

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE *Entamoeba*
histolytica QUE UNEN HEMOGLOBINA HUMANA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A

BIOL. ARELI CRUZ CASTAÑEDA

DIRECTOR DE TESIS

Dr. José de Jesús Olivares Trejo

MÉXICO, D.F.

FEBRERO 2008

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR

Dr. José de Jesús Olivares Trejo
Profesora-Investigadora. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

ASESORES

Dra. Minerva Camacho Nuez
Profesora-Investigadora. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez
Profesora-Investigadora. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga
Profesora-Investigadora. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

El presente proyecto de investigación fue realizado en el laboratorio 1 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Institución a la cual agradezco su apoyo académico y económico.

La realización del presente trabajo contó con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) (Proyecto Número 54212 de Ciencia Básica 2006).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todo mi comité tutorial por sus valiosas enseñanzas, críticas y facilidades ofrecidas para la realización de este trabajo.

Gracias al apoyo y valiosos consejos metodológicos brindados por el M. en C. Israel López Reyes, la Dra. Guillermina García Rivera, el QBP. Tomás Sánchez Maldonado y la Dra. Esther Orozco del laboratorio del Departamento de Patología Experimental del CINVESTAV-IPN.

Agradezco al Colegio de Profesores-Investigadores del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por sus grandes enseñanzas para mi formación.

Gracias a ti...

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABLAS

I. INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES GENERALES

| | | |
|---------|--|----|
| 1.1 | Amibiasis..... | 1 |
| 1.2 | Epidemiología..... | 2 |
| 1.3 | <i>Entamoeba histolytica</i> | 3 |
| 1.3.1 | Morfología..... | 3 |
| 1.3.2 | Ciclo de vida..... | 6 |
| 1.4 | Importancia del hierro para la sobrevivencia celular para los organismos..... | 8 |
| 1.4.1 | Fuentes de hierro en el cuerpo humano..... | 8 |
| 1.4.1.1 | Proteínas extracelulares que sirven como fuente de hierro | |
| | a) Albúmina..... | 9 |
| | b) Transferrinas..... | 9 |
| | c) Proteínas hemo extracelulares..... | 10 |
| 1.4.1.2 | Proteínas intracelulares que sirven como fuente de hierro | |
| | a) Ferritinas..... | 10 |
| | b) Proteínas hemo intracelulares..... | 10 |
| | c) Hemoglobina (Hb)..... | 10 |
| 1.5 | Mecanismos desarrollados por los patógenos para la adquisición de hierro dentro del cuerpo humano..... | 13 |
| 1.5.1 | Clasificación de sistemas de asimilación de hierro | |
| 1.5.1.1 | GRUPO 1 Sideróforos y hemóforos..... | 14 |
| | a) Sideróforos..... | 14 |
| | b) Hemóforos..... | 15 |
| 1.5.1.2 | GRUPO 2 Receptores de membrana externa | |
| | a) Receptores de transferrinas y lactoferrinas... 15 | |
| | b) Receptores de hemo y hemoglobina..... 16 | |

2. ESTADO DEL ARTE

| | | |
|-------|--|----|
| 2.1 | Proteínas de procariontes que unen Hb humana..... | 17 |
| 2.2 | Proteínas de eucariontes que unen Hb humana..... | 24 |
| 2.2.1 | Proteínas de <i>Candida albicans</i> que unen Hb..... | 24 |
| 2.2.2 | Proteína de <i>Leishmania donovani</i> que une Hb..... | 24 |

3. ANTECEDENTES PARTICULARES.....24

4. IMPORTANCIA PARA CONTINUAR EL TEMA.....24

II. OBJETIVOS

| | | |
|----|-----------------------------|----|
| 1. | OBJETIVO GENERAL..... | 25 |
| 2. | OBJETIVOS PARTICULARES..... | 25 |

III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....26

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

| | | |
|-----|--|----|
| 1. | Crecimiento de <i>E. histolytica</i> en medio con diferentes fuentes de hierro..... | 27 |
| 1.1 | Cultivo de <i>E. histolytica</i> | 27 |
| 1.2 | Crecimiento de <i>E. histolytica</i> en diferentes fuentes de hierro..... | 27 |
| 1.3 | Análisis de viabilidad de <i>E. histolytica</i> | 28 |
| 2. | Análisis <i>in silico</i> | 30 |
| 3. | Análisis de la expresión de los genes encontrados <i>in silico</i> utilizando trofozoitos de <i>E. histolytica</i> | 31 |
| 3.1 | Extracción de ARN mediante la técnica Fenol-Cloroformo..... | 31 |
| 3.2 | Determinación de la integridad del ARN..... | 32 |
| 3.3 | Ensayo de RT-PCR..... | 33 |

| | | |
|---|--|----|
| 4. | Clonación de los genes encontrados en la base de datos de <i>E. histolytica</i> | 34 |
| 4.1 | Extracción de ARN genómico de <i>Entamoeba histolytica</i> HM1-IMSS..... | 35 |
| 4.2 | Extracción de ARN plasmídico..... | 35 |
| 4.3 | Descripción del vector de expresión..... | 36 |
| 4.4 | Amplificación mediante PCR..... | 37 |
| 4.5 | Geles de agarosa para análisis de ADN..... | 38 |
| 4.6 | Digestión de ADN plasmídico y amplificados de PCR..... | 39 |
| 4.7 | Ligación del gen amplificado con el plásmido pGEX-6-P1..... | 39 |
| 4.8 | Preparación de células competentes..... | 40 |
| 4.9 | Transformación..... | 41 |
| 4.10 | Selección de las clonas candidato y caracterización de la clonación..... | 41 |
| 5. | Expresión de las proteínas recombinantes..... | 42 |
| 5.1 | Electroforesis en SDS-PAGE..... | 42 |
| 6. | Pruebas de solubilidad..... | 43 |
| 7. | Purificación de las proteínas recombinantes..... | 44 |
| 7.1 | Inmovilización de las proteínas | 45 |
| 7.2 | Detección de las proteínas fusionadas al tag GST..... | 45 |
| 8. | Reacción enzimática de corte del tag GST..... | 46 |
| 9. | Ensayos de unión a hemoglobina..... | 46 |
| 10. | Ensayo de unión a hemoglobina de proteínas totales de <i>E. histolytica</i> | 47 |
| V. RESULTADOS | | |
| 1. | Crecimiento de <i>Entamoeba histolytica</i> en diferentes fuentes de hierro..... | 48 |
| 2. | Análisis <i>in silico</i> | 52 |
| 3. | Análisis de la expresión mediante RT-PCR de los genes encontrados <i>in silico</i> en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> | 61 |
| 4. | Clonación en el vector pGEX-6-P1..... | 66 |
| 5. | Expresión de las proteínas EhhmbpA y EhhmbpB..... | 70 |
| 6. | Solubilidad de las proteínas EhmbpAr y EhhmbpBr..... | 73 |
| 7. | Purificación de las proteínas EhhmbpA y EhhmbpB..... | 76 |
| 8. | Reacción enzimática de corte del tag GST de las proteínas EhhmbpA y EhhmbpB..... | 79 |
| 9. | Ensayo de unión a Hb de la proteína EhhmbpA..... | 82 |
| 10. | Ensayo de unión a Hb de la proteína EhhmbpB..... | 84 |
| 11. | Ensayo de unión a hemoglobina de proteínas totales de <i>E. histolytica</i> | 86 |
| VI. DISCUSIÓN..... | | |
| VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | | |
| | | 90 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------------|--|
| ➤ ABC | Proteína de unión a ATP |
| ➤ ATP | Trifosfato de adenosina |
| ➤ ABS | Albúmina sérica de bovino |
| ➤ ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ➤ ARN | Ácido ribonucleico |
| ➤ ARNm | RNA mensajero |
| ➤ DEPC | Dietilpirocarbonato |
| ➤ DMSO | Dimetil sulfóxido |
| ➤ dNTPs | Deoxinucléotido tri-fosfatados |
| ➤ DTT | Dithiotreitol |
| ➤ EDTA | Ácido etilén diaiminotetra-acético |
| ➤ g | Gramos |
| ➤ GST | Glutación S-transferasa |
| ➤ h | Horas |
| ➤ Hb | Hemoglobina |
| ➤ HEPES | Ácido 4-(2-hidroxietil)-1- |
| ➤ IPTG | Isopropil- β -D-tiogelactopiranosido piperazinaetanosulfónico |
| ➤ kDa | Kilodaltones |
| ➤ LB | Medio Luria-Broth |
| ➤ mM | Milimoles |
| ➤ min | Minutos |
| ➤ μ g | Microgramos |
| ➤ μ l | Microlitros |
| ➤ ml | Mililitros |
| ➤ ng | Nanogramos |
| ➤ PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida |
| ➤ pb | Pares de bases |
| ➤ PBS | Fosfato buffer salino |
| ➤ PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| ➤ pmolar | Picomolar |
| ➤ RT-PCR | Reacción en cadena de la polimerasa retrotranscriptasa |
| ➤ SB | Suero bovino |
| ➤ s | Segundos |
| ➤ SDS | Dodecil sulfato de sodio |
| ➤ TAE | Buffer Tris-Acetato-EDTA |
| ➤ TEMED | N, N, N', N'', tetrametilen-diamina |
| ➤ TYI-S-33 | Medio de tripticasa, extracto de levadura, hierro y suero bovino para cultivo de <i>E. histolytica</i> |
| ➤ TYI-S-33/-Fe | Medio de tripticasa, extracto de levadura, y suero bovino para cultivo de <i>E.</i> <i>histolytica</i> |
| ➤ xg | Gravedades |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Trofozoítos del protozoario *Entamoeba histolytica*
- Figura 2. Quistes del protozoario *Entamoeba histolytica*
- Figura 3. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*
- Figura 4. Estructura de la Hemoglobina
- Figura 5. Grupo hemo
- Figura 6. Modelos de utilización de diferentes moléculas con grupo hemo en *Neisseria meningitidis*
- Figura 7. Modelo topológico de HmbR
- Figura 8. Alineamiento de sideróforos, receptores de hierro libre, receptores de hemo, Hb y Hemoglobina-Haptoglobina
- Figura 9. Estrategia experimental
- Figura 10. Campos visuales de una cámara de Neuvauer y la fórmula utilizada para determinar el número de células viables
- Figura 11. Pasos y los servidores utilizados en el análisis *in silico*
- Figura 12. Mapa del plásmido pGEX-6P-1
- Figura 13. Curva de crecimiento de *E. histolytica* cultivada en medio suplementado con diferentes fuentes de hierro
- Figura 14. Curva de crecimiento de *E. histolytica* cultivada en medio suplementado con diferentes fuentes de hierro pero sin suero bovino.
- Figura 15. Alineamiento de receptores para hemoglobina de diferentes organismos
- Figura 16. Alineamiento de receptores reportados en bacterias gram negativas y las secuencias obtenidas de la base de datos Pathema
- Figura 17. RT-PCR del gen *ehhmbpA* de amibas crecidas en medios suplementados con diferentes fuentes de hierro y sin suplementar
- Figura 18. RT-PCR del gen *ehhmbpB* de amibas crecidas en medios suplementados con diferentes fuentes de hierro y sin suplementar
- Figura 19. RT-PCR del gen *ehhmbpC* de amibas crecidas en medios suplementados con diferentes fuentes de hierro y sin suplementar
- Figura 20. Caracterización de pEhhmbpA
- Figura 21. Caracterización de pEhhmbpB
- Figura 22. Expresión de la proteína recombinante EhhmbpA
- Figura 23. Expresión de la proteína recombinante EhhmbpB
- Figura 24. Determinación de la solubilidad de la proteína EhhmbpA
- Figura 25. Determinación de la solubilidad de la proteína EhhmbpB
- Figura 26. Detección mediante western blot de la proteína EhhmbpA fusionada a GST

- Figura 27. Detección mediante western blot de la proteína EhhmbpB fusionada a GST
- Figura 28. Detección de la proteína EhhmbpA tratada con PPS usando anticuerpos anti GST
- Figura 29. Detección de la proteína EhhmbpB tratada con PPS usando anticuerpos anti GST
- Figura 30. Ensayo de unión a Hb de la proteína EhhmbpA
- Figura 31. Ensayo de unión a Hb de la proteína EhhmbpB
- Figura 32. Ensayo de unión a Hb de las proteínas totales de *E. histolytica*

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Identidad y similitud de proteínas homólogas a HghA
- Tabla 2. Receptores dependientes de Ton presentes en Gram negativas
- Tabla 3. Datos de las secuencias encontradas en las bases de datos de amiba y que poseen características del receptor de Hb.

I. INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES GENERALES

1.1 *Amibiasis*

La Organización Mundial de la Salud define a la amibiasis "como la condición de portar el parásito *E. histolytica* con o sin manifestaciones clínicas" (WHO, 1969).

La amibiasis puede ser agrupada como asintomática, sintomática sin invasión tisular y sintomática con invasión tisular (Ortiz-Ortiz, 1994). Es una enfermedad que se relaciona con la pobreza, la ignorancia, malas condiciones sanitarias y desnutrición (Sepúlveda, 1982).

La amibiasis sintomática es una enfermedad intestinal y cuando llega a ser extraintestinal generalmente involucra al hígado. El absceso hepático amibiano se debe a la presencia de grandes cantidades de amibas en el hígado que llegan por el sistema sanguíneo a partir de ulceraciones intestinales (Martínez-Palomo, 1987). Los hepatocitos sufren de necrosis y las lesiones tienden a ser confluentes, dando origen a granulomas que suelen contener eosinófilos generando zonas necróticas (Shibayama-Salas y col., 1992) y el desenlace de dicho proceso generalmente es la muerte.

La amibiasis intestinal se asocia con condiciones clínicas como colitis amibiana ulcerativa, megacolon tóxico o disentería amibiana fulminante, ameboma o granuloma amibiano y apendicitis amibiana (Pérez-Tamayo, 1986). La amibiasis intestinal es la forma sintomática más frecuente de amibiasis, sin embargo, los síntomas de esta enfermedad son inespecíficos (Martínez-Palomo, 1987).

1.2 *Epidemiología*

La Organización Mundial de la Salud estima que la amibiasis es la tercera causa de muerte por enfermedades parasitarias después de la malaria y la schistosomiasis en América Central, América del Sur, África y la India y es responsable de más de 100,000 muertes anualmente (WHO, 1997; Stanley, 2003).

La amibiasis está ampliamente distribuida en el mundo, siendo la India, Sur y Oeste de África, Lejano Oriente y Sur y Centro América las áreas con mayor incidencia (Ravdin, 1995).

Respecto al absceso hepático, tiene una incidencia de aproximadamente el 2% de los adultos infectados con *E. histolytica* en áreas endémicas y de 4% en las epidémicas (Pérez-Tamayo, 1986). Es 13 veces más frecuente en hombres que en mujeres y 10 veces más frecuente en adultos que en niños (Sepúlveda y Martínez-Palomo, 1984).

En México el 11% de la población entre 5 y 9 años de edad ha sido infectada alguna vez con prevalencia de infección más alta en mujeres (9.34%) (Caballero y col., 1994). La incidencia de amibiasis intestinal es del 9% de los pacientes con diarrea, siendo controlables con la aplicación de quimioterapia adecuada. Menos del 10% de los casos con amibiasis intestinal invasora resulta en infecciones severas mortales (Martínez-Palomo, 1987).

1.3 *Entamoeba histolytica*

Entamoeba histolytica es un parásito protozario intestinal que infecta humanos y causa enfermedades asociadas con significantes niveles de

morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Stanley, 2003) como por ejemplo, colitis amibiana y abscesos hepáticos.

Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino Protista

Phylum Sarcomastigophora

Clase Lobosea

Orden Amoebida

Género *Entamoeba*

Especie *histolytica*

1.3.1 Morfología

El ciclo de vida de *E. histolytica* presenta dos estadios: un estado de trofozoíto y una fase de quiste infectivo (WHO, 1997; Tanyuksel y Willian, 2003). El trofozoíto es la forma infectiva del parásito y éste es anaerobio facultativo con un tamaño de 10-40 μm , su citoplasma carece de algunos organelos que se encuentran en la mayoría de los eucariontes (Martínez-Palomo, 1987). Los trofozoítos son las formas móviles que invaden las células epiteliales del intestino y se mueven por extensiones citoplasmáticas llamadas pseudópodos. Esas proyecciones son utilizadas también para rodear partículas de alimento y fagocitarlas (Figura 1) (Ortiz, 1994).

En muchos casos los trofozoítos permanecen confinados en la luz intestinal, pero en algunos individuos invaden la mucosa intestinal, el hígado, pulmones y cerebro.



Figura 1. Trofozoítos del protozario *Entamoeba histolytica*. La forma alargada que se aprecia en el centro de la imagen corresponde al trofozoíto y las formas redondas de color anaranjado corresponden a eritrocitos. Los eritrocitos que se observan en el interior del trofozoíto fueron fagocitados por la amiba.
Tomado de <http://www.bioltrop.fr/08-diagparasito/histolitica-fv.jpg>

Los quistes son formas redondas o ligeramente ovaladas de 8 a 20 μm de diámetro y al microscopio se ven como cuerpos hialinos. Su citoplasma es incoloro permitiendo la visualización de los cuerpos cromatóides y nucleolos en número de uno a cuatro (Martínez-Palomo, 1982). Los quistes son una forma de resistencia de *E. histolytica*, ya que pueden sobrevivir fuera del hospedero por semanas o meses en un ambiente húmedo. El proceso de enquistamiento de la amiba se da cuando las condiciones ambientales del intestino le son desfavorables a los trofozoítos (Figura 2) (Avron y col., 1982).



Figura 2. Quistes del protozooario *Entamoeba histolytica*. La forma redonda que se aprecia en el centro de la imagen corresponde al quiste de la amiba y las flechas en el interior del quiste señalan los núcleos.

Tomado de: <http://www.biltek.tubitak.gov.tr/bilgipaket/canlilar/img/entamoeba1.jpg>

1.3.2 Ciclo de vida

La infección de *E. histolytica* se adquiere por la ingestión de quistes maduros tetranucleados, los cuales son capaces de resistir el pH gástrico, provenientes de agua o alimentos contaminados con materia fecal. El desenquistamiento ocurre en el intestino delgado. Del quiste sale una amiba tetranucleada que multiplica sus núcleos para formar una amiba de 8 núcleos, después la amiba se fragmenta en 8 pequeñas amibas llamadas amébulas metaquísticas, éstas se transforman en trofozoítos que finalmente se establecen en el colon. Posteriormente, los trofozoítos pueden enquistarse por condiciones del lumen no ideales. Dentro del quiste continúan el metabolismo y la división nuclear hasta formar los 4 núcleos. Después de ser eliminados con las heces, los quistes pueden permanecer viables por semanas o meses dependiendo de las condiciones ambientales. La infección no se transmite por trofozoítos debido a que se mueren rápidamente fuera del cuerpo y a que se destruyen con el jugo gástrico. La infección puede producirse por la ingesta de un solo quiste presente en el agua o alimentos (Figura 3) (Ravdin, 1986; Avron y col., 1982; Martínez-Palomo, 1982).

Cuando *E. histolytica* entra en contacto con eritrocitos, los trofozoítos llevan a cabo el evento de eritrofagocitosis, el cual consiste primero en el reconocimiento y la interacción de ligandos y receptores de superficie, posteriormente hay rearrreglos del citoesqueleto de actina para la formación de pseudópodos que envuelven el eritrocito internalizándolo al citoplasma de la amiba, sitio en el cual comenzará a ser degradado por acción enzimática de proteasas como hemolisinas liberando diferentes proteínas incluyendo la Hb proteína, de la cual puede adquirir hierro (Okada y col., 2005).

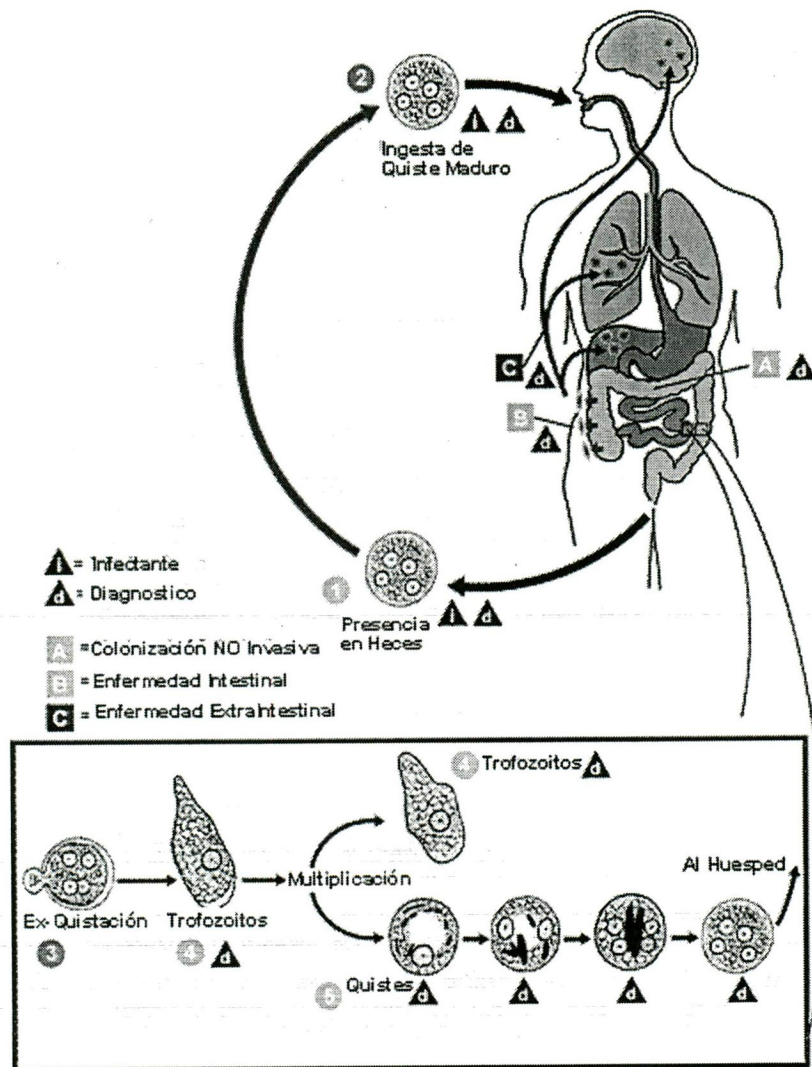


Figura 3. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*. La amibiasis se adquiere por la ingestión de quistes maduros 1 a partir de agua, alimentos o las manos contaminadas con heces. Los trofozoítos móviles se liberan a través de los quistes 2 del intestino delgado, donde permanecen confinados en el lumen intestinal (A) del intestino de la mayor parte de los pacientes. Los trofozoítos se multiplican por fisión binaria y producen quistes 4, los cuales son expulsados en las heces. En algunos pacientes los trofozoítos invaden la mucosa intestinal, produciendo una colitis sintomática (B: enfermedad intestinal), o a través del torrente sanguíneo, sitios extraintestinales dando lugar a la aparición de abscesos en el hígado, el cerebro y los pulmones (C: enfermedad extraintestinal)

Tomado de: <http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/images/amebia.gif>

1.4 Importancia del hierro para la sobrevivencia celular de los organismos

El hierro se puede presentar en dos formas: la forma oxidada (Fe^{+3}) y la forma reducida (Fe^{+2}). Es un elemento esencial para los organismos, ya que forma parte de algunas proteínas como catalasas, peroxidasas y oxidasas. Participa en la síntesis de pirimidinas y aminoácidos en el ciclo de los ácidos carboxílicos y en la cadena de transporte de electrones (Ratledge y Dover, 2000). A pesar de la importancia del hierro para los organismos, no se puede encontrar de forma libre, ya que el hierro libre al reaccionar con el peróxido de hidrógeno promueve la generación de especies reactivas de oxígeno que pueden dañar el ADN, las membranas lipídicas y las proteínas (Zheng y col., 1999).

El hierro es un elemento esencial para los patógenos y necesario para procesos metabólicos básicos implicados en su crecimiento como la respiración y la síntesis de ADN y en bacterias patógenas determina su capacidad de establecerse en el hospedero (Ratledge y Dover, 2000). La toxicidad del hierro genera que la presencia de hierro libre en nuestro organismo sea muy escasa. La mayor parte del hierro es captada por ferriproteínas y hemoproteínas, las cuales son fuentes de hierro disponibles en el hospedero (Baker y col., 2003).

1.4.1 Fuentes de hierro en el cuerpo humano

El hierro en forma libre genera daño celular, motivo por el cual los organismos poseen mecanismos para mantener un bajo nivel de hierro libre. En el humano estos mecanismos se encuentran basados en sintetizar proteínas que unen los iones de hierro. Dentro de estas proteínas se pueden mencionar proteínas extracelulares como albúmina,

transferrinas, hemopexina, haptoglobina y proteínas intracelulares como ferritinas y hemoglobina (Neilands, 1995). Por lo tanto, dentro del cuerpo humano las transferrinas y hemoproteínas funcionan como fuentes que pueden proveer hierro a los patógenos.

1.4.1.1 Proteínas extracelulares que sirve como fuente de hierro

a) *Albúmina*

La albúmina es una proteína globular de alrededor de 68 kDa que constituye el 60% de las proteínas totales del plasma. Se ha descrito que una molécula de albúmina puede unir hasta 10 átomos de hierro (Genco y Dixon, 2001).

b) *Transferrinas*

Las transferrinas son una familia de glicoproteínas extracelulares de cadena única y peso molecular que varía entre 75 y 80 kDa. Se estructuran formando dos lóbulos, cada uno con un sitio de unión de elevada afinidad por el hierro (Otto y col., 1992). En sangre y linfa el hierro se encuentra asociado con una elevada afinidad a transferrinas séricas. Las transferrinas transportan el hierro desde los sitios de absorción y almacenamiento hasta los sitios de utilización; lugar donde el complejo ferri-transferrina entra a la célula vía endocitosis mediada por receptor. Las células eucariotas utilizan el ambiente relativamente ácido de los endosomas para liberar el hierro de la ferri-transferrina que posteriormente será devuelta a circulación (Baker y col., 2003).

La lactoferrina es una transferrina que está presente en secreciones exocrinas como en la leche, la saliva, las lágrimas, secreciones nasales y en los gránulos de los leucocitos polimorfonucleares. Durante la

desgranulación de leucocitos se libera apo-lactoferrina aumentando su concentración local en los sitios de infección. Además, la lactoferrina tiene actividad bacteriolítica. Dicha actividad reside en un fragmento peptídico catiónico que cuando es liberado mediante proteólisis, interacciona con la membrana externa bacteriana desorganizando su estructura (Farnaud y Evans, 2003).

c) *Proteínas hemo extracelulares*

La hemopexina es una glicoproteína sérica que une hierro y lo entrega a los hepatocitos mediante endocitosis mediada por receptor (Baker *et al.*, 2003). La haptoglobina y la hemopexina son proteínas de fase aguda cuyos niveles aumentan de dos a cuatro veces durante los procesos inflamatorios.

1.4.1.2 Proteínas intracelulares que sirven como fuente de hierro

a) *Ferritinas*

Las ferritinas almacenan el hierro intracelular y son las principales proteínas de almacenamiento de hierro. Están ampliamente distribuidas en animales, plantas y microorganismos (Chasteen, 1998).

La ferritina es la principal proteína de almacenamiento de hierro. Se localiza en la mayoría de los tejidos animales, pero sobretodo en el hígado. Su peso molecular es de alrededor de 50 kDa.

b) Proteínas hemo intracelulares

La hemosiderina que es una proteína de características parecidas a la ferritina se sintetiza cuando hay exceso de hierro en el hígado (Ratledge y Dover, 2000).

