



IDENTIFICACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA KMP-11 DE *Crithidia spp.*: COMPARACIÓN CON SUS ORTÓLOGOS DE OTROS TRIPANOSOMÁTIDOS

IDENTIFICATION OF THE GEN ENCODING THE KMP-11 PROTEIN FROM *Crithidia spp.*: COMPARISON WITH ITS ORTOLOGS FROM OTHER TRYPANOSOMATIDS

C. Cuervo¹, J. Rauscher², M. C. López³, M.C. Thomas³ C.J. Puerta¹

¹ Laboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Carrera 7 # 43-82. Bogotá, Colombia

² Departamento de Biología, Universidad de Puerto Rico, Río Piedras, PR.

³ Departamento de Biología Molecular, Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra", CSIC, Granada, España.
cpuerta@javeriana.edu.co

Resumen

El orden *Kinetoplastida* está conformado por un grupo de organismos que se caracterizan por presentar un ADN extranuclear denominado cinetoplasto. Dentro de éste, los tripanosomátidos constituyen una familia de protozoos altamente divergentes que incluye varios géneros de interés médico y económico por ser patógenos de humanos, plantas e insectos. El género *Crithidia* constituye un grupo de parásitos monogenéticos encontrados en el tracto digestivo de artrópodos e invertebrados. Recientes estudios han mostrado el carácter conservado de la proteína 11 de membrana de kinetoplastidos (KMP-11) y su importancia biológica e inmunológica en el contexto de su asociación con la membrana de tripanosomátidos. En este trabajo se amplificaron y secuenciaron los genes *kmp-11* de *Crithidia spp.* Estos genes tienen un marco de lectura abierto de 279 pb que codifica para una proteína con peso molecular de 11 kDa, la cual presenta una elevada identidad con su ortóloga de otros tripanosomátidos. Análisis filogenéticos basados en la secuencia de nucleótidos sustentan el carácter polifilético del género *Crithidia* al encontrarse que éste se encuentra más estrechamente relacionado con *T. rangeli*, *T. cruzi* y *T. brucei* que con *Leishmania*.

Palabras clave: cinetoplasto, *Crithidia spp.*, proteína KMP-11, ortólogos, tripanosomátidos.

Abstract

Kinetoplastida order comprises a group of organisms characterized by the presence of extra-nuclear DNA known as kinetoplast. Within this highly divergent family of protozoa, the trypanosomatids include many genera of economical and medical interest since they are pathogenic for humans, plants and insects. Genus *Crithidia* is formed by a group of monogenetic parasites found in the digestive tract of arthropods. Recent studies have shown the conservative character of the kinetoplast membrane protein-11 (KMP-11) and its biological and immunological importance in the context of its association with the trypanosomatid membrane. In this paper, *Crithidia spp.* KMP-11 protein genes were sequenced. The *Crithidia spp.* KMP-11 genes have a 279 bp open reading frame which codes for a protein with a molecular weight of 11 kDa. This protein shows a high identity with its orthologues in other trypanosomatids. Phylogenetic analyses, based on the coding nucleotide sequence, support the polyphyletic character of *Crithidia* genus given that it is more closely related to *T. rangeli*, *T. cruzi* and *T. brucei* than to *Leishmania*.

Key Words: *Crithidia spp.*, kinetoplast, KMP-11 protein, orthologue, trypanosomatids.

INTRODUCCIÓN

Los kinetoplástitos son un grupo bien conocido de protozoos flagelados pertenecientes al orden *Kinetoplastida*, los cuales divergieron hace aproximadamente 800 millones de años de otros eucariotas (Fernández *et al.*, 1993). Estos microorganismos son distinguibles de otros protozoos por la presencia de una red de ADN extranuclear, la cual constituye el ADN mitocondrial del parásito, conocido como cinetoplasto (kDNA) (Sinha *et al.*, 2004; Klingbeil *et al.*, 2001). Quizá como consecuencia del largo tiempo de divergencia, los kinetoplástitos exhiben características biológicas raramente vistas en otros eucariotas como: edición del ARN, “*trans-splicing*”, variación antigénica y compartimentalización de la glicólisis, entre otros; constituyéndose en importantes modelos para el estudio de procesos biológicos básicos (Stevens *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 1993).

