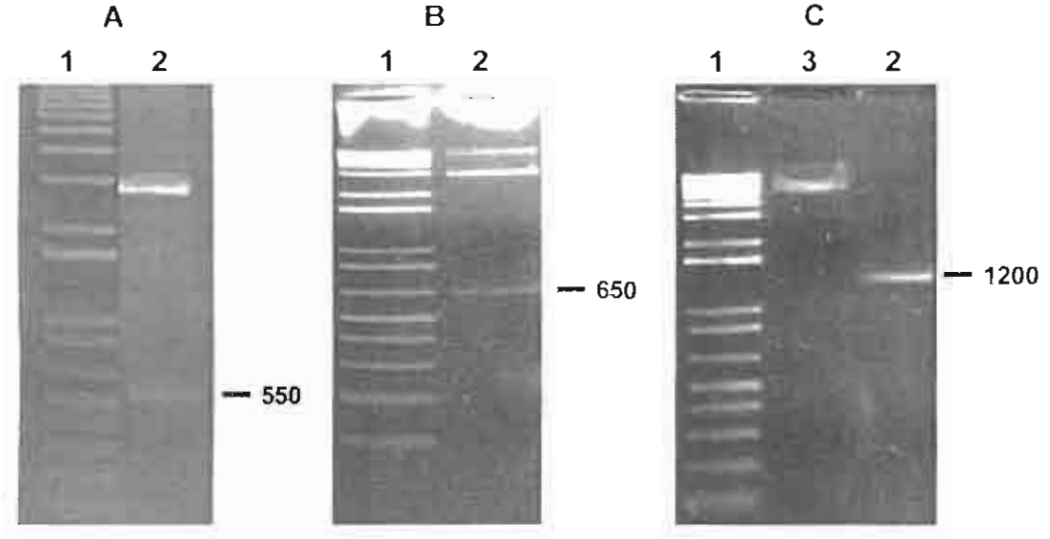


Figura 5. Análisis de restricción de las clonas pProexHT–b-. A) EhCRT-N, B) EhCRT-C, y C) EhCRT-1200 respectivamente. Se digirieron los plásmidos recombinantes con las enzimas de restricción *Bam*H1 y *Xho*1. Geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. El carril 1 corresponde al corrimiento de los marcadores, en el carril 2 se muestra las digestiones de cada una de las clonas.

Estos plásmidos fueron transfectados en bacterias competentes *E. coli* de la cepa BL21 la cual permite la sobreexpresión de los insertos clonados.

Se produjeron los péptidos y la proteína recombinantes por inducción del promotor con IPTG. El análisis electroforético de las diferentes fracciones del lisado bacteriano (fracción soluble e insoluble) permitió determinar la localización de nuestras proteínas recombinantes en la fracción insoluble del lisado bacteriano como se observa en la figura 6.

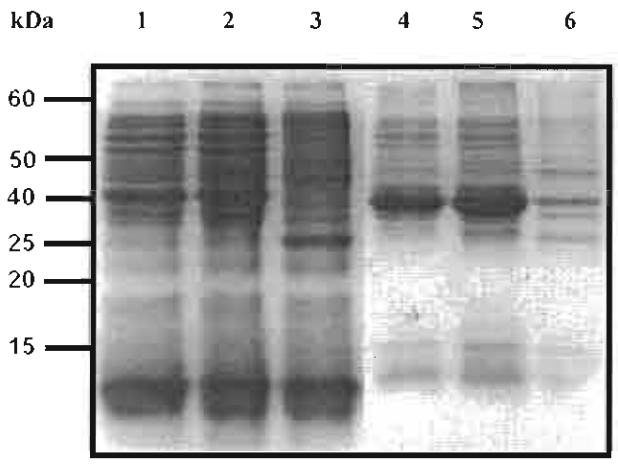


Figura 6. Electroforesis SDS/PAGE al 12% de las fracciones solubles e insolubles de la clona recombinante (EhCRT-C). Los pozos 1-3 muestran el corrimiento de la fracción insoluble del lisado bacteriano: 1) BL21 sin transfectar, 2) BL21/pProEx-HT /Sin inserto, 3) BL21/pProEx-HT-EhCRT-C. Los pozos 4-6 muestran el corrimiento de la fracción soluble del lisado bacteriano; 4) BL21 sin transfectar, 5) BL21/pProEx-HT /Sin inserto y 6) BL21/pProEx-HT-EhCRT-C. Gel de acrilamida/bisacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie, se indican los marcadores moleculares a la izquierda en kDa.

Por tal motivo las proteínas recombinantes se purificaron utilizando condiciones desnaturalizantes. Se obtuvo un rendimiento en promedio para cada una de las proteínas recombinantes de 2mg/ml partiendo de un cultivo de 500 ml.

Las proteínas recombinantes están unidas a una cola de 6 histidinas en la región amino terminal por lo que fueron purificadas a partir de los lisados bacterianos utilizando una columna de afinidad Ni-NTA, ya que el Ni se une específicamente a las colas de histidinas (6H).

El corrimiento electroforético de las proteínas recombinantes purificadas se muestra en la figura 7, en la cual se observa que las proteínas migraron a un peso mayor al que se había calculado teóricamente para cada una de ellas, la EhCRT-6H que presentó un PM de 60 kDa se le determinó un PM calculado de 45.5 kDa, la EhCRT-C-6H mostró un PM de 45 kDa sin embargo su PM calculado es de 27.6 kDa y la EhCRT-N-6H presentó un PM de 40 kDa aunque teóricamente se había calculado un PM de 25.5 kDa.

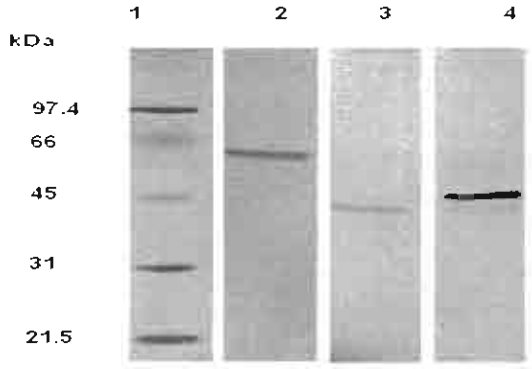


Figura 7. Electroforesis SDS/PAGE al 10% de las proteínas recombinantes purificadas. 1) muestra el corrimiento de los marcadores moleculares, a la izquierda se indican los marcadores de PM en kDa. 2) corresponde a la proteína completa EhCRT-6H. 3) EhCRT-N-6H Corresponde a la región N-Terminal y 4) EhCRT-C-6H corresponde al a región C-Terminal de la proteína, el gel se tiño con azul de Coommassie.

A estas proteínas recombinantes se les determinó su inmunoreactividad con los anticuerpos heterólogos C17 y FmC-75 aunque se sabe que no son anticuerpos específicos, así como contra anticuerpos IgG provenientes de pacientes de AHA en un sistema de ELISA, ambos tipos de anticuerpos reconocieron las proteínas recombinantes purificadas (tabla 4). También se observa que no hay diferencias en cuanto a la reactividad de estos anticuerpos contra la región analizada de la proteína.

Tabla 4. Análisis de la reactividad de las proteínas recombinantes por ELISA contra diferentes anticuerpos.

Anticuerpos/ Proteína	Ag-Eh[a]	BL21-ProEx-b[b]	Eh-CRT-1200	Eh-CRT-N	Eh-CRT-C
C-17	1.914 ± 0.152	0.236 ± 0.124	1.850 ± 0.170	0.238 ± 0.125	1.102 ± 0.160
FMc75	0.645 ± 0.182	0.113 ± 0.096	0.491 ± 0.146	0.447 ± 0.121	0.437 ± 0.171
AHA[c]	1.384 ± 0.124	0.364 ± 0.047	0.549 ± 0.015	0.308 ± 0.153	0.387 ± 0.115
N[d]	0.296 ± 0.012	0.382 ± 0.025	0.240 ± 0.049	0.343 ± 0.068	0.293 ± 0.067

Análisis de la reactividad de anticuerpos anti-CRT contra las proteínas recombinantes EhCRT. Los valores son el promedio de la DO (490nm) ± DS de dos ensayos. [a] Antígeno de *E.histolytica* HMI:IMSS, [b]extracto total de *E. coli* cepa BI-21 ; [c] mezcla de 5 sueros de pacientes con AHA; [d] mezcla de 5 sueros de individuos clínicamente sanos.

Debido a la baja especificidad mostrada por los anticuerpos utilizados así como a las diferencias encontradas entre el PM observado y el teóricamente calculado de nuestras proteínas recombinantes, se decidió realizar la secuenciación de estas proteínas por espectrofotometría de masas. Los resultados obtenidos para el caso de la EhCRT-6H y EhCRT-C-6H se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados de la secuenciación de las proteinas recombinantes; EhCRT-6H y EhCRT-C-6H por espectrofotometría de masas.

Proteína	Secuencia/péptido	Posición	PM observado Da	Secuencia cubierta (%)
EhCRT-6H	K. ALGPFK. I	36 – 41	632.32	
	K. LDEEFSNK. D	71 – 78	491.22	
	K. LDEEFSNK. D	71 – 78	491.22	
	K.LDEEFSNKDK. N	71 – 80	612.74	
	K.NLIVQYNLK. F	81 – 89	552.75	
	R. THVIMNYK. G	136 – 143	503.21	
	K. TIVDPNAK. K*	234 – 241	429.28	
	K.RIPNPAYK. G	272 – 279	479.76	
	K.VILER. N	338 – 342	629.25	
				13
EhCRT-C-6H	K. FDEDWDNLAPK. E	188 – 198	683.68	
	K. FDEDWDMLAPK. E	188 – 198	691.72	
	K. TIVDPNAK. K	234 – 241	429.19	
	K. GEWVHPQIANPDYVYDPELYK.Y	280 – 300	845.24	
	K. AGTIYDDILITDDIEEAEK. E	319 – 334	1062.40	
	K. AGTIYDDILITDDIEEAEKEAK. V	316 – 337	1226.40	
	K. VILER. N	338 – 342	629.25	
				17

Secuencia en aminoácidos de los péptidos identificados y secuenciados por análisis de espectrofotometría de masas LC-ESI-MS/MS de las proteinas recombinantes EhCRT-6H y EhCRT-C-6H. El análisis del BLAST resulto en una identidad significante con la secuencia reportada para la CRT de *E. histolytica* HM1: IMSS gi|6747971. La secuencia total cubierta fue del 30%.

El análisis de BLAST para confirmar la identidad de estas proteínas recombinantes resultó en una homología del 100% con la secuencia de amino ácidos de la probable CRT reportada para *E. histolytica* recientemente gi|6747971 como se muestra en la figura 9. Es necesario mencionar que este es el gene del cual obtuvimos las secuencias de las cuales partimos para el diseño y síntesis de los iniciadores utilizados para la amplificación específica de este gene por medio del empleo de la PCR.

1 MFTLFLLIAL SSAKVYFHET FENRDKWIDS TSSGKALGPF KIVSGKWYGD
51 ANNKGLQTSE DNKFYIAAAK LDEEFSNKDK NLIVQYNLKF EQGIDCGGGY
101 IKLLPKKSIE SEEKFTPESE YNIMFGPDVC GGSKRTHVIM NYKGKNNLIR
151 KEIKCESDDI SHLYTLIIRP NNTYVVKIDG VEKQEGK**FDE DWDMLAPK**EI
201 DDPNVSKPAD WVDEKEIDDP NDKKPEGWDD IPKTIVDPNA KKPEEWNDED
251 DGEWEAPTIE NPEYKGEWKP KRIPNPAYK**G EWVHPQIANP DYVYDPELYK**
301 YDSFAYIGID VWQVK**AGTIY DDILITDDIE EAEKEAKVIL ER**NAAEKKMR
351 DEIKEAEKQK EEEAKKEAEK QKEEETKEEI KKEENKEEL

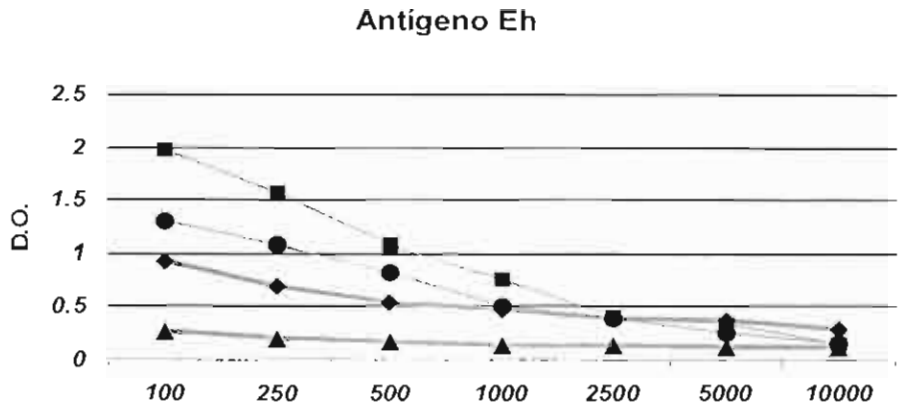
Figura 9. Resultados del análisis BLAST, se muestran la secuencia en aminoácidos de la proteína EhCRT (gi|6747971). Las secuencias de los péptidos identificados se muestran en negritas para la EhCRT-C-6H y para la EhCRT-1200-6H subrayadas. La secuencia total cubierta representa el 30%.

En base a la reactividad observada y a la confirmación por la secuenciación parcial de las proteínas recombinantes por espectro-fotometría de masas, podemos asegurar que el gene que se clonó y expresó corresponde al que codifica para la CRT de la *E. histolytica* y que además, puede ser el mismo que codifica para la proteína de 51 kDa que previamente habíamos reportado como una *probable* CRT ya que la secuencia de 18 aminoácidos de la región amino-terminal de esta fracción de 51 kDa se localizó también dentro de este gene.

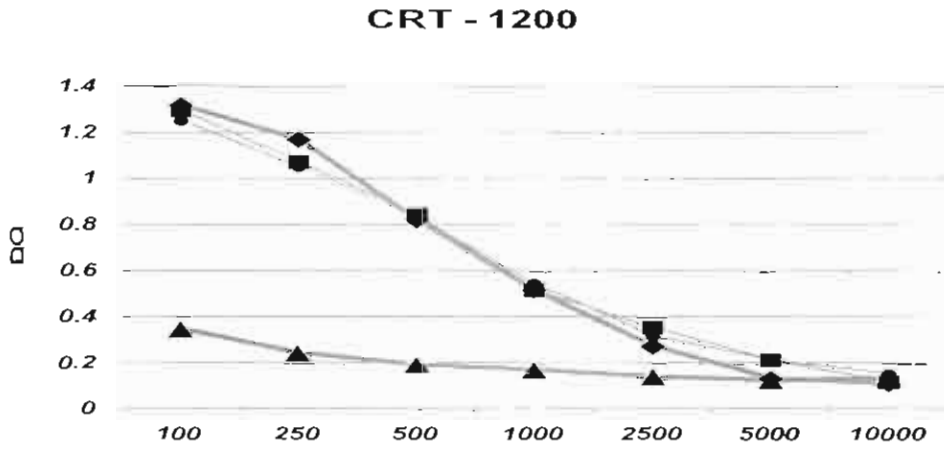
Inmunodetección de la EHCRT en los trofozoítos amibianos.

Las proteínas recombinantes resultaron ser buenos inmunógenos en los ratones inmunizados ya que en general se obtuvieron títulos de anticuerpos de 1:2,500 en los sueros hiperinmunes como se observa en la figura 10, de estos sueros hiperinmunes se purificaron las IgGs por columnas de afinidad (proteína A-Sefarosa) como se mencionó en la metodología, obteniéndose las IgGs con un buen grado de pureza (datos no mostrados). Por otro lado se determinó la reactividad de estos Ac por inmunoelectrotransferencia contra el Ag total de la *E. histolytica* como contra las proteínas recombinantes observando una reactividad positiva contra las proteínas recombinantes y contra una sola banda de 55 kDa en el corrimiento del Ag amibiano, como se observa en la figura 11.