La hemoglobina es la proteína encargada del transporte de oxígeno en los glóbulos rojos, pesa 64.5 kDa y puede unir hasta cuatro átomos de hierro. Esta proteína puede ser liberada al plasma, debido a la lisis de los eritrocitos, pero es rápidamente capturada y dirigida al hígado por la haptoglobina generando el complejo hemoglobina-haptoglobina (Otto y col., 1992).

c) Hemoglobina (Hb)

La Hb es una proteína globular presente en los eritrocitos en altas concentraciones, fijan oxígeno en los pulmones y lo transportan por la sangre hacia los tejidos y células que rodean el lecho capilar del sistema vascular. Al volver a los pulmones desde la red de capilares, la hemoglobina actúa como transportador de CO₂ y de protones (Schultz, 1993).

La Hb se compone de 4 cadenas polipeptídicas que contienen 141 aminoácidos las α y 146 las β y difieren en la secuencia aminoacídica (Lehmann y Carrell, 1969). La estructura cuaternaria consta de 4 subunidades: 2 monómeros de globina α y 2 β (Figura 4). Cada globina contiene un grupo hemo que es una molécula plana que consta de un anillo tetrapirrólico (la protoporfirina IX) y de un hierro ferroso en su centro (Figura 5) (Howard, 1970).

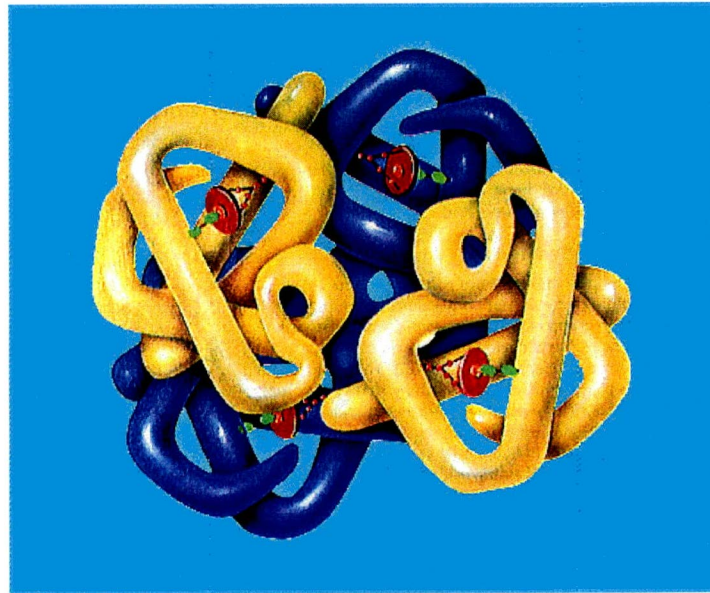


Figura 4. Estructura de la Hemoglobina. En color amarillo se representan las subunidades α y en color azul se representan las subunidades β . En color rojo se representa el grupo hemo que es el responsable de unir en hierro.

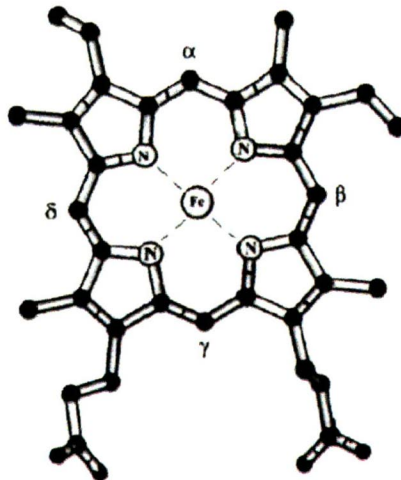


Figura 5. Grupo hemo. El hierro está representado como Fe y se encuentra unido con los nitrógenos de la protoporfirina IX.

Para los patógenos la Hb representa una fuente de hierro en el hospedero. Se ha reportado que organismos como *Haemophylus sp* son capaces de adquirir hierro a partir de Hb (Elkins, 1995).

1.5 Mecanismos desarrollados por los patógenos para la adquisición de hierro dentro del cuerpo humano

Aún cuando el hierro es el cuarto elemento más abundante en el humano, la mayoría de este elemento se encuentra asociado a proteínas como hemoglobina o ferritina (Simpson y col., 2000), esto representa para los patógenos un obstáculo para obtener suficiente de este elemento que es esencial para su crecimiento y establecimiento de la infección. Las bacterias, hongos y protozoarios patógenos han desarrollado diferentes sistemas de asimilación de hierro altamente sofisticados (Stojiljkovic y Srinivasan, 1997; Elkins, 1995; Weissman y Kortnitzer, 2004).

Los sistemas de los patógenos para asimilar el hierro se pueden clasificar en dos grupos: el primer grupo corresponde a los sideróforos y hemóforos que implican la síntesis y liberación de moléculas con gran afinidad por el hierro o por proteínas que poseen el grupo hemo (Ratledge y Dovert, 2000) y el segundo grupo es el grupo de los receptores que son los sistemas que implican la interacción directa con las proteínas del hospedero que transportan el hierro (transferrina, lactoferrina, hemoglobina, etc.). Además de estos mecanismos, algunos patógenos producen enzimas como hemolisinas y hemoglobinasas que incrementan la eficiencia de estos sistemas. Así, ciertos microorganismos sintetizan proteasas que son secretadas al medio y degradan a las proteínas transportadoras de hierro en el hospedero (Genco y Dixon, 2001).

1.5.1. Clasificación de sistemas de asimilación de hierro de los patógenos

1.5.1.1 GRUPO 1 Sideróforos y hemóforos

a) Sideróforos

Los sideróforos son moléculas solubles, de bajo peso molecular que tienen una alta afinidad por los iones Fe^{+3} . Tienen una alta capacidad de remover el Fe^{+3} de ferriproteínas pero no del grupo hemo, (Braun, 1999).

La afinidad de los sideróforos por el ion férrico es lo suficientemente alta como para permitirles competir con la ferri-transferrina, la ferri-lactoferrina y la ferritina y en ambientes terrestres o acuáticos con los hidróxidos férricos. (Crosa y Walsh, 2002). Los sideróforos son sintetizados y secretados por bacterias, hongos y plantas monocotiledóneas en respuesta a las condiciones de privación de hierro. En algunos casos, por ejemplo en las micobacterias, los sideróforos permanecen anclados a la membrana externa mediante largas cadenas alifáticas (Faraldo-Gómez y Sansom, 2003).

Los sideróforos son secretados al medio y cuando captan el hierro son reconocidos por receptores específicos de membrana. Una vez que los sideróforos son reconocidos por los receptores de membrana, penetran al interior de la célula. En el interior de la célula los sideróforos liberan a la molécula de hierro y son secretados nuevamente al medio para captar otra molécula que posea hierro (Ratledge y Dover, 2000).

b) Hemóforos

El mecanismo de captura de hierro en el que participan los hemóforos consiste en que estas moléculas extraen el grupo hemo de las hemoproteínas (hemopexina, hemoglobina/haptoglobina o hemoglobina) y lo dirigen a receptores de superficie para ser posteriormente internalizado al espacio periplásmico (Genco y Dixon, 2001).

En la literatura se ha reportado que los hemóforos son sintetizados en bacterias y hongos en respuesta a las condiciones de carencia de hierro. Se secretan mediante transportadores de tipo ABC (ATP Binding Casette). Los transportadores de tipo ABC son un grupo de proteínas intramembranales que llevan a cabo el transporte del hierro hacia el citoplasma (Andrews y col., 2003).

El hemóforo HasA de *Serratia marcescens* es el mejor caracterizado. Es secretado en condiciones de restricción de hierro para remover el grupo hemo de la Hb (Létóffé y col., 2001).

1.5.1.2 GRUPO 2: Receptores de membrana externa

a) *Receptores de transferrinas y lactoferrinas*

El contacto con ferriproteínas como transferrina y lactoferrina está mediado por receptores de superficie denominados Tbp (transferrin binding protein) y por el receptor Lbp (lactoferrin binding protein). Estos receptores permiten el transporte de hierro contra gradiente de concentración a través de la membrana externa hacia el espacio periplásmico (Perkins y col., 2004). El hierro presente en el espacio periplásmico es captado por proteínas periplásmicas (periplasmic binding proteins, PBP) que promueven su unión a la permeasa ABC (Andrews y col., 2003).

b) *Receptores de hemo y hemoglobina*

Los receptores de hemo y hemoglobina son proteínas de membrana. Pueden unir una gran variedad de compuestos que contienen el grupo hemo como son hemoglobinas, hemopexinas y hemosiderina. Algunos ejemplos de estos receptores son: los receptores de hemo/hemoglobina, (*Yersinia*, *E. coli* y *Shigella*) y el receptor específico para hemoglobina descrito en *Neisseria sp.* (Wandersman y Stojiljkovic, 2000).

A pesar de las diferencias en la especificidad, todos los receptores de membrana median la disociación del grupo hemo de la hemoproteína y el subsiguiente transporte del grupo hemo a través de la membrana externa mediante el complejo TonB-ExbBD. Este complejo proporciona la energía para que el grupo hemo sea transportado a través de la membrana externa. El grupo hemo es transportado a través de la membrana interna mediante una permeasa del tipo ABC (Genco y Dixon, 2001).

Se han descrito receptores para hemoglobina en *Haemophilus ducreyi* (Elkins, 1995), en *P. gingivalis* (Fijumura y col., 1996) y en distintas especies de *Neisseria* (Stojiljkovic y col., 1995).

Todos estos receptores presentan una similitud del 17 al 23% con los sideróforos y hemóforos, pero se caracterizan por la presencia de un dominio altamente conservado llamado FRAP/NPLN (Bracken y col., 1999).

2. ESTADO DEL ARTE

2.1 Proteínas de procariontes que unen Hb humana

En 1995 Elkins identificó y purificó una proteína de 100 kDa de *Haemophilus ducreyi* (HgbA), la cual es una proteína de membrana externa capaz de unir Hb y que presenta similitud a los receptores de membrana externa dependientes de TonB en otros organismos. La tabla 1 muestra las proteínas homólogas de HgbA reportadas en otros organismos.

| Nombre de la proteína | Organismo al que pertenece | % de homología | % de identidad |
|------------------------------------|--|----------------|----------------|
| Tbp1 (Transferrin binding protein) | <i>N. gonorrhoeae</i> y <i>N. meningitidis</i> | 47-50 | 25-27 |
| Lpb1 (Lactoferrin binding protein) | <i>N. gonorrhoeae</i> y <i>N. meningitidis</i> | 48-50 | 25-26 |
| HemR (Receptor heme) | <i>Yersinia pestis</i> | 48 | 26 |

Stojiljkovic y col. en 1995 clonaron y caracterizaron el gen *hmbR* (Hb receptor) que codifica para el receptor de Hb presente en *Neisseria meningitidis*, el cual utiliza el grupo hemo como fuente de hierro. Se ha demostrado que HmbR se encuentra regulado por la presencia de hierro y además tiene la capacidad de unir diferentes hemoglobinas de mamíferos (caballo, ratón, humano), utilizando de manera más eficiente la Hb humana (Stojiljkovic y col., 1996). En *Neisseria meningitidis* se ha detectado el receptor Hpu, el cual utiliza el complejo Hb-haptoglobina como única fuente de hierro. Deleciones en la región que codifica para el extremo amino terminal de las proteínas Hpu y HmbR mostraron que

Neisseria mantiene su capacidad para usar hemo. La eficiencia de las mutantes al utilizar hemo sugiere la existencia de otras proteínas que usan Hb. Se propuso un modelo del uso del hemo y Hb y este modelo se basa en que en *Neisseria* tiene al menos dos mecanismos de captación de hierro y mediante el uso de al menos dos receptores de membrana puede unir Hb. Uno de ellos es el receptor HmbR y une Hb mediante la interacción del receptor con una de las subunidades de la Hb a través de un mecanismo dependiente de TonB-ExbBD. El otro receptor llamado ThbR (Hb transmembranal receptor) une hemoglobina mediante la interacción del receptor con el grupo hemo unido a hemoglobina y es un mecanismo independiente de TonB-ExbBD. *Neisseria sp* posee además el receptor dependiente de TonB-ExbBD Hpu, el cual une el grupo hemo del complejo hemoglobina-haptoglobina y el receptor HemX puede unir el grupo hemo libre (Figura 6). Se han identificado las regiones funcionales de HmbR y se ha propuesto un modelo hipotético que posee regiones intracelulares, transmembranales y asas extracelulares. Para proponer este modelo se realizaron en las regiones del gen que codifican para todas las asas mutaciones en las que sustituyeron al menos un aminoácido. Las mutantes fueron crecidas en un medio provisto de Hb como fuente de hierro encontrando que las mutantes a las que se les cambiaron las asas extracelulares L6 y L7 eran incapaces de utilizar Hb sugiriendo que estas asas son requeridas para la utilización de Hb (Figura 7). Se observó que el asa L7 posee motivos conservados en la secuencia de otros receptores que son esenciales para la utilización de Hb. Estos motivos fueron los denominados FRAP y NPNL (Figura 7 recuadro) (Perkins y col., 2003).

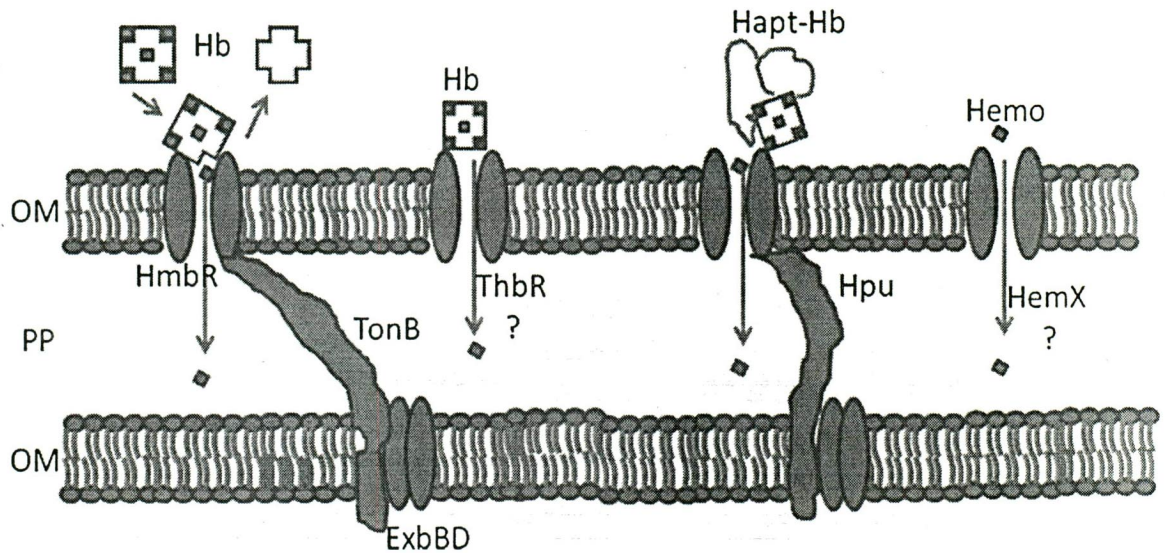


Figura 6. Modelos del uso de diferentes moléculas con grupo hemo en *Neisseria meningitidis*. El receptor HmbR une Hb mediante la interacción con una de las subunidades de la Hb y es un mecanismo dependiente de TonB-ExbBD. El receptor ThbR une Hb mediante la interacción con el grupo hemo unido a hemoglobina y es un mecanismo independiente de TonB-ExbBD. El receptor dependiente de TonB-ExbBD Hpu une el grupo hemo del complejo hemoglobina-haptoglobina y el receptor HemX puede unir el grupo hemo. La Hb está representada con una cruz blanca, el grupo hemo está esquematizado con un cuadro, OM; Membrana externa y membrana interna, PP; Espacio intermembranal.

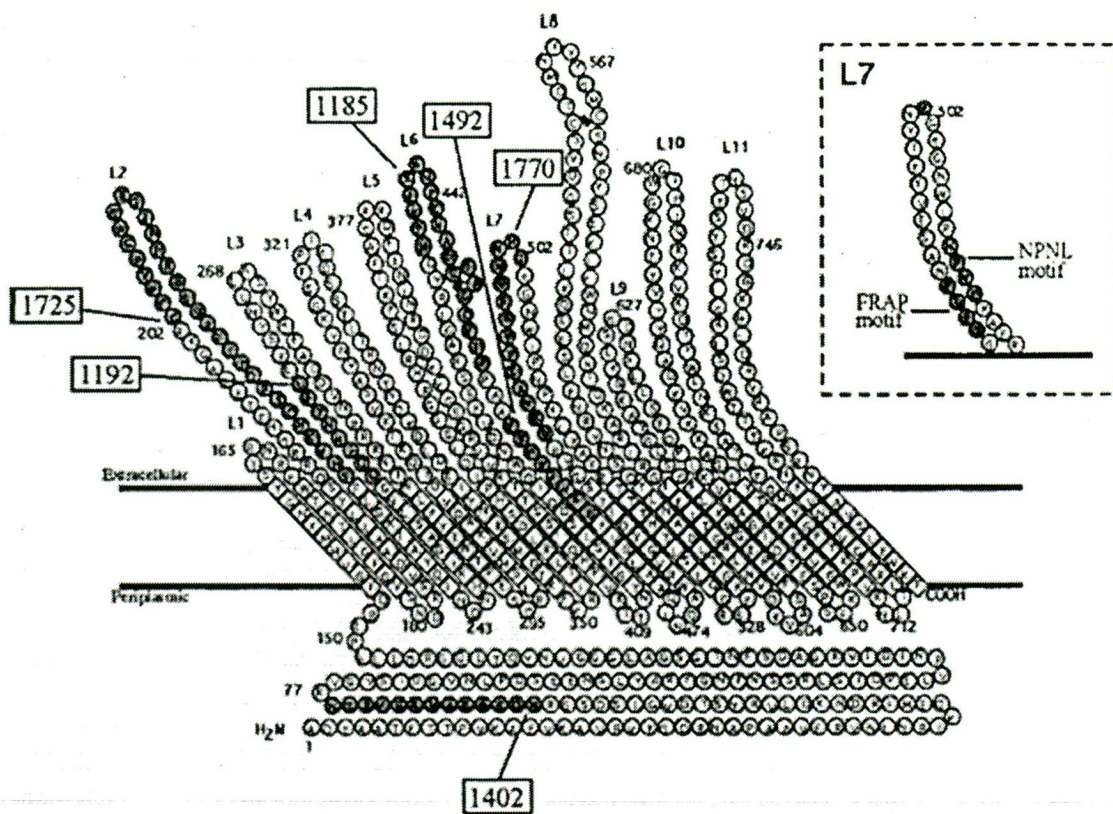


Figura 7. Modelo topológico de la proteína HmbR de *Neisseria* sp. Se muestran las asas extracelulares de la proteína y con números arábigos se señala el sitio de las mutaciones. A la derecha se muestra el asa L7 y los dominios conservados. Tomado de Perkins y col., 2003.

En *Porphyromonas gingivalis*, se ha caracterizado un receptor de Hb dependiente de Ton (HmuR) (Simpson y col., 2000). Se observó que la secuencia de aminoácidos posee los dominios FRAP y NPNL y es similar a otros receptores de membrana externa dependientes de Ton presentes en bacterias gram negativas (Tabla 2).

| Tabla 2. Receptores dependientes de Ton presentes en bacterias Gram negativas | |
|---|--|
| Organismo | Receptor |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | HemR (Receptor de hemo) |
| <i>Shigella dysenteriae</i> | ShuA (Receptor de hemo) |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>N. meningitidis</i> | Hpu (Receptor de hemoglobina-haptoglobina) |
| <i>N. meningitidis</i> | HmbR (Receptor de hemoglobina) |
| <i>Haemophylus ducreyi</i> | HgbA (Receptor de hemoglobina) |
| <i>H. Influenzae</i> | HgpB (Receptor de hemoglobina) |

En *Staphylococcus aureus* se cristalizó la estructura de los dominios denominados NEAT (NEAr Transporter) de la proteína IsdH/HarA (proteína regulada por hierro), que es el receptor de Hb. La estructura de la proteína consiste en 10 cadenas β antiparalelas y la secuencia de aminoácidos tiene una identidad del 46 al 65% con otros receptores de Hb y haptoglobina (Pilpa y col., 2006).

En un alineamiento en el cual se incluyeron sideróforos, receptores de hierro libre, receptores de hemo, Hb y Hemoglobina-Haptoglobina, (Figura 8), se observó que dentro del propio motivo conservado pueden existir cambios en los cuales están sustituidos aminoácidos (Brackent y col. 1999).

A

| | | | |
|--|----------------------------------|-----------------------------------|----------------|
| Sideroforos | IUTA | 401...TG-RYPSYDITNLAAPLQSGYDI-- | NNLFTLNGGVRYQ |
| | FHUE | 636...TSYRLPVMPELTVGGGVNWQNRVY-- | TDTVTPYGTFFRAE |
| | FOXA | 547...-ANRAVPATY-YVPAGKVNSQGL--- | ELEARSQISDRLS |
| | PEPA | 464...-AYKAPSL---YQTNPNYILYSKGGQ- | NDDLKAEPTSINKE |
| | CIRA | 418...TAFKAPSLQLSPDWTNSNSCRGACKI | SPDLKPEPTSESWE |
| BTUB | 401...EGYRFIASYGTSYKAPNLGQLYGYG | NPNLNPEKSKQWE | |
| Receptores de Hierro | HITBP1 | 642...NAFRAPTSDEIYMTFKHPDFSIGP-- | NTNLKAEPTAKTKE |
| | TSPB16 | 639...TGFRLPSFAEMWELGLAGSGKAGNFK | LSGFKTKYRDFIE |
| | LPB | 670...SGFRTPSPFQELFGIDYHDYPKGWQ- | RPALKSEKAANRE |
| Receptores de hemo ¹ Hb y Hb-Hpt | HEMR | 445...QAFRAPTMGEMYNDSKHPDFYLK--A | NPNLKAEKAKQWE |
| | HGBA | 690...TGFRAPTSDEIYFVQHPSPFSIY--P | NLYLKAERSKNKE |
| | HMUR | 445...QAFRAPTMGEMYNDSKHFAPIRP-- | NPDLKPEPTNETQE |
| | HPUB | 534...TGFRAPTSDETWLLFPHPDFYLK--A | NPNLKAEKAKQWE |
| | CHUA | 432...QAFRAPTMGEMYNDSKHFISIGRFYTN | NPNLRPETNETQE |
| | HMBRC | 508...SGYRVNASEVYFTYNHGSGNWL--P | NPNLKAEPTTTHT |
| | HXUC | 467...EAFRAPSMQERFVSGSHFGTSSILGRN | NPNLRPETAKNKE |
| | HASR | 620...KSWRPPAITETLTNGSAHSSSTQYP | NPFLQPERSRAWE |
| | HI0635 | 643...NAFRAPTSDEIYMTFKHPDFSIGP. | NTNLKAEPTAKTKE |
| | HUTA | 458...QGFRAPDFQELYYSFGNPAHGYYVFKP | NPNLKAEPTSVSYE |
| | HMBRA | 508...SGYRVNASEVYFTYNHGSGNWL--- | NPNLKAEPTTTHT |
| | SHUA | 432...QAFRAPTMGEMYNDSKHFISIGRFYTN | NPNLRPETNETQE |
| | HMBRB | 508...SGFRVFNASEVYFTYNHGSGTGWK--- | NPNLKAEPTTTHT |
| | HI0661 | 489...KGFRTPTSDEMYFTFKHPDFTILP.. | NTDLKPEIATKKE |
| | HHUA | 761...--FRAPTSDEIYFTFLHPDFSIRP-- | NLDROAETAKTKE |
| HI0712 | 770...NGFRAPTSDEIYMTFKHPKFSIQP.. | NTDLKAEPTSKTKE | |

(Brackent y col., 1999)

Figura 8. Alineamiento de sideróforos, receptores de hierro libre, receptores de hemo, Hb y Hemoglobina-Haptoglobina. En letras más oscuras se presentan los aminoácidos conservados de los motivos FRAP y NPNL.
Tomado de Brackent y col., 1999.

2.2 Proteínas de eucariontes que unen Hb humana

2.2.1 Proteínas de *Candida albicans* que unen Hb

En *Candida albicans* se identificó una familia de proteínas ancladas a membrana que unen el grupo hemo. Estas proteínas poseen el dominio "CFEM" que se caracteriza por poseer un motivo que tiene 9 cisteínas. Cuando *S. cerevisiae* fue transfectado con el gen *rht51* (de *C. albicans*) se observó que desarrolló habilidad de utilizar el hierro de la Hb. La participación del gen *rht51* para adquirir Fe de la Hb fue corroborada al deletar el gen en *Candida albicans*, lo que originó que este patógeno perdiera la habilidad de utilizar hemo y hemoglobina como fuente de hierro (Weissman y Kortnitzer, 2004)

2.2.2 Proteína de *Leishmania donovani* que une Hb

En promastigotes de *Leishmania donovani* la unión y endocitosis de Hb está mediada por una proteína de 46 kDa y mediante microscopía electrónica se demostró que dicha proteína se encuentra localizada en el bolso flagelar del protozoario (Sengupta y col., 1997). Posteriormente se clonó el gen que codifica la proteína de 46 kDa y fue expresada en *E. coli*. Usando delecciones se determinó que la región de unión a Hb se localizó en el extremo N-terminal. Mediante un ensayo funcional de degradación de glucosa determinaron que además de unir Hb tiene actividad de hexocinasa (Krishnamurthy y col. 2005).

3. ANTECEDENTES PARTICULARES

Entamoeba histolytica es capaz de degradar las células del intestino y estar en contacto con Hb de eritrocitos lisados y completos y realizar el

evento de eritrofagocitosis, sin embargo, no se conoce ningún mecanismo de adquisición de hierro utilizando como fuente a la Hb.

En *E. histolytica* en un experimento de eritrofagocitosis utilizando anticuerpos anti-hemoglobina se observó la presencia de Hb tanto en la membrana plasmática como en la membrana nuclear del parásito. (Olivares Trejo, comunicación personal). Se ha reportado que este parásito utiliza la lactoferrina como fuente de hierro y los sitios de unión son diferentes a los de otras proteínas con hierro. Se demostró que la lactoferrina se une a una proteína de 90 kDa y a otra de 45 kDa y mediante ensayo de competencia con lactoferrina y Hb se observó ausencia de unión de lactoferrina a la proteína de 45 kDa, sugiriendo que la Hb se unió a esta proteína (León-Sicairos y col., 2005).

4. IMPORTANCIA PARA CONTINUAR EL TEMA

Entamoeba histolytica requiere de hierro para su crecimiento y dentro del hospedero este elemento puede ser obtenido de la Hb. Por lo tanto, resulta interesante conocer si existe la presencia de proteínas que unen Hb y entender el mecanismo de adquisición de hierro de este parásito.

II. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

- Identificar proteínas de *E. histolytica* que unen hemoglobina humana.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la capacidad de *E. histolytica* de crecer en diferentes fuentes de hierro.
- Identificar *in silico* en el genoma de *E. histolytica* genes que codifiquen para proteínas que contengan los dominios de unión a hemoglobina (FRAP y NPNL).
- Analizar la expresión de los genes que codifican para las proteínas identificadas.
- Expresar y purificar las proteínas identificadas de *E. histolytica* en un sistema heterólogo.
- Analizar la capacidad de las proteínas purificadas de unir hemoglobina humana.