Dentro del orden *Kinetoplastida* se encuentran diferentes estilos de vida: organismos de vida libre, parasitismo monogénico, el cual involucra un solo hospedero (usualmente invertebrado) y parasitismo digenético, en el cual el ciclo de vida del parásito se alterna entre invertebrado y vertebrado o plantas. Es así como la familia *Bodonidae*, incluye organismos de vida libre y monogénicos, mientras que la familia *Trypanosomatidae*, agrupa organismos monogénicos y digenéticos (Maslov *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 1993), patógenos para el hombre y animales (*Leishmania* y *Trypanosoma*), así como también para plantas (*Phytomonas*) e insectos (*Crithidia*) (Morris *et al.*, 2001; Stevens *et al.*, 2000; Ramírez *et al.*, 1998; Tanowitz *et al.*, 1992).

Crithidia es un parásito monogénico encontrado en el intestino de artrópodos,

frecuentemente estudiado debido a que constituye un excelente modelo biológico de estudio para los organismos patógenos de su familia y es fácilmente cultivable (Klingbeil y Englund, 2004; Lukes *et al.*, 2002).

Estudios previos de las relaciones evolutivas dentro de la familia *Trypanosomatidae* se enfatizaban en características morfológicas o consideraciones respecto al estilo de vida de los parásitos. Recientemente, la reconstrucción de la evolución molecular ha sido aplicada a la relación existente entre los tripanosomátidos. Es así como, diferentes estudios basados en las secuencias del ADN ribosomal sugieren que los géneros *Leishmania*, *Leptomonas*, *Endotrypanum* y *Crithidia* son similares entre sí y forman un grupo aparte de *T. brucei* y *T. cruzi* (Fernández *et al.*, 1993; Briones *et al.*, 1992; Gómez *et al.*, 1991; Hernández *et al.*, 1990).

Por otra parte, la proteína de 11 kDa de la membrana de los kinetoplástitos (KMP-11) se encuentra presente y altamente conservada en los organismos pertenecientes al orden *Kinetoplastida* incluyendo distintas especies de *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Crithidia*, *Leptomonas* y *Phytomonas* (Stebeck *et al.*, 1995). Esta proteína ha sido caracterizada molecularmente en *T. brucei* (Bridge *et al.* 1998; Stebeck *et al.*, 1995), *Leishmania donovani* (Jardim *et al.*, 1995a,b) *Leishmania infantum* (Berberich *et al.*, 1997a,b), *Leishmania panamensis* (Ramírez *et al.*, 1998), *T. cruzi* (Thomas *et al.*, 2000) y más recientemente en *Trypanosoma rangeli* (Díez *et al.*, 2005); organismos en los que presenta características comunes como: peso molecular de 11 kDa, carácter anfipático, estructura secundaria caracterizada por la presencia de dos hélices alfa unidas por un segmento enrollado al azar, elevado número de copias (1×10^6 - 2×10^6 copias por genoma haploide), loca-

lización asociada al citoesqueleto, flagelo, bolsillo flagelar y membrana celular del parásito y expresión en todos los estadios del ciclo de vida del parásito, especialmente en los estadios desarrollados en el insecto (Díez *et al.*, 2004).

Hasta el momento la función biológica de la proteína KMP-11 se desconoce, pero su conformación estructural, homología con las apolipoproteínas y posible asociación en la membrana de los parásitos con otros componentes anfipáticos como el LPG en *Leishmania* y las proteínas ácidas repetitivas en *T. brucei* sugieren que ella puede interactuar con la bicapa lipídica regulando la presión e incrementando la consistencia de la membrana al permitir la estabilidad de moléculas tales como el LPG. Asimismo la presencia mayoritaria de la proteína en las formas de desarrollo parasitarias en el insecto hacen pensar que esta proteína puede tener otras funciones relacionadas con la interacción del parásito con el huésped vector (Díez *et al.*, 2004). Otros hallazgos tales como su homología con las proteínas asociadas al citoesqueleto (CIP1) de *Arabidopsis thaliana* y sus propiedades fijadoras de calcio sugieren que la proteína KMP-11 puede estar implicada en la movilidad del parásito y en la unión a la célula huésped. Pero quizás una de las características más importantes de esta proteína es su carácter inmunogénico, inductor de respuesta inmune humoral y celular en modelos murinos y humanos (Díez *et al.*, 2005; Planelles *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2000).