A)



B)



C)

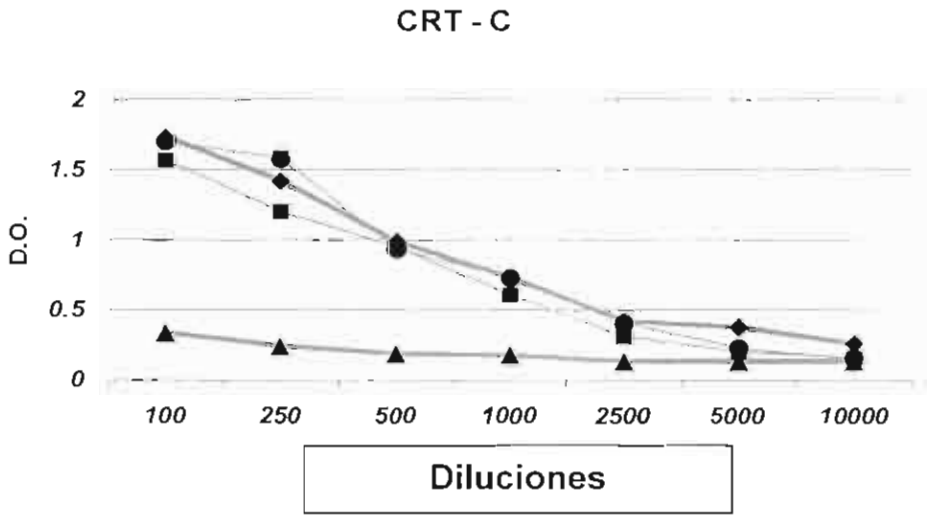


Figura 10.-Titulación de los sueros de los ratones, inmunizados contra Ag de *E. histolytica*, *Eh*CRT-1200 y *Eh*CRT-C por ELISA, se evaluó la reactividad de las diferentes diluciones de los sueros contra; A) Ag total de *Eh*, B) contra la *Eh*CRT-6H, C) contra CRT-C-6H. -▲- suero negativo, -♦- suero anti- Ag Eh, -■- suero anti-CRT-1200, -●- suero anti-CRT-C,

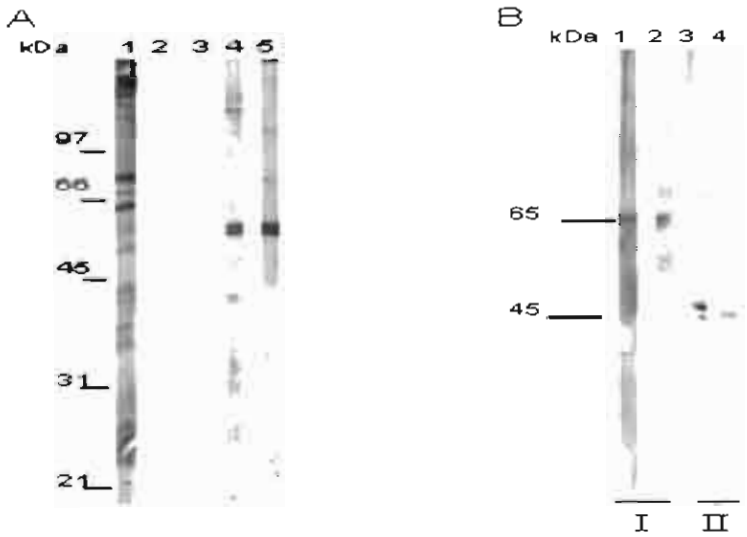


Figura 11. Inmunoelectrotransferencia del Ag de *E. histolytica* y de las proteínas recombinates, contra las IgGs purificadas de los ratones hiperinmunes.
A) 10μg de Ag de *E. histolytica* se transfirieron a nitrocelulosa y se evaluó su reactividad contra; 1) IgG de ratón anti- Ag de *Eh* (control +), 2) IgG de suero de ratón preinmune (control -), 3) control del segundo Ac (cabra Anti-IgG de ratón -AP, 4) IgG anti-*Eh*CRT, 5) IgG anti-CRT-C. B) 10μg de cada una de las proteínas recombinantes se transfirieron a papel de nitrocelulosa; I) *Eh*CRT, II) *Eh*CRT-C. Probando su reactividad contra las IgGs de los ratones inmunizados anti-*Eh*CRT (1, 3) y anti-*Eh*CRT-C (2, 4). Se indican los marcadores de pesos en kDa.

En base a estos resultados se decidió utilizar estos Ac para la identificación física de la EhCRT en los trofozoítos amibianos por inmunodetección realizándose directamente sobre trofozoítos axénicos de la *E. histolytica* y también, en trofozoítos localizados en AHA del modelo del hámster como se mencionó en la metodología. Los resultados de la inmunodetección nos muestran que los anticuerpos IgG anti-Ag *E.histolytica* (figura 12 B) dan un buena reactividad y que los controles negativos y el control del 2° anticuerpo no están dando reactividad (Figura 12 A), esto indica que el sistema funciona adecuadamente. Al utilizar los Ac contra-EhCRT-6H y contra-*Eh*CRT-C-6H (figura12C y D respectivamente) se observó la marca distribuida heterogéneamente en vesículas intracelulares, lo que concuerda con la citolocalización observada para otras proteínas asociadas al RE en la *E. histolytica*.

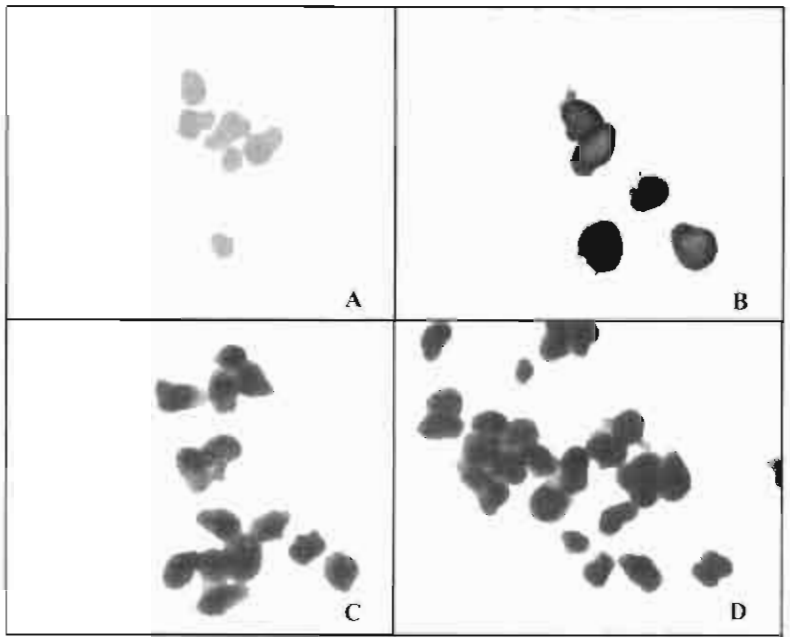


Figura 12.- Fotomicrografías de la inmunodetección de la EhCRT en trofozoitos de *E. histolytica*. Células crecidas sobre cubreobjetos y permeabilizados con Triton-X-100. Se tiñeron con IgG de sueros; A) preinmunes (control Negativo), B) IgGs anti-Ag *E. histolytica* (control positivo), C) tratados con anti- *Eh*CRT-C y D) anti *Eh*CRT, revelados con un segundo Ac de cabra unido a fosfatasa anti-IgG de ratón y contrateñidos con eosina. Fotos tomadas por microscópia óptica a una resolución de 40X.

Así mismo también la inmunolocalización de esta proteína EhCRT en los trofozoítos de *E. histolytica* localizados en las lesiones de AHA producidos en hámster mostraron un patrón de tinción similar al que se observó en los trofozoítos crecidos en cultivo axénico, y además se observa que los Ac producidos contra las proteínas recombinantes son específicos ya que no mostraron reactividad inespecífica contra la CRT de los hepatocitos del hámster, estos resultados se muestran en la figura 13.

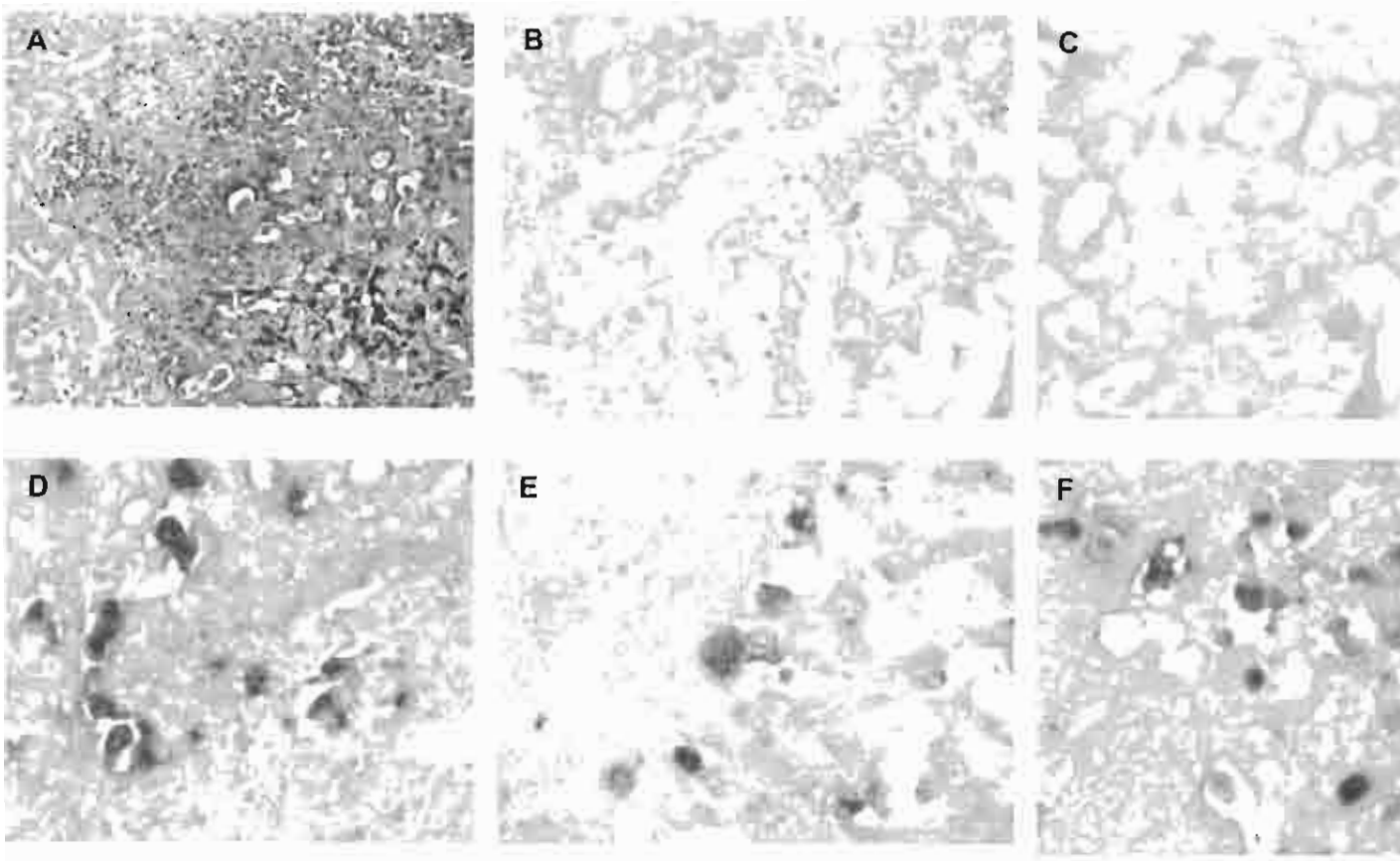


Figura 13. Inmunohistoquímica de cortes de hígado de hámster con AHA. Se realizó la inmunodetección de la EhC
Acs; B) IgGs de sueros de ratón preinmune (control negativo), C) control del 2° Ac, D) IgG de ratón anti-Ag de *E. h*
E) IgG anti-EhCRT, F) IgG- anti EhCRT-C, se utilizó un segundo Ac de cabra anti-IgG de ratón unido a fosfatasa rev
sustrato de la fosfatasa NBT/BCIP y finalmente las micropreparaciones se contratiñeron con eosina. En la fotom
tinción de PAS del corte de hígado con AHA como control de la tinción. Fotos tomadas por microscópia óptica a una

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Los anticuerpos heterológos CRT-283 y CRT C-17, así como los sueros de los pacientes de AHA, a pesar de la buena reactividad que se observó contra la fracción de 51 kDa que previamente se había reportado como una probable CRT, al utilizarlos como herramienta en la inmunodetección del gene o los genes que codifican para la CRT amibiana en la búsqueda de las bibliotecas recombinantes de *E. histolytica* (λgt11 y λZapII) no permitieron la identificación de clonas recombinantes para la probable EhCRT. Sin embargo el hecho de obtener una buena reactividad tanto por ELISA como por inmunoelectrotransferencia con el anticuerpo CRT-283 confirma que esta fracción es por un lado una CRT y que además presenta la secuencia del péptido de retención al RE, ya que sabemos que este anticuerpo CRT-283 está dirigido específicamente contra el péptido sintético QAKDEL que representan la secuencia 386-401 de la CRT del conejo y que se determinó que este anticuerpo es específico para la CRT, ya que no reacciona con la calsecuestrina u otras proteínas residentes del RE que presentan la secuencia KDEL, incluyendo la PDI, GrP,78 (Bip) y la ERP72.[121]

Mientras que la reactividad que se observó al utilizar el anticuerpo heterólogo C-17, el cual solo reconoció la fracción de 51 kDa por ELISA y no por inmunoelectrotransferencia, sugiere que este anticuerpo puede estar reconociendo epítopes conformacionales. Además estos dos anticuerpos están dirigidos contra regiones o secuencias de la región carboxilo-terminal de la CTR y se sabe que esta región es la menos conservada evolutivamente en todas las CRTs reportadas, sin embargo también se observó que estos anticuerpos sobre todo el C-17 presentó una gran reactividad contra el RNA de la *E. histolytica*, esto nos indica que este anticuerpo no es tan específico como se caracterizó previamente y de ahí que se obtuviéra tanta reactividad inespecífica en la inmunodetección de las clonas recombinantes de las bibliotecas utilizadas. En este sentido se sabe que fracciones ribosomales pueden ser inmunogénicas en el humano.[181]

Por otro lado, al comparar las secuencias de nucleótidos de las clonas recombinantes obtenidas a partir de la búsqueda en las librerías recombinates

de *E. histolytica*, que codifican para secuencias de RNAr de la *E. histolytica* y que denominamos g11-B, g11C y Z5B8, contra las secuencias de las CRT reportadas en la base de datos del Genbank, se encontró que había una homología del 40 % con las secuencias de las CRT. De tal manera que la reactividad de estos anticuerpos o de los oligonucleótidos contra la fracción ribosomal de la *E. histolytica* impedía amplificar el gen de la CRT por medio de la PCR realizada sobre DNA genómico, ya que sabemos que el RNA es mucho más abundante en las células amibianas que la cantidad del gene que codifica para una proteína en particular en este caso la CRT.[174,182] Por este motivo obtuvimos tantas secuencias que codificaban para RNAr a pesar de utilizar diferentes estrategias (inmunodetección e hibridación sobre bibliotecas diferentes y por PCR).

De tal manera que solamente al utilizar un DNA nuclear, es decir libre de RNA, y los oligonucleótidos específicos para la probable CRT amibiana reportada en el 2005 fue posible amplificar por PCR el gene de la CRT para *E. histolytica*. El cual fue posteriormente clonado exitosamente en el vector p-Bluescript-KS+ y secuenciado totalmente.