III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

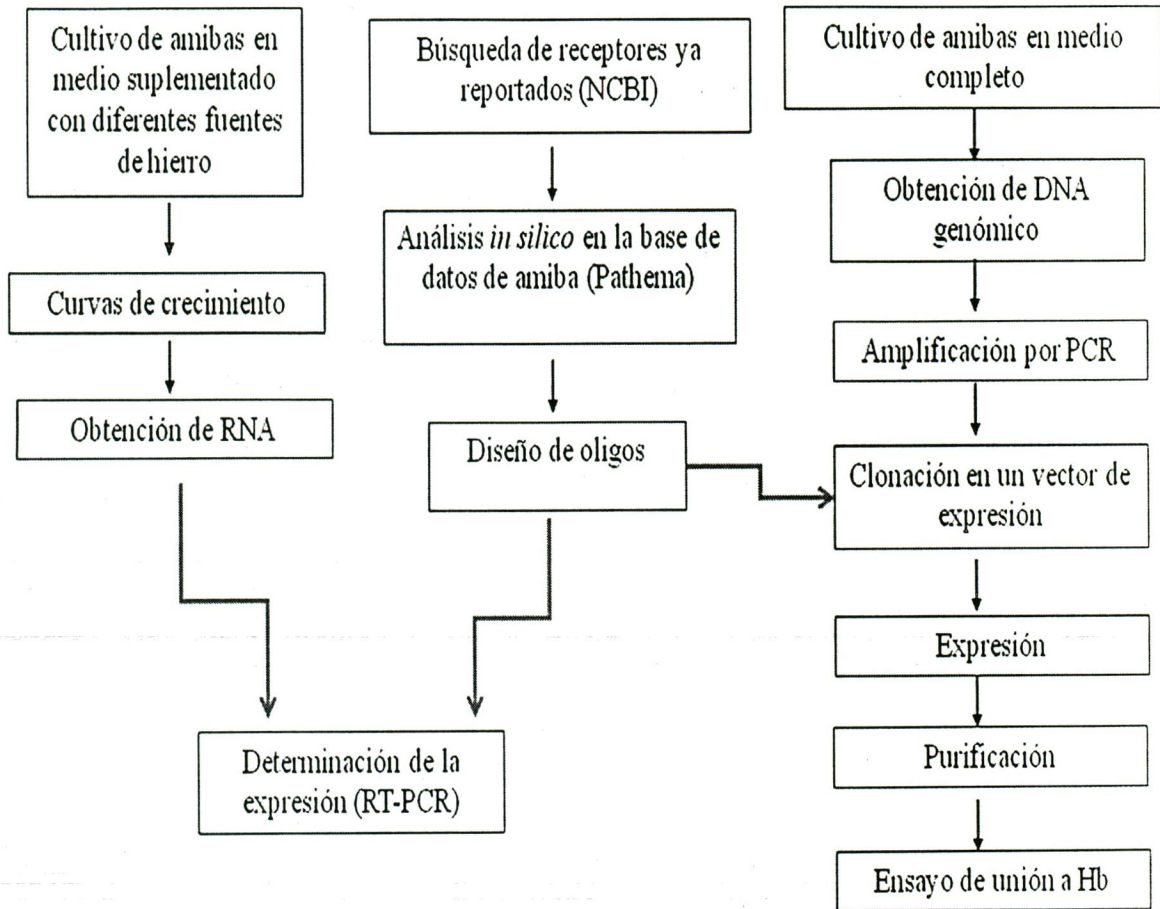


Figura 9. Estrategia experimental empleada en este proyecto.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. *Crecimiento de E. histolytica en medio con diferentes fuentes de hierro*

1.1 Cultivo de *E. histolytica*

Trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HM1-IMSS fueron cultivados en medio TYI-S-33 (biosate 34.48 gr, glucosa anhidra 10.45 gr, NaCl 2.29 gr, KH₂PO₄ 0.68 gr, K₂HPO₄ 1.14 gr, ácido ascórbico 0.28 gr, L-cisteína 1.43 gr y citrato férrico 0.028 gr disueltos en 1 L de agua) (Diamond y col., 1980), suplementado con 16% de suero bovino (SB), inactivado (Equitech-bio, inc) a 56°C durante 30 min en baño de agua (Barnsted Lab-Line Mod. Aquabath). Además se suplementó con 1% con vitaminas (Diamond vitamin tween 80 JRH biociencias) y con 100 U de penicilina/ml y 100 µg/ml de estreptomicina.

1.2 Crecimiento de *E. histolytica* en diferentes fuentes de hierro

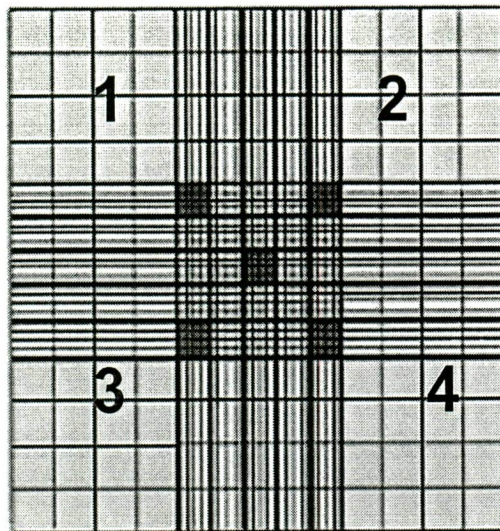
Los cultivos confluentes de *E. histolytica* fueron lavados y ayunados de hierro durante 2 h en medio TYI-S-33 carente de hierro. Transcurrido este tiempo se inocularon amibas en tubos de vidrio con 10 ml de medio TYI-S-33 carente de hierro (TYI-S-33/-Fe) que fueron suplementados con 10 mM de citrato férrico (Sigma Cat. 036K0011), 10 mM de Hb purificada (Sigma Cat. 052K7625), la fracción soluble de un extracto de eritrocitos, eritrocitos completos (100 eritrocitos:amiba) o 16% de suero. Como control negativo se utilizó un tubo con medio sin suplementar. Estos cultivos fueron preparados por triplicado e incubados a 37°C. De cada uno de los cultivos se tomó una muestra cada 24 h y mediante la técnica

de exclusión de azul de tripano se contó el número de células vivas. Este experimento se realizó tres veces.

1.3 Análisis de viabilidad de *E. histolytica*

La viabilidad de *E. histolytica* crecida en diferentes fuentes de hierro fue determinada mediante la técnica de exclusión de azul de tripano.

El azul de tripano es un colorante que permite diferenciar las células viables (no teñidas) de las no viables (teñidas). Esta tinción se utilizó para determinar el número de células viables en cada uno de los medios utilizados. Para ello se tomó una muestra de 10 μl del cultivo y se adicionaron 5 μl de azul de tripano (1% azul de tripano marca Sigma en PBS estéril). Esta mezcla se colocó sobre la cámara de Neubauer y se observó al microscopio óptico (Iroscope Mod. SI-PH). La cámara de Neubauer consta de cinco campos ópticos: campo visual superior izquierdo y derecho, campo visual inferior izquierdo y derecho y campo visual central. Se contó el número de células viables presentes en cada campo visual exceptuando el campo central (Figura 10). El número de células por ml se obtuvo multiplicando el número de células contadas por 1.5 (factor de dilución con el cultivo y el azul de tripano) y por 100 (Figura 10). El resultado obtenido corresponde al número de células viables.



de células contadas x 1.5 x 100 = # de células viables/ml

Figura 10. Esquematiza los campos visuales de una cámara de Neubauer y la fórmula utilizada para determinar el número de células viables. Los campos con los números 1, 2, 3 y 4 corresponden a los campos en los cuales se contó a los trofozoítos de *E. histolytica*.

A los datos obtenidos se les calculó la media y la desviación estándar con el programa GraphPad Prism versión 5.01 y realizaron las gráficas en las que fue representado el crecimiento de las amibas bajo las distintas fuentes de hierro.

2. Análisis in silico

La búsqueda de receptores para hemoglobina ya reportados en otros organismos se realizó en la base de datos del NCBI (www.ncbi.nih.gov) y después se realizaron alineamientos para encontrar regiones conservadas entre estos receptores. Posteriormente con cada una de las secuencias obtenidas en la base de datos del NCBI se realizaron búsquedas en la base datos Pathema (www.pathema.tigr.org) para identificar una secuencia en el genoma de *E. histolytica* con características de alguno de los receptores ya reportados (Figura 11).

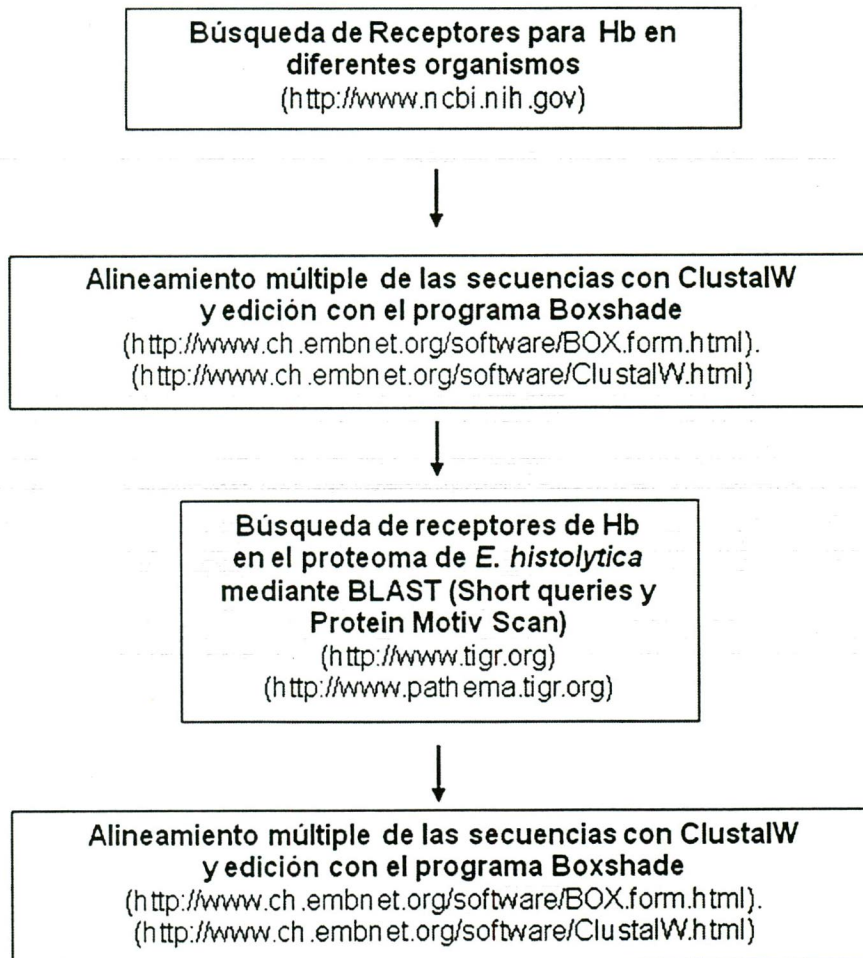


Figura 11. Esquematiza los pasos y los servidores utilizados en el análisis *in silico*.

3. Análisis de la expresión mediante RT-PCR de los genes encontrados in silico utilizando trofozoítos de *E. histolytica*.

Mediante ensayos de RT-PCR se determinó la expresión de los genes. A los cultivos de *E. histolytica* crecidos en diferentes fuentes de hierro se les extrajo ARN mediante la técnica fenol-cloroformo (Sambrook y Russell, 2001). Cultivos confluentes crecidos en medio TYI-S-33 fueron pasados a medio TYI-S-33/-Fe, en el cual las amibas fueron ayunadas de hierro durante 2 h, transcurrido este tiempo, una muestra de trofozoítos fue cosechada para realizarles extracción de ARN, a otra muestra se suplementó el medio con 10 mM de Hb humana purificada comercial (Sigma Cat. 052K7625) y una última provista de hierro mediante 10 mM citrato férrico (Sigma Cat. 036K0011). Después de 24 h, a estas dos últimas muestras también se les realizó extracción de ARN. Con los ARN obtenidos se hicieron las reacciones de RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos y un kit comercial (Superscript One-Step Cat. 11922028 Invitrogen). Como control de RT- se corrió una reacción sin la enzima retrotranscriptasa. El control de carga utilizado en este experimento fue el amplificado de un fragmento del gen ribosomal (18sARN) de *E. histolytica*. Los productos fueron resueltos en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio y observados en un transiluminador de luz UV (Marca UVP modelo TX28199D).

3.1 Extracción de ARN mediante la técnica Fenol-Cloroformo

Trofozoítos de *E. histolytica* crecidos en cada una de las condiciones ya mencionadas fueron cosechados centrifugando a 312 xg durante 7 min (Sorval modelo Biofuge Primo R). Se les realizaron dos lavados con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM), las pastillas obtenidas fueron resuspendidas en 500 µl de PBS. Posteriormente a cada muestra se le agregó 500 µl de fenol ácido y se

mezcló por inversión, después de mezclar se centrifugó a 312 xg durante 1 min y se recuperó la fracción acuosa de cada muestra. Estas fracciones fueron colocadas en diferentes tubos de 2.5 ml, se les adicionó 250 μ l de fenol ácido y 250 μ l de cloroformo, se mezcló por inversión y se centrifugó nuevamente, se recuperó la fracción acuosa de cada muestra en diferentes tubos de 2.5 ml nuevos y se les adicionó 500 μ l de cloroformo, se mezcló por inversión y se centrifugó, las fracciones acuosas fueron recuperadas en otros tubos de 2.5 ml y se les adicionó 1 ml de etanol absoluto, se incubó 20 min a -20°C y se centrifugó a 14000 xg durante 15 min a 4°C . El sobrenadante de cada muestra fue removido cuidadosamente con una pipeta y se realizaron dos lavados con 1 ml de etanol al 70% centrifugando a 14000 xg durante 15 min a 4°C . Se removió el sobrenadante y se dejaron secar las pastillas a temperatura ambiente y por último las pastillas fueron resuspendidas en 50 μ l de agua DEPC libre de RNAsas. De cada muestra se tomó una alícuota y se le determinó la absorbancia a 260 y 280 nm con un espectrofotómetro (Thermo spectronic modelo BioMate 3).

3.2 Determinación de la integridad del ARN

Para determinar la integridad del ARN extraído de las amibas de cada muestra se analizó el ARN total mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Para ello, se tomó una muestra de 6 μ l de ARN en un tubo de 1.5 ml y se agregó a cada muestra: 10 μ l de formamida desionizada, 4 μ l de formaldehído al 37%, 2 μ l de 10x MOPS y 10 μ l de buffer de carga. Se mezcló con un vortex y se calentó a 65°C durante 10 min, se incubó en hielo durante 5 min y se resolvió en el gel de agarosa, el cual por último fue teñido con bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador de luz UV y fotodocumentado (GelDoc-Xr Biorad).

3.3 Ensayo de RT-PCR

Para cada una de las muestras de ARN utilizado se preparó una mezcla, a la cual se adicionaron todos los componentes necesarios para la reacción, a excepción del ARN control y la enzima. Estos se adicionaron ya que la mezcla había sido alicuotada en tubos para PCR. Cada reacción contenía 1 µl RT platinum Taq/HiFi mix, 2X reaction mix (buffer que contiene 0.4 mM de cada dNTPs y MgSO4 mM), 20 pmolar oligonucleótido sentido, 20 pmolar oligonucleótido antisentido, 1 µg de ARN y agua DEPC. En el caso de la reacción –RT en vez de agregar 1 µl RT platinum Taq/HiFi mix se agregó una unidad de Taq polimerasa (Invitrogen Cat. 10342020).

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados son los siguientes:

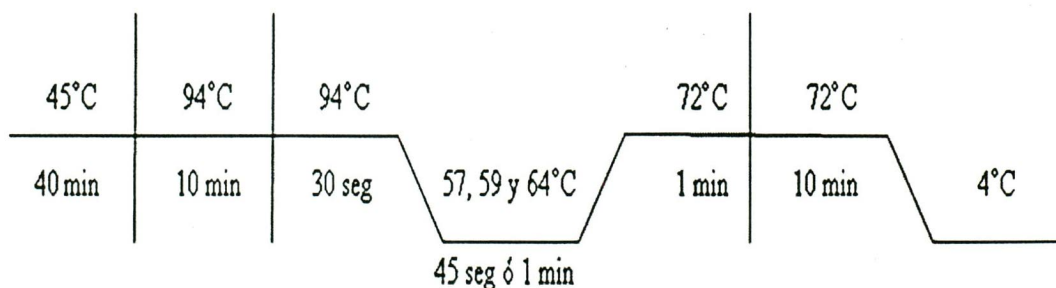
| | |
|----------|---|
| NPNLSE | 5' CCATGGGGATCCATGTCTCAAGTTATACTCCAAGTGAAT 3' |
| NPNLAS | 5' ACAGCCAAGCTTTTAATTAATAAATACAAAAGACTCTTT 3' |
| NPNLSEGR | 5' CCATGGGGATCCATGTATGATTTCTATTCTCAAATTA AAA 3' |
| NPNLAEGR | 5' ACAGCCAAGCTTAGTATAAATGATAAAAGATAAAAATAAT 3' |
| FRAPES | 5' CCATGGGGATCCATGACTTCAATTAAGGACA 3' |
| FRAPEA | 5' ACAGCCAAGCTTTTATTCATCATCTTCTTTT 3' |

Los oligonucleótidos se diseñaron en base a la secuencia de nucleótidos de los genes completos obtenidos en la base de datos de *E. histolytica*. Se les agregó en los extremos 5' y 3' los sitios de corte para las enzimas *BamHI* y *XhoI* respectivamente, esto con el fin de usarlos para amplificar la secuencia de los genes y con el amplificado realizar una clonación dirigida.

Las secuencias de los oligonucleótidos del fragmento del gen que se utilizó como control de carga (ARN ribosomal 18S) son las siguientes:

Sentido 5' ATTGTCGTGGCATCCTAACTCA 3'
 Antisentido 5' GCGGACGGCTCATTATAACA 3'

La reacción de RT-PCR se llevó a cabo en un termociclador siguiendo las indicaciones del fabricante (Hybaid modelo Px2) utilizando el siguiente programa:



30 ciclos

4. Clonación de los genes encontrado en la base de datos de *E. histolytica*.

Los genes se amplificaron por PCR usando oligonucleótidos específicos utilizando como templado el ADN genómico de *E. histolytica* de la cepa HM1-IMSS, el cual fue obtenido mediante un kit comercial (Wizard Genomic-DNA Promega Purification kit Cat. A1120). El ADN amplificado así como el vector pGEX-6-P1 (Gelifesciences) fueron digeridos con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I (New England BioLabs Cat. RO136L y RO146L). Ambos fragmentos fueron ligados con una relación molar 3-1 inserto-vector usando una unidad de la enzima T4 ligasa (Invitrogen Cat. 15224025). La reacción fue utilizada para transformar células competentes *E. coli* DH5 α , las cuales fueron sembradas en agar LB con 100 μ g/ml de ampicilina para seleccionar las transformantes. Los candidatos fueron caracterizados por ensayos de doble digestión. Para ello el ADN de los candidatos se obtuvo y fue digerido con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I (New England BioLabs Cat. RO136L y RO146L). Así

mismo, se realizó amplificación por PCR usando el ADN plasmídico de los candidatos como templado.

4.1 Extracción de ADN genómico de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS

El ADN utilizado se obtuvo de trofozoítos de amiba crecidos en medio TYI-S-33 y utilizando un kit comercial (Wizard Genomic-DNA Promega Purification kit Cat. A1120). Los trofozoítos fueron cosechados por centrifugación en tubos de 15 ml, la pastilla fue resuspendida con 200 μ l de PBS y se transfirió a un tubo de 1.5 ml, posteriormente se le adicionó 600 μ l del buffer de lisis de núcleos y mezcló para lisar las células. Después de mezclar se agregaron 200 μ l del buffer de precipitación de proteínas y se mezcló durante 20 s con un vortex, se incubó en hielo durante 5 min y se centrifugó a 15 000 xg por 4 min, se recuperó el sobrenadante con el ADN y se transfirió a un tubo que contenía 600 μ l de isopropanol, se mezcló por inversión y se centrifugó a 15, 000 xg durante 1 min, se centrifugó y la pastilla se resuspendió con 1 ml de etanol al 70% frío, se centrifugó y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente, por último el ADN (pastilla) se rehidrató con 100 μ l de agua desionizada.

4.2 Extracción de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico fue realizada mediante el proceso de lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001) y fue utilizada para extraer el plásmido sin inserto así como las construcciones realizadas.

Para obtener el DNA plasmídico se inoculó una colonia de bacterias en 2 ml de medio líquido Luria Bertani/ampicilina (LB) (peptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1% y 50 μ g/ml de ampicilina), se incubó durante

toda la noche a 37°C en una incubadora (New brunswick modelo C25KC). El cultivo se transfirió a tubos de 1.5 ml y se centrifugó a 12,000 xg durante 30 seg a 4°C, después por aspiración con una micropipeta se quitó y desechó el sobrenadante, se dejó secar la pastilla y se resuspendió con 100 µl de solución I fría (Glucosa 50 mM, Tris-HCL pH 8.0 25 mM y EDTA pH 8.0 10 mM). Se adicionaron 200 µl de solución II fresca (1% SDS y NaOH 0.2N) y RNAsa, se mezcló 5 veces por inversión y se incubó en hielo durante 10 min. Se agregó 150 µl de solución III fría (60 ml de acetato de sodio 5M, 11.5 ml de ácido acético y 28.5 de agua desionizada) y se mezcló suavemente por inversión durante 10 s, se incubó en hielo 5 min, se centrifugó a 12,000 xg durante 5 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante, ya que éste contenía el ADN y fue precipitado con 1 ml de etanol frío, se centrifugó y la pastilla se resuspendió con 1 ml de etanol al 70% frío, se centrifugó y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente, por último el ADN (pastilla) fue resuspendido en 50 µl de agua desionizada.

4.3 Descripción del vector de expresión

El plásmido de expresión utilizado en esta investigación fue el pGEX-6P-1 (GE Life Sciences). El plásmido pGEX-6P-1 tiene un tamaño de aproximadamente 5000 pb y se caracteriza por poseer un promotor inducible con IPTG, un gen de resistencia a ampicilina y un sitio de múltiple corte, el cual tiene en sentido de 5' a 3' los sitios de corte para las enzimas *BamHI* y *XhoI*, los cuales fueron necesarios para llevar a cabo una clonación dirigida. pGEX posee una etiqueta de glutatión-S-transferasa (GST). A ésta se liga el gen clonado. Entre el GST y el sitio de múltiple corte se codifica la secuencia del sitio de corte para la proteasa PPS (PreScission Protease), proteína que corta el GST para dejar libre la proteína recombinante purificada (Figura 12).

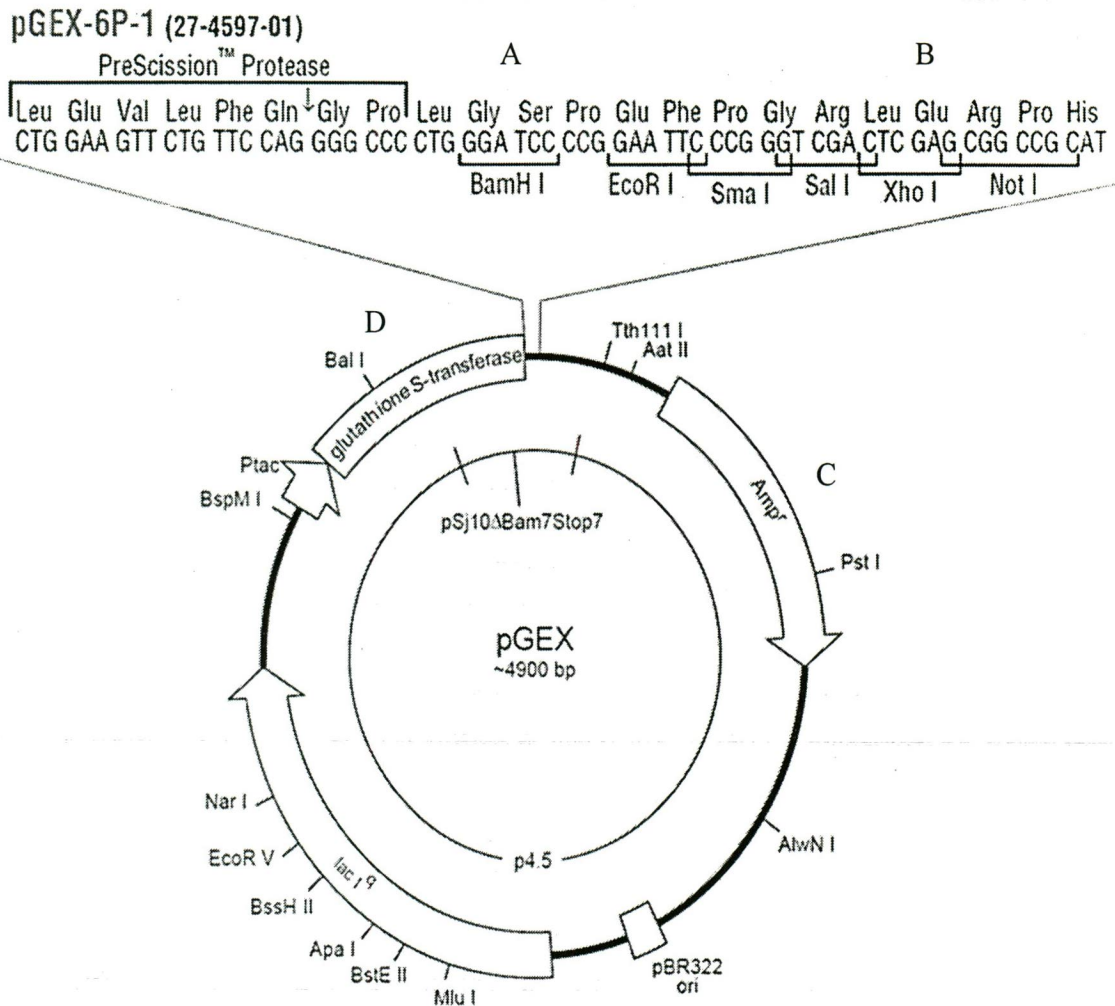
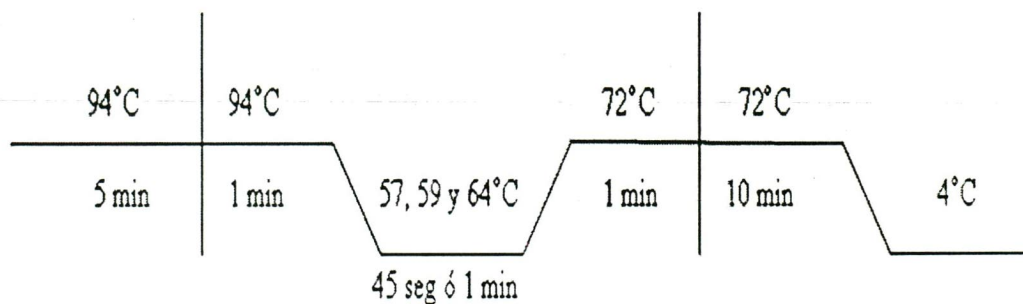


Figura 12. Mapa del plásmido pGEX-6P-1. En A y B se observan los sitios de corte para las enzimas *Bam*HI y *Xho*I respectivamente, los cuales fueron necesarios para una clonación dirigida. En C se esquematiza un gen de resistencia a ampicilina y en D una etiqueta de glutatión-S-transferasa (GST). Entre el GST y el sitio de corte para la enzima *Bam*HI se encuentra el sitio de corte para la PPS (PreScission Protease).