Teniendo en cuenta el carácter conservado a nivel evolutivo de esta proteína y su importancia biológica e inmunológica, en este estudio se realizó la secuenciación de los genes *kmp-11* de *Crithidia spp.* con la finalidad de compararlos con sus ortólogos en otros tripanosomátidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Parásitos y obtención del ADN

La cepa del parásito *Crithidia spp.* procedente del municipio de Charalá (Santander) y aislada de un insecto triatomino fue amablemente cedida por el Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Salud (INS). El ADN del parásito se obtuvo mediante extracción orgánica con fenol-cloroformo-álcohol isoamílico y precipitación con etanol según lo indicado por Puerta y Urueña (2005).

Ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A partir de ADN genómico de *Crithidia spp.* se amplificó el marco de lectura abierto del gen que codifica para la proteína KMP-11, usando los oligonucleótidos KMP11F/R (Díez *et al.*, 2005) diseñados con base en la secuencia del gen *kmp-11* de *T. cruzi* (n° de acceso a GenBank AJ000077). La PCR se realizó en un volumen final de 25 µl conteniendo: 125 ng de ADN genómico purificado, 1 X de buffer (10 mM Tris-HCl pH 9, 50 mM KCl y 0,1% de Triton X-100), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP (Invitrogen), 20 pmoles de cada oligonucleótido y 1,25 U de Taq DNA polimerasa (Corpogen). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador MJ Research PT-100 usando el siguiente perfil: 95°C por 5 minutos y 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 1 min., 72°C por 40 seg. y una extensión final a 72°C durante 5 min. (Díez *et al.*, 2005). El producto de amplificación se observó en gel de agarosa al 1,5% conteniendo 0,5 µg/ml de bromuro de etidio (Sambrook y Russell, 2001).

Clonación y ensayo de "Southern blot" del gen *kmp-11* de *Crithidia spp.*

El producto de amplificación de aproximadamente 280 pares de bases, se extrajo del

gel de agarosa haciendo uso del estuche comercial "QIAquick Gel Extraction Kit" (QIAGEN) y se clonó en el plásmido comercial pGEM[®]-T Easy (Promega), mediante reacción con la enzima "T4 DNA Ligase", según recomendaciones de la casa comercial. El producto de ligación fue posteriormente introducido en bacterias electrocompetentes JM-109 de *Echerichia coli*. Finalmente, las bacterias recombinantes se seleccionaron en medio Luria Bertani con 100 µg/ml de ampicilina tras realizar el test de blancas y azules (Puerta y Uruña, 2005). El ADN plásmidico de los clones recombinantes se extrajo haciendo uso del estuche comercial "Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System" (Promega), sometándose a digestión con la endonucleasa de restricción *EcoRI* (Promega), según recomendaciones de la casa comercial.

Los productos de la digestión fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y transferidos a membranas de nailon (Amersham Pharmacia) usando el método alcalino (Puerta y Uruña, 2005). Los ensayos de hibridación se realizaron usando la metodología previamente descrita (Puerta y Uruña, 2005). Como sonda se utilizó el gen que codifica para la proteína KMP-11 de *T. rangeli* marcado con biotina mediante la técnica de "Random primer" (Díez *et al.*, 2005). Los filtros fueron lavados con 1 X SSC/0,1% SDS a 42°C por 15 min. y 0,1 X SSC/ 0,1% SDS a 65°C por 15 min. y posteriormente revelados mediante reacción colorimétrica con el conjugado fosfatasa alcalina- estreptavidina y el sustrato NBT/BCIP (Promega) (Puerta y Uruña, 2005).

Secuenciación y análisis bioinformático

La reacción de secuenciación se llevó a cabo en el Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra", CSIC (Granada, España). Ambas hebras del ADN clonado fueron

secuenciadas por el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) en un secuenciador automático ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) usando los oligonucleótidos universales M13F/M13R. La búsqueda de identidad con otras secuencias reportadas en la base de datos de GenBank se realizó usando el programa BLAST de NCBI (Altschul *et al.*, 1997) y fueron alineadas usando los programas MULTALIGN (Corpet, 1988) y LALIGN (Pearson, 1990). La secuencia deducida de aminoácidos de la proteína se obtuvo mediante análisis de la secuencia de nucleótidos con el programa "Translate tool" del Instituto Suizo de Bioinformática (Appel *et al.*, 1994) y los análisis adicionales a la secuencia de aminoácidos se realizaron con el servidor ExPASy (Gasteiger *et al.*, 2003).