El análisis de la secuencia de los amplificados mostró una identidad a nivel de aminoácidos del 100% contra el gen reportado previamente como probable CRT

El gene completo subclonado posteriormente en el plásmido de expresión pProEx-HT-b-*Ehcrt*-1200 presenta un marco de lectura abierto de 1178 pb que codifican a su vez para una proteína recombinante con un peso calculado de 47.5 kDa que coincide con el rango de pesos reportados para otras CRTs recombinantes.[112,183] Además el gene presenta características propias de los genes amibianos como es el alto contenido de bases A-T (mas del 70%). [182,184] Este gene no presenta intrones como la mayoría de los genes amibianos ya que se ha reportado la presencia de intrones solo en 1/3 de los genes que codifican para proteínas en la *E. histolytica* como es el caso de las RAbs que son unas de las pocas proteínas amibianas que presentan intrones.[185]

Aparentemente sólo existe un gene para la EhCRT, sin embargo al realizar el análisis de BLAST de las clonas secuenciadas contra la base de datos del genoma de la *E. histolytica* se encontró una homología contra un

segundo probable gene para la EhCRT (gi/ 67466599) reportado en dicha base de datos, sin embargo al analizar esta secuencia se observó que es de menor tamaño ya que sólo codifica para una proteína de 139 aminoácidos (figura 3), por lo que no sabemos si este es una secuencia incompleta del primer gene o si es una secuencia parcial que no se ha terminado de caracterizar.

En general se ha demostrado que la CTR es codificada por un solo gene y transcrita por un solo RNAm en muchas de las especies en las que se ha descrito esta proteína,[112] sin embargo, también existen algunas excepciones en las que se ha descrito más de un gene para la CRT como es el caso de *T. cruzi* y algunas especies de plantas.[114,186]

En cuanto a la caracterización del gene clonado y expresado se identificaron las secuencias motivo CRT I-VI que caracterizan a esta proteína como miembro de la Familia de las CRTs, también se identificaron algunas de las secuencias conservadas para esta proteina como son los probables sitios de glicosilación, sitios de unión a Ca^{++}, sitios de unión al componente C1q del sistema del complemento sérico humano, el hecho de localizar estas secuencias motivo en la EhCRT sugiere que esta proteina puede desarrollar las mismas funciones o funciones similares a las que se han descrito en los diferentes tipos celulares en los que se ha caracterizado dicha función.[112] Así también el hecho de que se haya localizado a esta proteína por análisis proteómico asociada a proteínas que intervienen en los procesos de fagocitosis y transporte vesicular,[164,165] sugiere que esta proteina debe participar en alguna forma en estos procesos. Por otra parte dichas funciones no han sido caracterizadas totalmente en la *E. histolytica*. El hecho de identificar esta proteina permitirá contar con una herramienta más para la determinación y caracterización de las funciones de esta importante proteína en los procesos de adherencia, fagocitosis, transporte vesicular y motilidad en la *E. histolytica*.

En cuanto al grado de identidad contra las CRTs de otras especies observamos una mayor identidad (60 %) con las CRTs de mamíferos incluidas las de *H. sapiens*, lo que puede explicar el alto grado de reactividad cruzada al utilizar los anticuerpos heterológos dirigidos contra la CRT Humana.

La secuencia de la EhCRT resultó ser más diferente con las CRTs de *T. criuzi, L. donovani* que mostraron una identidad de 46 al 53% lo cual puede

explicarse debido a que estos son parásitos intracelulares, y *E. histolytica* es un parásito extracelular.

Así también la comparación con las CRT de las garrapatas resultó con una identidad del 53 al 56% sobre todo en la región carboxilo terminal, lo que puede estar asociado con un mayor índice de secreción de la CRT hacia el medio, como se ha demostrado en estas especies de artrópodos. [187,188]

A pesar de las variaciones observadas en cuanto a la identidad, el grado de homología observado en todas las secuencias analizadas fue del 70 a 75% para todas las especies analizadas lo que nos confirma el alto grado de conservación de este gene a través de la evolución.

También en el análisis de las secuencias se identificó una secuencia C-terminal homóloga que podría ser una nueva secuencia de retención al RE (KEEL) ya que solo en nemátodos y en garrapatas se encuentra una secuencia similar (HEEL),[112] y además la sustitución K/H resulta ser un cambio conservado, sin embargo, la presencia de la variabilidad en esta secuencia de retención al RE se ha correlacionado con un mayor grado de liberación o secreción de esta proteína en la saliva de estos parásitos.[158,187,189] En este sentido, los estudios de mutaciones puntuales en proteinas asociadas al retículo endoplásmico[190,191] han determinado que los aminoácidos más importantes para la retención de dichas moléculas en el RE son los últimos dos aminoácidos (EL) los cuales si están presentes en nuestra proteina EhCRT recombinante.

Las proteínas recombinantes obtenidas EhCRT-6H, EhCRT-C-6H y EhCRT-N-6H presentaron un peso molecular mayor al predeterminado, el cual no corresponde al que previamente habíamos obtenido con la fracción de 51kDa como una probable EhCRT. Sin embargo, este corrimiento anómalo de la CRT en el análisis electroforetico SDS/PAGE no es nada sorprendente ni nuevo ya que se ha reportado este hecho para diferentes proteínas tanto amibianas como de otras especies.[192,193] En el caso particular de la CRT también se ha registrado este fenómeno y se ha atribuido principalmente a su forma tridimensional tan característica y peculiar ya que presenta una estructura globular en sus 2/3 partes y el resto una estructura lineal y al alto número de aminoácidos ácidos que contiene.[182,194,195,196] Sin embargo este fenómeno no se ha observado en todas las CRT reportadas.

Por otro lado, la reactividad que observamos en las proteínas recombinantes obtenidas contra los anticuerpos heterológos a pesar de la inespecificidad mostrada podemos concluir que reconocen positivamente las proteínas recombinantes comparándola con los controles negativos. Así también la secuenciación por espectrofotometría de masas de dichas proteínas nos confirma que las clonas recombinantes así como sus productos corresponden a la CRT de *E. histolytica*.

Para determinar la localización subcelular de la EhCRT, se obtuvieron dos anticuerpos policlonales contra las proteínas recombinantes, EhCRT-6H que representa a la proteína completa y la región C- terminal de la proteína (EhCRT-C-6H) siendo esta la región menos conservada de la proteína. Estas proteinas recombinantes fueron usadas como inmunógenos para producir antisueros de ratón, los cuales respondieron adecuadamente y produjeron buenos títulos de anticuerpos (1:2,500) lo que concuerda con lo que previamente se ha reportado, que esta proteína presenta características inmunogénicas en el caso del humano.[1,3] Además la CRT se ha reportado como un buen inmunógeno en otras infecciones parasitarias como la tripanosomiasis y la esquistosomiasis. [146,147]

Los anticuerpos con isotipo IgG purificados por columna de inmunoafinidad (Proteína A- sefarosa) se lograron obtener en un buen grado de pureza, al evaluar su reactividad por *Western blot* contra el antígeno total de *E. histolytica* observamos que tienen una buena especificidad, es decir las IgGs anti-EhCRT-6H y anti-*Eh*CRT-C-6H reconocen una sola banda que corresponde el tamaño esperado de 55 kDa, el cual concuerda con el peso molecular previamente reportado para la *Eh*CRT.[3] Esto confirma que son una buena herramienta para la inmunodetección, y su utilización permitió la identificación física del a EhCRt en los trofozoítos amibianos, se observó una distribución de la tinción de la fosfatasa sobre algunas vesículas distribuidas heterogéneamente en el citoplasma celular. Lo que coincide con la inmunolocalización de otras proteínas asociadas al RE.

En *E. histolytica* se han podido identificar proteínas mediante tinciones citoqímicas e inmunohistoqímicas que se sabe que están asociadas con el RE y estructuras semejantes al Golgi; como son las fosfatasas, ARF y las ξCop. Estos estudios han demostrado que estos sistemas principalmente están

formados por vesículas de diferentes tamaños dispersas de manera irregular en el citoplasma del trofozoíto.[16, 17,197]

Por otro lado, usando anticuerpos contra la proteína ERD2 amibiana la cual es una proteína receptora para proteínas del RE que se localizan en Cis-Golgi y la PDI que es una proteína del lumen del RE, estos anticuerpos detectan numerosas vesículas de diferente tamaño en distintas partes del citoplasma.[38]

El hecho de poder idenficar la presencia de la EhCRT en los trofozoítos de la *E. histolytica* causantes del AHA en los hígados de los hámsters nos puede sugerir que esta proteína interviene de alguna forma en este proceso invasivo de la *E. histolytica*, sin embargo es algo que todavía requiere de una mayor caracterización.

En este momento no se cuenta todavía con cantidades suficientes de la proteína recombinante para poder evaluar su reactividad contra los anticuerpos IgG e IgA de los pacientes de amibiasis invasora, pero en base a la reactividad que observamos con la fracción de 51 kDa de la *E. histolytica*, creemos que esta molécula de CRT amibiana puede tener utilidad diagnóstica y seroepidemiológica, a pesar de la controversia que existe, al ser ésta una molécula con propiedades auto-antigénicas en el humano, sin embargo, también en algunas otras parasitosis se ha determinado que puede ser un antígeno inmunodominante y desencadenar anticuerpos específicos contra la CRT del parásito y por tanto se ha reportado su utilización diagnóstica y de protección.[146,147,158]

En el caso de la CRT de *T. cruzi* (*Tc*CRT) se ha reportado a esta CRT como una proteína dimérica. En *T. cruzi* existen múltiples copias del gene para la CRT, en comparación con otros parásitos como la *Tenia solium* en la cual solo existe un gene y la proteína no se comporta como un antígeno inmunodominante.[198] Lo que nos podría sugerir que esta inmunodominancia puede estar asociada a la existencia de más de un gene o a la expresión de las diferentes isoformas de la proteína.

En este trabajo se logró la clonación del gen para la *Eh*CRT así como la producción de la proteína recombinante, sin embargo, en este momento no se han caracterizado las funciones biológicas de esta proteína en *E. histolytica.* En base al análisis de sus secuencia con las previamente reportadas en las bases

de datos del GenBank se han identificado secuencias conservadas para la unión a Ca^{++}, secuencias probables de glicosilación, así como secuencias de unión al componente C1q del sistema del complemeto del suero humano, de tal manera que se puede predecir que la *Eh*CRT puede desarrollar las mismas funciones que desarrolla en las células eucariontes donde se han caracterizado dichas funciones.

Por otro lado, al localizar una secuencia de retención al RE en la EhCRT KEEL y el hecho de que previamente se había reportado la existencia del receptor para estas secuencias de retención (EhERD-2)[198] nos abre un amplio campo de trabajo en el estudio de los mecanismos del tráfico vesicular que ocurren en este parásito a pesar de la aparente ausencia de un retículo edoplásmico y un aparato de Golgi estructurado.

CONCLUSIONES

Se logró identificar y clonar del gene *Ehcrt* que codifica para la CRT para el protozoario parásito *E. histolytica*.

Se identificó la presencia de la secuencia de retención en el RE KEEL que es muy similar a la descrita para garrapatas y algunos nemátodos (HEEL), lo que sugiere que esta proteína debe estar asociada a una estructura semejante a un RE en la *E. histolytica*.

La proteína expresada muestra en su secuencia primaria los dominios característicos de esa familia de proteínas CRT-I a CRT-VI.

El gene *Ehcrt* y la proteína EhCRT están altamente conservados a través de la evolución, como la mayoría de las CRTs reportadas, lo que nos confirma la importancia de esta proteína multifuncional.

El análisis de las secuencia de la EhCRT apoya la existencia de secuencias motivo características asociadas a funciones específicas de esta proteína por lo que se puede predecir que la EhCRT también debe regular y participar en funciones tales como la unión de Ca^{++}, unión e inhibición del componente C1q del sistema del complemento.

Las proteínas recombinantes EhCRT-6H y EhCRT-C-6H resultaron buenos inmunógenos para los ratones inmunizados.

La inmunodetección de la CRT en los trofozoítos amibianos concuerda con la inmunolocalización dentro de vesículas distribuidas irregularmente en todo el citoplasma como se ha reportado para otras moléculas (PDI, EhERD-2,) asociadas al RE en la *E. histolytica*.

PERSPECTIVAS.

Evaluar y caracterizar inmunológicamente la EhCRT, con el fin de determinar si esta proteína puede tener utilidad diagnóstica o seroepidemiológica como se había determinado con la fracción de 51 kDa.

Caracterizar biológicamente a la proteína para determinar si interviene en las mismas funciones en las cuales se le ha involucrado y caracterizado en las diferentes células en las que se ha estudiado.

Evaluar su posible papel en la regulación de algunos de los mecanismos de patogenisidad propios del parásito mediante la inhibición o sobreexpresión del gene *Ehcrt* a través de la transfección directa en los trofozoítos de *E. histolytica* utilizando el vector pProex EhNeo-.

BIBLIOGRAFIA.

1- Ximénez C, Sosa O, Leyva O, Morán P, Melendro EI. Western blot of *Entamoeba histolytica* antigenic fractions: reactivity analysis with sera from intestinal amoebiasis patients. *Ann Trop Med Parasitol.* 1992; **86**: 121-127.

2- González E, Rico G, Morán P, Ramos F, Garcia G, Padilla G, Ramiro M, Valdez E, Muñoz O, Gómez A, Kretchmer R, Melendro EI, Ximénez C. Purification and biochemical characterization of three cysteine proteases of *E. histolytica* with potential application in epidemiologic trials. *Arch Med Res* 2000; **31**: 49-52.

3- González E, Rico G, Mendoza G, Ramos F, García G, Morán P, Valadez A, Melendro EI, Ximénez C. Calreticulin – like molecule in trophozoites of *E. histrolytica* HMI IMSS. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; **67**: 636-639.

4- Boletin Epidemiológico OMS/OPS/UNESCO. 1997: **18**; 13-14.

5- Lohia A. The cell cycle of *Entamoeba histolytica. Mol Cell Biochem.* 2003; **253**: 217-222.

6-. Eichinger D. A role for a galactose lectin and its ligands during encystment of *Entamoeba. J Eukryot Microbiol.* 2001; ***48:*** 17-21.

7- Meza I. *E. histolytica*: phylogenetic considerations. A review. *Arch Med Res.* 1992; **23**: 1-5.

8- Bakker-Grunwald T, Worstmann C*E. histolytica* as a model for the primitive eukaryotic cell. *Parasitol Today.* 1993; **9**: 27-31.

9- Clark CG, Roger AJ. Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica. Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; **92**: 6518-6521.

10- Rosenthal B, Mai ZM, Caplivski D. Evidence for the bacterial origin of genes encoding fermentation enzymes of the amitochondriate protozoan parasite *Entamoeba histolytica. J Bacteriol.* 1997; **179**: 3736-3745.

11- Yang W, Kairong LE, Stanley SL. *Entamoeba histolytica* has an alcohol dehydrogenase homologous to the multifuntional *adhE* gene product of *E. coli. Mol Biochem Parasitol.* 1994; **64**: 253-260.

12- Vargas-Rodríguez L, Villagómez-Castro JC, Flores-Carreón A, López-Romero E. Identification and characterization of early reactions of asparagine-linked oligosacharide assembly in *Entamoeba histolytica. Int J Parasitol.* 1998; **28**: 1333-1340.

ARCHIVO HISTORICO

13- Villagómez-Castro JC, Calvo-Mendez C, Vargas-Rodríguez L, Flores-Carreón A, López-Romero E. *Entamoeba histolytica:* solubilization and biochemical characterization of dolichol phosphate mannose syntase an essential enzyme in glycoprotein biosynthesis. *Exp Parasitol.* 1998; **88:** 111-120.

14- Que X, Reed SL, The role of extracellular cysteine proteinases in pathogenesis of *Entamoeba histolytica* invasion. *Parasitol Today.* 1997; **13**: 190-194.

15- Leippe M. Amoebapores. *Parasitol Today.* 1997; **13**: 178-183

16- Mazzuco A, Benchimol M, DeSousa W. Endoplasmic reticulum and Golgi-like elements in *Entamoeba. Micron.* 1997; **28:** 241-247.

17- Ghosh SK, Field J, Frisardi M, Rosenthal B, Mai Z, Rogers R, Samuelson J. Chitinase secretion by encysting *Entamoeba invadens* and transfected *E. histolytica* trophozoites: Localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum, and golgi apparatus. *Infect Immun.* 1999; **67**: 3073-3081.

18- Bredeston LM, Caffaro CE, Samuelson J, Hirschberg CB. Golgi and endoplasmic reticulum function take place in different subcellular compartments of *Entamoeba histolytica. J Biol Chem.* 2005; **280**: 32168-32176.