4.4 Amplificación mediante PCR

La amplificación de los genes se realizó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos descritos en el ensayo de RT-PCR, ADN genómico de *E. histolytica* como templado, una unidad de Taq polimerasa, 10X buffer (Tris-HCL pH 8.0 200 mM, KCL 500 mM), MgCl₂ 1.5 mM, dNTP's 0.2 mM, 0.1 μM oligonucleótido sentido, 0.1 μM oligonucleótido antisentido, 1 ng de ADN y agua desionizada.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador (Hybaid modelo Px2) utilizando el siguiente programa:



35 ciclos

4.5 Geles de agarosa para el análisis de ADN

La electroforesis en gel de agarosa se utilizó como método general para el análisis de ADN genómico y plasmídico y para separar, identificar y purificar amplificadores de ADN. El porcentaje de agarosa en los geles fue del 1%. El buffer utilizado para disolver la agarosa y para realizar la electroforesis fue TAE (Tris acetato 40 mM y EDTA 1 mM). Se utilizaron cámaras de electroforesis de ADN marca OWL modelo B1A. Los geles

fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados con un transiluminador de luz UV.

4.6 Digestión de ADN plasmídico y amplificados de PCR

La digestión del plásmido, así como el amplificado de cada uno de los genes fue realizada con las enzimas *BamHI* y *XhoI*. La digestión se llevó a cabo primero con la enzima *BamHI*, los fragmentos restringidos se purificaron y se restringieron ahora con la enzima *XhoI*. Las reacciones se incubaron durante 2 h a 37°C en un baño de agua (Barnstead Lab-Line modelo Aquabath).

La reacción de digestión para la enzima *BamHI* estuvo realizada por una unidad de *BamHI*, buffer 1X (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, dithiothreitol pH 7.9 1 mM), 100 µg/ml de albumina y 8 µg de ADN.

La reacción de digestión realizada para la enzima *XhoI* contenía una unidad de *XhoI*, buffer 1X (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, dithiothreitol pH 7.9 1 mM), 100 µg/ml de albumina y 8 µg de ADN.

4.7 Ligación de los genes amplificados con el plásmido pGEX-6P-1

Después de la digestión, el ADN fue analizado y purificado en geles de agarosa con un kit comercial (Geneclean Cat. # 1001-400). Una vez que se purificó, se ligaron con una unidad de la enzima T4 ligasa (Invitrogen Cat. 15224025) en una relación 3:1 inserto-vector. Las reacciones se llevaron a cabo durante 12 h a 16°C y se utilizó una unidad de T4 DNA ligasa (Invitrogen), buffer 1X (Tris-HCl 250 mM pH 7.4, MgCl₂ 50 mM, ATP 5 mM, DTT 5 mM, polietilen glicol-8000 25%), ADN plasmídico y amplificado digeridos. Los controles utilizados fueron el plásmido sin

inserto digerido con las enzimas *BamHI* y *XhoI*, plásmido sin inserto y sin restringir y ADN del fago λ restringido con la enzima *HindIII*.

4.8 Preparación de células competentes

Las células utilizadas para transformar fueron *E.coli* DH5 α para obtener un alto número de copias del plásmido y BL21pLysS para expresar las proteínas. Las células fueron hechas competentes mediante el método de Hanahan (Sambrook and Russell, 2001).

Se inoculó una colonia de bacterias en 5 ml de medio LB, se incubó a 37°C a 47 g durante toda la noche, se tomaron 2 ml de este cultivo y se inocularon en 50 ml de medio SOB (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%; se esterilizó autoclave y se adicionó KCl 1M 25%, MgCl₂ 1M 1%, MgSO₄ 1M 1%, NaCl 5 M 0.2%). Se incubó a 37°C con agitación hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.6, se colectó el cultivo en un tubo de 50 ml y se incubó en hielo durante 15 min, después se centrifugó a 624 xg durante 15 min a 4°C, cuidadosamente se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en buffer FSB (Standard transformation buffer: Cloruro de rubidio 100 mM, Cloruro de manganeso 50 mM, Acetato de potasio 30 mM, Cloruro de calcio 10 mM y 10% de Glicerol) y se incubó en hielo durante 15 min. Nuevamente se centrifugó y la pastilla ahora se resuspendió en 4 ml de buffer FSB, se agregaron 140 μ l de DMSO e inmediatamente se agitó y se incubó en hielo durante 5 min, se agregó la misma cantidad de DMSO y se incubó 15 min y por último se hicieron alícuotas de 100 μ l, las cuales se almacenaron a -70°C.

4.9 Transformación

Las células competentes *E.coli* DH5 α y BL21pLysS fueron usadas para transformar DNA plasmídico mediante choque térmico y para ello se tomaron 100 μ l de células competentes y se adicionó 30 ng de DNA plasmídico. Se incubó durante 20 min en hielo y al término de los 20 min se les dió un choque térmico durante 120 s a 42°C en baño de agua (Barnstead Lab-Line Mod. Aquabath). Después fueron transferidas a hielo e incubadas durante 2 minutos, se les adicionó 800 μ l de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, se esterilizó en autoclave y se adicionó KCl 1M 25%, MgCl₂ 1M 1%, MgSO₄ 1M 1%, NaCl 5 M 0.2% y 20 ml de glucosa 1M), se incubaron las células a 37°C a 47 xg durante 1 h en una incubadora con agitación (New brunswick Mod. C25KC). Por último se transfirieron 200 μ l a placas LB con 2% de agar y con 100 mg/ml de ampicilina y se incubó durante toda la noche a 37°C.

4.10 Selección de las clonas candidato y caracterización de la clonación

Las clonas crecidas en las placas fueron seleccionadas al azar, e inoculadas en 5 ml de medio LB/ampicilina, se incubaron toda la noche a 37°C y se les realizó extracción de DNA plasmídico mediante lisis alcalina. Mediante geles de electroforesis de DNA se analizó el corrimiento de los plásmidos extraídos comparando con el plásmido nativo, aquellos plásmidos que migraron de manera distinta al plásmido nativo fueron analizados mediante restricción con las enzimas utilizadas para clonar, posteriormente se analizó nuevamente mediante geles de electroforesis de DNA visualizando si se liberaba un fragmento que correspondiera al tamaño del gen clonado.

5. Expresión de las proteínas recombinantes

Las células competentes de *E. coli* BL21pLysS fueron transformadas con los plásmidos candidatos. Una de las colonias purificadas fue inoculada en 5 ml de medio LB/ampicilina y cultivada durante 12 h a 37°C, de este cultivo se realizó una dilución 1-50 en medio LB con 100 mg/ml de ampicilina y se incubó a 37°C a 47 xg cuando los cultivos alcanzaron una D.O=0.4-0.6, se tomó una muestra de 100 µl para emplearla como control de células no inducidas, el resto del cultivo fue inducido con IPTG (Invitrogen) a una concentración final 1mM y se continuó la incubación por 3 h. Posteriormente las proteínas totales fueron resueltas mediante geles SDS-PAGE al 12%, los cuales fueron teñidos con azul de Coomassie. Como controles se utilizaron las células sin inducir, células sin transformar y células transformadas con pGEX-6P-1.

5.1 Electroforesis en SDS-PAGE

Para separar las proteínas en función de su tamaño se realizó una electroforesis en gel de SDS-PAGE (Laemmli, 1970). El detergente SDS desnaturaliza las proteínas y les confiere carga negativa, permitiendo su separación en una matriz de poliacrilamida cuando se aplica un campo eléctrico. Se utilizó el sistema de electroforesis Miniprotean (Biorad). En este trabajo todos los geles separadores contenían un 12% de acrilamida y se prepararon con las siguientes soluciones:

- Acrilamida/Bisacrilamida (30%).
- 0.5 M Tris-HCl pH 8.8
- 0.1% SDS.
- 10% persulfato de amonio.
- 0.1% TEMED

Las muestras fueron preparadas con buffer de carga y para ello en un tubo de 0.5 ml se les adicionó la cantidad necesaria de modo que el buffer de carga quedara a una concentración 1X (5X = 250 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50% de glicerol, 10 % de SDS, 0.05 % de azul de bromofenol, 2 % de DTT, β -mercaptoetanol 1 mM). Se mezclaron por agitación y posteriormente se hirvieron en baño de agua durante 7 min, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y por último se colocaron las muestras en el gel. Una vez que todas las muestras fueron cargadas en el gel, se llevó a cabo la electroforesis en buffer Laemmli (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 0.1% SDS, en agua desionizada). La corrida se llevó a cabo en un campo eléctrico a 100 volts.

Una vez que terminó la electroforesis los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (10% de ácido acético, 40% de etanol, 0.05% de Coomassie brilliant-blue). Debido a que los geles estaban completamente teñidos, fueron desteñidos con solución decolorante de geles de proteínas (30% de metanol, 10% de ácido acético en agua desionizada) durante 20 min.

6. Pruebas de solubilidad

La solubilidad de las proteínas se analizó para determinar en que fracción celular se encontraron las proteínas. La solubilidad se determinó a partir de una muestra de cultivos inducidos con IPTG, se centrifugaron a 312 xg durante 10 min para separar las células del medio de cultivo, cada una de las pastillas obtenidas fueron resuspendidas en 50 μ l por ml de cultivo de PBS pH 7.3 frío (4°C), después se les adicionó lisozima y se incubaron durante 15 minutos en hielo. La lisozima fue utilizada a partir de un stock 10 mg/ml en Tris-HCl pH 8.0 25mM y la cantidad agregada a cada pastilla fue lo correspondiente a 0.1 volumen del PBS utilizado. Una

vez pasado el tiempo de incubación, las muestras se sonicaron 1 min con pulsos de 10 s y pausas de 20 s a una amplitud de 60%. Al término de la sonicación, a los extractos se les adicionó Triton X-100 a una concentración final del 1% y se mezclaron por agitación suave a 4°C durante 1 h. Posteriormente las fracciones insolubles fueron separadas de las fracciones solubles centrifugando a 2080 xg durante 20 min a 4°C. Se recuperaron ambas fracciones de cada muestra y de cada una se tomó una alícuota para ser resuelta en geles SDS-PAGE y visualizar en qué fracción se encontraba la proteína.

7. Purificación de las proteínas recombinantes

Una vez que las proteínas se encontraron en la fracción soluble, 500 μ l de dicha fracción fueron incubadas 12 h a 4°C en agitación suave con 1.33 ml de una matriz de Glutathion-Sefarosa (Amersham Biosciences), posteriormente se realizaron seis lavados, cada uno con 6.65 ml con PBS frío, y 4 eluciones con buffer de elución (Hepes 75 mM, NaCl 150 mM, Glutathión reducido 15 mM, 0.1% de Triton X-100 y DTT 0.5 mM). De cada uno de los lavados, así como de las eluciones de cada una de las muestras, se tomó una alícuota de 20 μ l para resolver las proteínas en SDS-PAGE, uno de los geles fue teñido con azul de Coomassie y el otro fue electrotransferido a una membrana de nitrocelulosa de poro de 0.22 μ m (Biorad), a la cual se le realizó un Western Blot utilizando anticuerpos anti-GST y anti-inmunoglobulina con peroxidasa (cabra). Finalmente este ensayo fue revelado con quimioluminiscencia con el kit ECL (Amersham Bioscience).

7.1 Inmovilización de las proteínas

Está basada en la transferencia de las proteínas separadas en un gel de SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa. Se colocó una esponja y encima se colocó un papel Whatman, sobre este papel se colocó una membrana de nitrocelulosa y encima se colocó el gel de proteínas. Cuidando que no quedaran burbujas de aire entre la membrana y el gel, encima se colocó un papel Whatman y sobre éste una esponja, todo lo mencionado estaba mojado con buffer de transferencia (Tris-base 25 mM, glicina 40 mM, SDS 0.05 %, metanol 20 %). Esta preparación se colocó en una cámara de electrotransferencia (Biorad modelo 170-3930), se llenó con buffer de transferencia, se transfirió durante 2 h a 400 mA.

7.2 Detección de las proteínas fusionadas al tag GST

Para detectar las proteínas separadas por SDS-PAGE se utilizó Western blot utilizando anticuerpos específicos anti-GST. Las membranas en las cuales se inmovilizaron las proteínas fueron incubadas con solución de bloqueo (PBS 1X, Tween-20 0.05% y leche Svelty Nestlé 5%) durante 2 h a temperatura ambiente en agitación, se eliminó la solución de bloqueo y se incubaron con el anticuerpo anti-GST diluido 1:8000 en PBS-Tween (PBS 1X y Tween-20 0.05%), se incubó durante una hora con agitación y se realizaron 3 lavados de 15 min con PBS-Tween, después de lavar se incubó con anticuerpo anti-inmunoglobulina con peroxidasa durante 1 h y con agitación. Este anticuerpo se encontraba diluido 1:10 000 en PBS-Tween. Se hicieron 4 lavados de 15 min con PBS-Tween, se preparó la reacción del kit ECL y las membranas fueron incubadas con esta solución durante 1 min, posteriormente se les quitó el exceso de reactivo del kit ECL y se revelaron en un cuarto oscuro con luz roja realizando

exposiciones a diferentes tiempos en una película de autorradiografía, utilizando soluciones reveladora y fijadora (FUJIFILM).

8. Reacción enzimática de corte del tag GST

El GST fue removido de las proteínas recombinantes mediante una reacción enzimática con la proteasa PPS. Con el fin de equilibrar el buffer de elución por buffer de corte (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM y DTT 1 mM), las fracciones enriquecidas con las proteínas recombinantes fueron dializadas durante 12 h cambiando el buffer cada 2 h, después fueron tratadas durante 12 h a 4°C en agitación con una proteasa (Pre Scission Protease) para cortar el GST. Una vez que el GST fue cortado, era necesario separarlo de las proteínas para que en las muestras únicamente se tuvieran las proteínas nativas. Para ello, las muestras fueron equilibradas durante 12 h con PBS frío y nuevamente se incubaron con la matriz de sefarosa acoplada a glutatión reducido, después de incubar 12 h, las muestras fueron centrifugadas. Se recuperaron los sobrenadantes, ya que estos contenían las proteínas libres de la proteína de fusión GST. Posteriormente el GST fue separado de la columna de sefarosa utilizando el mismo buffer de elución descrito en la purificación.

9. Ensayos de unión a hemoglobina

La capacidad de las proteínas de unir Hb se demostró mediante ensayos de overlay. Las proteínas recombinantes fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa, la cual fue bloqueada con 5% de leche descremada-PBS-Tween durante 2 h, después se incubó con 5 µg de hemoglobina humana purificada durante 12 h, se incubó con anticuerpos anti-hemoglobina diluido 1:10000 en PBS-Tween, se realizaron 4 lavados de 15 min con PBS-Tween, después se incubó con un segundo

anticuerpo anti-inmunoglobulina diluido 1:10000 en PBS-Tween, se realizaron 4 lavados con PBS-Tween y por último se reveló mediante quimioluminiscencia. Como controles se utilizaron extractos totales de *E.coli* y otra membrana que no fue incubada con hemoglobina.

10. Ensayos de unión a hemoglobina de proteínas totales de *E. histolytica*

Las proteínas totales de trofozoítos de *E. histolytica* fueron analizadas para determinar la capacidad de unir Hb. Se obtuvieron las proteínas totales de trofozoítos *E. histolytica* crecidos en ausencia de hierro, presencia de Hb y medio completo. Las proteínas fueron resueltas en geles de electroforesis SDS-PAGE al 12% y electrotransferidas a membrana de nitrocelulosa. Se realizó un ensayo de Overlay como el ya descrito (pag. 48. Ensayo de unión a Hb) y se realizó un ensayo de overlay compitiendo la Hb con albumina.

V. RESULTADOS

Se ha reportado que los patógenos requieren hierro para su desarrollo dentro del hospedero y este elemento puede ser adquirido de diferentes fuentes tales como ferritinas, transferrinas y proteínas hemo como la hemoglobina (Stojiljkovic y col., 1995). *E. histolytica* es un parásito que cuando se encuentra en contacto con eritrocitos es capaz de llevar a cabo el evento de eritrofagocitosis. Sin embargo, en *E. histolytica* se desconoce la presencia de alguna proteína capaz de unir la Hb.

1. *Crecimiento de Entamoeba histolytica en diferentes fuentes de hierro*

Para determinar la capacidad de *E. histolytica* para utilizar la Hb como fuente de hierro se realizaron curvas de crecimiento. *E. histolytica* se dejó 2 h de ayuno de hierro, se suplementó el medio TYI-S-33/-Fe con diferentes fuentes de hierro (Hb purificada, Fracción soluble de eritrocitos, Eritrocitos, Citrato férrico y Suero). De cada cultivo se tomaron muestras cada 24 h y se midió la viabilidad de los parásitos, los datos obtenidos fueron analizados y graficados.

E. histolytica fue capaz de mantener su crecimiento en presencia de Hb purificada, la fracción soluble de eritrocitos y eritrocitos completos, así como en el medio completo, a diferencia del medio sin hierro en el que la amiba muere a partir del segundo día (Figura 13). Estos resultados indican que *E. histolytica* es capaz de obtener hierro a partir de diferentes fuentes.

El experimento anterior mostró que *E. histolytica* mantiene el crecimiento, pero pudo deberse a la presencia de suero en el medio ya que el suero está enriquecido de proteínas como la transferrina o lactoferrina y a su vez estas proteínas podrían funcionar como donadoras de hierro

enmascarando el efecto de la Hb. Por esta razón, se decidió realizar un experimento similar al anterior, pero en este no se contempló la adición de suero. En este experimento se observó que la Hb purificada y la fracción soluble de extracto de eritrocitos son utilizados por la amiba como donadores de hierro debido a que logró soportar el crecimiento celular hasta 5 días a diferencia del medio con ausencia de hierro en el que la amiba muere después del segundo día (Figura 14). Estos datos sugieren que la amiba es capaz de crecer utilizando el hierro de la hemoglobina.

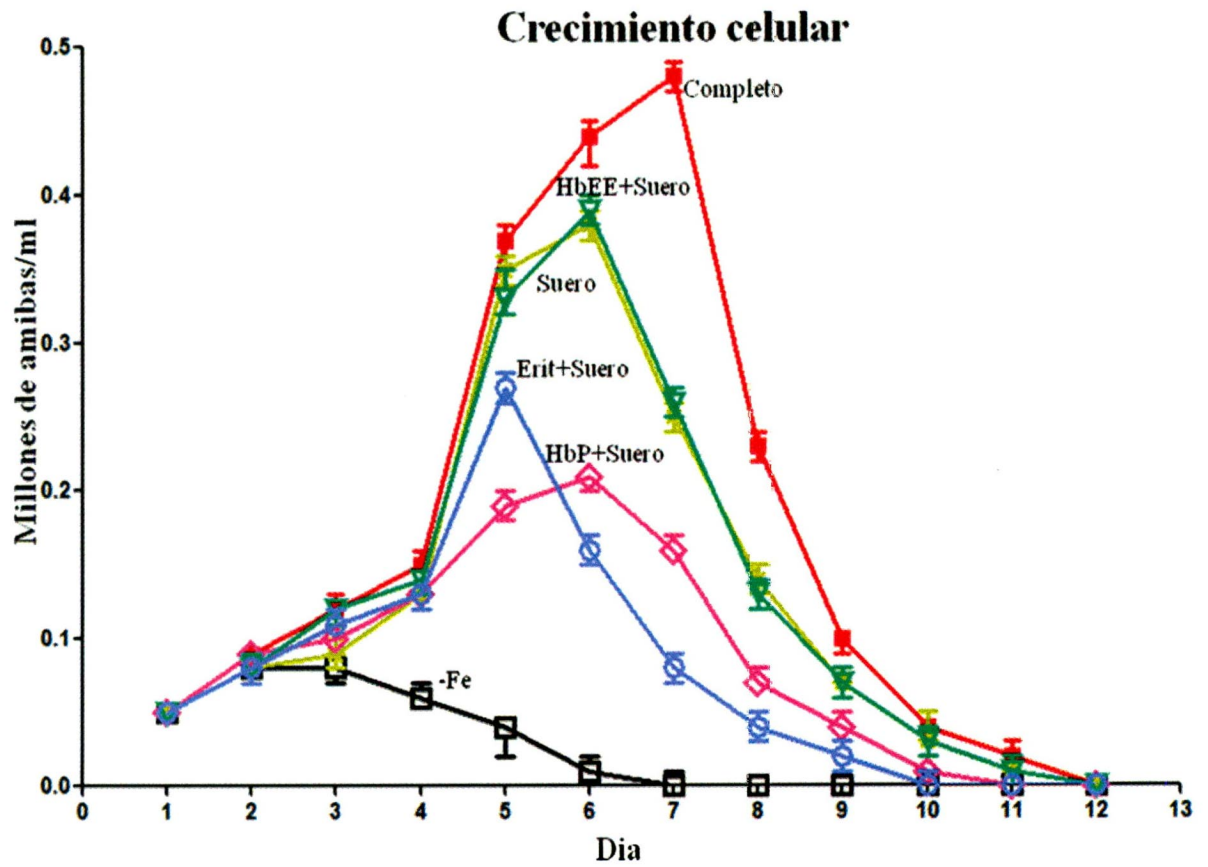


Figura 13. Curva de crecimiento de *E. histolytica* cultivada en medio suplementado con diferentes fuentes de hierro.

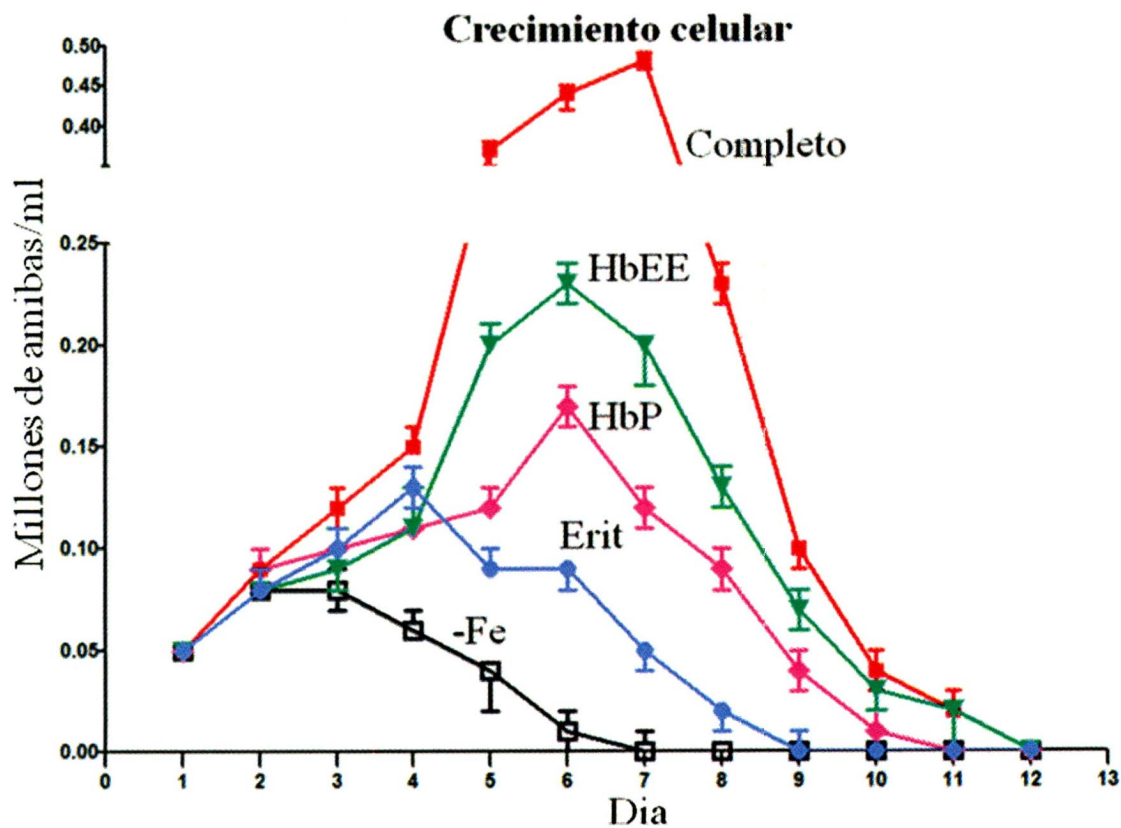


Figura 14. Curva de crecimiento de *E. histolytica* cultivada en medio suplementado con diferentes fuentes de hierro, pero sin suero bovino.