Análisis filogenético

En primer lugar se alinearon las secuencias de nucleótidos obtenidas del gen *kmp-11* en *Crithidia spp.* con las secuencias reportadas para este mismo gen en el GenBank mediante el programa Clustal W. Posteriormente, se realizó un análisis filogenético mediante análisis de máxima parsimonia soportado por un *bootstrap* de 1000 réplicas.

RESULTADOS

Amplificación y clonación del gen *kmp-11* de *Crithidia spp.*

Con el objetivo de conocer la secuencia de la proteína KMP-11 de *Crithidia spp.* se realizó un ensayo de PCR haciendo uso de los oligonucleótidos KMP11F/R, diseñados con base a la región codificante del gen *kmp-11* de *T. cruzi* (Díez *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2000). A partir de ADN genómico total de *Crithidia spp.* se amplificó una banda del tamaño esperado, aproximadamente 300 pb, de acuerdo a lo encontrado en otras especies de kinetoplastidos como *T. cruzi* y *T. rangeli* (Díez *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2000). Di-

cho fragmento fue clonado en el plásmido pGEM®-T Easy, seleccionándose dos colonias recombinantes al azar, denominadas clones CK1 y CK3. Luego de digestión con la endonucleasa de restricción *EcoRI* (corta a ambos lados del sitio múltiple de clonación del vector), estos clones, liberaron un inserto del tamaño esperado (figura 1A); los cuales fueron analizados median-

te “*Southern blot*” utilizando el gen *kmp-11* de *T. rangeli* marcado con biotina como sonda en los experimentos de hibridación (Díez *et al.*, 2005). Los fragmentos de aproximadamente 300 pb generados, en cada caso, mostraron una fuerte señal de hibridación, sugiriendo que los mismos corresponden al gen *kmp-11* de *Crithidia spp.* (figura 1B).