19- Gathiram V, Jackson TFHG. A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodems of *Entamoeba histolytica. S Afr Med J.* 1987; **72:** 669-672.

20- Haque R, Ali IM, Sack RB. Amebiasis and mucosal IgA antibody against *Entamoeba histolytica* adherence lectin in Bangladesh children. *J Infect Dis.* 2001; **183**: 1787-1793.

21- Espinosa-Cantellano M, Martinez-Palomo A. Pathogenesis of intestinal amoebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev.* 2000; **13**: 318-331.

22- Pérez-Tamayo, R. Patología de la amibiasis. En Martínez-Palomo, A, (ed), AMIBIASIS, Medica Panamericana, México, 1989. pp. 42-78.

23- Thompson JE, Forlenza S, Verma R. Amebic liver abscess: a therapeutic approach. *Rev Infect Dis.* 1985; **7**: 171-179.

24- Stanley SL Jr. Amoebiasis. *Lancet.* 2003; **361**: 1025-1034.

25- Amano K, Takeuchi T. Amebiasis in adquired immunodeficiency syndrome. *Int Med.* 2001; **40**: 563-564.

26- Pérez-Tamayo R, Montfort I, Olivos GA, Ramos E, Barba OC. Pathogenesis of acute experimental liver amebiasis. *Arch Med Res.* 2006; **37**: 203-209.

27- Leippe M, Andrä J, Nickel R, Tannich E, Muller-Eberhard HJ. Amoebapores a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol.* 1994; **14**: 895-904.

28- Petri WA Jr, Man BJ, Haque R. The bittersweet interface of parasite and host: lectin –carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica. Annu Rev Microbiol.* 2002; **56**: 39-64.

29- Haque R, Huston Ch D, Hughes M, Houpt E, Petri WA Jr. Amebiasis. *N Engl J Med.* 2003; **348**: 1565-1573.

30- Long-Krug SA, Ravdin JI. The role of amebic phospholipase in cytolysis of target cell by *E. histolytica*. In: Ravdin JI, ed. Amebiasis: Human infection by *E. histolytica*. New York: John Wiley and Sons. 1987. pp 232-256.

31- Muñoz ML, Calderon J, Rojkind M. The collagenase of *Entamoeba histolytica. J Exp Med.* 1982; **155**: 42-51.

32- Que X, Reed S. Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev.* 2000; **13**: 196-206

33- Bruchhaus I, Loftus BJ, Hall N, Tanich E. The intestinal protozoan parasite of *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukaryot Cell.* 2003; **2:** 501-509.

34- Keene WE, Petitt MG, Allen S, Mckerrow JH. The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica. J Exp Med.* 1986; **163:** 536-549.

35- Leippe M, Sievertsen HT, Tanich E, Horstmann RD. Spontaneous release of cisteine proteinases but not of pore-forming peptides by viable *Entamoeba histolytica. Parasitology.* 1995; **111**: 569-574.

36- Stanley SL Jr, Zhang T, Rubin D, Li E. Role of the *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Infect Immun.* 1995; **63**: 1587-1590.

37- Ankri S, Stolarsky T, Bracha R, Padilla-Baca F, Mirelman D. Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases affects *Entamoeba histolytica* induced formation of liver abscess in hamsters. *Infect Immun.*1999; **67:** 421-422.

38- Maning Cela R, Marquez C, Franco E, Talamas-Rohana P, Meza I. BFA-sensitive and insensitive exocytic pathways in *Entamoeba histolytica* trophozoites: their relationship to pathogenesis. *Cell Microbiol.* 2003; **5**: 921-932.

39- Marian S, Laurent Ch, Gillen N. Signalization and cytoeskeleton activity through myosin Iβ during the early steps of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*: a proteomic approach. *Cell Microbiol.* 2005; **7**: 1504 -1518.

40- Okada M, Nozaki T. New insights into molecular mechanisms of phagocytosis in *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Arch Med Res.* 2006; **37**: 244-252.

41- Tsutsumi V, Shibayama M. Experimental amebiasis: a selectec review of some *in vivo* models. *Arch Med Res.* 2006; **37**: 210-220.

42- Ghadirian E, Kongshavn PAL. Genetic control of susceptibility of mice to infection with *E. histolytica. Parasite Immunol.* 1984; **6**: 349-360.

43- Seydel KB, Li E, Swanson PE, Stanley SL. Human intestinal epithelial cell produce proinflammatory cytokines in response to infection in SCID mouse-human intestinal xenograft model of amebiasis. *Infect Immun.* 1997; **65**: 1631-1639.

44- Sistema Nacional de Salud. Boletin Mensual de Epidemiología México.1993; **8** (11): 172 pp

45- Navarrete-Espinoza J., Navarrete-Cadena E, Escandon-Romero C, Escobedo de la Peña J. Prevalencía e parasitosis intestinal en la población infantil de Santiago Jamiltepec Oaxaca. *Rev Med IMSS* (Méx).1993; **31**: 157-.

46- Treviño-García., Manzo N., Escandon-Romero C., Escobedo de la Peña J., Hernández-Ramos JM., Fierro-Hernández H. Amibiasis in the epidemiologic transition in Mexico its morbidity and mortality trends in the IMSS. *Arch Med Res.* 1994; **25**: 393 -399.

47- Lee-Ramos AF, Gonzalez-Montesinos F. Prognosis of invasive amebiasis of the liver. *Arch Med Res.* 1970; **1**: 199 -204.

48- Ximenéz C. Ed Cuadernos Fund Salud (34) Ciudad de México, Fundación Mexicana para la Salud, 2000.

49- Valenzuela O, Moran P, Gómez A, Córdova K, Canales N, Cardoza J, Gómez N, Cano M, Ximenéz C. Epidemiology of amoebic liver abscess in México: the case of Sonora. *Annals Trop Med Parasitol.* 2007; **101**: 533-538.

50- Blessmann J, Van LA, Tannich E. Epidemiology and treatment of amebiasis in Hue, Vietnam. *Arch Med Res.* 2006; **37:** 270-272.

51- Staufer W, Abd-Alla MD, Ravdin J. Prevalence and incidence of *E. histolytica* infection in South Africa and Egypt. *Arch Med Res.* 2006; **37**: 266-269.

52- Brumpt E. Etude somaire de l' *Entamoeba dispar* sp. amibe à kystes quadrinucléés, parasite de l' homme. *Bull Acad Med* (Paris) 1925; **94:**943. In Martínez-Palomo A. (ed) AMIBIASIS, Medica panamericana. Mexico 1989.

53- Diamond L S, Clark CG. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudin, 1903 (Emended Walker 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brump, 1925. *J Euk Microbiol.* 1993; **40**: 340-344.

54- Clarck CG, Diamond LS. Ribosomal RNA genes of "pathogenic" and "nonpathogenic" *Entamoeba histolytica* are distinct. *Mol Biochem Parasitol.* 1991; **49**: 297-302.

55- Tanich E, Burchard GD. Differentiation of pathogenic from no-pathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragments analysis of a single gene amplified *in vitro*. *J Clin Microbiol.* 1991; **29**: 250-255.

56- Romero JL, Descoteaux S, Reed S, Orozco E, Santos J, Samuelson J. Use of polymerase chain reaction and no-radioactive DNA probes to diagnose *E. histolytica* in clinical samples. *Arch Med Res.* 1992; **23**: 277-279.

57- Ximénez C. Epidemiology of Amebiasis in Mexico: A molecular approach. *Arch Med Res.* 2006; **37**: 263-265.

58- Pineiro SMB, Maciel RF, Morais MA, Aca IS, Carvalho LB, Coimba MRM. Genetic characterization of *Entamoeba dispar* isolates in Northern Brazil. *Act Trop.* 2005; **894**: 35-40.

59- Acuña-Soto R, Samuelson J, De Girolomi P, Zárate L, Millán-Velazco F, Schoolnick G, Wirth D. Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med Hyg.* 1993; **48**: 58-70.

60- Ramos F, Morán P, González E, García G, Ramiro M, Gómez A, García de León MC, Melendro EI, Valadez A, Ximénez C. High prevalence rate of *Entamoeba histolytica* asymptomatic infection in a rural Mexican comunity. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; **73:** 87-91.

61- Trissl D. Inmunology of *Entamoeba histolytica* in human and animal hosts. *Rev Infect Dis.* 1982: **4**; 1154-1184.

62- Del Muro R, Acosta E, Merino E, Glender W, Ortiz-Ortiz L. Diagnosis of *E. histolytica* using salivary IgA antibody detection. *J Infec Dis.* 1990: **162;** 1360-1364.

63- Acosta G, Barranco C, Isibasi A, Campos R. Excresión de anticuerpos de la clase IgA específicos anti-amiba en bilis de ratas inmunizadas con trofozoítos de *E: histolytica*. *Arch Invest Méd.* 1982: **13**; 51-65.

64.- Ramos F, Valenzuela O, Morán P, González E, Ramiro M, Cedillo R, Martinez Ma C, Gómez A, Muñoz O, Melendro EI, Ximénez C. Anti-*E. histolytica* IgA antibodies in saliva of *E. histolytica* or *E. dispar* infected individuals: longitudinal study of cohorts. *Arch Med Res.* 1997; **28:** 327-329.

65- Ortíz-Ortíz L, Samacona G, Sepúlveda B, Capin NR. Cell mediated immunity in patients with amebic abscess of the liver. *Clin Immunol Immunopathol.* 1975; **4**:127-134.

66- Kretschmer RR. Immune phenomena in amebiasis: *Surv Immunol Res.* 1984; **3**: 1-10.

67- Ganguly NK, Mahajan RC, Sharma S, Chandanani RE, Gupta AK, Dutta DV. Cellular reactions to amebic antigen in invasive amoebiasis: a preliminary comunication. *Indian J Med Res.* 1979; **69:** 412-416.

68- Salata RA, Ravdin JI. Review of the human immune mechanisms directed against *Entamoeba histolytica. Rev Infect Dis.* 1986; **8**: 261-272.

69- Dramstein T. Trissl D, Klos M, Gold D, Hanh H. Mitogenicity of *Entamoeba histolytica* extracts for murine lymphocytes. *Immunology* .1980; **41**: 347-352.

70- Salata RA, Cox JG, Ravdin JI. The interaction of human T-lymphocytes and *E. histolytica* killing virulent amoeba by lectin –dependent lymphocytes. *Parasite Immunol.* 1987; **9**: 249-261.

71- Ghadirian E, Meerovitch E. Macrophage requirement for host defense against experimental hepatic amebiasis in the hamster. *Parasite Immunol.* 1982; **4**: 219-225.

72- Ghadirian E, Meerovitch E, Kongshaun PA. Role of macrophages in host defense against hepatic amoebiasis in hamsters. *Infect Immun.* 1983; **42**: 1017-1019.

73- Ghadirian E, Konsghaun PA. Effect of silica on resistencie of mice to *E. histolytica* infection. *Infect Immonol.* 1984; **45:** 399-402.

74- Salata RA, Martínez-Palomo A, Murray HW, Canales L, Treviño N, Segovia E, Murphy CF, Ravdin JI. Patients trated amebic liver abscess develop a cell mediated immune response. *J Immunol.* 1986; **136:** 2633-2639.

75- Scott P, Kaufman SHE. The role of T-cell subsets and cytokines in the regulation of infection. *Immunol Today.* 1991; **12**: 346-348.

76- Talamas-Rohana P, Schilie-Guzmán MA, Hernández VI, Rosales-Encina JL. T-cell suppression and selective *in vivo* activation of T-h2 subpopulation by *E. histolytica. Infect Immun.* 1995; **63**; 3953-3958.

77- Salata RA, Martínez-Palomo A, Canales L, Murray HW. Treviño N, Ravdin JI. Supresión of T- lymphocyte response to *Entamoeba histolytica* antigen by immune sera. *Infec Immun.* 1990; **58:** 3941-3946.

78- Morán P, Rico G, Ramiro M, Olvera O, Ramos F, González E, Valadez A, Curiel O, Melendro EI, Ximénez C. Defective production of reactive oxigen intermediates (ROI) in a patient with recurrent amebic liver abscess. *Am J Trop Med Hyg*. 2002; **67**: 632-635

79- Krupp IM. Antibody response in intestinal and extraintestinal amebiasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1970; **19**: 57-62.

80- Lotter H, Jackson TFHG, Tannich E, Evaluation of three serological tests for the detection of antiamebic antibodies sera of patients from an area endemic for amebiasis. *Trop Med Parasitol*. 1995; **46:** 180-182.

81- Grundy MS, Cartwright-Taylor L, Lundin L, Huldt G. Antibodies against *Entamoeba histolytica* in human milk and serum en Kenya. *J Clin Microbiol*. 1983; **17**: 753-758.

82- Acosta-Altamirano G, Torres-Sánchez E, Meraz E, Isibasi A, Kumate J. Detection of class IgA antibodies directed against lipopeptidophosphoglycan of *Entamoeba histolytica* in samples of human colostrum. *Arch Invest Med (Mex)*. 1986; **17:** 291-295.

83- Sepúlveda B, Martínez-Palomo A. Immunology of amoebiasis produced by *E. histolytica*. In: Cohen S. y Warren K. (eds). Inmunology of parasitic Infections 2a ed. Blackwell Scientific publications, Oxford. 1982; 170 p.

84- Ximénez C, Hernández J, Melendro EI, Ramiro M, Coproanticuerpos y anticuerpos séricos antiamibianos en la amibiasis intestinal aguda. *Arch Invest Méd* (Méx) 1990: **21** (Supl 1): 239-249.

85- Ravdin JI, Abd-Alla MD, Welles SL, Reddy S, Jackson TFHG. Intestinal antilectin immunoglobulin A antibody response and immunity to *Entamoeba dispar* infection following cure of amebic liver abscess. *Infect Immun*. 2003; **71**: 6899-6905.

86- Blessmann J, Van Linh P, Nu PA, Thi HD, Muller-Myhsok B, Buss H, Tanich E. Epidemiology of amebiasis in a region of high incidence of amebic liver abscess in central Vietnam. *Am J Trop Med Hyg*. 2002; **66**: 578-583.

87- Sharma MP, Dasaranthy S, Sushma S, Verna M. Long term follow of amebic liver abscess: clinical and ultrasound patterns of resolution. *Trop Gastroenterol*. 1995; **16**: 24-28.

88- Petri WA Jr, Chaudhry O, Haque R, Houpt E. Adherence-blocking vaccine for amebiasis. *Arch Med Res*. 2006; **59:** 288-291.

89- Stanley SL Jr. Protective immunity to amebiasis: new insight and new challenge. *J Infect Dis*. 2001; **184**: 504-506.

90- Zhang T, Cieslak PR, Stanley SL. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with a recombinant *Entamoeba histolytica* antigen. *Infect Immun*. 1994; **62**: 1166-1170.

91- Song CJG, Torian BE, Abd-Alla MD, Jackson TFHG, Gathiram V, Ravdin JI. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with a recombinant *Entamoeba histolytica* 29-kilodalton antigen. *Infect Immun*. 1995; **63**: 472-475.

92- Stanley SL. Progress towards development of vaccine for amebiasis. *Clin Microbiol Rev*. 1997; **10:** 637-649.

93- Huston ChD, Petri WA. Host-Pathogen interaction in amebiasis and progress in vaccine development. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1998; **17**: 601-614.

94- Stanley SL, Becker A, Kuntz-Jenkins C, Foster L, Li E. Cloning and expression of membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats. *Proc Natl Acad Sci USA*: 1990; **87:** 4976-4980.

95- Petri WA Jr, Ravdin JI. Protection of gerbils from amebic liver abscess by inmunization with the galactose specific adherent lectin of *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun*. 1990; **59**: 97-101.

96- Lotter H, Zhang T, Seydel KB, Stanley SL Jr, Tanich E. Identification of an epitope on the *Entamoeba histolytica* 170 kDa lectin conferring antibody mediated protection against invasive amebiasis. *J Exp Med*. 1997; **185:** 1793-1801.

97- Haque R, Ali IK, Akther S, Petri WA Jr. Comparison of PCR isoenzyme analysis and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J Clin Microbiol*. 1998; **36**: 449-452.

98- Jackson TFGH, Gathiram V, Simjee E. serological differentiation between past and present infections in hepatic amoebiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1984; **78**: 342-345.