2. Análisis in silico

Las curvas de crecimiento sugirieron que *E. histolytica* puede adquirir hierro a partir de Hb, por lo que en nuestra hipótesis se plantea que dentro del genoma de *E. histolytica* puede existir un gen que codifique para una proteína que pueda unir Hb como se ha reportado para otros patógenos. Con el objetivo de encontrar un dominio conservado de las diferentes proteínas que unen Hb y después usar esta secuencia como sonda en el genoma de *E. histolytica*, se llevó a cabo un análisis *in silico*. Primero se realizó una búsqueda en bases de datos (NCBI) para obtener las proteínas que unen Hb en otros organismos. De la búsqueda de receptores reportados en la base de datos del NCBI se obtuvo al menos una secuencia de aminoácidos para bacterias Gram positivas, Gram negativas, protozoarios y hongos. Estas secuencias fueron alineadas mediante Clustal W y editadas con Boxshade observándose en la figura 15 que los receptores son muy divergentes y no poseen dominios conservados.

| | | | |
|----------------|-----|---|--|
| Leishmania | 1 | S----- | -----LATQ |
| Trypanosoma | 1 | S----- | -----LANQ |
| Candida | 1 | P----- | -----IQEQ |
| Neisseria | 1 | P----- | -----VKAE |
| Haemophilus | 1 | TN----- | -----QPTNQ |
| Staphylococcus | 1 | ESTTT---- | -----EKAPEAKSVANAVSVSNKEVEAPTSET-----KEVKP |
| | | | |
| Leishmania | 6 | FTMSSEKMKQLTMYMHEHEVEG----- | -----LEGRPSTVRMLPSFVY |
| Trypanosoma | 6 | FTVGKDHKQLMLYMHQHEG----- | -----LEGRESTLRMLPSYVY |
| Candida | 6 | FTISADKLRAIVKHFHESELDRG----- | -----LSKAGGNIPMIPGWVM |
| Neisseria | 6 | IKEVRVKDQLNAPATHEERVNLG----- | -----RIQQEMIRDNKLVDVRY |
| Haemophilus | 8 | PTNQPTNQNSNASEQHEQNVSGSTENTDTKAPPKIAETVKTAKKLEKQAQDVKDLVRY | |
| Staphylococcus | 38 | AAKSDNNTYPILNQHEAREAKN----- | -----PAIKDKDHSAPNSRPI |
| | | | |
| Leishmania | 44 | TSIPAKATG--V-YYLDLGGTNFRVLRVSRGGKIDDRDTS---- | -----KFVIPKSALVGDAT |
| Trypanosoma | 44 | KTIPSKATG--V-FYLDLGGTNFRVLRVTCKEGRVADRVA---- | -----KFVIPPQALQGTAE |
| Candida | 44 | DFPTGKETG--S-YLIDLGGTNLRVLRVKGGNRDFDTTQS---- | -----KFALPAHMRATSD |
| Neisseria | 44 | STIVGLSDSGRH-QKFAVRCVVEGNRIVGSLDGVSLPDPSEEN---- | -----SLYARYGNFNSSRL |
| Haemophilus | 68 | ETGITVVEHGRFGNSHFAVRCVVEENRVAQHDCLHQAETISSQGFKELFEGYGNFNNTNRN | |
| Staphylococcus | 76 | DFEMKKENHEQQ-FYHYASSVKPARVFTDSKPEIELGLQSG---- | -----QFWRKFVEVYEGDKK |
| | | | |
| Leishmania | 97 | DFDFIAQSVKKMMSENAPDLEKRVPLGFTFSFPVDQK----- | -----AVNKG--LLIKWTKG |
| Trypanosoma | 97 | DFFGFIAQSVKKMMEQKAPEDLNRTVPLGFTFSFPTEQK----- | -----GVDHG--FLIKWTKG |
| Candida | 97 | ELWDFIAKCKKEFVDEIYPDGCSEPLPLGFTFSYPASQN----- | -----RINEG--ILQRWTKG |
| Neisseria | 99 | SIDPEIVRNHEIAKGADSFNTGSGALGGGVNYQTLQGH----- | -----LLDDDRFGVMMKNG |
| Haemophilus | 128 | SAEIE TLKQNTIRKADSLKSGSALGGSVSLDTKDARD----- | -----YLLNKNYYASYKRG |
| Staphylococcus | 131 | LPIKLVSYD TVKDYAIRFSVSNGTAKVKIVSSTHFNKKEEKYDYTMEFAQPIYNSADK | |
| | | | |
| Leishmania | 149 | RSTKNVEGNVVELLQASLFRVRNINNVVALCNDTVGLTVARFVNTDQVQVGIIG--TG | |
| Trypanosoma | 149 | RSTRGVEGKQVELLQKALRMEVKKVVALCNDTVGLTITNFFDPDPTQVQVGIIG--TG | |
| Candida | 149 | RSIDGIEGKQVEMLQKALIKVGVPIIDVVALINDTTGTLVASMYTDPPEAKMGLIFG--TG | |
| Neisseria | 153 | YSRNRNFWNTLGGFVSNDEVDAALYSQRRGHHTESAGERGYPVEGAGSGANIRGSSRG | |
| Haemophilus | 181 | YNTADNQNLNTLGGRYKYFDAALTSRKGHELENFGYKNYNDKIQQKTREKADPYRR | |
| Staphylococcus | 191 | EKTEEDYKAEKLLAPYKKAETLERQVYENKIQDKLPEKLAEYKKLEETKKALDEQVK | |
| | | | |
| Leishmania | 207 | GNACYFERASAVTKDP---AVSARGNAVIPINM----- | ----- |
| Trypanosoma | 207 | GNACYFEDAYAVTKEP---SVAARGTTOIPINM----- | ----- |
| Candida | 207 | VNGAYEDVVKDIPKLEGGKCPDIPPESPMAINCE----- | ----- |
| Neisseria | 213 | IPDPSKHKYHNFLGKIAYQINDKHRIGPFNGQQ----- | ----- |
| Haemophilus | 241 | IQDSALLKIGFQPTENHRFSVVADLYKQISKGHDFSYTLKPNTQYMTYDEKELRHTNDKV | |
| Staphylococcus | 251 | SAITEIQNVQPTNEKMTDLQDTKYVVEHVENNESMMDTFV----- | ----- |
| | | | |
| Leishmania | 238 | ----- | -----CGNIDSK |
| Trypanosoma | 238 | ----- | -----CGNIDSK |
| Candida | 241 | ----- | -----YGSID-N |
| Neisseria | 247 | ----- | -----GHNNTI- |
| Haemophilus | 301 | ERKNIAFVYENFTETPFWDTLKITYSHQKITTSARTDDYCDGNDKCALAGNPLGMKINQD | |
| Staphylococcus | 292 | ----- | -----KHPIKTGMLNGK |
| | | | |
| Leishmania | 245 | YKYAIPVYVYDDEMDAITPNRENQRQEKLVSGMYLG----- | ----- |
| Trypanosoma | 245 | YKFPVPIVAYDEAMDVAVTPNRNFQTQEKMVSGMYLG----- | ----- |
| Candida | 247 | EKYIIPRKYDVQIDEESPRPQQTFEKMISGYL----- | ----- |
| Neisseria | | ----- | ----- |
| Haemophilus | 361 | NQLVGDGKSAKYQDINKTQVIKERLPFTKPNGRWRFRHKVDWDALKKKYPGVPIYASCLEE | |
| Staphylococcus | 304 | KYMVETNDDYWKDFMVEGQVRVITISKDAKNNTRTIIFP----- | ----- |
| | | | |
| Leishmania | 281 | ----- | ----- |
| Trypanosoma | 281 | ----- | ----- |
| Candida | 283 | ----- | ----- |
| Neisseria | | ----- | ----- |
| Haemophilus | 421 | DNDPSEFCTYEVKTTKKENTFEINGKRYDLLSEADKNVISDEQRLPTNVSYLFCSDLNLC | |
| Staphylococcus | 344 | ----- | ----- |

| | | |
|----------------|-----|---|
| Leishmania | 281 | ----- |
| Trypanosoma | 281 | ----- |
| Candida | 283 | ----- |
| Neisseria | | ----- |
| Haemophilus | 481 | DKKTILGFKKRRNLLKIFLFEVIEKRCQKYGKTKVKANDQLSGPYLFMPNKKGYQANLWS |
| Staphylococcus | 344 | ----- |
| | | |
| Leishmania | 281 | ----- |
| Trypanosoma | 281 | ----- |
| Candida | 283 | ----- |
| Neisseria | | ----- |
| Haemophilus | 541 | QRDLTSETKQINLDLTKHLELGKTQHDSYGGWSEMEKSMTNLAGDTPLNVKWWAQYPH |
| Staphylococcus | 344 | ----- |
| | | |
| Leishmania | 281 | -----EISRRLIVHLAQLGCL |
| Trypanosoma | 281 | -----EISRRIAHLAELHCL |
| Candida | 283 | -----EVLRLILLEFAEEKKL |
| Neisseria | | ----- |
| Haemophilus | 601 | NCATFLPSTMTPNAKPTLNPERTSTLCNNVNVFSFLIPVKTKTGALYFINDFRVNNYVA |
| Staphylococcus | 344 | -----YVEGKTLYDAIVKVVHVKTI |
| | | |
| Leishmania | 297 | PR--GLVDGCRPWAESKHMGMIAAQMPLQFTRELKRIAGVDVTMSDLHTIRETC |
| Trypanosoma | 297 | PS--ALASKAKPWSSETKFMGMISARMPGLQFTROVFQELFQVDVTVADLHVLRDVC |
| Candida | 299 | IFKGQNLDKKVPYVMDASYPKIEEPPFENLSDVADLFRKLGIEETEP-ERKIIIRCLA |
| Neisseria | | ----- |
| Haemophilus | 661 | FNLGYRYDRKYEPEKIPGKTPKIPDMVTNLYIKTPEFDASKADSDPELSKKEANAAA |
| Staphylococcus | 363 | DYDGQYHVRVDKEASTKANADKTNKKEQQDNSAKKETTPTPSKPTTPPVEKESQKQDS |
| | | |
| Leishmania | 355 | CLVRNRAAQGAVFTAAPMLKTTQGLATVAVDGSYEEKPSFQRVYQECIT----- |
| Trypanosoma | 355 | CLVRGAAQISAMFCSAPLVKTEKEGRATVAIDGSVFEKPSFRRLLQONMN----- |
| Candida | 358 | ELIGERSAR-FSVCGIAAICQKRGYKTAHCAADGSYINKYPGFKERTAQALR----- |
| Neisseria | | ----- |
| Haemophilus | 721 | NIKEIAQPKKFSASSYSFGTTLDPLNWLRLQAKYSKGFRAPTSDIYFTFKHPDFSIQPN |
| Staphylococcus | 423 | QKDDNKQSPSVEKENDASSESGDKTPATKPAKGEVSSSTPTKVVSTQN----- |
| | | |
| Leishmania | 407 | -SILGSTS NVK---VVLQKDGSGVG----- |
| Trypanosoma | 407 | -AII L G P G C D V T --- T A L A R D G S G I G ----- |
| Candida | 409 | -D I Y E W P A D V K D P I I I V P A E D G S G V G ----- |
| Neisseria | | ----- |
| Haemophilus | 781 | RDLQPETA KT K E L S L T V H N D M G Y I T T S V F D T R Y Q N F I D L S Y Q G R R D V H G S K L I P H F Y Q |
| Entamoeba | | |
| Staphylococcus | 475 | -A A K P T T A S S E T T K D V V Q T S A G S S E A ----- |
| | | |
| Leishmania | 428 | ----- |
| Trypanosoma | 428 | ----- |
| Candida | 434 | ----- |
| Neisseria | | ----- |
| Haemophilus | 841 | NVNRPNKVTGF E I A S Q I S L G N I T K L F N G F S L S Y K Y T Y Q K R I N G N I P M N A I Q P R T A V Y G |
| Staphylococcus | 500 | ----- |
| | | |
| Leishmania | 428 | -----AAMICALAVNKK----- |
| Trypanosoma | 428 | -----AAFISALVVNDK----- |
| Candida | 434 | -----AAVIAALTEKRLKEGKSVGLLGA--- |
| Neisseria | | ----- |
| Haemophilus | 901 | VSYVHPDDKYGLDLYISHASAKNAEDTYNMFYKEEGKTDSTIKWRSKSYTTIDLLGYIKP |
| Staphylococcus | 500 | -----KDSAPLQKANIKNNTDGHGTQSENKKN |

```

Leishmania -----
Trypanosoma -----
Candida -----
Neisseria -----
Haemophilus 961 IKNLTLRAGVYNLTNRKYITWDSARSIRPFGTSNMINQDTGLGINRFYAPERNYRMSVQF
Staphylococcus 526 TQENKAKSLPQTGEESNKDMTLPMLSLALSSIIAF-VLPRKRKN-----

Leishmania --
Trypanosoma --
Candida --
Neisseria --
Haemophilus 1021 EF
Staphylococcus --

```

Figura 15. Alineamiento de receptores para hemoglobina de diferentes organismos. Las regiones grises indican aminoácidos que no se conservan, pero que tienen características fisicoquímicas similares y en negro se muestran los aminoácidos conservados.

En este análisis no se logró identificar una secuencia que caracterizara a las proteínas de unión a Hb. Se continuó la siguiente estrategia: usando cada una de las secuencias de DNA y las secuencias de los dominios funcionales de los receptores ya reportados, se realizó una búsqueda en la base de datos Pathema (*E. histolytica*). La sonda con la que se obtuvo un resultado positivo fue con la secuencia de aminoácidos de los dominios funcionales FRAP y NPNL del receptor HmbR de *Neisseria meningitidis*. De manera interesante en esta búsqueda se obtuvieron tres genes que codifican para proteínas que poseen los dominios FRAP y NPNL, los cuales son indispensables para la unión y utilización de Hb en bacterias Gram negativas. Dichos genes encontrados en amiba son de 678, 1151 y 2838 pares de bases y codifican para proteínas de 228, 383 y 946 aminoácidos respectivamente. En la tabla 3 se muestra el código de acceso de los genes. En la base de datos actual de *E. histolytica* (Pathema), así como lo que se encuentra en la anterior base de datos de amiba (TIGR), es importante mencionar que uno de los genes que se identificó en la base de datos TIGR cambió su longitud. A pesar de ello, lo que ahora se reporta en la base de datos Pathema sigue conservando los dominios FRAP y NPNL. En este trabajo se decidió darles una nomenclatura basada en las propiedades funcionales hipotéticas y el tamaño de las proteínas, a las cuales denominamos EhhmbpA, EhhmbpB y EhhmbpC (*Entamoeba histolytica* hemoglobine binding protein A, B y C). Los valores de expected obtenidos indican que las proteínas no son homólogas, sin embargo se ha reportado que en este tipo de receptores sólo un 17% de ellos es homólogo y que lo único que conservan entre sí son los dominios FRAP y NPNL.

Tabla 3. Datos de las secuencias encontradas en las bases de datos de *E. histolytica* y que poseen características de receptor de Hb.

| Nombre en TIGR | Nombre en Phatema | Nombre hipotético | Longitud del Gen | Longitud de la proteína | Valor de expected |
|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------------|-------------------|
| <u>265.m00064</u> | EHI_096540 | EhhmbpA | 678 | 228 | 0.045 |
| <u>6.m00451</u> | EHI_022250 | EhhmbpB | 1151 | 338 | 0.001 |
| <u>357.m00038</u> | EHI_032950 | EhhmbpC | 2838 1758 | 946 586 | 7e-09 |

En azul se muestra la longitud que se reporta en la base de datos TIGR.

El análisis *in silico* demostró que las proteínas encontradas poseen los dominios responsables de la unión de Hb, lo cual sugiere que las proteínas encontradas (EhhmbpA, EhhmbpB y EhhmbpC) pueden tener la capacidad de unir Hb. Sin embargo, el valor de *e* indica que no son proteínas homólogas a los receptores, por lo cual fue necesario demostrar experimentalmente la función de unión a Hb. Para determinar si las proteínas encontradas en el genoma de *E. histolytica* poseen alguna otra región conservada, se realizaron alineamientos múltiples con los receptores ya reportados en bacterias Gram negativas, y de manera interesante se observó que en estos receptores las únicas regiones conservadas son los dominios denominados FRAP y NPFL (Figura 16). Además de los dominios FRAP y NPFL se identificaron otras regiones conservadas que no están descritas en la literatura, por ejemplo las secuencias GSGALGG y EMY.

[Identificación de proteínas de *Entamoeba histolytica* que unen hemoglobina humana]

| | | |
|-------------------------|-----|--|
| Neisseria meningitidis | 1 | ETTPVKAIEIKAVRVKG-----QRNAFAAVERVNLNRIKQEMI |
| Vibrio cholerae | 1 | ----- |
| Haemophilus influenzae | 1 | TNQPTNQPTNQPTNQNG--NVSEQLQINVSGSTENS DTKTPPKIAETVKTAKTLEREQA |
| A. pleuropneumoniae | 1 | DTVIVKDGIIQQ-----QKTSSEIKKSAKQLAKQOV |
| Porphyromonas gingivali | 1 | GNIALEDIVVTGSR TAR-----LLKDVFPPTKVFKAADIKAIAP |
| Yersinia pestis | 1 | MVVVATGNERSS-----FEAPMVTVEGNAPTSQTA |
| Shigella dysenteriae | 1 | MTVVATGNARSS-----FEAPMVSVIDTSAPENQTA |
| E. histolytica EhhmbpA | 1 | ----- |
| E. histolytica EhhmbpB | 1 | ----- |
| E. histolytica EhhmbpC | 1 | ITVVATGNARSA-----FEAPMVSVIDTSAPENQTA |
| Neisseria meningitidis | 38 | RDNKDLVRYSTDVGFSDSGR-HQK-----GFALRGVEGNRVGFSIDGVNLPDSEEN |
| Vibrio cholerae | 1 | -----MEGKRVKILVDGASCPGVFDG |
| Haemophilus influenzae | 59 | NNIKDLVYETGVTVEAGRFQGS-----GFALRGVDENRVAIINL DGLRQHE TLSS |
| A. pleuropneumoniae | 30 | QDSRDLMRYETGVTVEAGRFQGS-----GYALRGVDENRVAITVDGLRQHE TLSS |
| Porphyromonas gingivali | 40 | SSFIDVLIQYLLPGLEFTKHGSRDQ-----INAQGFDESSLLFLVDGELISTG--- |
| Yersinia pestis | 33 | ATAADLIRQVPGITVTGSGR TNQO-----DVMVRGYGKQGVLLTLVDGVRQO--- |
| Shigella dysenteriae | 33 | TSATDLIRHVPGITLDGGR TNQO-----DINVRGYDHRGVLLFLVDGIRQO--- |
| E. histolytica EhhmbpA | 1 | ----- |
| E. histolytica EhhmbpB | 1 | MEGPDITVYKIGDYIIG-----KLGHGSTAVYFLGTHIMTG--- |
| E. histolytica EhhmbpC | 33 | SSAADLIRKVPGITLDGGR TNQO-----DVMVRGYDHRGVLLFLVDGVRQO--- |
| Neisseria meningitidis | 88 | S----LYARYGNFNSSRLSDPELVNIEIVVGADSFNTGSGALGGVNNVQTHQERD LLL |
| Vibrio cholerae | 22 | G-----PYSFINSSAVSDPDM LKSEIVVGAASSLHGSDAIGGVVAPETRKDPADFLK |
| Haemophilus influenzae | 110 | QGFKELFEGYGNFNTRNGAIEETLKEVNTTEGANS LKSGSGLGGSVILKTKDARPYLL |
| A. pleuropneumoniae | 81 | QGFKELFEGYGNFNTRNSVEIETLKOATIRGADS VRVSGSALGGAVMPETRKDAEFLT |
| Porphyromonas gingivali | 87 | -----STSGIDFERINPDDERIEFLR GASSALYGSNAIGGVINLIITRAKDFER |
| Yersinia pestis | 79 | -----TDTGHLNSTFLDPAIVKRIEIVRGPAALLYGSGALGGVIAVETVDAADMLQ |
| Shigella dysenteriae | 79 | -----TDTGHLNGTFIDPALIKRWEIVRGPSAALLYGSGALGGVIVDTDAKDL LQ |
| E. histolytica EhhmbpA | 1 | ----- |
| E. histolytica EhhmbpB | 38 | -----MKYAIKIEKSSYKQENIKSQIYREIFMFKLIIRNSYIVQLHQYENSTHL |
| E. histolytica EhhmbpC | 79 | -----TDTGHLNSTFLDPAIVKRIEIVRGPSAALLYGSGALGGVIVDTDAKDL LQ |
| Neisseria meningitidis | 144 | DDROKGVMMKNGYSSTRNKEWTNTLGFVSNDRVDALLYS-CRRGHETESAGNRYAVEG |
| Vibrio cholerae | 75 | NGKVGGGQAKLSYSSEDSFSEHVAVAKRFDFNVEALVAYT-RRDCKELQWFSKAPYDDYS |
| Haemophilus influenzae | 170 | N-KDLYVSYKKGVAENNSQSFNTLLAGRYKKEDELYVTH-SRNGCHELEMYDYKNANSLT |
| A. pleuropneumoniae | 141 | E-NDLHFGYKYGSSADNQKANSITFGRYKNEIDIAKKE-WRDCHLELEMYDYKTADGSV |
| Porphyromonas gingivali | 137 | -----VSASARDSDRGGQKYDVAAGVKRGI FTSSQSGYQYRADKSYILADQFEQLNVAG |
| Yersinia pestis | 130 | PGQNSGYRVYSSAAEDHDSFGLGSAFGRITDDIDGILSTG-TRDIGNIRSDGFNAPNDE |
| Shigella dysenteriae | 130 | EGQSSGFRVFGTGGTGDHSLGLGSAFGRITENIDGILVANS-SRDRGLRIRSNGETAPNDE |
| E. histolytica EhhmbpA | 1 | ----- |
| E. histolytica EhhmbpB | 88 | FIVLDYMEGGELVDLIHTQGTLDLTSILFQCQVLRCSYLHSKTICHRDIK----- |
| E. histolytica EhhmbpC | 130 | AGKNSGYRVFATGAGDHSIGMGSAFGRITDIDGILVANS-SRDRGLRIRSDGARAPNDE |
| Neisseria meningitidis | 203 | EGSGANIRGSARGIPDSSKHKYHSELGKLAQNDNHRIGASLNGQQGHNYTVEESYN-- |
| Vibrio cholerae | 134 | VESQ-----DYVKADLILKLSQSSDHRLEFLGEVIYN----- |
| Haemophilus influenzae | 228 | QGKKREKA-----DPYKIEQDSTLLKLSNPENHRFLLAADLVEHRSRGQDLSYTLK |
| A. pleuropneumoniae | 199 | QGKEREKA-----DPYSIKKDS TLKFGYSPSNHRFSSVADLVEKKNRGHDFSNLK |
| Porphyromonas gingivali | 191 | -----NATWNNQKFTISPTENLSFNLTG----- |
| Yersinia pestis | 189 | -----TISNVLAKGTHQDSIQSLSANLRYMNN----- |
| Shigella dysenteriae | 189 | -----SINNVLAKGTHQDSAQSLGLVRYMNN----- |
| E. histolytica EhhmbpA | 1 | ----- |
| E. histolytica EhhmbpB | 140 | -----PENILLDSG----- |
| E. histolytica EhhmbpC | 189 | -----SINNVLAKGSEKIDPAQTLGSLRYMNN----- |
| Neisseria meningitidis | 261 | -----LTASSWREADVNRRENANLFYEWMPDSNWLSSLKADFQYQTKVAAVNN--- |
| Vibrio cholerae | 168 | -----QNDSDIASSSKNENSEDTTKQNRGLKHIWLVDTTITDSIT |
| Haemophilus influenzae | 281 | YQKTDPNLLEVDSRHTNDKTKRNNISFSYENFSQTPFWDTLKITYSDQRIKTRARTDDYC |
| A. pleuropneumoniae | 252 | PTTYIN-VDEYELRHTNDKSKRONYAFVYENFSANPLWDTLKITYSTQKIKNRARTDDYC |
| Porphyromonas gingivali | 215 | -----LVNLRKHWTDKIDELVNSYDVKAGANWRISETSDDLVS---- |
| Yersinia pestis | 217 | -----SAIEPKNPQTSAPS-SINVMTNRSTIQRDAQLRYNIKPLDQEW |
| Shigella dysenteriae | 217 | -----DAREPKNPQTVASESSENPMVDRSTIQRDAQLSYKLAPOGNDW |
| E. histolytica EhhmbpA | 1 | ----- |
| E. histolytica EhhmbpB | 149 | -----HTNPKLIDFGVSLFSLNEKLERIGTPGYIAPEVFN----- |
| E. histolytica EhhmbpC | 217 | -----DAQEPKNPQITDAS-SINPMTDRSTIQRDAQLGYRTAPAGNDW |
| Neisseria meningitidis | 311 | ----- |
| Vibrio cholerae | 210 | SRLTWTDKKEENG----- |
| Haemophilus influenzae | 341 | DAG-VRYCEGTANPAGLKLTDGKI TRRDGSELQFEKKDKNIDNNIYDFDKFITDDDR VIE |

[Identificación de proteínas de *Entamoeba histolytica* que unen hemoglobina humana]

| | | |
|-------------------------|-----|---|
| A. pleuropneumoniae | 311 | DG---SHCKETENLAGLQLKDGKVVDRDG-----NQPNLGVDELGLTTITDSKGT |
| Porphyromonas gingivali | 254 | ----- |
| Yersinia pestis | 259 | LN----- |
| Shigella dysenteriae | 260 | LN----- |
| E. histolytica EhhmbpA | 1 | ----- |
| E. histolytica EhhmbpB | 186 | ----- |
| E. histolytica EhhmbpC | 259 | LN----- |
| | | |
| Neisseria meningitidis | 311 | ----- |
| Vibrio cholerae | 222 | ----- |
| Haemophilus influenzae | 400 | GKGLRRSSGTWYDCSIFDCKDKTKMKIFETEHPYGYGTTGTWKKDFELEIKKLNDRK-- |
| A. pleuropneumoniae | 358 | YTEGVNLVRAYWFDCSVFDCNKSVTAYYKDSN----NITSEEVALTKTYTDEKGRK-- |
| Porphyromonas gingivali | 254 | ----- |
| Yersinia pestis | 261 | ----- |
| Shigella dysenteriae | 262 | ----- |
| E. histolytica EhhmbpA | 1 | ----- |
| E. histolytica EhhmbpB | 186 | ----- |
| E. histolytica EhhmbpC | 261 | ----- |
| | | |
| Neisseria meningitidis | 311 | -----KGSFPMDYSTWTRNYNQKDI DEIYNRS MDTRFR R ETLRLDS SHPLQL |
| Vibrio cholerae | 222 | -----LTNRFKEASAGVPPRVPNGDNQ Q KDYQYAENKIE ETQ EDKELE EHYLVY |
| Haemophilus influenzae | 458 | ---FARVKDANNKTYSLPSSP EYLERLW QRD DTNTQQLNLD TR SD KTWRV ENLQY |
| A. pleuropneumoniae | 411 | ---FATLDPKSKFKSILLPGSK EY TENIYT RD LD DTDKQLNLD TR SE SLLGQ EHSLY |
| Porphyromonas gingivali | 254 | -----YHYDKYSRDTCLIKTENQK LP IF DEDMHHL RAQYNL NLA EV LLNV |
| Yersinia pestis | 261 | ---ATAQVYYSEVEIN RF QGS AEE GK Q T E G V K E N R E L E S P A S E L L T Y |
| Shigella dysenteriae | 262 | -----ADAKIYWSEVRIN Q N T G S S G E Y E Q I T K G A R E N R S T L E A D S F A S E L L T Y |
| E. histolytica EhhmbpA | 1 | -----MSQV L P S E F Q R L L T A A A I T T V P D I D L L |
| E. histolytica EhhmbpB | 186 | -----VDYDPFLADVYSCGELLHVM Y G N H H Y F F D G H Q T N E P D N H G S G L L S |
| E. histolytica EhhmbpC | 261 | -----ADAKIYWSEARIN Q N I D A S G E E R K Q T K G K E N R E L S D S F A S E L L T Y |
| | | |
| Neisseria meningitidis | 357 | GGGRH L S F K T F V S R R D F E N L N R D D Y F S G ----- |
| Vibrio cholerae | 274 | GLS Y K T S R I S N T N R E F N S D P N ----- |
| Haemophilus influenzae | 515 | GSS N T T M K R M V N R A G N - D A S D V Q W A E P T L G S --- L L Y D K P H T C K T A Y G G - W K A N L |
| A. pleuropneumoniae | 468 | GGS Y S R T E K K M V N R G G F A T S N T Q W T K R F L G M R N N F F K G E E V I T C K N A T G S D Q W N G L I |
| Porphyromonas gingivali | 301 | GLE Y L I D N ----- |
| Yersinia pestis | 312 | GTET Y R Q E Q ----- |
| Shigella dysenteriae | 313 | GGE Y R Q E Q ----- |
| E. histolytica EhhmbpA | 32 | NG----- |
| E. histolytica EhhmbpB | 233 | KMLQKDPK----- |
| E. histolytica EhhmbpC | 312 | GGE Y R Q E Q ----- |
| | | |
| Neisseria meningitidis | 387 | -RVVRTTS I Q H P V K T T N Y G F S L S D O L O W N - D V F S S R A G I R Y D H T K M P Q E L N A E C H A C D |
| Vibrio cholerae | 295 | --T P D K I Y V T E D A K E M S F G L F E D E I S V L N D K V L T P G V R Y D Y E S T D -----P |
| Haemophilus influenzae | 568 | CPRVDPK F S L L P I K T K E S V L E D N V I T - D Y L S F D L G V R D N I H Y Q P K Y K H G V T P K L P |
| A. pleuropneumoniae | 528 | CPNED-T F F L I P V E A K N G S L F A D N E K A N - D Y L S F D I G V R Y D D I S Y K P K Y V A G O T A K I P |
| Porphyromonas gingivali | 309 | VAS E R L S S P N D E G E S V N N K I L Y G Q Y T Y K V T P K V I S Y G R L D K H S G ----- |
| Yersinia pestis | 321 | --T P G G A T E S F Q A K I R F S S G L O D E I L R D L P V S L L A C T R Y D N S G S -----S |
| Shigella dysenteriae | 322 | --H P G G A T G F Q A K I D F S S G L O D E I L R D L P V S L L A C T R Y D N S G S -----S |
| E. histolytica EhhmbpA | 34 | ----- |
| E. histolytica EhhmbpB | 242 | ----- |
| E. histolytica EhhmbpC | 321 | --H P G G A T G F Q A K I D F S S G L O D E I L R D L P V S L L A C T R Y D N S G S -----S |
| | | |
| Neisseria meningitidis | 445 | KTPPAANTYK G W S -----GFV C L A A Q L N Q A W R V |
| Vibrio cholerae | 342 | SDTVDESFI K S -----DSAFT G L G A T Y K V A E G T L |
| Haemophilus influenzae | 627 | DDIVKGLFIP L P S G K N N N D D P E V K N V Q N I D I A K Q N K K Y K A H S Y S F V S T I D P T S E L R L |
| A. pleuropneumoniae | 586 | DDMLQGLFV P L P --- D R P T K E Q I R Q N A E E N I K Y L S R - N V K Y Q H S Y S L A T A D E F S E L R V |
| Porphyromonas gingivali | 356 | ---FGLY Y T S R -----LSAM Y K C S H T N |
| Yersinia pestis | 368 | DGYADVDAD K S -----SR G E I S L T P T D N L M L |
| Shigella dysenteriae | 369 | DGYKDVDAD K S -----SR A G M T I N P T N L M L |
| E. histolytica EhhmbpA | 34 | ----- |
| E. histolytica EhhmbpB | 242 | ----- |
| E. histolytica EhhmbpC | 368 | DGYDDVDAD K S -----SR A G L V S P A D N L M L |

| | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|-----|--------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|------|-------|
| <i>Neisseria meningitidis</i> | 473 | GYDITS | GRVFNAS | RYFTY | NHG | ----- | SGNW | PNP | NLKE | ERST | HTT | SLQ | GRSE |
| <i>Vibrio cholerae</i> | 437 | ETQISC | GFRAP | SE | LYTY | DNP | GH | ----- | G | TNF | PNP | LESE | NSLSE |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | 687 | QLKYSK | GFRAP | TS | DE | YET | KHP | ----- | D | TI | PNT | NLKE | EIAK |
| <i>A. pleuropneumoniae</i> | 642 | QVKYAN | GFRAP | TS | DE | YET | KHP | ----- | D | TV | PNV | DLK | SE |
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 376 | RLSYAE | GFRAP | SE | RYFTY | NHG | ----- | A | FI | YGN | FDL | KIE | SR |
| <i>Yersinia pestis</i> | 395 | EGSYAC | GFRAP | TS | DE | YND | SKH | FA | IR | PGL | T | NYW | PNP |
| <i>Shigella dysenteriae</i> | 396 | EGSYAC | GFRAP | TS | DE | YND | SKH | FS | IG | --- | F | Y | NYW |
| <i>E. histolytica EhmbpA</i> | 34 | --HYNI | IF | ESK | TE | LYL | RW | AP | ----- | L | F | N | F |
| <i>E. histolytica EhmbpB</i> | 27 | TMKTIK | AFO | AK | NS | SE | TS | SQ | ----- | T | V | V | K |
| <i>E. histolytica EhmbpC</i> | 396 | E-KKYI | EF | NS | EH | EL | YAC | EN | PE | ----- | V | L | G |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | 523 | KG-MLD | ANL | Q | SN | Y | RF | SEE | QK | IT | T | S | G |
| <i>Vibrio cholerae</i> | 489 | AS-TSE | IAL | Y | S | D | Y | T | D | F | I | O | T |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | 737 | DWGFIS | TS | L | K | N | Y | K | F | I | L | I | F |
| <i>A. pleuropneumoniae</i> | 692 | LG-FIT | TS | Y | K | D | Y | D | F | I | L | K | Y |
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 426 | -K-TL | M | G | N | Y | E | N | H | V | R | I | F |
| <i>Yersinia pestis</i> | 455 | DLMAE | DD | L | Q | K | V | S | Y | F | D | T | K |
| <i>Shigella dysenteriae</i> | 452 | DLALS | N | D | A | L | E | K | A | S | Y | F | D |
| <i>E. histolytica EhmbpA</i> | 82 | QPQ | S | N | S | G | L | T | K | M | T | D | A |
| <i>E. histolytica EhmbpB</i> | 292 | INEL | S | I | R | D | Y | L | A | S | P | N | P |
| <i>E. histolytica EhmbpC</i> | 451 | DL | L | A | N | D | A | L | E | K | A | S | Y |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | 582 | RIR | G | E | E | T | G | R | N | V | D | K | A |
| <i>Vibrio cholerae</i> | 527 | IR | G | E | S | N | T | D | L | N | R | A | N |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | 787 | VIR | G | E | N | S | K | F | L | G | K | A | K |
| <i>A. pleuropneumoniae</i> | 743 | RIR | G | E | N | S | K | N | F | G | L | Q | W |
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 456 | V | S | E | M | R | I | F | G | E | G | Q | A |
| <i>Yersinia pestis</i> | 491 | S | N | I | D | Q | A | K | I | G | W | D | A |
| <i>Shigella dysenteriae</i> | 488 | S | N | V | P | N | A | K | I | G | W | D | A |
| <i>E. histolytica EhmbpA</i> | 109 | N | N | L | R | M | D | P | I | Y | Q | K | Y |
| <i>E. histolytica EhmbpB</i> | 329 | F | I | K | S | E | N | I | L | A | I | P | T |
| <i>E. histolytica EhmbpC</i> | 487 | S | N | V | P | N | A | K | I | G | W | D | A |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | 628 | D | P | L | K | V | A | S | D | Y | E | S | P |
| <i>Vibrio cholerae</i> | 572 | N | P | W | N | A | G | A | N | D | A | P | N |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | 832 | D | P | K | T | M | Y | C | L | G | D | H | P |
| <i>A. pleuropneumoniae</i> | 788 | R | P | R | T | S | F | F | L | G | A | H | P |
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 506 | R | P | H | A | A | T | A | T | S | Y | G | H |
| <i>Yersinia pestis</i> | 537 | N | P | D | T | V | T | S | I | M | D | V | P |
| <i>Shigella dysenteriae</i> | 534 | N | P | D | T | V | T | S | I | N | I | P | A |
| <i>E. histolytica EhmbpA</i> | 154 | V | D | F | F | Y | F | A | G | V | E | L | K |
| <i>E. histolytica EhmbpB</i> | 371 | E | M | K | L | K | N | Q | C | E | L | R | I |
| <i>E. histolytica EhmbpC</i> | 533 | N | P | D | T | V | T | S | I | M | D | V | P |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | 688 | K | S | A | Y | V | E | D | M | Y | G | F | K |
| <i>Vibrio cholerae</i> | 622 | E | S | T | V | E | D | L | T | Y | E | K | P |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | 886 | K | S | Y | T | H | D | L | I | E | Y | V | Q |
| <i>A. pleuropneumoniae</i> | 842 | D | R | Y | T | L | D | M | I | E | V | K | W |
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 555 | P | E | Y | T | H | C | R | E | D | I | E | N |
| <i>Yersinia pestis</i> | 576 | A | G | Y | G | V | N | D | F | Y | V | S | Y |
| <i>Shigella dysenteriae</i> | 574 | P | E | Y | G | V | N | D | F | Y | V | S | Y |
| <i>E. histolytica EhmbpA</i> | 188 | T | L | E | Q | E | N | S | L | K | V | S | Q |
| <i>E. histolytica EhmbpB</i> | 401 | --E | V | Y | S | T | K | D | G | C | H | Q | V |
| <i>E. histolytica EhmbpC</i> | 573 | P | E | Y | A | V | N | D | F | Y | V | S | Y |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | 747 | Y | R | A | P | G | R | N | Y | A | S | L | E |
| <i>Vibrio cholerae</i> | 669 | L | T | Q | A | E | R | N | Y | N | S | V | K |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | 946 | F | Y | A | P | G | R | N | Y | K | S | V | O |
| <i>A. pleuropneumoniae</i> | 902 | F | T | A | P | G | R | N | F | K | L | T | A |
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 595 | -T | S | P | G | R | L | I | Y | G | L | V | R |
| <i>Yersinia pestis</i> | 618 | --Q | D | G | R | N | V | E | F | V | S | Y | O |
| <i>Shigella dysenteriae</i> | 616 | --Q | D | G | R | N | V | E | F | V | S | Y | O |
| <i>E. histolytica EhmbpA</i> | | ----- | | | | | | | | | | | |
| <i>E. histolytica EhmbpB</i> | | ----- | | | | | | | | | | | |
| <i>E. histolytica EhmbpC</i> | 615 | --Q | D | G | R | N | V | E | F | V | S | Y | O |

Figura 16. Alineamiento de receptores reportados en bacterias Gram negativas y las secuencias obtenidas de la base de datos Pathema. En el cuadro negro se destacan los dominios FRAP y NPNL, los cuales son requeridos para la unión de Hb.

3. Análisis de la expresión mediante RT-PCR de los genes encontrados *in silico* en trofozoitos de *E. histolytica*

En el análisis *in silico* se encontraron tres secuencias de proteínas que pudieran estar participando en la adquisición de hierro. Se analizó de manera experimental si los genes que codifican para las proteínas encontradas en el análisis *in silico* se encuentran en el genoma de *E. histolytica*. Mediante la técnica de PCR, usando como templado el DNA genómico de amiba, se obtuvo como resultado que los tres genes se encuentran presentes en el genoma de este parásito. Para analizar la expresión de los genes se midieron los niveles de ARNm mediante ensayos de RT-PCR usando oligonucleótidos específicos. El ARN utilizado en estos experimentos fue el obtenido de los cultivos crecidos en las condiciones mencionadas en la metodología (pag. 33).

Por PCR se obtuvo un amplicón de aproximadamente 700 pb del gen *ehhmbpA*, lo cual corresponde al tamaño esperado del mismo (Figura 17 panel A carril 1) e indica que el gen se encuentra en el genoma de *E. histolytica*. Por RT-PCR se observó que el gen *ehhmbpA* se expresa bajo condiciones de ayuno de hierro (Figura 17 panel A carril 2) y cuando el medio se suplementa con Hb (Figura 17 panel A carril 3), a diferencia de la respuesta al medio suplementado con citrato férrico y en condiciones basales en donde no se observó transcrito (Figura 17 panel A carriles 4 y 5 respectivamente).

El gen *ehhmbpB* fue amplificado mediante PCR y se obtuvo un amplicón de aproximadamente 1200 pb, lo cual corresponde al tamaño esperado. (Figura 18 panel A carril 1). El gen *ehhmbpB* se expresa en todas las condiciones (Figura 18 panel A carriles 2 al 5) y se puede apreciar mayor intensidad en el amplificado obtenido en ausencia de hierro (Figura 18

panel A carril 2). Es necesario realizar una RT-PCR semicuantitativa o una cuantificación de la expresión (PCR en tiempo real).

Del gen *ehhmbpC* se obtuvo mediante PCR un amplicón de aproximadamente 3000 pb (Figura 19 panel A carril 1). La expresión del gen *ehhmbpC* se observó solamente cuando las amibas se encontraron en ausencia de hierro (Figura 19 panel A carril 2).

Para demostrar que los amplicones se obtuvieron de ARN y no por contaminación con ADN se realizó un control negativo en el que no se adicionó la enzima retrotranscriptasa. No se observó amplificado en ninguno de los genes descartando la posibilidad de contaminación por ADN (Figura 17, 18 y 19 panel B). Como control de carga se amplificó un fragmento del gen ARN ribosomal 18s (Figura 17, 18 y 19 panel C).

Estos resultados sugieren que son genes que se encuentran regulados por la presencia de hierro y que probablemente pudieran participar en la adquisición de hierro utilizando como fuente a la Hb.

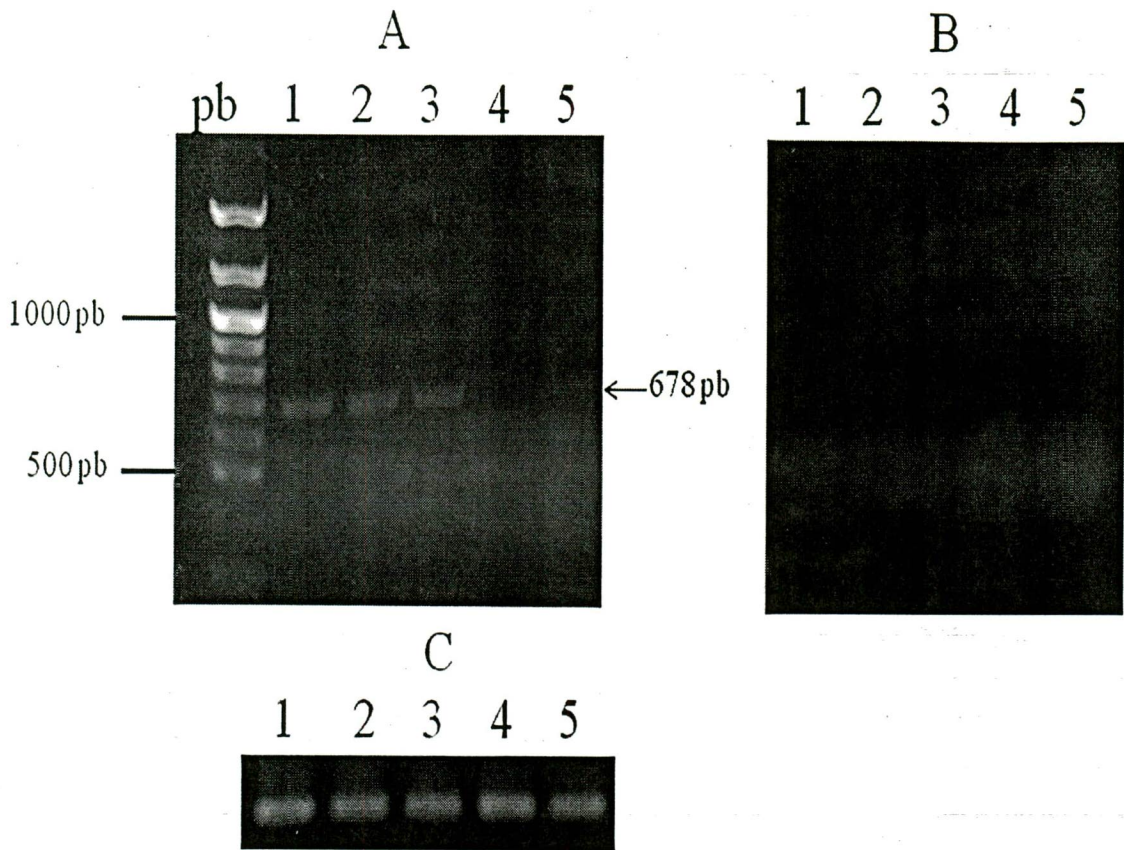


Figura 17. RT-PCR del gen *ehmbpA* de trofozoitos de *E. histolytica* crecidos en medios suplementados con diferentes fuentes de hierro y sin suplementar. Panel A; RT-PCR. Panel B; RT-. Panel C; control de carga, fragmento ARN Ribosomal 18s. pb; marcador 100 pares de bases. Carril 1; amplicón obtenido a partir de DNA genómico mediante PCR, Carril 2; amplicón del gen *ehmbpA* en condiciones de ausencia de hierro, Carril 3; ausencia de hierro y presencia de Hb, Carril 4; ausencia de hierro y suplementado con citrato férrico, Carril 5; condiciones basales.

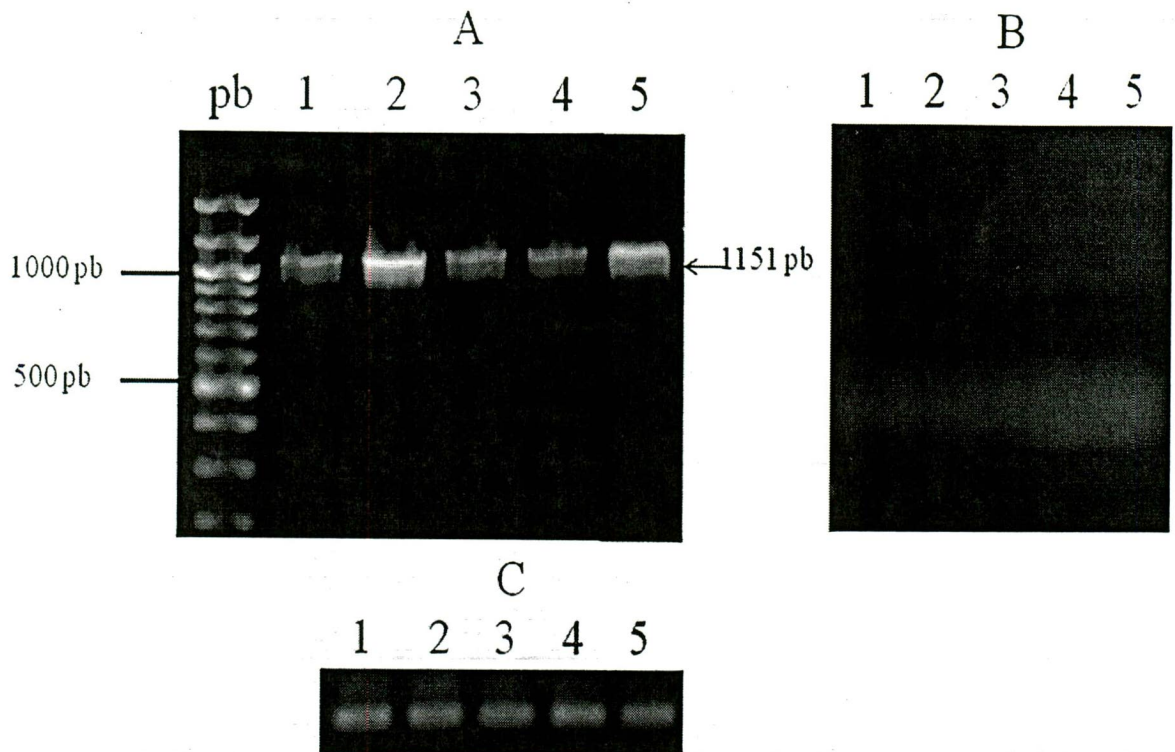


Figura 18. RT-PCR del gen *ehmbpB* de trofozoítos de *E. histolytica* crecidos en medios suplementados con diferentes fuentes de hierro y sin suplementar. Panel A; RT-PCR. Panel B; RT-. Panel C; control de carga, fragmento de RNA ribosomal 18s. pb; marcador 100 pares de bases. Carril 1; amplicón obtenido a partir de ADN genómico mediante PCR, Carril 2; amplicón del gen *ehmbpB* en condiciones de ausencia de hierro, Carril 3; ausencia de hierro y presencia de Hb, Carril 4; ausencia de hierro y suplementado con citrato férrico, Carril 5; condiciones basales.

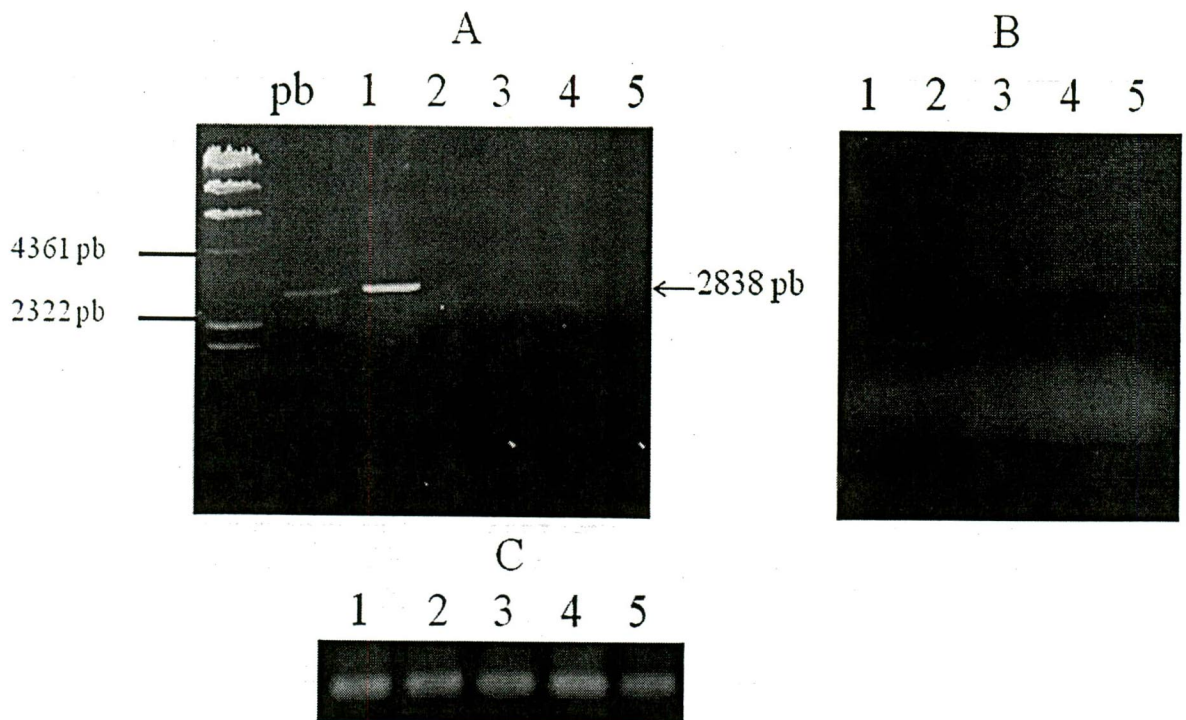


Figura 19. RT-PCR del gen *ehmbpC* de trofozoítos de *E. histolytica* crecidos en medio suplementado con diferentes fuentes de hierro y sin suplementar. Panel A; RT-PCR. Panel B; RT-. Panel C; control de carga, fragmento de ARN ribosomal 18s. pb; marcador λ *HindIII*. Carril 1; amplicón obtenido a partir de ADN genómico mediante PCR, Carril 2; amplicón del gen *ehmbpB* en condiciones de ausencia de hierro, Carril 3; ausencia de hierro y presencia de Hb, Carril 4; ausencia de hierro y suplementado con citrato férrico, Carril 5; condiciones basales.

4. Clonación en pGEX-6-P1

Por las observaciones realizadas en la expresión de los genes, se decidió clonar en el vector de expresión pGEX-6-P1 el gen *ehhmbpA*, debido a que es el que se expresa en ausencia de hierro y en presencia de Hb, y del gen *ehhmbpB* porque se expresa en ausencia de hierro, presencia de Hb, presencia de citrato férrico y en condiciones basales.

Para cada gen se realizó una clonación dirigida utilizando el vector pGEX-6-P1 y el amplificado obtenido mediante PCR. Los genes *ehhmbpA* y *ehhmbpB* se amplificaron a partir de DNA genómico mediante PCR utilizando oligonucleótidos que contenían en sus extremos 5' y 3' los sitios de corte para las enzimas *BamHI* y *XhoI* respectivamente. A estas construcciones se les denominó pEhhmbpA y pEhhmbpB.

Los posibles candidatos *ehhmbpA* y *ehhmbpB* fueron analizados mediante restricción con las enzimas *BamHI* y *XhoI*. Además fueron corroborados por ensayos de PCR. En las figuras 20 y 21 del carril 1 se muestra el vector de expresión pGEX-6-P1 linealizado en un tamaño de aproximadamente 4900 pb. En el carril 2 se muestra pEhhmbpA (Figura 20) y pEhhmbpB (Figura 21). Se observó un plásmido de mayor tamaño lo cual indicó que probablemente los plásmidos candidatos tenían insertados los genes *ehhmbpA* y *ehhmbpB*. La doble restricción de la construcción pEhhmbpA mostró una banda de 4900 pb, lo cual corresponde al vector y la liberación de un fragmento de aproximadamente 700 pb que corresponde al gen *ehhmbpA* (Figura 20 carril 3). En el caso de la construcción pEhhmbpB se observó el vector de 4900 pb y la liberación de un fragmento de aproximadamente 1200 pb que corresponde al gen *ehhmbpB* (Figura 21 carril 3). Por último, en el

carril 4 se muestran los amplicones obtenidos por PCR utilizando como templado el DNA de la construcción pEhhmbpA (Figura 20) y pEhhmbpB (Figura 21). Estos resultados mostraron que los genes *ehhmbpA* y *ehhmbpB* se encuentran clonados dentro del vector de expresión pGEX-6-P1.

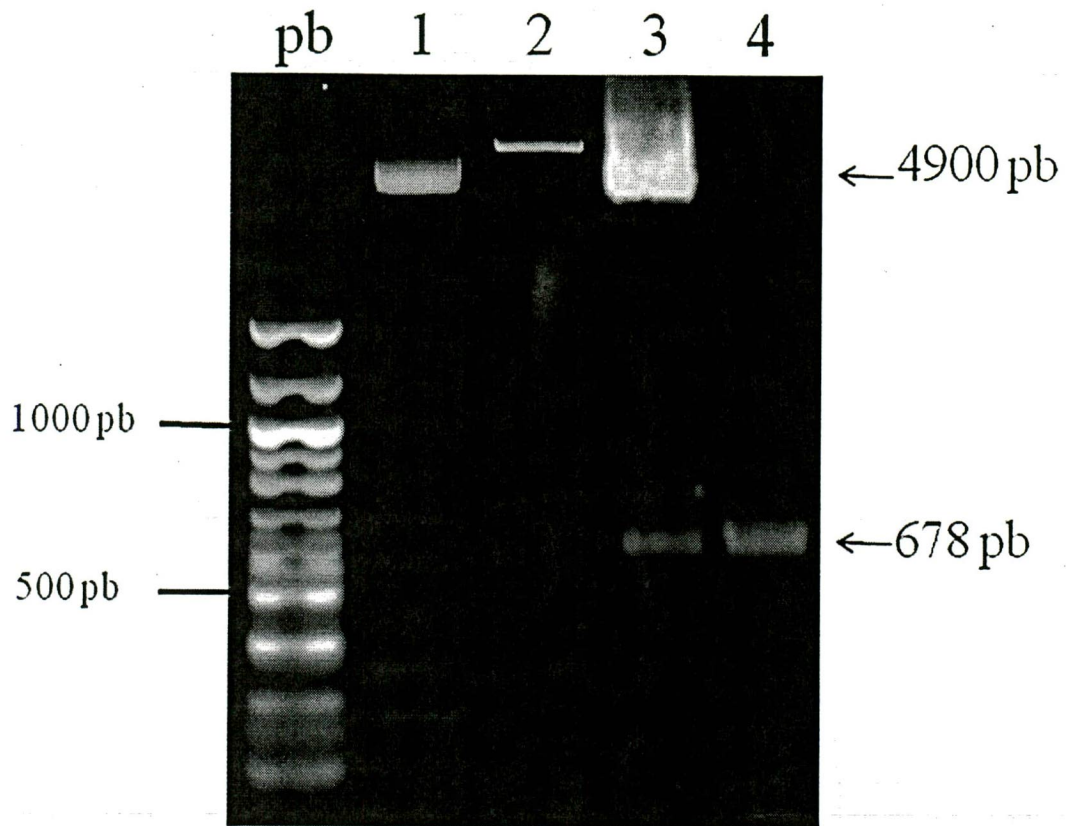


Figura 20. Caracterización de pEhhmbpA. pb; marcador 100 pares de bases; Carril 1; vector de expresión pGEX-6P-1, Carril 2; construcción pEhhmbpA, Carril 3; doble restricción de pEhhmbpA con *Bam*HI y *Xho*, Carril 4; amplificación de aproximadamente 700 pb obtenido, PCR utilizando como templado el ADN plasmídico pEhhmbpA. La cabeza de flecha indica el vector de 4900 pb y el gen *ehhmbpA*.