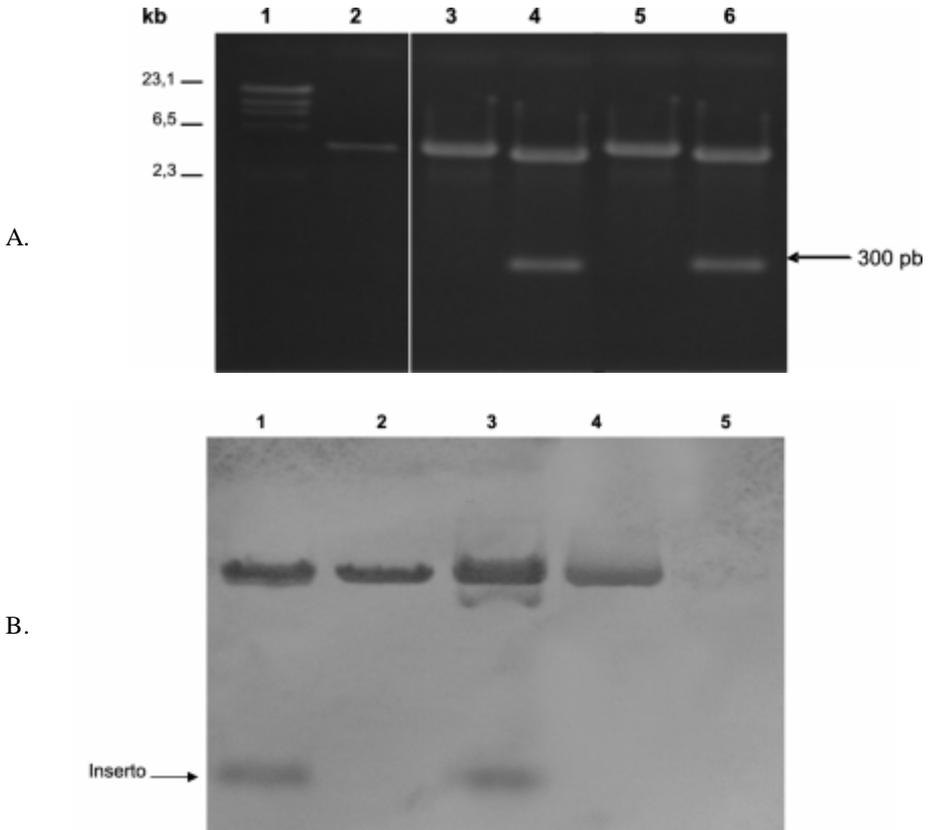


FIGURA 1. Identificación de los genes *kmp-11* de *Crithidia spp.* (A) Digestión del ADN plasmídico de los clones CK1 y CK3 con la endonucleasa de restricción *EcoRI*. El ADN de los clones CK1 y CK3 fue digerido con la enzima *EcoRI*, resuelto en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz UV. 1: patrón de peso molecular fago λ -HindIII (Promega), 2: ADN plasmídico del vector pBS sin digerir, 3: ADN plasmídico del clon CK1 sin digerir, 4: CK1 digerido con *EcoRI*, 5: ADN plasmídico del clon CK3 sin digerir, 6: CK3 digerido con *EcoRI*. (B) Análisis de “*Southern blot*” del ADN plasmídico de los clones CK1 y CK3 hibridado con el gen *kmp-11* de *T. rangeli*. El ADN plasmídico fue digerido y transferido a un soporte sólido para ser hibridado con el gen *kmp-11* de *T. rangeli* marcado con biotina. 1: ADN plasmídico del clon CK3 digerido con *EcoRI*, 2: CK3 sin digerir, 3: ADN plasmídico del clon CK1 digerido con *EcoRI*, 4: CK1 sin digerir, 5: ADN plasmídico de pBS sin digerir.

Genes *kmp-11* de *Crithidia* spp.

El análisis de la secuencia de los clones CK1 (n° de acceso al GenBank DQ194339) y CK3 (n° de acceso al GenBank DQ194340), mostradas en la figura 2A, confirmó que dichos clones contienen un único marco de lectura abierto (ORF) de 279 pb, el cual codifica para una proteína de 92 aminoácidos (figura 2B). El análisis comparativo de la secuencia de nucleótidos de

los clones CK1 y CK3 mostró una identidad de 99,6% entre ellos, debido a una diferencia en el nucleótido (nt) 41 consistente en un cambio de una A por G en la secuencia del clon CK3 respecto a la secuencia del clon CK1 (figura 2A). Este hecho indica que ambos clones portan secuencias de dos copias diferentes del gen *kmp-11* de *Crithidia* spp. Interesantemente, dicho cambio en la secuencia de nucleótidos afecta a la secuencia de aminoácidos, donde