99- Lotter H, Jackson TFGH, Tannich E. Evaluation of three serological tests for the detection of antiamebic antibodies applied to sera of patients from an area endemic for amebiasis. *Trop Med Parasitol*. 1995; **71**: 401-407.

100- Gandhi B, Irshad M, Chawla TC Tandon BN. Enzime linked protein-A an ELISA for detection of amebic antibody. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1987; **81**:183-185.

101- Ungar B, Yolken R, Quinn T. The use monoclonal antibody in an enzyme immunoassay for the detection of *E. histolytica* in fecal specimens. *Am J Trop Med Hyg*. 1985; **34:** 465-472.

102- Healy GR. Immunologic tools in the diagnosis of amebiasis: epidemiology in the United States. *Rev Infect Dis.* 1986; **8:** 239-246.

103- Myung K, Buech D, Jackson T, Stanley SJr. Serodiagnosis of invasive amebiasis using a recombinant *E. histolytica* antigen-based ELISA. *Arch Med Res.* 1992; **23:** 285-288.

104- Lee J, Soon-Jung P, Tai-Soon Y. Serodiagnosis of amebiasis using a recombinant protein fragment of the 29 KD surface antigen of *Entamoeba histolytica. Int J Parasitol.* 2000; **30:** 1487-1491.

105- Haque R, Neville LM, Hahn P, Petri WA Jr. Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. *J Clin Microbiol.* 1995; **33**: 2558-2561.

106- Haque R, Mollah NU, Ali IKM, Alam K, Eubanks A, Lyerly D, Petri WA Jr. Diagnosis of amebic liver abscess and intestinal infection with the Tech Lab *Entamoeba histolytica* II antigen detection and antibody tests. *J Clin Microbiol.* 2000; **38**: 3235-3239.

107- Megan L, Haque R, Kabir M, Roy S, Lahlou RM, Mondal D, Tannich E, Petri WA Jr. Evaluation of *Entamoeba histolytica* antigen and antibody point-of-care Test for the rapid diagnosis of amebiasis. *J Clin Microbiol.* 2006; **44**: 4569-4571.

108- Paul J, Srivastava S, Bhattacharya S. Molecular methods for diagnosis of *Entamoeba histolytica* in a clinical setting: An overview. *Exp Parasitol.* 2007; **116:** 35-43.

109- Ackers JP. The diagnostic implications of separation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar. J Bioscience.* 2002; **27:** 573-78.

110- Bhattacharya D, Haque R, Singh U. Coding and no coding genomic regions of *Entamoeba histolytica* have significantly different rates of sequence polymorphisms: implications for epidemiological studies. *J Clin Micribiol.* 2005; **43**: 4815-4819.

111- Clark CG. Methods for the investigation of diversity in *Entamoeba histolytica. Arch Med Res.* 2006; **37**: 259-262.

112- Michalak M. Corbett EF, Mesaeli N, Nakamura K, Opas M. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J.* 1999; **344**: 281-292.

113- Persson S, Rosenquist M, Sommarin M. Identification of a novel isoform (Crt2) in human and mouse. *Gene.* 2002; **297**: 151-158.

114- Persson S, Rosenquist M, Svensson K, Galvao R, Boss WF, Sommarin M. Phylogenetic analyses and expression studies reveal two distinct groups of calreticulin isoforms in higher plants. *Plant Phisiol.* 2003; **133**: 1385-1396.

115- Pelham HR. The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci.* 1990. **15**: 483–486.

116- Gelabart P, Opas M, Michalak M. Calreticulin a Ca^{2+} binding chaperone of the endoplasmic reticulum. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005; **37:** 260-66.

117- Nakamura K, Zuppini A, Arnaudeau S, Linch J, Ahsan I, Krause R. Funtional specialization of calreticulin domains. *J Cell Biol.* 2001; **154**: 961-972.

118- Michalak M, Robert Parker JM, Opas M. Ca2+ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium.* 2002; **32**: 269-278.

119- Bedard K, Szabo E, Michalak M, Opas M. Cellular functions of endoplasmic reticulum chaperones calreticulin, calnexin, and ERp57. *Int Rev Cytol.* 2005; **245:** 91-121.

120- Corbett EF, Oikawa K, Francois P, Teissier DC, Kay C, Bergeron JJ, Thomas D, Krause KH, Michalak M. Ca2+ regulation of interactions between endoplasmic reticulum chaperones. *J Biol Chem.* 1999; **274**: 6203-6211.

121- Jhonson S, Michalak M, Opas M, Eggleton P. The ins and outs of calreticulin; from the endoplasmic reticulum lumen to the extracellular space. *Trends Cell Biol.* 2001; **11**: 122-129.

122- Andrin C, Pinkoski MJ, Burns K, Atkinson EA, Krahenbuhl IO, Hudig D, Fraser SA, Winkler U, Tschopp J, Opas M, Bleackley RC, Michalak M. Interaction between a Ca2+ binding protein calreticulin and perforin, a component of the cytotoxic T-cell granules. *Biochemistry.* 1998; **37**: 10386-10394.

123- Depuis M, Schaerer E, Krause KH, Tschopp J. The calcium, binding protein calreticulin is a major constituent of lytic granules in cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med.* 1993; **177**: 1-17.

124- Rojiani MV, Finlay BB, Gray V, Dedhar S. In vitro interaction of polypeptide homologous to human Ross-A antigen (calreticulin) with a highly conserved amino acid sequence in the cytoplasmic domain of integrin α- subunits. *Biochem.* 1991; **30**: 9859-9866.

125- Holaska JM, Black BE, Lone DC, Hanover JA, Lessky J, Paschal BM. Calreticulin is a receptor for nuclear export. *J Cell Biol.* 2001; **151**: 127-140.

126- Gray AJ, Park PN, Broekdmann, JJ, Laurent GJ, Reeves ST, Stenmarck KR, Mechan RP. The mitogenic effects of the B chain of fibrinogen are mediated though cell surface calreticulin. *J Biol Chem.*1995; **270**: 26602-26606.

127- Papp S, Fadel MP, Opas M. ER- to-cell surface signaling: calreticulin and cell adhesion. *J Applied Biomedicine.* 2004; **2**: 1-14.

128- Jaworski DC, Higgins JA, Radulovic S, Vaughan JA, Azad AF. Presence of calreticulin in vector fleas (*Siphonaptera*). *J Med Entomol.* 1996; **33**: 482-489.

129- Jaworski DC, Simmen FA, Lamoreaux W, Coons LB, Muller MT, Needham GR. A secreted calreticulin protein in Ixodid tick (*Amblyoma americanum)* saliva. *J Insect Physiol.* 1995; **41**: 369-375.

130- Sueyoshi T, McMuller BA, Marnell LL, Duclos TW. A new procedure for the separation of protein 2, prothrombin fragment 1.2 and calreticulin from human plasma. *Thromb Res.* 1991: **63**: 569-575.

131- Booth C, Koch GLE. Perturbation of cellular calcium induces secretion of luminal endoplasmic reticulum proteins. *Cell.* 1989; **59**: 729-737.

132- Eggleton P, Lieu TS, Zappi EG, Sastry K, Coburn J, Zaner JS, Sontheiner RD, Capra JD, Tauber AI. Calreticulin is released from activated neutrophils and binds to C1q and mannan-binding protein. *Clin Immunol Immunopathol.* 1994; **72**: 405-409.

133- Nakamura M, Moriya M, Baba T, Michikawa Y, Yammanobe T, Aras K, Okinaga S, Kobayashi T. An endoplasmic reticulum protein calreticulin is transported into the acrosome of rat sperm. *Exp Cell Res.* 1993; **205**: 101-110.

134- Sonnichsen B, Fullekrug J, Van PN, Diekmann W, Robinson DG, Mieskes G. Retention and retrieval: both mechanisms cooperate to maintain calreticulin in the endoplasmic reticulum. *J Cell Science.*1994; **107**: 2705-2717.

135- Afshar N, Black BE, Paschal BM. Retrotranslocation of the chaperone calreticulin from the endoplasmic reticulum lumen to the cytosol. *Mol Cell Biol.* 2005; **25**: 8844-8853.

136- Souto-Padrón T, Labriola CA, de Sousa W. Immunocytochemical localization of calreticulin in *Tripanosoma cruzi. Histochem Cell Biol.* 2004; **122**: 563-569.

137- Opas M, Tharin S, Milner RF, Michalak M. Identification and localization of calreticulin in plant cells. *Protoplasma.* 1996; **191**: 164-171.

138- Nelson DE, Glausinger B, Bohnert HJ. Abundant accumulation of the calcium-binding molecular chaperone calreticulin in specific floral tissues of *Arabidopsis thaliana. Plant Phisiol.* 1997; **114**: 29-37.

139- Borisjuk N, Sitailo L, Adler K, Malyshera L, Tewes A, Borisjuk L, Manteuffel R. Calreticulin expression in plant cell; developmental regulation, tissue specificity and intracellular distribution. *Planta.* 1998; **206:** 504-514.

140- Dedhar S, Rennie PS, Shago M, Leung-Hagestijn CY, Yang H, Filmus J, Hawley RG, Bruchousky N, Cheng H. Inhibition of nuclear hormone receptor activity by calreticulin. *Nature (London).* 1994; **367:** 480-483.

141- Nash PD, Opas M, Michalak M. Calreticulin: no just another calcium binding protein. *Mol Cell Biochem.* 1994; **135:** 71-78.

142- Vassilakos A, Michalak M, Lehrman MA, William DB. Oligosaccharide binding characteristics of molecular chaperones calnexin and calreticulin. *Biochemistry.* 1998; **37**: 3480-3490

143- Joshi M, Pogue GP, Duncan RC, Lee NS, Singh NK, Atreya CD, Dwyer DM, Nakhasi HL. Isolation and characterization of *Leishmania donovani* calreticulin gene and its conservation of the RNA binding activity. *Mol Biochem Parasitol.* 1996; **81**: 53-64.

144- Khalife J, Trottein F, Schacht AM, Godin C, Pierce RJ, Capron A. Cloning of the gene encoding a *Schistosoma mansoni* antigen homologous to human Ro/SS-A autoantigen. *Mol Biochem Parasitol.* 1993; **57**: 193-202.

145- Corbett EF, Michalak KM, Oikawa K, Jhonson S, Campbell ID, Eggleton P, Kay C, Michalak M. The conformation of calreticulin is influenced by the endoplasmic reticulum luminal environment. *J Biol Chem.* 2000; **275**: 27177-27185.

146- Marcelain K, Colombo A, Molina MC, Ferreira L, Lorca M, Aguilar JC, Ferreira A. Development of an immunoenzymatic assay for the detection of human antibodies against *Tripanosoma cruzi* calreticulin, an immunodominant antigen. *Acta Tropica.* 2000; **75:** 291-300.

147- El Gengehi N, El Ridi R, Tawab NA, El Demellawy M, Mangold BL. A *Schistosoma mansoni* 62 kDa band is identified as an irradiated vaccine T-cell antigen and characterized as calreticulin. *J Parasitol.* 2000; **86**: 993-1000.

148- Kinoshita G, Keech CL, Sontheimer RD, Purcell A, McCluskey J, Gordon TP. Spreading of the immune response from 52KDRo and 60KDRo to calreticulin in experimental autoimmunity. *Lupus* .1998; **7**: 7-11.

149- Eggleton P, Llewellyn DM. Pathophysiological roles of calreticulin in autoimmune disease. *Scan J Immunol.* 1999; **49**: 466-473.

150- Staikou EV, Routsias JG, Makri AA, Terzoglu A, Sakarellos-Daitsiotis M, Sakarellos C, Panayotou G, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG. Calreticulin binds preferentially with B cell linear epitopes of Ro 60 KD autoantigen, enhancing recognition by anti-Ro60 KD autoantibodies. *Clin Exp Immunol.* 2003; **134**:143-150.

151- Eggleton P, Ward FJ, Jhonson S, Khamashta MA, Hughes GR, Hajela VA, Michalak M, Corbett EF, Staines NA, Reid KB. Fine specificity of autoantibodies to calreticulin: epitope mapping and characterization. *Clin Exp Immunol.* 2000; **120:** 348-391.

152 - Lux FA, McCualiffe DP, Buttner DW, Lucius R, Copra DJ, Sontheimer RD, Lieu TS. Serological cross-reactivity between a human Ro/ SS-A autoantigen (calreticulin) and the λRAL-1 antigen of *Onchocerca volvulus*. *J Clin Invest.* 1992; **89**: 1945-1951.

153- Rokeach LA, Zimmerman PA, Unnasch TR. Epitopes of *Onchocerca volvulus* RAL-1 antigen, a member of the calreticulin family of proteins, recognized by sera from patients with onchocerciasis. *Infect Immun.* 1994; **62:** 3696-3704.

154- Gao B, Adhikari R, Howarth M, Nakamura K, Gold MC, Hill AB, Knee R, Michalak M, Elliott T. Assembly and antigen-presenting function of MHC class1 molecules in cells lacking the ER chaperone calreticulin. *Immunity.* 2002; **16**: 99-109.

155- Ogden CA, de Cathelineau A, Hoffmann PR, Bratton D, Ghebrehiwet B, Fadok VA, Henson PM. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD 91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med.* 2001;**194**: 781-795.

156- Kishore U, Sontheimer RD, Sastry KN, Zaner KS, Zappi EG, Hughes GR, Khamashta MA. Strong P, Reid KB, Eggleton P. Release of calreticulin from neutrophils may alter C1q-mediated immune functions. *Biochem J.* 1997; **322**:543-50.

157- Ferreira V, Molina MC, Schwaeble W, Lemus D, Ferreira A. Does *Trypanosoma cruzi* calreticulin modulate the complement system and angiogenesis? *Trends. Parasitol.* 2005. **21**: 169–174.

158- Winter JA, Davis OR, Brown, M.C. Garnet, S. Stolnik, Pritchard DI. The assessment of hookworm calreticulin as a potential vaccine for necatoriasis. *Parasite Immun*ol. 2005: **27:** 139–146.

159- Ferreira V, Valck C, Sanchez G, Gingras A, Tzima S, Molina MC, Sim R, Schwaeble W, Ferreira A. The classical activation pathway of human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Tripanozama cruzi. J Immunol.* 2004; **172**: 3042-3050.

160- Stuart GR, Lynch NJ, Day AJ, Schwaeble WJ, Sim RB. The C1q and collectin binding site within C1q receptor (cell surface calreticulin). *Immunopharmacology.* 1997; **38**: 72-80.

161- Gardai SJ, Xiao YQ, Dickinson M, Nick JA, Voelker DR, Greene KE, Henson PM. By binding SIRP alpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. *Cell.* 2003; **115**: 13-23.

162- Ferreira V, Molina MC, Valck C, Rojas A, Aguilar L, Ramírez G, Schwaeble W, Ferreira A. Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts. *Mol Immunol.* 2004; **40**: 1279–1291.

163.- Nakashi HL, Pogue GP, Duncan RC, Joshi M, Atreya CD, Lee NS, Dwyer DM. Implications of calreticulin function in parasite biology. *Parasitology Today.* 1998; **14**: 157-160.

164- McCoy JJ, Mann BJ. Proteomics analysis of Gal/GalNAc lectin associated proteins in *Entamoeba histolytica. Exp Parasitol.* 2005; **110**: 220-225.

165- Tolstrup J, Krause E, Tannich E, Bruchhaus I. Proteomic analysis of *Entamoeba histolytica. Parasitol.* 2007: **134:** 289–298.

166- Okada M, Huston Ch D, Oven M, Mann BJ, Petri W Jr, Kita K, Nosaki T. Kinetic and strain variation of phagosome proteins of *Entamoeba histolytica* by proteomics analysis. *Mol Biochem Parasitol.* 2006: **145**:171-183.

167- Diamod LS, Harlow R, Cunnick CA. New medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba. Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1978; **72**: 431-432.

168- Aley SB, Scott WA, Cohn ZA. Plasma membrane of *Entamoeba histolytica. J Exp Med* 1980; **152**: 391-404.