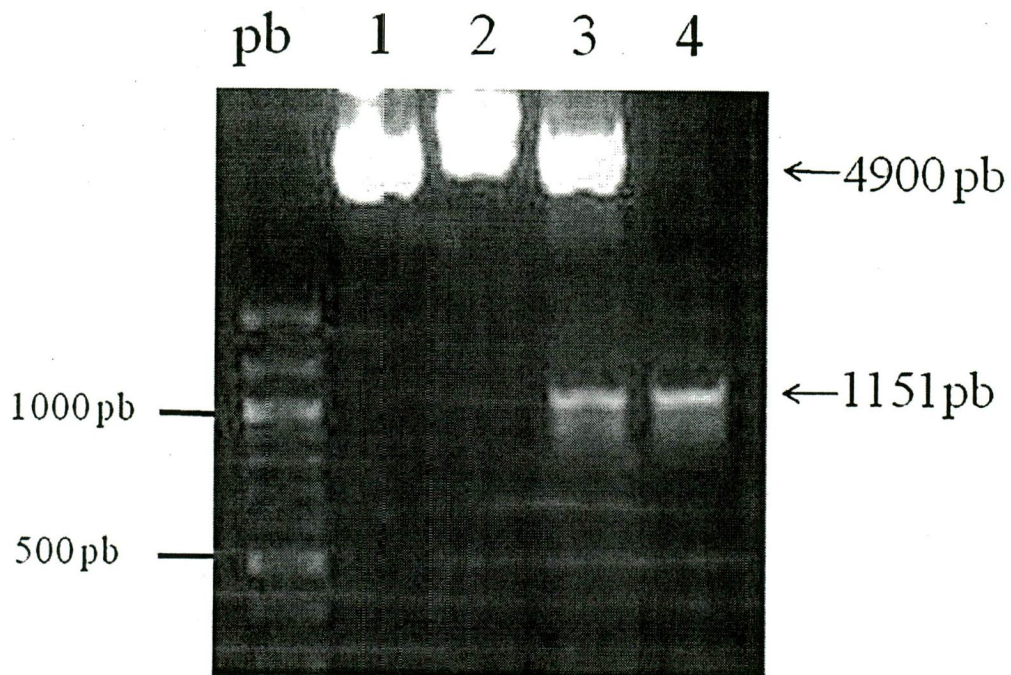


Figura 21. Caracterización de pEhhmbpB. pb; marcador 100 pares de bases, Carril 1; vector de expresión pGEX-6-P1, Carril 2; construcción pEhhmbpB, Carril 3; doble restricción de pEhhmbpB con *Bam*HI y *Xho*I, Carril 4; amplicón de aproximadamente 1200 pb obtenido, PCR utilizando como template el ADN plasmídico pEhhmbpB. La cabeza de flecha indica el vector de 4900 pb y el gen *ehhmbpB*.

5. Expresión de las proteínas EhhmbpA y EhhmbpB

Después del análisis de la clonación de *ehhmbpA* y *ehhmbpB*, en el vector de expresión se realizó la inducción de la expresión de los genes *ehhmbpA* y *ehhmbpB*. Se realizaron transformaciones con los plásmidos pEhhmbpA y pEhhmbpB en *E. coli* BL21pLysS, se indujeron con IPTG durante 3 h, después de la inducción las proteínas totales fueron extraídas y analizadas mediante geles SDS-PAGE al 12%. En *E. coli* BL21pLys transformada con pGEX-6-P1 sin inducir no se observó la sobreexpresión de las proteínas (Figuras 22 y 23 carril 1). En el caso de la inducción con IPTG de *E. coli* BL21pLys transformada con pGEX-6-P1 se observó la sobreexpresión de una proteína de aproximadamente 25 kDa, la cual corresponde al GST del plásmido pGex-6-P1 (Figuras 22 y 23 carril 2) y en la inducción de *E. coli* BL21pLysS transformada con la construcción pEhhmbpA se observó la sobreexpresión de una proteína de 45 kDa. El peso molecular corresponde al peso de la proteína recombinante EhhmbpA fusionada al GST (Figura 22 carril 3). Respecto a la inducción de *E. coli* BL21pLysS transformada con la construcción pEhhmbpB, se observó la sobreexpresión de una proteína de aproximadamente 73 kDa. Este peso corresponde a la proteína EhhmbpB fusionada al GST (Figura 23 carril 3). Estos resultados mostraron que las proteínas EhhmbpA y EhhmbpB se obtienen después de la inducción con IPTG durante 3 h.

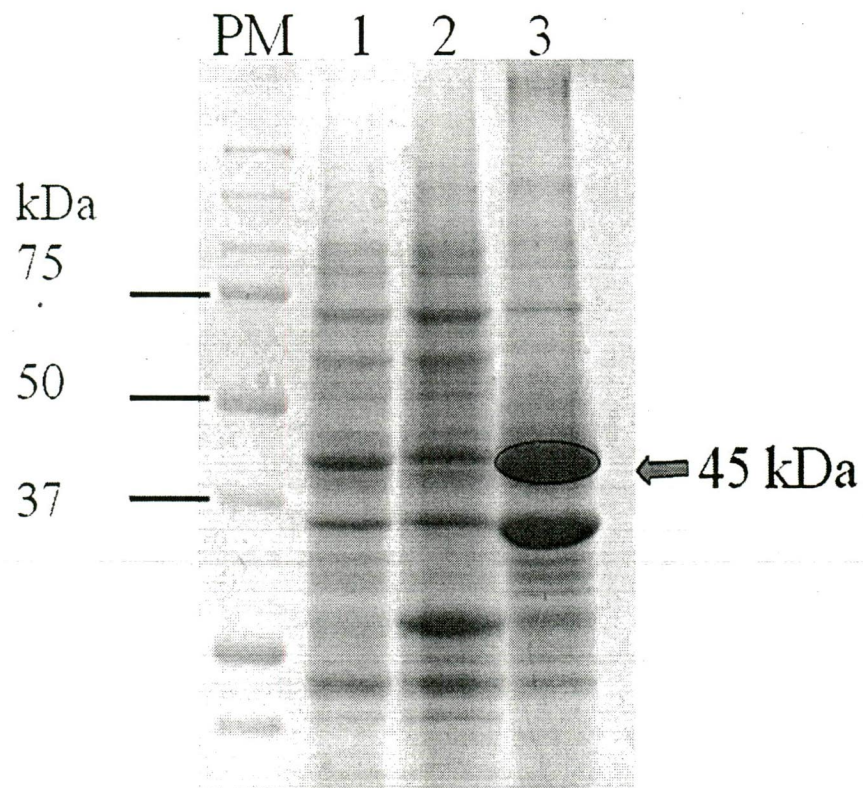


Figura 22. Expresión de la proteína recombinante EhhmbpA. PM, indica el marcador de peso molecular, Carril 1; muestra *E. coli* BL21pLys transformada con pGex-6-P2 sin inducir, Carril 2; inducción de pGEX-6-P1 con IPTG, Carril 3; muestra la inducción de *E. coli* BL21pLysS transformada con la construcción pEhhmbpA. La cabeza de flecha señala la sobreexpresión de una proteína de aproximadamente 45 kDa.

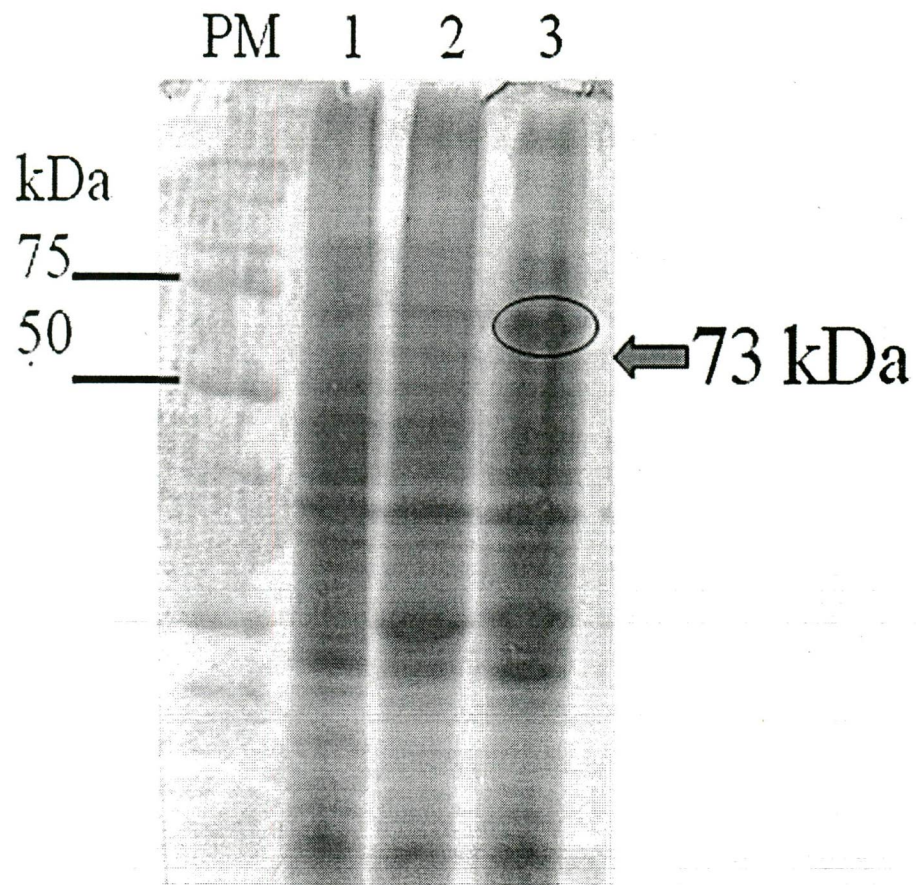


Figura 23. Expresión de la proteína recombinante EhhmbpB. PM, indica el marcador de peso molecular, Carril 1; muestra *E. coli* BL21pLys transformada con pGex-6-P2 sin inducir, Carril 2; inducción de pGEX-6-P1 con IPTG, Carril 3; muestra la inducción de *E. coli* BL21pLysS transformada con la construcción pEhhmbpB. La cabeza de flecha señala la sobreexpresión de una proteína de aproximadamente 73 kDa.

6. Solubilidad de las proteínas EhhmbpAr y EhhmbpBr

La solubilidad de las proteínas expresadas fue analizada mediante pruebas de solubilidad (Pruebas de solubilidad pag. 45) y se realizó con el fin de analizar si las proteínas expresadas se localizaban en la fracción soluble o insoluble para después a partir de la fracción en la que se localizaran purificarlas. Las proteínas totales obtenidas de la inducción de *E. coli* BL21pLysS transformada con la construcción pEhhmbpA mostraron la sobreexpresión de una proteína de 45 kDa, peso de la proteína recombinante EhhmbpA fusionada al GST (Figura 24 carril 1). En las proteínas totales obtenidas de la inducción de *E. coli* BL21pLysS transformada con la construcción pEhhmbpB se observó la sobreexpresión de una proteína de aproximadamente 73 kDa. Este peso corresponde al de la proteína recombinante EhhmbpB fusionada al GST (Figura 25 carril 1). En las proteínas de las fracciones insolubles no se observaron las proteínas EhhmbpA y EhhmbpB (Figuras 24 y 25 carril 2). Sin embargo, al analizar las proteínas de las fracciones solubles se observó un enriquecimiento de una proteína de 45 kDa (Figura 24 carril 3) y otra de 73 kDa (Figura 25 carril 3), lo que indicó que las proteínas recombinantes eran solubles y a partir de las fracciones solubles se purificaron las proteínas EhhmbpAr y EhhmbpBr.

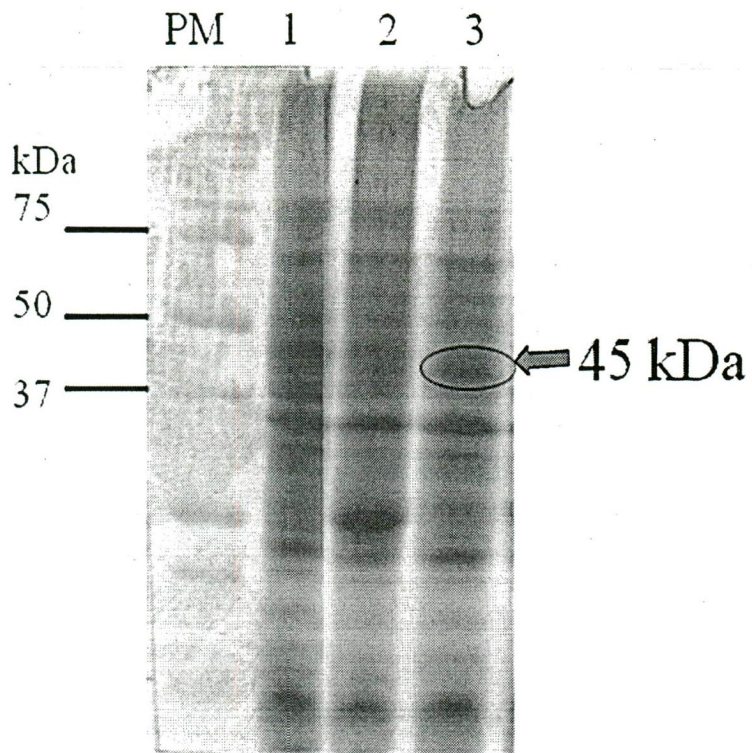


Figura 24. Determinación de la solubilidad de la proteína EhhmbpA. PM Muestra el marcador de peso molecular, Carril 1; proteínas totales obtenidas de la inducción de *E. coli* BL21pLysS transformada con la construcción pEhhmbpA, Carril 2; proteínas de la fracción insoluble, Carril 3; proteínas de la fracción soluble. La cabeza de flecha señala una banda de 45 kDa, la cual corresponde a la proteína EhhmbpA fusionada al GST.

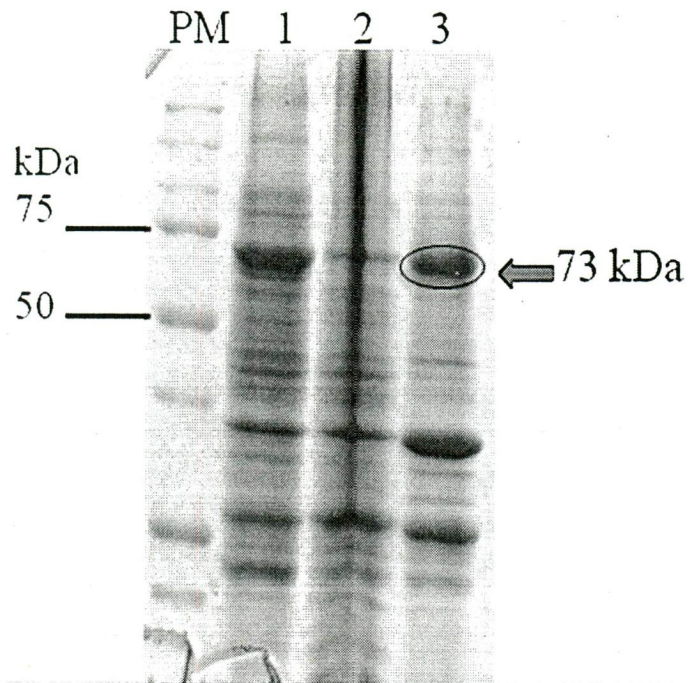


Figura 25. Determinación de la solubilidad de la proteína EhhmbpB. PM Muestra el marcador de peso molecular, Carril 1; proteínas totales obtenidas de la inducción de *E. coli* BL21pLysS transformada con la construcción pEhhmbpB, Carril 2; proteínas de la fracción insoluble, Carril 3; proteínas de la fracción soluble. La cabeza de flecha indica una de las bandas de 73 kDa, la cual corresponde a la proteína EhhmbpB fusionada al GST.

7. Purificación de las proteínas EhhmbpA y EhhmbpB

Las proteínas EhhmbpA y EhhmbpB se purificaron a partir de la fracción soluble. Debido a que las proteínas recombinantes se encontraban fusionadas al GST, la purificación se realizó por afinidad del GST a glutatión reducido y fueron analizadas mediante geles SDS-PAGE al 12%. Para confirmar que las proteínas purificadas eran proteínas fusionadas a GST se realizaron ensayos de western blot usando anticuerpos anti-GST. Se usó el GST como herramienta para identificar a las proteínas EhhmbpA y EhhmbpB. En las figuras 26 y 27 se muestran los resultados del western blot de la purificación de las proteínas EhhmbpA y EhhmbpB. Los lavados realizados fueron para separar todas las proteínas que no se habían unido a la matriz de glutatión reducido (Figuras 26 y 27 carriles 1 al 6). En el primer lavado de la purificación de la proteína EhhmbpA se detectó una banda (Figura 26 carril 1), lo cual indica que es una proteína que no se unió a la sefarosa acoplada a glutatión, y en la purificación de la proteína EhhmbpB se detectó en los primeros 2 lavados (Figura 27 carriles 1 y 2). La proteína EhhmbpA fue eluída en las primeras dos fracciones (Figura 27 carriles 7 y 8). Se observaron dos bandas, una de 45 kDa que corresponde a la proteína EhhmbpA fusionada a GST y la otra banda detectada en 25 kDa que corresponde al GST. La proteína EhhmbpB fue eluída en las primeras 3 fracciones (Figura 27 carriles 7 al 9) en donde se observaron dos bandas, una de 73 kDa que corresponde a la proteína EhhmbpB fusionada a GST y la otra banda detectada en 25 kDa que corresponde al GST.

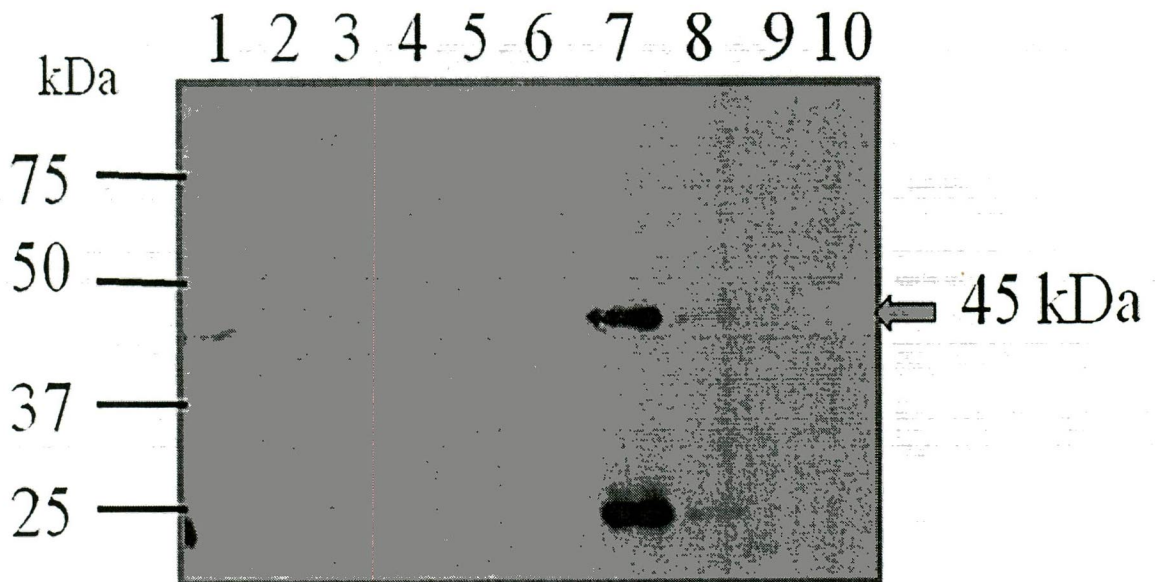


Figura 26. Tinción con coomassie y detección mediante western blot de la purificación de proteína EhhmbpA fusionada a GST. kDa muestra el marcador de peso molecular, Carriles 1-6; lavados, Carriles 7-10; eluciones. La cabeza de flecha señala la proteína purificada EhhmbpA fusionada a GST.

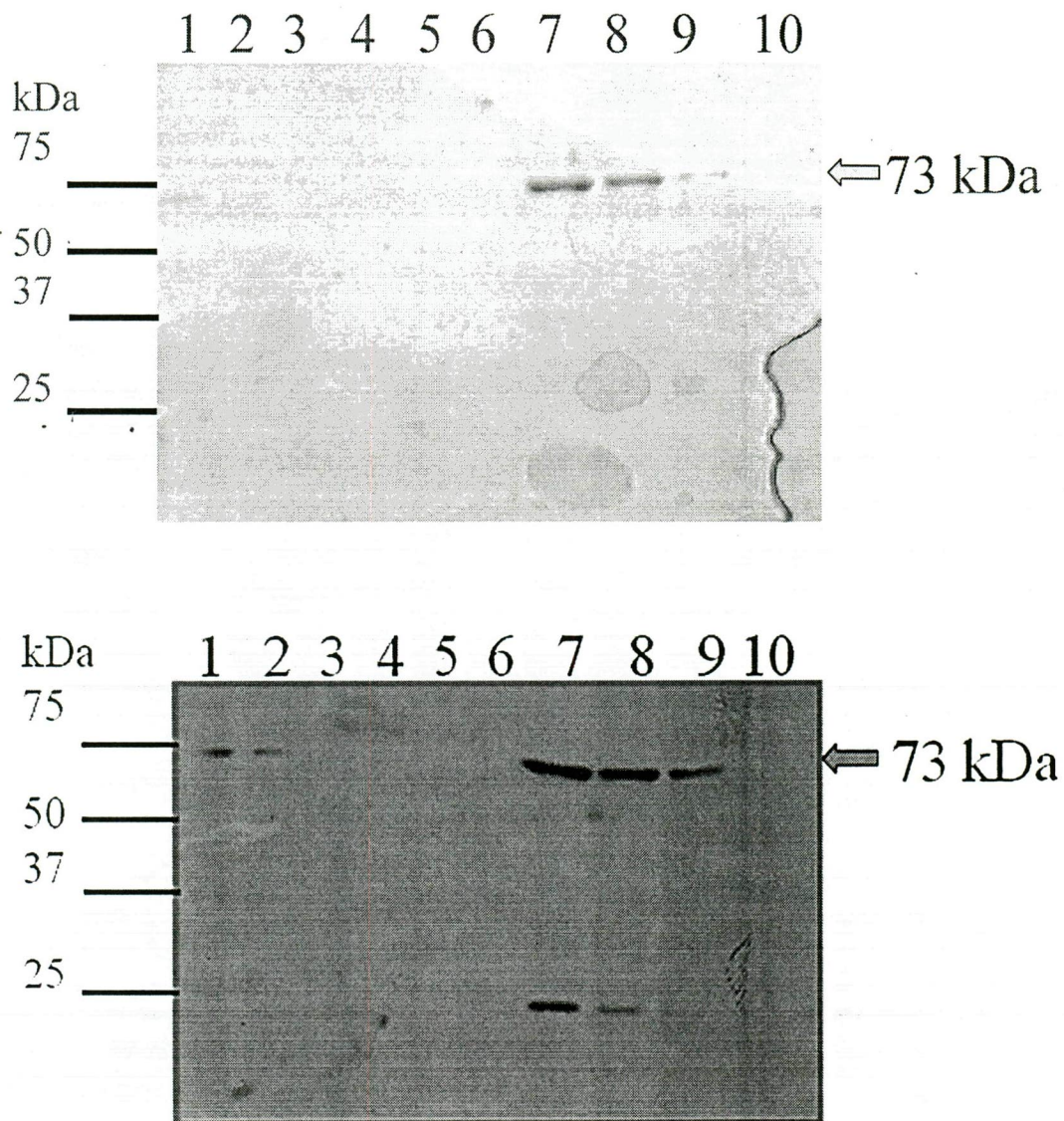


Figura 27. Tinción con coomassie y detección mediante western blot de la purificación de proteína EhhmbpB fusionada a GST. kDa muestra el marcador de peso molecular, Carriles 1-6; lavados, Carriles 7-10; eluciones. La cabeza de flecha señala la proteína purificada EhhmbpB fusionada a GST.

8. Reacción enzimática de corte del tag GST de las proteínas EhhmbpA y EhhmbpB

Las proteínas EhhmbpA y EhhmbpB fusionadas a GST fueron tratadas con una proteasa para eliminarles el GST (descrito en metodología; Corte de GST pag. 47). Las proteínas purificadas EhhmbpA y EhhmbpB fusionadas a GST, así como la EhhmbpA sin GST y el GST, fueron analizadas en geles de SDS-PAGE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Para descartar la posibilidad de que hubiera GST en las muestras que contenían las proteínas EhhmbpA y EhhmbpB libres de GST se realizaron ensayos de western blot utilizando anticuerpos dirigidos contra GST (Figuras 28 y 29). En la figura 28 el carril 1 muestra la proteína EhhmbpA fusionada a GST (45 kDa). En el carril 2 se analizó la muestra que contenía la proteína EhhmbpA después de someterla al tratamiento con la proteasa para separarla del GST y se detectó una señal de aproximadamente 25 kDa, lo cual corresponde al GST. En el carril 3 se trató la proteína EhhmbpA después de separarla del GST por afinidad de este último a una columna de sefarosa acoplada a glutatión reducido y no se detecta ninguna señal. Esto quiere decir que la proteína EhhmbpA ya no tenía GST. En el carril 4 se muestra el GST sin EhhmbpA. En la figura 29 carril 1 se muestra la proteína EhhmbpB fusionada a GST (73 kDa). En el carril 2 se muestra la proteína EhhmbpB después de someterla al tratamiento con la proteasa para separarla del GST y se detecta una señal de aproximadamente 25 kDa, lo cual corresponde al GST. En el carril 3 se muestra la proteína EhhmbpB después de separarla del GST y no se detecta ninguna señal. Esto quiere decir que la proteína EhhmbpB no tenía GST. En el carril 4 se muestra el GST sin EhhmbpB. De estos experimentos se puede concluir que las proteínas EhhmbpA y EhhmbpB se encuentran libres de GST y que no son reconocidas por anticuerpos dirigidos contra GST.

BIBLIOTECA UACM

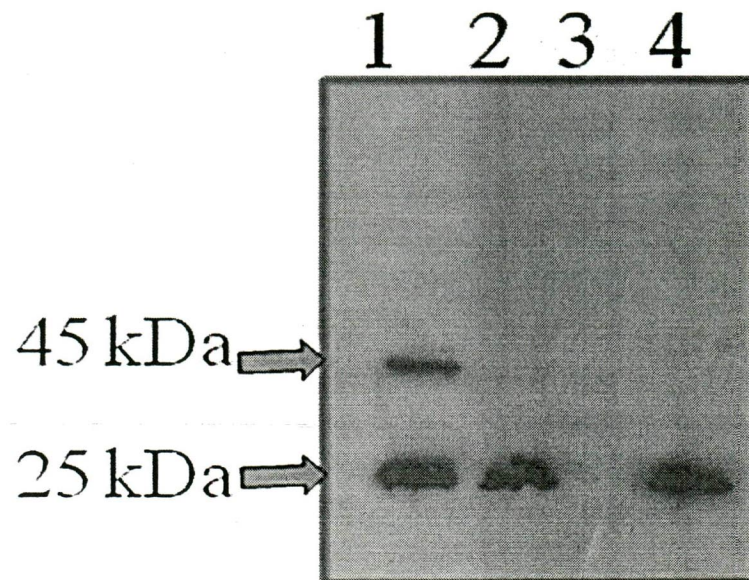


Figura 28. Western blot usando anticuerpos anti GST. En el carril 1 se muestra la proteína EhhmbpA fusionada a GST, el carril 2 corresponde a la proteína EhhmbpA tratada con la proteasa para separarla del GST, en el carril 3 se muestra la proteína EhhmbpA libre de GST y en el carril 4 se muestra el GST. La cabeza de flecha señala la proteína EhhmbpA fusionada a GST (45 kDa) y a GST (25 kDa).

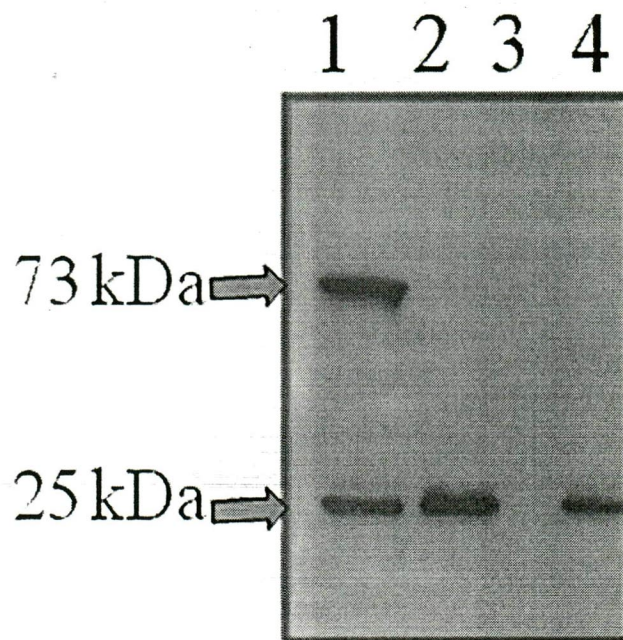


Figura 29. Western blot usando anticuerpos anti GST. En el carril 1 se muestra la proteína EhhmbpB fusionada a GST, el carril 2 corresponde a la proteína EhhmbpB tratada con la proteasa para separarla del GST, en el carril 3 se muestra la proteína EhhmbpB libre de GST y en el carril 4 se muestra el GST. La cabeza de flecha señala la proteína EhhmbpB fusionada a GST (73 kDa) y a GST (25 kDa).