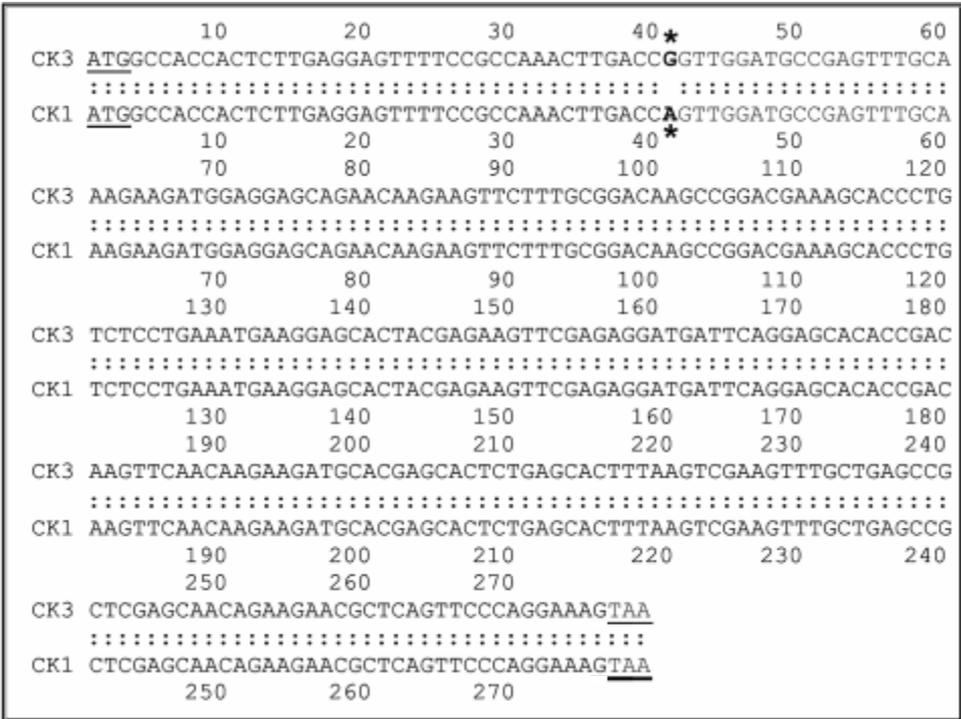


FIGURA 2. (A) Alineamiento de las secuencias de nucleótidos del gen *kmp-11* de *Crithidia* spp. Secuencia de nucleótidos de los clones CK1, copia A (DQ194339) y CK3, copia B (DQ194340), correspondientes a la proteína KMP-11 de *Crithidia* spp. En negrilla y con asterisco se denota la diferencia entre las secuencias y subrayados los codones de inicio y parada del gen. (B) Alineamiento de las secuencias deducidas de aminoácidos de la proteína KMP-11 de *Crithidia* spp. Secuencia de aminoácidos de los clones CK1 y CK3, correspondiente a la proteína KMP-11 de *Crithidia* spp. Con asterisco se denota la diferencia entre las secuencias. ● indica los dos posibles sitios de fosforilación de la casein cinasa II, ■ indica los dos posibles sitios de fosforilación de la proteína cinasa C, en negrilla se denota el sitio de unión a calcio, subrayado se indican los aminoácidos que comprenden las dos α -hélices teóricas.

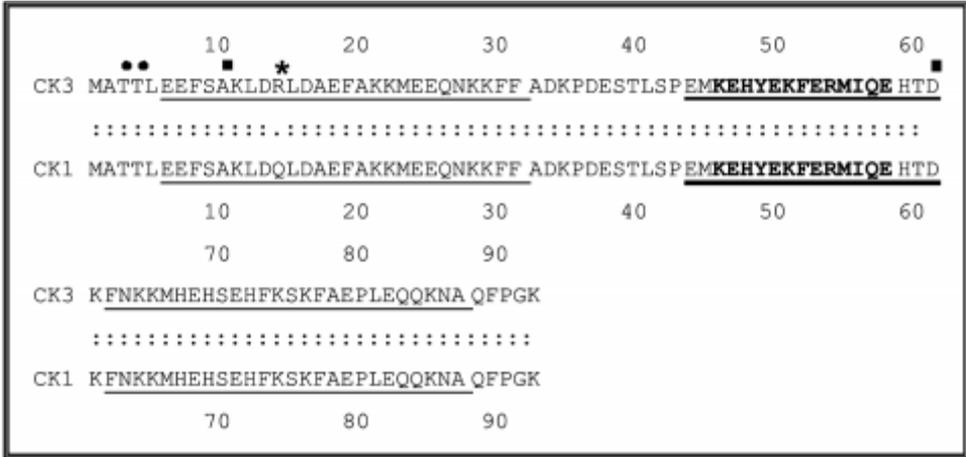


FIGURA 2. (B)

una glutamina (Q₁₄) en el clon CK1 se corresponde con una Arginina (R₁₄) en la secuencia del clon CK3, presentando estas proteínas una identidad de 98,9% (figura 2B). Este cambio de nucleótido afecta a la diana de restricción *AgeI* que en dicha posición se encuentra en el clon CK3, posición 39, y no en el clon CK1.

Análisis adicionales de la secuencia de nucleótidos de ambos clones mostraron que el clon CK2 presenta un contenido de GC de 49,82% y el CK3 de 50,18%. Asimismo ambos clones exhiben una fuerte preferencia por determinados codones; por ejemplo, 4/5 residuos de D son codificados por GAC, 13/15 residuos de E son codificados por GAG, 5/5 residuos de H son codificados por CAC, 14/15 residuos de K son codificados por AAG y 5/6 residuos de glutamina (Q) son codificados por GAG (figura 2).

Análisis comparativos de la secuencia de nucleótidos de los clones CK1 y CK3 con la secuencia de la proteína KMP-11 de otros tripanosomátidos, indican que los genes de *Crithidia spp.* poseen una identidad de 96,5% con las secuencias reportadas para

varias cepas de *T. rangeli*, de 87,5% con *T. cruzi*, de 85,5% con varias especies de *Leishmania* y de 83% con *T. brucei*.