169- Salgado M, Villagómez-Castro JC, Rocha-Rodríguez R, Sabanero-López M, Ramos MA, Alagón A, López-Romero E, Sanchez-López R. *Entamoeba histolytica* Biochemical and molecular insights into the activities with in microsomal fractions. *Exp. Parasitol.* 2005. **110**: 363–373.

170- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quanties of protein dye binding. *Annal Biochem.* 1976; **72**: 248-54.

171- Maniatis T, Fritsch EF. Sambrooks J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY. 1989.

172- Lee Ch, Levin A, Branton D. Cooper staining: a five minutes protein stain for sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gels. *Anal Biochem.* 1987;**166**: 308-312.

173- Towbin H, Staehelin T, Gordon G. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulosa sheets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979; **76:** 4350-4354.

174- Ghosh TC, Gupta SK, Majundar S. Studies on codon usage in *Entamoeba histolytica. Int J Parasitol.* 2000; **30**: 715-722.

175- Loftus B, Anderson I, Davis R, Alsmark UC, Samuelson J, Amedeo P, Rocaglia P, Berriman M, Hirt RP, Mann BJ, Nozaqui T, etal. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica. Nature,* (London) 2005; **433**: 865-868.

176- Edman U. Meza I, Agabian N. Genomic and cDNA actin sequences from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; **84**: 3024-3028.

177- Saavedra-Lira E, Pérez- Monfort R. Cloning and sequence determination of the gene coding for the pyruvate phosphate dikinase of *Entamoeba histolytica*. *Gene*. 1994; **142**: 249-251.

178- Altschul SF,. Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z , Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein data base search programs. *Nucl Acids Res*. 1997. **25**: 3389–3402.

179- Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl Acids Res*. 1988. **16:** 10881–10890.

180- Kinter M, Sherman NE. In Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry. Desiderio D. M. Nibbering N.M M. Eds; John Wiley-Interscience, Inc. New York. 2000. pp 147–165.

181- Sawhney S, Chakravarti N, Jain P, Vinayak K. Inmunogenicity of axenic *E. histolytica* antigens and its fractions. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1980; **74**: 26-29.

182- Bhattacharya A, Satish S, Bagchi A, Bhattacharya S. The genome of *Entamoeba histolytica*. *Inter J Parasitol*. 2000; **30**: 401-410.

183- Coppolino MG, Dedhar S. Molecules in focus: Calreticulin. *Int J Biochem Cell Biol*. 1998; **30:** 553-558.

184- Carrero JC, Laclette JP. Molecular biology of *Entamoeba histolytica*: A review. *Arch Med Res*. 1996; **27**: 403-412.

185- Saito-Nakano Y, Loftus BJ, Hall N, Nozaki T. The diversity of Rab GTPases in *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol*. 2005; **110:** 244–252.

186- Aguillon JC, Ferreira L, Perez C, Colombo AC, Molina MC, Wallace WA, Solari W, Carballo P, Galindo M, Galanti N, Om A, Billeta R, Ferreira A. Tc45 a dimorphic *T. cruzi* inmmunogen with variable chromosomal localization is calreticulin. *Am J Trop Med Hyg*. 2000; **63**: 306-312.

187- Sanders MI, Jaworski BC, Sanchez JL, DeFraites RF, Glass GE, Scoot AL, Raha S, Ritchie BC, Needham GR, Schwartz BS. Antibody to cDNA – derived calreticulin protein from *Amblyomma americanum* as a biomarker of tick exposure in humans. *Am J Trop Med Hyg*. 1998; **59:** 279-285.

188- Xu GQ, Fang Q, Keirans JE, Durden LA. Cloning and sequencing of putative calreticulin complementary DNA from four hard tick species. *J Parasitol*. 2004; **90:** 73-78.

189- Alarcon-Chaidez F, Ryan R, Wikel S, Dardick K, Lawler C, Foppa IM, Tomas P, Cushman A, Hsiech A, Spielman A, Bouchard KR, Dias F, Krause PJ. Confirmation of tick bite by detection of antibody to Ioxodes calreticulin salivary protein. *Clin Vacc Immunol.* 2006; **13**: 1217-1222.

190- Andres DA, Dickerson IM, Dixon JE. Variants of the carboxyl-terminal KDEL sequence direct intracellular retention. *J Biol Chem.* 1990. **265**: 5952–5955.

191- Haugejorden SM, Snirivasan M, Green M. Analysis of the retention signals of two resident luminal endoplasmic reticulum proteins by in vitro mutagenesis. *J Biol Chem.* 1991; **266**: 6015-6018.

192- Karaoglu D, Kelleher DJ, Gilamore R.. The highly conserved STT3 protein is a subunit of the yeast oligosaccharyl transferase and forms a subcomplex with Ost3p and Ost4p. *J Biol Chem.*1997; **272**: 32513-32520.

193- Spirig U, Glavas M, Bodmer D, Reiss G, Burda P, Lippuner V, te –Heesen S, Aebi M, The STT3 protein is a component of the yeast oligosaccharyl transferase cpmplex. Mol Gen Genet. 1997; 256:

194- Spiro RG, Zhu Q, Bhoyroo V, Soling HD. Definition of the lectin-like properties of the molecular chaperone, calreticulin, and demonstration of its copurification with endomannosidase from rat liver Golgi. *J Biol Chem.* 1996; **271**: 11588-11594.

195- Matsuoka K, Seta K, Yamakawa Y, Okuyana T, Shinoda T, Isobe T. Covalent structure of bovine brain calreticulin. *Biochem J.* 1994; **298**: 435-442.

196- Bouvier M, Stafford W. Probing the three dimensional structure of human calreticulin. *Biochemistry.* 2000; **39**:14950–14959.

197- Mendlovic F, Ostoa-Saloma P, Solis CF, Martinez-Ocaña J, Flisser A, Laclette JP. Cloning, characterization, and functional expression of *Taenia solium* calreticulin. *J Parasitol.* 2004; **90**: 891-893.

198- Sánchez-López R, García-Castro S, Ramos MA, Lizardi PM, Alagón A. Cloning and expression of *Entamoeba histolytica* ERD2 gene. *Mol Biochem Parasitol.* 1998; **92**: 355–359.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 67(6), 2002, pp. 636–639
Copyright © 2002 by The American Society of Tropical Medicine and Hygiene

CALRETICULIN-LIKE MOLECULE IN TROPHOZOITES OF *ENTAMOEBA HISTOLYTICA* HM1:IMSS (SWISSPROT: ACCESSION P83003)

ENRIQUE GONZÁLEZ, GUADALUPE RICO, GUILLERMO MENDOZA, FERNANDO RAMOS, GABRIELA GARCÍA, PATRICIA MORÁN, ALICIA VALADEZ, EMMA I. MELENDRO, AND CECILIA XIMÉNEZ

Depto. de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM, México, D.F., México; Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, México, D.F., México; Hospital de Pediatría, Centro Médico Siglo XXI, IMSS, México, D.F., México

Abstract: In this work, we report the partial sequence of a 51 kDa protein of *Entamoeba histolytica* that is highly immunogenic in humans. Partial sequencing of the N-terminal end showed that 18 of the first 20 amino acid residues of the protein were identified uniquely, indicating that the final product was a homogeneous protein preparation. The N-terminal sequence that was found was: KVYFEETFENGWKXIWSKW. Comparing the 19-amino acid sequence of the protein in automated databases shows significant similarity with amino acid sequences of the calreticulin-like protein of spinach leaves (77%) and of the calreticulin precursor of *Dictyostelium discoideum* (60%).

INTRODUCTION

Calreticulin (CR) is a widely distributed protein in eukaryotic cells except for yeast and erythrocytes.[1] Filogenetically, it is a highly conserved protein in both its amino acid sequence and molecular organization. CR is a resident endoplasmic reticulum (ER) membrane protein that belongs to the family of KDEL proteins.[2] It contains an N-terminal signal sequence and a C-terminal KDEL-ER retrieval sequence.[3] CR binds Ca^{2+} with high capacity and plays an important role in control of intracellular Ca^{2+} homeostasis.[4] CR also modulates steroid-sensitive gene expression and cell adhesion.[5,6] This protein possesses chaperone activity, binding specifically to partially processed monoglucosylated N-linked oligosaccharides;[7] therefore, it is not surprising that the most frequently reported location of this interesting protein is within the ER.

In the present work, we report partial sequencing of a 51 kDa protein of *Entamoeba histolytica* that is highly immunogenic in humans.[8] This protein is recognized by IgA and IgG anti-amebic antibodies in saliva and serum of patients with invasive amebiasis (> 91%), in contrast with the low recognition frequency obtained in asymptomatic cyst passers (<10%) and non-parasitized individuals.[9] We also observed that after 6–12 months of follow-up, patients with invasive amebiasis have antibody levels against this protein that are decreased by nearly 70%. This renders the protein potentially useful in diagnosis and detection of new cases of invasive amebiasis in endemic areas.

MATERIALS AND METHODS

Electrophoresis and Western blot of 51 kDa protein. Membrane antigen fraction of *E. histolytica* HM1:IMSS was prepared as described previously.[10] Electrophoresis of antigen was performed in 10% polyacrylamide-SDS gels under non-reducing conditions and run at 100 volts for 60 min at room temperature;[11] gels were stained with Coomassie blue for detection of 51 kDa band. Electroelution of the 51 kDa band was carried out using preparative 10% SDS-polyacrylamide gels stained with Coomassie blue. The 51 kDa band was cut with a scalpel blade and submitted to electroelution in an electroeluter chamber (model 422, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) using 0.025 M Tris-HCl buffer added to 0.19 M glycine and 1% SDS for 6 h, 10 mA at 4°C. The electroeluted protein was recovered and then dialyzed against Tris-HCl 0.01 M pH 7.5; finally, the protein was concentrated by ultrafiltration using Centricon 10 Units (Amicon Millipore Co., Bedford, MA) and a filter of 30,000-molecular-weight-cutoff (XM-30) (DIAFLO, Amicon). The 51 kDa band obtained in electroelution was analyzed in a two-dimension electrophoresis gel with a pH gradient of 3–10. The gel was stained with Coomassie blue to identify the homogeneity of the protein and its isoelectric point.

On the other hand, 51 kDa electroeluted protein was run in SDS-PAGE transferred to nitrocellulose and tested for reactivity with goat anti-human CR antibody (sc-6467) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), goat anti-rabbit skeletal muscle CR antibody (designated CRT283), and anti-amebic antibodies obtained from a pool of five serum samples from amebic liver abscess (ALA) patients in Western blot assay.[12] Sites of nitrocellulose membrane strips uncovered with protein were blocked with 50% skim-milk solution in 0.02 mM pH 7.4,[12] and the nitrocellulose membrane strips were washed with PBS added to 0.5% Tween 20 (PBS-Tw) (Sigma Chemical Co., St. Louis). For detection of KDEL-ER retrieval sequence in *E. histolytica*, 51 kDa protein, goat anti-rabbit skeletal muscle CR (CRT283) was used (donated by Dr. M. Michalak, Department of Biochemistry, University of Alberta, Manitoba, Canada).[13] This antibody was raised against synthetic peptide QAKDEL, which encodes C-terminal amino acids 386–401 of rabbit CR.[1] The CRT283 antibody was affinity-purified using BSA-coupled QAKDEL synthetic peptide affinity column.

Nitrocellulose strips were incubated (1 h at room temperature) with CRT283 antibody (1:300 dilution), goat anti-human CR antibody (1:1000 dilution), or serum antibodies from patients with ALA (1:1,000 dilution). After incubation, strips were washed as before and incubated with goat anti-rabbit IgG, rabbit anti-goat IgG, or goat anti-human IgG peroxidase-conjugated antibody (Zymed Laboratories, San Francisco) (1:1,000 dilution) in accordance with the respective origin of the first antibody used. Immunoreactive bands were detected with diaminobenzidine tetrahydrochloride solution (50 mg/100 mL in PBS). For analysis of reactivity of 51 kDa protein submitted to two-dimension electrophoresis and Western blot assay, the procedure was the same as described previously.

Reactivity analysis of 51 kDa *E. histolytica* protein in ELISA system. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed in microtiter well strips coupled with electroeluted 51 kDa *E. histolytica* protein (1 μg/well) Strips

were blocked with 3% solution of bovine serum albumin (BSA) in 0.01 M phosphate buffer at 4°C overnight. Thereafter, strips were washed twice with both 0.01 M phosphate buffer added with 0.5% BSA and 0.5% Tween 20 (Tw). A total of 50 μL/well of proper dilutions of CRT283, anti-human CR antibodies, or serum anti-amebic antibodies from patients with ALA were reacted for 2 h at room temperature and then washed once with PBS-BSA-Tw and twice with PBS-Tw (10 min). Peroxidase-conjugated antibodies used to detect antigen-antibody reaction in this ELISA were the same as described previously in the Western blot assays (50 μL of equivalent dilutions/well). Strips were incubated overnight at 4°C. Substrate consisted of 50 μL/well of 10 mL of 0.1M citrate buffer, pH 4.5 containing 10 mg o-phenylenediamine and 4 μL H_2O_2 (30%). The reaction was stopped after 3 min with 1 M of H_2SO_4 (200 μL/well) and then read in a micro-ELISA reader (Bio-Tek Instruments Co., Winoosky, VT) at 490 nM.

Sequentiation. Protein sample was prepared and sequenced after SDS-PAGE and electroblotted to polyvinylidenedifluoride membrane (Immobilon, Bio-Rad) by the Towbin method.[12] N-terminal sequence was determined by automated Edman degradation[13] on a gas-phase protein sequencer (LF 3000, Beckman Instruments, Irvine, CA) equipped with an online Beckman System Gold high-performance liquid chromatography system.[14] HPLC equipment included models 126 pump and 168 diode array detector settings at 268 and 293 nm for signal and reference, respectively. The HPLC column used was a Beckman Spherogel Micro PTH (2 X 150 mm) column, while standard Beckman sequencing reagents were used for analysis.

RESULTS

Electroeluted 51 kDa *E. histolytica* protein analyzed in two-dimension electrophoresis gel showed a unique spot located in the range of pH 6.7 (Figure 1), demonstrating the presence of only one homogeneous protein in a molecular weight of 51 kDa of *E. histolytica* antigen. Western blot of two-dimension electrophoresis gels reacted with anti-KDEL-ER retrieval sequence, anti-human CR antibodies, or the anti-amebic serum antibodies of patients with ALA showed no reactivity. However, in one-dimension electrophoresis and Western blot of previously electroeluted 51 kDa protein of *E. histolytica*, reactivity of 51 kDa protein with anti-KDEL antibody (CRT283) was positive (Figure 2), demonstrating the presence of KDEL sequence in the studied protein.

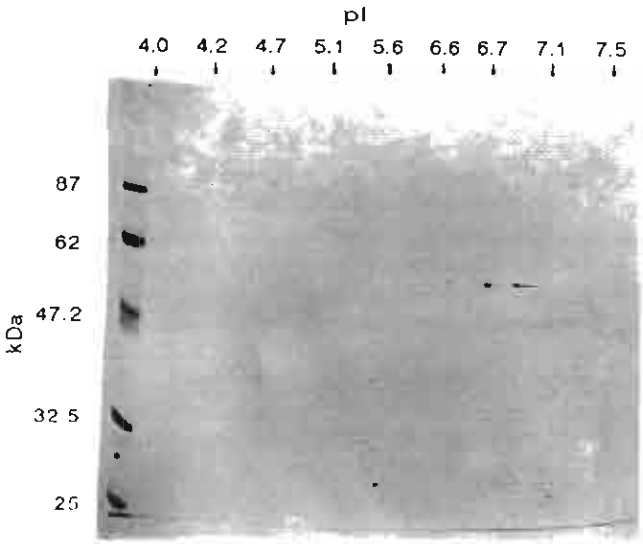


FIGURE 1. Two-dimension electrophoresis gel of electroluted 51 kDa band of *E. histolytica* HM1:IMSS membrane antigen. Range of pH used was 3–10; the unique spot obtained in 51 kDa MW site is marked with an arrow showing an isoelectric point of pH 6.7.