9. Ensayo de unión a Hb de la proteína EhhmbpA.

Para analizar si la proteína EhhmbpA era capaz de unir Hb se realizó un ensayo de overlay. La proteína EhhmbpA fusionada a GST, así como la EhhmbpA sin GST y el GST, fueron separadas mediante geles de SDS-PAGE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. El ensayo overlay se realizó incubando con Hb humana y utilizando anticuerpos dirigidos contra Hb. Como controles se utilizaron extractos totales de *E. coli* y otra membrana que no fue incubada con hemoglobina (Figura 30). El panel A corresponde al overlay incubado con Hb, el panel B corresponde al overlay sin Hb y el panel C corresponde al overlay con Hb de las proteínas totales de *E. coli*. En el carril 1 del panel A y del panel B se muestra la proteína EhhmbpA fusionada a GST, el carril 2 corresponde a la proteína EhhmbpA tratada con la proteasa para separarla del GST, en el carril 3 se muestra la proteína EhhmbpA libre de GST y en el carril 4 se muestra el GST. En el panel A carril 1 se detectó una proteína de 45 kDa, lo cual indica que la proteína EhhmbpA fusionada a GST es capaz de unir Hb, en el carril 2 se detectó una proteína de aproximadamente 25 kDa que también es capaz de unir Hb, sin embargo el GST se detecta en ese mismo peso, pero en el carril 3 donde se encuentra la proteína EhhmbpA libre de GST también unió Hb a diferencia del carril 4, en el cual no se detectó ninguna señal lo que indica que la proteína que está uniendo la Hb es la EhhmbpA y no el GST. El panel B no muestra ninguna señal y se atribuye a que la señal detectada en el panel A es resultado de la unión de los anticuerpos a la Hb y no porque sean inespecíficos. Por último, el panel C muestra que no se detectó ninguna proteína de *E. coli*, por lo tanto se puede concluir que la proteína EhhmbpA es capaz de unir Hb y es una proteína que no pertenece a *E. coli*.

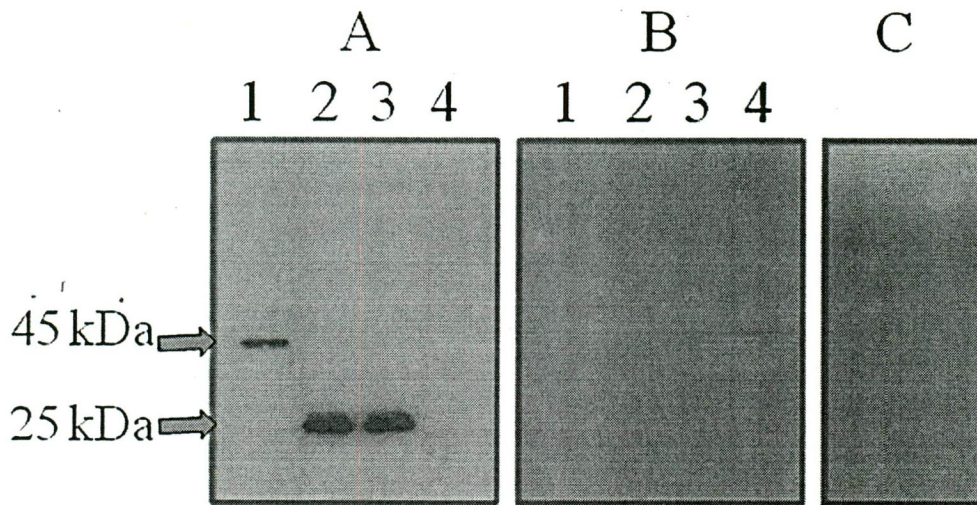


Figura 30. Ensayo de unión a Hb. Panel A corresponde al overlay incubado con Hb, el panel B corresponde al overlay sin Hb, y el panel C corresponde al overlay con Hb de las proteínas totales de *E. coli*, en el carril 1 del panel A y del panel B se muestra la proteína EhhmbpA fusionada a GST, el carril 2 corresponde a la proteína EhhmbpA tratada con la proteasa para separarla del GST, en el carril 3 se muestra la proteína EhhmbpA libre de GST y en el carril 4 se muestra el GST. La cabeza de flecha señala las proteínas a las cuales se unió la Hb.

10. **Ensayo de unión a Hb de la proteína EhhmbpB.**

Para analizar si la proteína EhhmbpB era capaz de unir Hb se realizó un ensayo de overlay. La proteína EhhmbpB fusionada a GST, así como la EhhmbpB sin GST y el GST fueron resueltas en geles de SDS-PAGE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa a la cual se le realizó un ensayo de overlay incubando primero con Hb humana y utilizando anticuerpos dirigidos contra Hb. Como controles se utilizaron extractos totales de *E. coli* y otra membrana que no fue incubada con hemoglobina. (Figura 31). El panel A corresponde al overlay incubado con Hb, el panel B corresponde al overlay sin Hb y el panel C corresponde al overlay con Hb de las proteínas totales de *E. coli*. En el carril 1 del panel A y del panel B se muestra la proteína EhhmbpB fusionada a GST, el carril 2 corresponde a la proteína EhhmbpB tratada con la proteasa para separarla del GST, en el carril 3 se muestra la proteína EhhmbpB libre de GST y en el carril 4 se muestra el GST. En el panel A carril 1 se detectó una proteína de 73 kDa, lo cual indica que la proteína EhhmbpA fusionada a GST es capaz de unir Hb. En el carril 2 se detectó una proteína de aproximadamente 50 kDa que también es capaz de unir Hb, el carril 3 donde se encuentra la proteína EhhmbpB libre de GST también unió Hb a diferencia del carril 4, en el cual no se detectó ninguna señal lo que indica que la proteína que está uniendo la Hb es la EhhmbpB y no el GST. El panel B no muestra ninguna señal y se atribuye a que la señal detectada en el panel A es resultado de la unión de los anticuerpos a la Hb y no porque sean inespecíficos. Por último, dado que en el panel C se muestra que no se detectó ninguna proteína de *E. coli* se puede concluir que la proteína EhhmbpB capaz de unir Hb no pertenece a *E. coli*.

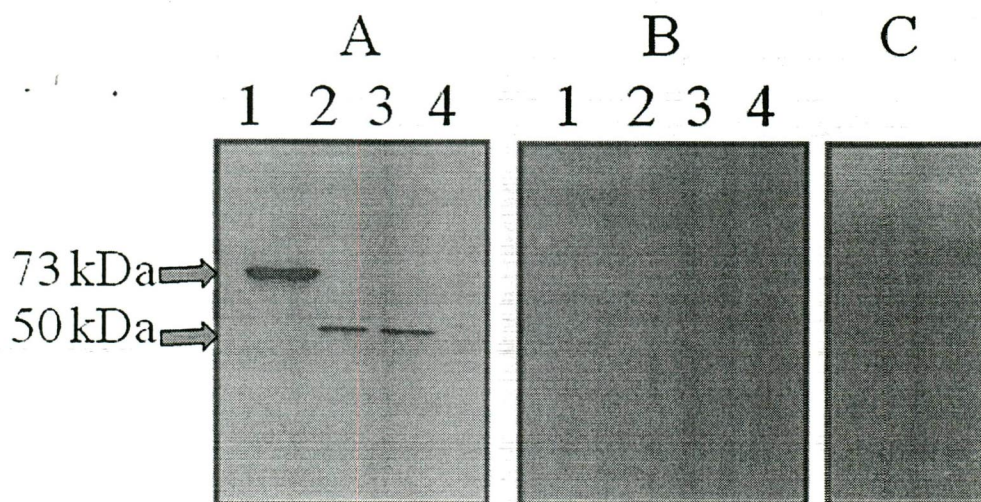


Figura 31. Ensayo de unión a Hb. Panel A corresponde al overlay incubado con Hb, el panel B corresponde al overlay sin Hb, y el panel C corresponde al overlay con Hb de las proteínas totales de *E. coli*. En el carril 1 del panel A y del panel B se muestra la proteína EhhmbpB fusionada a GST, el carril 2 corresponde a la proteína EhhmbpB tratada con la proteasa para separarla del GST, en el carril 3 se muestra la proteína EhhmbpB libre de GST y en el carril 4 se muestra el GST. La cabeza de flecha señala las proteínas a las cuales se unió la Hb.

11. **Ensayos de unión a hemoglobina de proteínas totales de *E. histolytica*.**

Para determinar la presencia de proteínas que unan Hb y correspondan al peso de las proteínas EhhmbpA y EhhmbpB se realizaron ensayos de overlay con extractos de proteínas totales de *E. histolytica* crecida en medio con ausencia de hierro, medio suplementado con Hb y medio completo. En las proteínas de los trofozoítos crecidos con ausencia de hierro se obtuvo unión inespecífica de la Hb, por lo cual no fue posible discernir entre los pesos de las posible proteínas a las cuales se unió Hb (Figura 32 panel A carril 1). En los trofozoítos crecidos en medio completo se identificó una proteína de 45 kDa cuyo peso corresponde a la proteína EhhmbpB (Figura 32 panel A carril 2). En las proteínas de los trofozoítos crecidos en presencia de Hb se observó una proteína de 25 kDa. Dicho peso corresponde al de la proteína EhhmbpA. Debido a la unión inespecífica de la Hb, bajo esta condición no se logró observar ninguna proteína que corresponda al peso de la proteína EhhmbpB (Figura 32 panel A carril 3). Para analizar que la unión de la Hb fuera específica, se realizó un ensayo de overlay compitiendo la Hb con albúmina, y en las proteínas de los trofozoítos crecidos en presencia de Hb se observó unión específica de Hb a diferentes proteínas, incluyendo una de 25 kDa y otra de 45 kDa que corresponden a los pesos de las proteínas EhhmbpA y EhhmbpB (Figura 32 panel B carril 3). En las proteínas que no fueron incubadas con Hb no se observó la unión de Hb. Estos resultados sugieren que *E. histolytica* posee más de una proteína capaz de unir Hb y dos de ellas pudieran corresponder a las proteínas EhhmbpA y EhhmbpB.

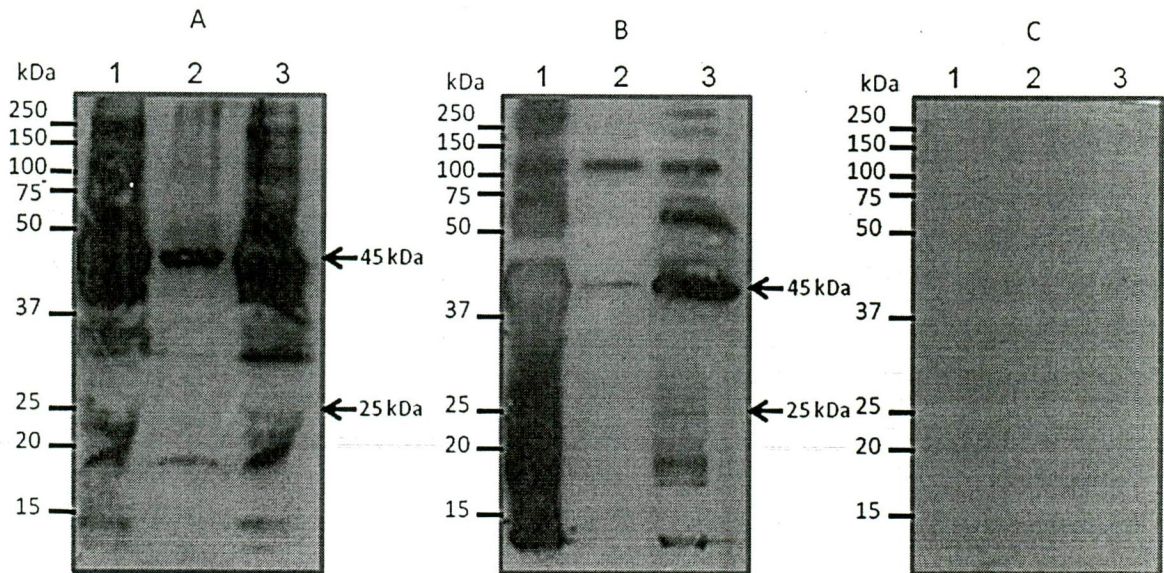


Figura 32. Ensayo de unión a Hb de proteínas totales de *E. histolytica*. Panel A corresponde al overlay incubado con Hb, el panel B corresponde al overlay con Hb compitiendo con albúmina, y el panel C corresponde al overlay sin Hb, en el carril 1 se muestran las proteínas totales de trofozoítos de *E. histolytica* crecidos en ausencia de hierro, el carril 2 corresponde a las proteínas totales de trofozoítos de *E. histolytica* crecidos en medio completo, en el carril 3 se muestran las proteínas totales de trofozoítos de *E. histolytica* crecidos en presencia de Hb. La cabeza de flecha señala las proteínas de 25 y 45 kDa a las cuales se unió la Hb.

VI . DISCUSIÓN

La capacidad de *E. histolytica* de crecer en diferentes fuentes de Fe sugiere que la amiba a desarrollado diferentes mecanismos para adquirir el Fe. Por ejemplo, la utilización de Fe apartir de Hb observada en este trabajo, concuerda con lo reportado para otros patogenos como *Haemophylus ducreyi*, *Neisseria sp*, *Porphyromonas gingivalis* y *Candida albicans* (Elkins, 1995., Stojiljkovic, y col., 1996, Simpson y col., 2000, Weissman y Kortnitzer, 2004) por lo que en *E. histolytica* debe de existir un mecanismo que permita la obtención de este elemento apartir de Hb.

En este trabajo nos investigamos esta hipótesis y la estrategia que utilizamos nos permitió identificar en el genoma de *E. histolytica* tres genes que codifican para tres proteínas con el dominio FRAP/NPNL. A las proteínas se les asignó la siguiente nomenclatura: EhhmbpA, EhhmbpB y EhhmbpC (*Entamoeba histolytica* hemoglobin binding protein A, B y C). Aunque el dominio de estas tres proteínas posee diferencias en le secuencia de los aminoácidos en comparación con lo reportado, pensamos que la capacidad de unir Hb no se ve afectada, porque existen reportes en otros organismos en los que se ha demostrado que aun con variaciones en este dominio siguen uniendo Hb (Brackent y col. 1999).

Con la finalidad de entender la participación de estos genes en la biología de la amiba se analizaran cada uno por separado.

En el caso de la proteína EhhmbpA pudiera tratarse de un hemóforo, por tres razones principalmente: primero es una proteina de bajo peso molecular, previamente se ha descrito que los hemóforos son proteínas de bajo peso molecular (Braun, 1999, Genco y Dixon, 2001). Segundo el transcrito que codifica para esta proteina se evidenció en ausencia de Fe y presencia de Hb, esto coincide con la literatura porque se ha reportado que los hemóforos se expresan en ausencia de hierro libre (Andrews y col., 3003, Faraldo-Gomez y Sansom, 2003). Por último, la proteina EhhmbpA purificada fue capaz de unir Hb humana, se sabe que los

hemóforos son moléculas que tienen una alta afinidad por el grupo hemo y la Hb es una hemoproteína, por lo tanto estas tres evidencias sugieren fuertemente que la proteína EhhmbpA es un hemóforo. Un posible mecanismo que explique la participación de la proteína EhhmbpA en la adquisición de Hb sería que se encargue de la recolección de Hb proveniente de eritrocitos lisados fuera de la amiba, posteriormente la Hb es acarreada a la membrana citoplasmática donde sería presentada a una probable proteína receptora (Andrews y col., 2003).

Respecto al gen *ehhmbpB* solo podemos decir que se trata de una proteína que une Hb, porque fue capaz de unir Hb purificada. En cuanto al tamaño molecular (45 kDa) es muy similar al receptor de Hb (46 kDa) descrito para *Leishmania donovani* (Sengupta y col., 1997). La expresión constitutiva de este gen descarta la posibilidad de que se trate de un hemóforo o sideróforo. Sin embargo, creemos que es necesario realizar más experimentos que nos indiquen la posible función de esta como probable proteína receptora de Hb. Por ejemplo, demostrar que se encuentra a nivel de membrana.

En relación al gen *ehhmbpC*, este se encuentra presente en el genoma de *E. histolytica* y solo podemos sugerir que es un gen regulado por la ausencia de hierro, porque solo se expresó bajo esta condición. A diferencia de los genes *ehhmbpA* y *B* no se cuenta con más evidencias experimentales que permitan dilucidar acerca de la participación de este gen en la biología de *E. histolytica*.

Las proteínas encontradas en este trabajo sugieren que en la amiba debe existir un mecanismo para la adquisición de Fe²⁺ a partir de Hb. Por lo que proponemos realizar algunos experimentos adicionales que permitan dilucidar el mecanismo.

En base a lo obtenido respecto a los genes *ehhmbpA* y *B*, proponemos, obtener anticuerpos para realizar inmunolocalizaciones de las proteínas en *E. histolytica*, de esta manera determinar en que sitio de la amiba se encuentran localizadas las proteínas. Si la localización de la proteína EhhmbpA es extracelular podría reforzar la hipótesis de que se trata de un hemóforo. En el caso de la proteína EhhmbpB se espera que se localice en la membrana citoplasmica lo que reforzaria que se trata de un receptor para Hb.

Proponemos determinar la afinidad con la que las proteínas Ehhmbp A y B unen la Hb para y realizar competencias en el ensayo de overlay utilizando otras proteínas donadoras de Fe para conocer la especificidad. Realizar mutagénesis dirigida en el dominio FRAP/NPNL identificado *in silico* para corroborar que esta es la región responsable de unir Hb, analizar si las proteínas interactúan entre sí para sugerir que participan en un mismo sistema.

Con relación al gen *ehhmbpC*, es necesario analizar la participación de este gen en la adquisición de hierro, por lo cual proponemos clonarlo, expresarlo y analizar si la proteína purificada tiene la capacidad de unir Hb.

Sugerimos ampliar el estudio mediante perfiles de expresión diferencial revelados por ensayos de overlay, debido a que la estrategia utilizada nos permitió encontrar solo los genes que comparten el dominio FRAP/NPNL (*ehhmbpA*, *ehhmbpB* y *ehhmbpC*), y podrían estarse excluyendo proteínas que pudieran estar implicadas en el mecanismo de adquisición de hierro a partir de Hb.

II. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrews, S. Robinson, A., Rodríguez-Quiñones F. 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 27:215-237.

Avron, B., Duestsch, R. M. and Mirelman, D. 1982. Chitin synthesis inhibitors prevent cyst formation by *Entamoeba* trophozoites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108:815-821.

Baker H., Anderson, B y Baker N. 2003. Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme. *Proc Natl Acad Sci.* 100:3579-3583.

Bracken, C., Baer, M., Abdur-Rashid, A., Helms, W. y Stojiljkovic I.1999. Use of heme protein complexes by the *Yersinia enterocolitica* HemR receptor: histidine residues are essential for receptor function. *J Bacteriol.* 181:6063-6072.

Braun, V. y Killmann, H. 1999. Bacterial solutions to the iron supply problem. *Trends Biochem. Sci.* 24:104-109.

Caballero, A., Viveros, B., Salvatierra, R., Tapia., Sepulveda, G., Gutierrez, G. y Ortiz, L. 1994. Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50:412-419.

Chasteen, N. D. 1998. Ferritin. Uptake, storage and release of iron. *Met Ions Biol Syst.* 35:480-505.

Crosa, J. and C. Walsh. 2002. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66:223-49.

Diamond, L. S. 1980. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*: progress and problems. *Arch. Invest. Méd.* 47-54.

Elkins, C., Ching, C., y Thomas, C. 1995. Characterization of the *hgbA* Locus Encoding a Hemoglobin Receptor from *Haemophilus ducreyi*. *Infection and immunology.* 63:2194–2200

Faraldo-Gómez, J., y Sansom. 2003. Acquisition of siderophores in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:105-116.

Farnaud S., y Evans, W. 2003. Lactoferrin- a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol Immunol.* 40:395-405.

Fujimura, S., Shibata, Y., Hirai, K., y Nakamura, T. 1996. Binding of hemoglobin to the envelope of *Porphyromonas gingivalis* and isolation of the hemoglobin-binding protein. *Infect Immun.* 64(6):2339–2342.

Genco, C. y Dixon, D. 2001. Emerging strategies in microbial haem capture. *Mol. Microbiol.* 39:1-11

Howard, GA. 1970. Studies on cessation of protein synthesis in a reticulocyte lysate-free system. *Biochim. Biophys. Acta.* 213:237-240.

Krishnamurthy, G., Vikram, R., Singh, S., Patel, N., Agarwal, S., Mukhopadhyay, G., Basu, S. y Mukhopadhyay, A. 2005. Hemoglobin Receptor in *Leishmania* Is a Hexokinase Located in the Flagellar Pocket. *J. of Biological Chemistry.* 208:5884-5891.

Lehmann, H. y Carrel, R. 1969. Variations in the structure of human hemoglobin. With particular reference to the unstable haemoglobins. *Br Med Bull* 228:726-739.

León-Sicairos, N., Reyes-López, M., Canizalez-Román, A., Bermúdez-Cruz, R., Jesús Serrano-Luna, J., Arroyo, R., y de la Garza, M. 2005. Human hololactoferrin: endocytosis and use as an iron source by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Microbiol.* 151:3859-3871.

Létoffé, S., Deniau, C., Wolff, N., Dassa, E., Delepelaire, P., Lecroisey, A. y Wandersman, C. 2001. Haemophore-mediated bacterial haem transport: evidence for a common or overlapping site for haem-free and haem-loaded haemophore on its specific outer membrane receptor. *Mol Microbiol.* 41:439-450.

Martínez-Palomo, A. 1987. The pathogenesis of amoebiasis. *Parasitology.* 3(4):111-118.

Neilands, J. 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem.* 270:26723-26726.

Okada, M. Huston, D. Mann, B. Petri, W. Kita, K. y Nozaki, T. 2005. Proteomic Analysis of Phagocytosis in the Enteric Protozoan Parasite *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell.* 4:827-831.

Otto BR, Verweij-van A. y MacLaren D. 1992. Transferrins and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria. *Crit Rev Microbiol.* 18:217-233.

Ortiz, L. 1994. Parasitic infections and the immune system. En: *Amebiasis*. Kierszenbaum, F. ed. Ac. Press, San Diego, CA. 145-162.

Perkins, D., Ratliff-Griffin, y Stojiljkovic, I. 2004. Iron Transport Systems in *Neisseria meningitides*. *Microbiol. Rev.* 68:154–171.

Perkins, D., T. Baer, M. y Stojiljkovic, I. 2003. Identification of functionally important regions of a haemoglobin receptor from *Neisseria meningitides*. *Microbiology.* 149:3423–3435.

Ratledge, C., y L. Dover. 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 54:881-941.

Ravdin, J. I. 1986. Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*: studies of adherence, secreted toxins, and contact-dependent cytolysis. *Rev.Infect.Dis.* 8:247-260.

Ravdin, J. I. 1995. State of the art clinical article. *Clin. Infect. Dis.* 20:1453-1466.

Shibayama-Salas, M., Tsutsumi, V. y Martínez-Palomo, A. 1992. Early invasive intestinal amebiasis in Mongolian gerbils. *Arch. Med. Res.* 23(2): 187-190.

Schultz, R. 1993. Proteínas fisiológicas. En: Devlin T (ed.). *Bioquímica*. Barcelona: Reverté. p. 95-133.

Pilpa, R., Fadeev, A., Villareal, A., Wong, L., Phillips, M., y Clubb, T. 2006. Solution structure of the NEAT (NEAr Transporter) domain from

IsdH/HarA: the human hemoglobin receptor in *Staphylococcus aureus*. *J Mol Biol.* 360:435–437.

Sambrook y Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sengupta, S., Tripathi, J., Tandon R., Raje, M., Roy, R., Basu, S. y Mukhopadhyay, A. 1999. Hemoglobin Endocytosis in *Leishmania* Is Mediated through a 46-kDa Protein Located in the Flagellar Pocket. *J. of Biological Chemistry.* 29:2758-2765.

Sepúlveda, B. y Martínez-Palomo, A. 1984. Amebiasis. En: *Tropical and geographical medicine.* Warren, K. S. and Mahmoud, A. A. S., eds. McGraw-Hill, New York. 305-318.

Simpson, W., Olczak, T., y Attardo, C. 2000. Characterization and expresión of HmuR, a TonB-Dependent hemoglobin receptor of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* 182:5737-5748.

Sizhuang, Y., Negre, E., Cashel, J., Guo, N., Lyman, C., Walsh, T. y Roberts D. 1996. Specific Induction of Fibronectin Binding Activity by Hemoglobin in *Candida albicans* Grown in Defined Media. *Infection and immunology.* 64:2930-2935.

Stanley S. 2003. Amoebiasis. *Lancet.* 361:1021-1034.

Stojiljkovic, I. y Srinivasan, N. 1997. *Neisseria meningitidis tonB, exbB,* and *exbD* Genes: Ton-dependents utilization of protein-bound iron in *Neisseriae*. *J. Bacteriol.* 179:805-812.

Stojiljkovic, I., Hwa, S., Martin, L., Nassif, F., Heffron, F. y So, M. 1995. The *Neisseria meningitidis* haemoglobin receptor: its role in iron utilization and virulence. *Mol. Microbiol.* 15:531-542.

Stojiljkovic, I., Larson, J., Hwa, V., Anic, S., Y So, M. 1996. HmbR Outer Membrane Receptors of Pathogenic *Neisseria* spp.: Iron-Regulated, hemoglobin-Binding Proteins with a High Level of Primary Structure Conservation. *J. Bacteriol.* 178:4670-4678.

Stojiljkovic, I., V. Hwa, S. L. de Martin, X. Nassif, F. Heffron, y M. So. 1995. The *Neisseria meningitidis* haemoglobin receptor: its role in iron utilization and virulence. *Mol. Microbiol.* 15:531-542.

Tanyuksel, M. y William, A. 2003. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Microbiol. Rev.* 16:713-729.

Telen, M. 1994. Eritrocitos maduros. *En:* Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens J, Lukens J (eds.). *Wintrobe Hematología clínica*. Buenos Aires: *Intermédica*. p. 80-105.

Wandersman, C. y Stojiljkovic, I. 2000. Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Curr Opin Microbiol.* 3:215-220.

Weissman, Z. y Kornitzer, D. 2004. A family of *Candida* cell surface haem-binding proteins involved in haemin and haemoglobin-iron utilization. *Mol. Microbiol.* 53:1209-1220.

WHO. 1969. Amoebiasis. Geneva report of a W.H.O. Expert Committee. *W.H.O. Tech. Rep. Ser.*, No. 421

WHO. 1997. A consultation with experts on amoebiasis. *Epidemiological bulletin.* 18(1).

Zheng, M., Doan, T., Schneider, D. y Storz, G. 1999. OxyR and SoxRS regulation of *fur*. *J Bacteriol* 181:4639-4643.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 29 de febrero de 2008, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestra en Ciencias Genómicas a la Biol. Areli Cruz Castañeda

Dr. José de Jesús Olivares Trejo

Jesus Olivares

Dra. Minerva Camacho Nuez



Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez



Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