Proteína KMP-11 de *Crithidia spp.*

La secuencia deducida de aminoácidos de la proteína KMP-11 de *Crithidia spp.* corresponde a una secuencia de 92 aminoácidos con un peso molecular equivalente a 11 kDa y un punto isoelectrónico teórico de 5,8 (Gasteiger *et al.*, 2005). Un análisis realizado con el programa PROSITE (Hulo *et al.*, 2006) a la secuencia deducida de aminoácidos, mostró que dicha proteína posee 4 posibles sitios de fosforilación, dos de ellos dependientes de la proteína cinasa C y los otros dos dependientes de la caseína cinasa II. Llamativamente, la proteína también presenta los motivos de unión a calcio descritos en las proteínas KMP-11 de tripanosomas (Fuertes *et al.*, 2001) (figura 2B). Análisis teórico de la estructura secundaria realizado con el programa GOR IV (Garnier *et al.*, 1996) reveló la presencia de dos α -hélices separadas por una vuelta, igual a lo reportado para otras proteínas KMP-11 (Díez *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2000; Stebeck *et al.*, 1995). Finalmente, el análisis de identidad de la proteína KMP-

11 de *Crithidia spp.* con respecto a las otras proteína KMP-11 reportadas en la base de datos de "Swiss-prot" mostró que dicha proteína presenta una identidad del 95,4% con su ortóloga en *T. rangeli*, del 95% con la de *T. cruzi*, del 90% con la de *T. brucei* y del 79,6% con la KMP-11 reportada para varias especies de *Leishmania*.

Análisis filogenético de la proteína KMP-11 de *Crithidia spp.* con sus ortólogos de otros tripanosomátidos

Las secuencias de nucleótidos de la proteína KMP-11 de *Crithidia spp.* se compararon con las secuencias respectivas de otros tripanosomátidos disponibles en la base de datos del "GenBank". El análisis mostró 12 árboles igualmente parsimoniosos, de 151 pasos. Las secuencias de *Crithidia spp.* se agruparon con las secuencias de *T. rangeli*, con un *bootstrap* de 100% (figura 3).

DISCUSIÓN

La presencia de la proteína de membrana de 11 kDa de los kinetoplastidos (KMP-11) ha sido detectada en algunos miembros de la familia *Trypanosomatidae* como *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Leptomonas*, *Phytomonas* y *Crithidia* (Stebeck *et al.*, 1995). Sin embargo, la caracterización de sus genes sólo ha sido realizada en parásitos pertenecientes a los géneros *Trypanosoma* (Díez *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2000; Bridge *et al.*, 1998; Stebeck *et al.*, 1995) y *Leishmania* (Ramírez *et al.*, 1998; Berberich *et al.*, 1997ab; Jardim *et al.*, 1995a, b). Es así como, en el presente trabajo se reporta la secuencia de nucleótidos para dicha proteína en el género *Crithidia*.

La proteína KMP-11 de *Crithidia spp.* se encuentra codificada por un marco abierto de lectura de 279 pb, igual a lo reportado para este mismo gen en *L. donovani* (Jardim

et al., 1995a), *T. brucei* (Bridge *et al.*, 1998), *T. cruzi* (Thomas *et al.*, 2000) y *T. rangeli* (Díez *et al.*, 2005), presentando además una elevada identidad tanto en su secuencia de nucleótidos como en la secuencia deducida de aminoácidos. En consonancia con estos resultados, la proteína KMP-11 de *Crithidia spp.* comparte las características físico-químicas presentadas por las proteínas KMP-11 de tripanosomas y leishmania como peso molecular de 11 kDa y estructura secundaria caracterizada por la presencia de dos hélices alfa separadas por un segmento enrollado al azar, así como también sus motivos de fosforilación y unión a calcio (Díez *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2000; Bridge *et al.*, 1998; Jardim *et al.*, 1995a). En conjunto, estos hallazgos confirman el carácter conservado de esta proteína a nivel de tripanosomátidos y sugieren un papel relevante de la misma en estos protozoarios.