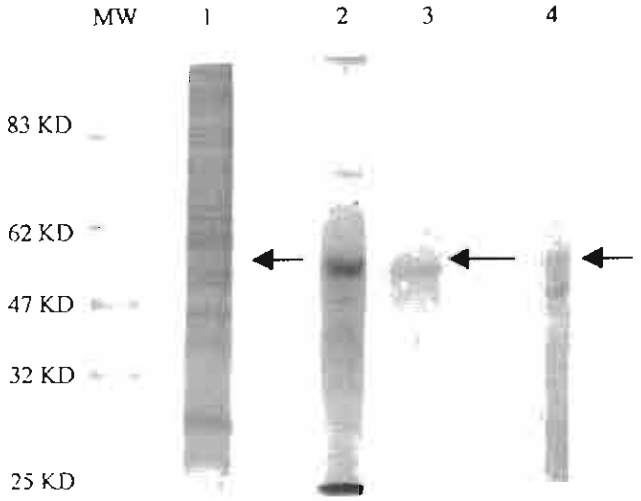


FIGURE 2. SDS-PAGE (10%) of membrane-rich extract of *E. histolytica* HM1:IMSS trophozoites under non-reducing conditions stained with Coomassie blue (1); electroeluted 51 kDa protein under reducing conditions (2); electroblotting of 51 kDa protein to nitrocellulose membrane (3); and immunoreactive bands of 51 kDa protein using CRT283 antibody(4); MW corresponds to molecular weight standards.

To test whether the absence of reactivity with other antibodies tested (anti-human CR, and serum antibodies of patients with ALA) was related to sensitivity of the Western blot assay, we tested electroeluted 51 kDa protein in an ELISA system, obtaining clear and strong reactivity of all antibodies tested (anti-KDEL-ER, anti-human CR, and ALA serum anti-amebic antibodies (Table 1). These results suggest that KDEL-ER retrieval sequence is present in 51 kDa *E. histolytica* protein; the protein also has antigenic similarity with human CR and is highly recognized by anti-amebic antibodies of patients with ALA.

Sequencing of 51 kDa protein showed that 18 of the protein's first 20 amino acid residues were uniquely identified, indicating that the final product was a homogeneous protein preparation. The N-terminal sequence found was: KVY-

TABLE 1
Reactivity analysis of *Entamoeba histolytica* calreticulin-like protein

Antibody	51 kDa *E. histolytica* protein
Non-immune serum	0.386 ± (0.054)
Serum of patients with amebic liver abscess	0.772 ± (0.083)
Anti-KDEL antibody (CRT283)	0.531 ± (0.065)
Anti-human calreticulin antibody (sc-6467)	0.522 ± (0.051)

Enzyme-linked immunosorbent assay of 51 kDa *Entamoeba histolytica* protein tested against non-immune serum obtained from a pool of five non-parasitized healthy individuals; CRT283 anti-KDEL-ER retrieval sequence antibody; anti-human calreticulin antibodies (sc-6467); and serum anti-amebic antibodies from a pool of five patients with amebic liver abscess. Values represent mean of optical density at 490 nM ± standard deviation.

TABLE 2
Amino acid sequence alignment of calreticulin proteins

Accession number	Amino acid sequences					Organism	Identities (%)	Positives (%)
tr P83003	1	KVYFEETFE	NGWKXIW	SKW	19	*Entamoeba histolytica*		
gb P30806	1	KVFFEERFE	DGWENRW	VK	18	*Spinacia oleracea*	11/18 (61)	14/18 (77)
gb PC1241	1	KVFFEERFE	DGWENRW	VK	18	*Spinacia oleracea*	11/18 (61)	14/18 (77)
gb 081919	26	KVFFEERFE	DGWEKRW	VK	43	*Beta vulgaris*	11/18 (61)	14/18 (77)
gb Q9ZPP1	23	EVFFEERFE	DGWESKW	VK	40	*Berberis stolonifera*	10/18 (55)	14/18 (77)
gb P93508	21	EVFFEERFE	DGWENRW	VK	38	*Ricinus communis*	10/18 (55)	14/18 (77)
gb Q9SLY8	30	EVFFQEKFE	DGWESRS	VK	47	*Oryza sativa*	11/18 (61)	14/18 (77)
gb Q9SP22	26	EVFFQEKFE	DGWESRW	VK	43	*Zea mays*	9/18 (50)	14/18 (77)
gb Q40401	29	EVFFEESFN	DGWESRW	VK	45	*Nicotiana plumbaginifolia*	9/18 (50)	14/18 (77)
gb Q40567	2	VFFEESFN	DGWESRW	VK	18	*Nicotiana tabacum*	9/17 (52)	12/17 (69)
tr Q40040	20	VFFQEKFE	DGWESRW	VK	36	*Hordeaum vulgare*	9/17 (52)	12/17 (69)
tr Q40041	23	VFFQEKFE	DGWESRW	VK	39	*Hordeaum vulgare*	9/17 (52)	12/17 (69)
gb O04151	23	VIFEEKFE	DGWEKRW	VK	40	*Arabidopsis thaliana*	10/18 (55)	13/18 (71)
gb Q9XF98	25	KVFFEERFE	DGWDKRW[1]	SEW	45	*Prunus armeniaca*	12/21 (57)	15/21 (71)
gb Q9STD3	19	KDYFKETFD	GSWADRW	TK	36	*Chlamydomonas reinhardtii*	9/18 (50)	12/18 (66)
gb Q23858	21	VHFKDTFD	NDWESRW[2]	SDW	40	*Dictyostelium discoideum*	9/20 (45)	12/20 (60)

Comparison of amino acid sequence of 51 kDa protein of *Entamoeba histolytica* in automated databases using BLAST program at NCBI Server (Altschul SF, Madden LT, Schaffer AA, Zhang JA, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Res 25*: 3389–3402). For alignment, "Multalin Version 5.4" and I.N.R.A.[16] were used (Corpet F. 1998. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl Acids Res 16*(22): 10881–10890). Identities represent identical amino acids. Positives represent identical amino acids plus conservative changes. [1]Site where V and S residues are located. [2]Site where 2 V are located.

FEETFENGWKXIWSKW. Comparison of the 19-amino acid sequence of this protein in automated databases showed significant alignment with different organisms (Table 2). The major homology was obtained with the amino acid sequence of CR-like protein of spinach leaves (77%) (Swissprot: accession P30806) and CR precursor of *Dictyostelium discoideum* (60%) (Swissprot: accession Q23858).

DISCUSSION

CR has been detected in *Onchocerca volvulus*, *Schistosoma japonicus*, *S. mansoni*, and *Leishmania major*.[15] In *Leishmania* and *Schistosoma* species, the Ca^{2+} binding property of CR is conserved *in vitro*.[16] There also is evidence concerning immunogenicity of CR from parasites in humans; anti-CR antibodies have been detected in serum from patients with onchocercosis,[17] schistosomiasis,[18] and tripanosomiasis.[19] Our results suggest the presence of a CR-like molecule in *E. histolytica* that appears highly immunogenic in patients with invasive amebiasis. This protein also possesses the KDEL sequence characteristic of RE resident proteins observed in other eukaryotic cells (Figure 2, Table 2). In addition to the diagnostic and epidemiologic importance of the CR-like molecule, the presence of this molecule in *E. histolytica*, a parasite without several morphologically recognizable organelles such as mitochondria, Golgi apparatus, RE, centrioles, or microtubules, supplies additional evidence for recent observations concerning an equivalent system to ER and Golgi complex[20–23] in this protozoan. The previous points open an interesting field of research related to the biologic function of this *E. histolytica* protein. Clonation of the putative gene for CR-like protein of *E. histolytica* is ongoing.

Acknowledgments: We thank Maggie Brunner for collaboration in the review of the manuscript and Ma. Elena Ortiz for secretarial assistance. We are grateful to Dr. M. Michalak for his donation of anti-KDEL antibody (CRT283).

Financial support: This work was supported by CONACYT grant 27169-M (México) and DGAPA UNAM grant IN219599 (México).

Authors' addresses: Enrique González, Fernando Ramos, Gabriela García, Patricia Morán, Alicia Valadez, Emma I. Melendro and Cecilia Ximénez. Depto. De Medicina Experimental, Facultad de Medicina UNAM, Dr. Balmis 148, Col. Doctores, 06726 México DF México. Guadalupe Rico. Hospital de Pediatría,Centro Médico Nacional Siglo XXI, Av. Cuauhtémoc 330 Col. Doctores, 03020 México, DF. México. Guillermo Mendoza, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM 04510 México DF, México.

Reprint requests: Dr. Cecilia Ximénez, Depto. de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM, Dr. Balmis 148, Col. Doctores, C.P. 06726, México, D. F., México. Telephone: +525-623-2666, Fax: +525-761-0249, E-mail: cximenez@servydor.unam.mx

REFERENCES

1. Fliegel L, Burns K, MacLennan DH, Reithmeier RA, Michalak M. 1989. Molecular cloning of the high affinity calcium-binding protein (calreticulin) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem 264*: 21522–21528
2. Krause KH, Michalak M. 1997. Calreticulin. *Cell 88*: 439–443.
3. Michalak M, Corbett EF, Mesaeli N, Nakamura K, Opas M. 1999. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J 344*: 28–92.
4. Michalak M, Mariani P, Opas M. 1998. Calreticulin, a multifunctional Ca^{2+} binding chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem Cell Biol 76*. 779–785.
5. Burns K, Duggan B, Atkinson EA, Famulski KS, Nemer M, Bleackley RC, Michalak M. 1994. Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor. *Nature 367*: 476–480.
6. Opas M, Szwczenko-Pawlikowski M, Jass GK, Mesaeli N, Michalak M. 1996. Calreticulin modulates cell adhesiveness via regulation of vinculin expression. *J Cell Biol 135*: 1913–1923.
7. Vassilakos A, Michalak M, Lehrman MA, Williams DB. 1998. Oligosaccharide binding characteristics of the molecular chaperone, calnexin and calreticulin. *Biochemistry 36*: 3480–3490.
8. Ximénez C, Sosa O, Leyva O, Morán P, Melendro EI, Ramiro M. 1992. Western blot of *Entamoeba histolytica* antigenic fractions: reactivity analysis with sera from intestinal amoebiasis patients. *Ann Trop Med Parasitol 86*: 121–127.
9. González E, Rico G, Morán P, Ramos F, García G, Padilla G, Ramiro M, Valdéz E, Muñoz O, Gómez A, Kretschmer R, Melendro EI, Ximénez C. 2000. Purification and biochemical characterization of three cysteine proteases of *E. histolytica* with potential application in epidemiologic trials. *Arch Med Res 31*: S49–S52.

10. Aley SB, Scott WA, Cohn ZA, 1980. Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med 152:* 391–404.
11. Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature 27:* 680–685.
12. Towbin H, Staehelin T, Gordon G, 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc Natl Acad Sci U S A 76:* 4350–4354.
13. Milner RE, Baksh S, Shemanko C, Carpenter MR, Smillie L, Vance JE, Opas M, Michalak M, 1991. Calreticulin, and not calsequestrin, is the major calcium-binding protein of smooth muscle sarcoplasmic reticulum and liver endoplasmic reticulum. *J Biol Chem 266:* 7155–7165.
14. Edman P, Begg G, 1967. A protein sequenator. *Eur J Biochem 1:* 80–91.
15. Joshi M, Pogue G, Duncan R, Lee N, Singh N, Atreya CD, Dwyer D, Nakhasi HL, 1996. Isolation and characterization of *Leishmania donovani* calreticulin gene and its conservation of the RNA binding activity. *Mol Biochem Parasitol 81:* 53–64.
16. Nakhasi HL, Pogue G, Duncan R, Joshi M, Atreya CD, Lee NS, Dwyer D, 1998. Implications of calreticulin function in parasite biology. *Parasitol Today 14:* 157–160.
17. Lux A, McCauliffe P, Buttner D, Lucius R, Capra D, Sontheimer R, Lieu T, 1992. Serological cross-reactivity between a human Ro/SS-A autoantigen (calreticulin) and the χRal-1 antigen of *Onchocerca volvulus*. *J Clin Invest 89:* 1945–1951.
18. Khalife J, Live JL, Pierce R, Porchet E, Godin C, Capron A, 1994. Characterization and localization of *Schistosoma mansoni* calreticulin Sm58. *Parasitology 108:* 527–532.
19. Marcelain K, Colombo A, Molina MC, Ferreira L, Lorca M, Aguilar JC, Ferreira A, 2000. Development of an immunoenzymatic assay for the detection of human antibodies against *Trypanosoma cruzi* calreticulin and immunodominant antigen. *Acta Trop 75:* 241–300.
20. Ghosh SK, Field J, Frisardi M, Rosenthal B, Mai Z, Rogers R, Samuelson J, 1999. Chitinase secretion by encysting *Entamoeba invadens* and transfected *Entamoeba histolytica* trophozoites: localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus. *Infect Immun 67:* 3073–3081.
21. Manning-Cela R, Carbajal EM, Meza I, 2000. Secretory pathway activation by interaction of *Entamoeba histolytica* trophozoites with fibronectin. *Arch Med Res 31:* S153–S154.
22. Sánchez LR, Gutiérrez A, Juárez P, Olvera A, Olvera F, Ramos MA, Sánchez R, Saralegui A, Stock RP, Alagón A, 2000. Molecular genetics of the secretory pathway in *Entamoeba histolytica*: an overview. *Arch Med Res 31:* S151–S152.
23. Chávez MB, Espinosa CM, Castañón G, Martínez-Palomo A, 2000. Ultrastructural evidence of smooth endoplasmic reticulum and Golgi-like elements in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Arch Med Res 31:* S165–S167.

Cloning and Expression of *Entamoeba histolytica* Calreticulin Gene

E. González, N. Villegas-Sepúlveda[1], R. Bonilla[1], G. García, G. Mendoza[2], F. Ramos, P. Morán, A. Valadez, A. Limón, El Melendro and C. Ximénez*

Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM. México City
[1]Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV, IPN México City
[2]Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. México City
Mr Enrique González is a PhD fellow in Biological Sciences of Universidad Autónoma Metropolitana Plantel Xochimilco in México City
**Corresponding Autor: Cecilia Ximénez García. Depto. de Medicina Experimental. Facultad de Medicina, UNAM. Dr. Balmis 148, Col Doctores C.P. 06726 México. México DF. ximenez@servidor.unam.mx*

Abstract

The aim of the present work was to clone and express the *crt* gene of the *E. histolytica* parasite. We use the PCR technique to amplify the *crt* gene using specific oligonucleotides and the nuclear genomic DNA of *E. histolytica*. PCR products were cloned in pBluescript KS+. For the expression of CRT, the plasmids were sub-cloned in pProEx-HT-b. We obtained a 1200 bp PCR product that corresponds to the complete *crt* gene, and two small amplification products of 650 and 550 bp that encodes the C-terminal and N-terminal end of CRT, respectively. These fragments show an identity of 100 % with the gene EAL49855, whicb encodes for a probable CRT reported in 2005. The recombinant protein EhCRT was sequenced by tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS) and all peptides sequenced corresponded to CRT. The three recombinant peptides were characterized with three anti-CRT heterologous antibodies.

Introduction

The protein calreticulin (CRT) is a highly conserved multi-functional ubiquitous protein in eukaryotes; one of its functions in endoplasmic reticulum (ER) is the binding of Ca^{++}. Calreticulin is one of the most important chap-

©2007 by MEDIMOND S.r.l.

erone proteins involved in the processing, joining and folding of nascent proteins in the ER. This protein mediates the retention and driving of incorrectly folded proteins to the proteosome where they are degraded. (1)

In parasites, CRT has been associated with sensor functions related to the adaptation capacity of parasites to different groups of hosts and to different biochemical environments in their respective life cycles (2, 3).

Recently, our group reported the partial sequence of a 51 kDa protein of *E. histolytica* having a homology 77% similar to CRT from spinach leaves, and 60% homologous to the precursor of CRT from *D. discoideum* (4).

CRT was also detected in *E. histolytica* by proteomic identification of lectin-associated proteins isolated by the Gal/GalNAc-conjugated magnetic beads technique (5). This fact strongly suggests the interaction of CRT with the mentioned lectin in amoeba.

The immunogenic character of CRT appears to be common in parasitic infections. High titers of anti-CRT antibodies were detected in Onchocercosis, Schistosomiasis, Trypanosomiasis and Leishmaniasis (6, 7, 8, 9). In the present work, we describe the cloning of the calreticulin gene of *Entamoeba histolytica* and the expression of the recombinant protein in a plasmid vector.

Material and Methods

*Clonig and expression of Eh*crt *gene*

Specific oligonucleotides were designed based on the analysis of the *E. histolytica* genome (Gene Bank, TIGER, www.tigr.org/tdb/e2k1/eha1). We found one gene sequence that encodes for a CRT-like protein (Gene Bank accession no. /EAL49855.1). The oligonucleotides designed for amplification of the CRL-like protein were: sense Eh*crt*F (5' GGA TCC ATG TTT ACT CTT TTC CTT CTC 3'), Eh*crt*550F (5'GGA TCC CAA GAA GGA AAG TTT GAT GAA 3') and the reverse primers Eh*crt*R (5' CTC GAG TTA AAG CTC TTC TTT GTT TTC 3') and Eh*crt*550R (5' CTC GAG TTC ATC AAA CTT ACC TTC TTG 3'). Primers were designed to include *Bam*-H1 (forward) and *Xho*1 restriction sites (reverse) (sites underlined).

The Eh*crt* gene was amplified by PCR using the oligunocleotides mentioned before and using genomic DNA obtained of axenically cultured *E. histolytica* HM1: IMSS trophozoites. PCR was performed using Taq gold polymerase (Qiagen).

The obtained PCR fragments were cloned into the vector pBluescript KS+ (Strategene, Heidelberg, Germany). The recombinant plasmid was introduced to the competent bacteria *E. coli* XL1-Blue (50mL $1X10^7$). Plasmids were purified using either the mini preps technique (10) or extraction with a plasmid mini kit (Bio Rad Laboratories, Hercules Ca, USA) in accordance with manufacturer's instructions. The insert was liberated using the restriction enzymes *Bam*-H1 and *Xho*-1 (Roche) and were verified by sequencing.

The PCR products were sequenced using the Big Dye Systems (Big Dye primer cycle sequencing ready reaction kit, Applied Biosystems, Foster City Ca, USA). The obtained nucleotide sequences and the amino acid deduced sequences were analyzed, and the homologies with previously reported se-

quences were investigated both in the *Entamoeba* genome data base (TIGER) and in the Gene Bank™. For the homology analysis, the PC/GENE and Blast™ software systems from the internet server NCBI were used (11, 12).

To prepare the recombinant protein, we obtained three clones: pB-EhCRT-1200, pB-EhCRT-N and pB-EhCRT-C, the mentioned clones correspond to the complete gene and to the half of the *crt* gene of *E. histolytica*, respectively. These recombinant plasmids were sub-cloned in the prokaryotic expression vector pProEX HT-b™ (Gibco) coupled to a 6-histidine flag in the NH_2 end. The cloning was directed with the restriction sites *Bam*-H1 /*Xho*-1. *E. coli* BL21 competent bacteria were transformed and the expression of recombinant proteins EhCRT-1200, EhCRT-N and EhCRT-C was induced with a final concentration of 1mM IPTG. The lysate was added to a 50% suspension of agarose Ni-NTA (Qiagen) and the recombinant protein was eluted with 8 M urea buffer pH 4.5, using denaturing conditions following the instructions of the protocol included in the kit for expression and purification of recombinant proteins (QIA-expressionist system, Qiagen).

The selected fractions were tested by electrophoresis in 10% acrylamide gels. With the aim of eliminating the urea, fractions were previously dialyzed against 19 mM phosphate buffer saline (PBS).

Tandem Mass Spectrometry (LC/ESI-MS/MS) of recombinant proteins

The protein bands were carefully excised from Coomassie stained SDS gels, distained, reduced, carbamidomethylated, washed, digested with trypsin and extracted according to manufacturer's instructions (13). Peptide mass spectrometric analysis was performed on a 3200 QTRAP System (Applied Biosystems). Spectra were acquired in automated mode using Information Dependent Acquisition (IDA). Database searching (NCBInr) and protein identification were performed with the Mascot Software (http://www.matrixscience.com).

Results

The PCR described previously allowed us to obtain a 1200 bp PCR product that corresponds to the complete *crt* gene, and two small amplification products of 650 and 550 bp that encode the C- terminal and N- terminal end of CRT, respectively.

Sequences of the amplification products were aligned with those registered in the data base of the *E. histolytica* genome project (www.tigr.org/tdb/e2kl/eha1) and the Gene Bank (NBCI). The sequences show an identity of 100 % with the gene EAL49855.1, which encodes for a probable CRT reported in 2005 (14).

We located the six motif sequences characteristics of the CRT, CRT I %VI which are highly conserved (figure 1); we also identified the sequence that corresponds to the sequence of the peptide of the 51 kDa protein of *E. histolytica* previously reported (4) with some punctual substitutions of residues (acces-

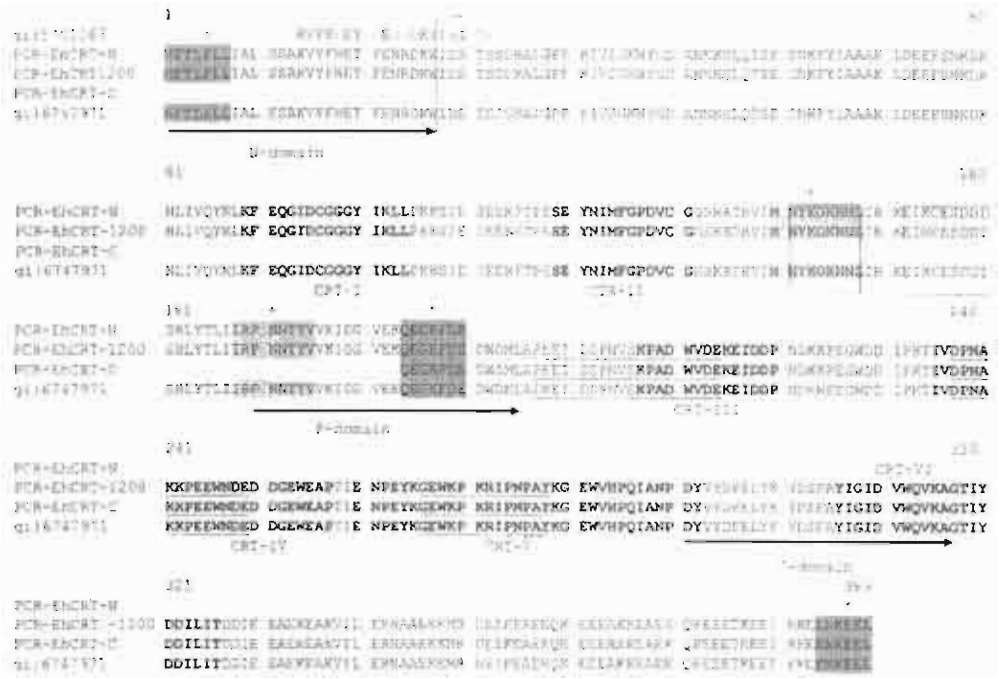


Figure 1. Alignment of deduced amino acid sequence in the sequenciation of the PCR of amplification products of Eh crt *gene. The amino acid sequence used to design the sense and antisense primers are match with (*), the arrows shown the major domains or CRT protein N-domain (1-170 residues), P-domain (171-290 residues) and C-domain (290-389 residues). The conserved CRT-motifs (CRT I – IV) are in bold. (+) Represent the putative glycosilation sites. The sequences in box indicate the putative C1q binding motifs and the underlined sequences indicated the binding sites for Ca⁺⁺. gi|5701263 represent the previously sequenced peptide by us (4). gi|6747971 sequence of CRT like of* E. histolytica *(14).*

sion no. gi: 5701263). This fact supports the hypothesis that the identified gene is the one that encodes for the previously mentioned 51 kDa protein reported as a CRT-like protein of *E. histolytica.* (Figure 1). On the other hand, when we analyzed this sequence and compared it with those sequences in other CRTs reported in Gen Bank, we observed a high identity with the CRT in *D. discoideum* (70%) (Gene Bank accession no. EAL 65647.1); human CRT (53%) (Gene Bank accession no. AAB 51176); mice CRT (54%) (Gene Bank accession no. AAH 03453.1) and a lower identity with CRT from other parasites like *Taenia solium* (50%) (Gene Bank accession no. AF 340232.1) and *Trypanosoma cruzi* (45%) (Gene Bank accession no. AF 162779). However the homology in all sequences analyzed were between 67 % 71%.

Expression of E. histolytica *CRT*

The recombinant protein of interest was present in the insoluble fraction of

Table 1. Peptides of Eh CRT-1200 Recombinant Proteins

Sequence	Star - end	Mr observed	Score
K. ALGPFK. I	36 – 41	632.32	46
K. LDEEFSNK. D	71 – 78	491.22	52
K. LDEEFSNK. D	71 - 78	491.22	52
K.LDEEFSNKDK. N	71 - 80	612.74	58
K.NLIVQYNLK. F	81 - 89	552.75	39
R. THVIMNYK. G	136 – 143	503.21	25
K. TIVDPNAK. K	234 - 241	429.28	25
K.RIPNPAYK. G	272 - 279	479.76	37
K.VILER. N	338 - 342	629.25	30

Peptides identified in LC/ESI-MS/MS analysis of the EhCRT-1200 recombinant protein after trypsin digestion. Significant hits in the CRT protein of *E. histolytica* HM1: IMSS gi: 6747971 from a total score of 308. Sequence coverage was 13%.

the bacterial lysate, and was subsequently purified using denaturing conditions. The clones express the recombinant proteins, giving a predicted weight for the entire CRT around 49 kDa. The N-terminal and C-terminal ends of the protein were around 22.5 and 27.6 kDa, respectively. However the molecular weights obtained were different (60 kDa and 45 kDa respectively).

The recombinant protein EhCRT was confirmed by sequencing using Tandem Mass Spectrometry (LC/ESI-MS/MS), and the 9 obtained peptides and their sequences corresponded to the sequence of CRTs previously reported (14) (Table 1).

On the other hand the reactivity of the recombinant proteins which anti-*E. histolytica* serum antibodies from ALA patients was tested in a ELISA system (15), obtaining a clear recognition of the recombinant proteins (data no shown); in contrast, with the low reactivity of serum from non-infected healthy individuals

Discussion

The presence of CRT in *E. histolytica* was reported previously by our group as a consequence of a study on the antigenic recognition analysis of serum samples from amebic dysentery or amebic liver abscess patients (16). The analysis showed that 95-100 % of these patients recognized a 51 kDa fraction of *E. histolytica* HM1: IMSS that when partially sequenced, appeared to be a CRT-like protein. This antecedent directed our interest in the search and cloning of the *crt* gene and the expression of recombinant CRT protein in this parasite.

Recently, the sequence for two putative *crt*-genes, one with 1200 bp (Gene Bank accession no. EAL49855.1) and the other with 417 bp (gi: 67466599), were reported (14), however, the cloning and expression of the *crt* gene in the *Entamoeba* species has not been described.

The cloning of the gene allowed us to determine that this gene was located in the nuclear DNA of this parasite, and that the entire sequence of the 1200 bp nucleotides obtained and reported here correlates with the predicted molecular weight of the *E. histolytic* CRT-like protein reported previously (14). Recently, a proteomic analysis of *E. histolytica* using MALDI-TOF mass spectrometry demonstrated the presence of CRT in the *E. histolytica* HM1: IMSS strain. This molecule showed a theoretical/experimental MW in kDa of 45/48 (16), however the theoretical MW of the recombinant proteins reported here is coincident; the experimental MW of our EhCRT was higher than the one reported by Tolstrup et al. (2007), which can be explained by differences in the analyzed molecule. EhCRT steel has a histidine tail, which represents around 3 kDa of the estimated MW. A different explanation for our results is the peculiar running displayed by this protein in an electrophoretic field, which is a consequence of the high number of acidic amino acids in this protein (17, 18).

The comparative analysis between the nucleotide sequence of EhCRT reported here and the previously reported (Gene Bank accession no-AEL49855.1) of *E. histolytica* showed a homologous sequence KEEL (Figure 1) that is known also to function as a retention signal for the ER (19).

The sequence of amino acids of the EhCRT recombinant protein determined by mass spectroscopy (Table 1) confirmed the identity of our EhCRT molecule.

Studies to determine the location of CRT in *E. histolytica* and *E. dispar* and the biological functions of this protein in both parasites are ongoing.

Acknowledgements

We, the authors, thank Mrs. Ma. Elena Ortiz for her secretarial support, and Mr. Marco Gudiño for the graphic design. The present work was partially supported by the Grants: DGAPA UNAM PAPIIT IN206405, PAPIME PE-200105, PAPIIT IN226806-3, PAPIIT IN227006-2, CONACYT 52424-Q.

References

1. Ferreira V, MC Molina, C Valck, A Rojas L Aguilar, G Ramírez, W Schwaeble, and A Ferreira. Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts. Mol Immunol. 40: 1279-1291. 2004.
2. Nakhasi HL, GP Pogue, RC Duncan, M Joshi, CD Atreya, NS Lee, and DM Dwyer. Implications of calreticulin function in parasite biology. Parasitol Today.14:157-160. 1998.
3. González E, G Rico, G Mendoza, F Ramos, G García, P Morán, A Valadez, El Melendro, C Ximénez. Calreticulin–like molecule in trophozoites of *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS. Am J Trop Med Hyg. 67: 636-639. 2002.
4. McCoy JJ, and BJ Mann. Proteomic analysis of Gal/GalNAc lectin-associated proteins in *Entamoeba histolytica*. Exp Parasitol 110: 220-225. 2005.
5. Aguillon JC, L Ferreira, C Pérez, . Colombo, MC Molina, A Wallace, and A Ferreira. Tc 45 a dimorphic *Trypanosoma cruzi* inmunogen with variable chromosomal localization is calreticulin. Am J Trop Med Hyg. 63: 306-312. 2000.

6. Joshi M, GP Pogue, RC Duncan, NS Lee, HK Singh, CD Atreya, DM Dwayer, and HL Nakhasi. Isolation and characterization of *Leishmania donovani* calreticulin gene and its conservation of the RNA binding activity. Mol Biochem Parasitol 81: 53-64. 1996.
7. Khalife J, J Liu, R Pierce, E Porchet, C Godin, and A Capran. Characterization and localization of *Schistosoma mansoni* calreticulin Sm58. Parasitology. 108: 527-532. 1998.
8. Rokeach LA. PA Zimmerman, and TR Unnasch. Epitopes of *Onchocerca volvulus* RAL1 antigen, a member of the calreticulin family of proteins, recognized by sera from patients with onchocerciasis. Infect Immun. 62: 3696-3704. 1994.
9. Sambrook J, EF Fritsch, and T Maniatis. Molecular Cloning: a Laboratory Manual 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
10. Altschul SF, TL Madden, AA Schaffer, J Zhang, Z Zhang, W Miller, and DJ Lipman. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein data base search programs. Nucl Acids Res. 25: 3389-3402. 1997.
11. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucl Acids Res. 16: 10881-10890. 1988.
12. Kinter M, and N E Sherman. In Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry. Desiderio DM, Nibbering N. M. M. Eds; John Wiley-Interscience, Inc. New York. pp 147-165. 2000.
13. Loftus B, I Anderson, R Davies, CM Alsmark, J Samuelson, P Amedeo, et al. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. Nature. 433: 865-868. 2005.
14. Ximenez C, O Sosa, O Leyva, P Morán, El Melendro, and M Ramiro. Western blot of *Entamoeba histolytica* antigenic fractions; reactivity analysis with sera from intestinal amoebiasis patients. Ann Trop Med Parasitol. 86: 121-127. 1992.
15. Tolstrup J, E Krause, E Tannich, and I. Bruchhaus. Proteomic analysis of *Entamoeba histolytica*. Parasitol. 134: 289-298. 2007.
16. Bouvier M, and W Stafford. Probing the three dimensional structure of human calreticulin. Biochemistry. 39: 14950-14959. 2000.
17. Coppolino MG, and S Dedhar. Molecules In focus: Calreticulin. Int J Biochem Cell. Biol. 30: 553-558. 1998.
18. Pelham HR, The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. Trends Biochem Sci. 15: 483-486. 1990.