Teniendo en cuenta que los genes *kmp-11* se encuentran repetidos en otros protozoos pertenecientes al orden *Kinetoplastida* (Jardim *et al.*, 1995^a; Thomas *et al.*, 2000; Díez *et al.*, 2005) y el polimorfismo observado a nivel de nucleótidos entre los clones CK1 y CK2, se propone designar las secuencia correspondientes a los clones CK1 y CK3 como las copias A y B. Polimorfismos de restricción han sido observados igualmente entre las copias del gen *kmp-11* de *T. rangeli*, las cuales difieren en su patrón de restricción para las enzimas *Xho I* y *Xmn I* (Díez *et al.*, 2005). La variación entre las secuencias de nucleótidos de las copias A y B de *Crithidia spp.* también afecta la secuencia de aminoácidos, observándose un cambio conservativo, los cuales han sido igualmente encontrados en *T. rangeli*, en donde una de las cuatro copias presenta 3 modificaciones, mientras que en *T. cruzi* sólo ocurre delección de la lisina carboxilo terminal en una de las cuatro copias y en *T. brucei* las copias no exhiben

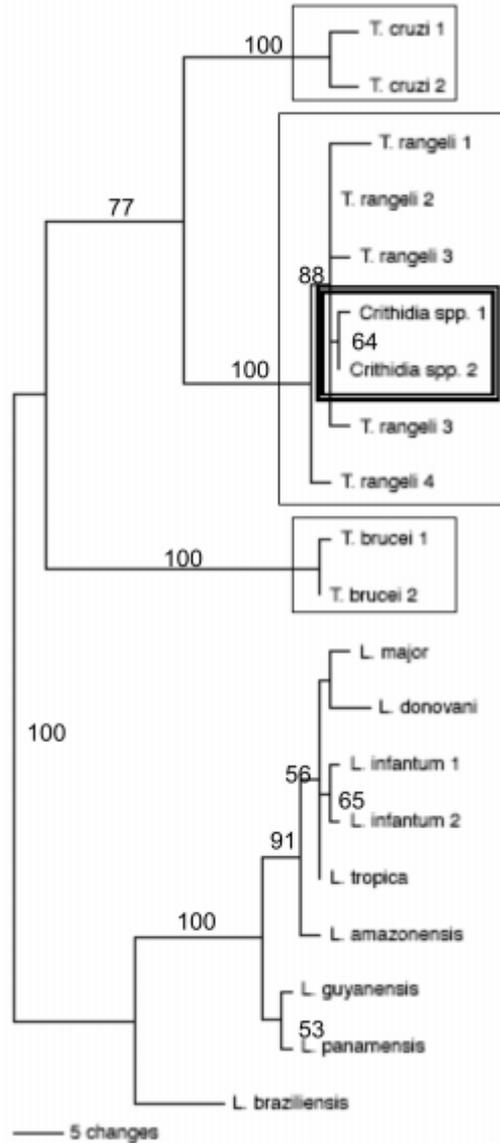


FIGURA 3. Análisis filogenético de *Crithidia* spp. Se compararon las secuencias de nucleótidos de la proteína KMP-11 en *Crithidia* spp. con las secuencias reportadas de este mismo gen en el GenBank. Se muestra uno de los 12 árboles más parsimoniosos con sus valores *bootstrap*. Secuencias GenBank: *Crithidia* spp.1 (DQ194339); *Crithidia* 2 (DQ194340); *T. rangeli* 1 (AY325812), *T. rangeli* 2 (DQ194342; AY147901; DQ194343); *T. rangeli* 3 (DQ194344); *T. rangeli* 4 (DQ194349); *T. rangeli* 5 (DQ194341); *T. cruzi* 1 (AF167435); *T. cruzi* 2 (AJ000077); *T. brucei* 1 (XM_822500); *T. brucei* 2 (XM_822499); *L. major* (AY490814); *L. guyanensis* (AF026141); *L. panamensis* (U93579); *L. infantum* 1 (X95627); *L. infantum* 2 (X95626); *L. tropica* (AJ000078); *L. donovani* (S77039); *L. amazonensis* (AF193432); *L. braziliensis* (AF142990).

polimorfismo en su secuencia de aminoácidos (Díez *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2000; Bridge *et al.*, 1998).

Análisis de comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína KMP-11 de *Crithidia spp.* y la de otros tripanosomátidos, mostró que dicha proteína presenta una identidad mayor cuando se compara con su ortóloga de varias especies de *Trypanosoma* que con *Leishmania*. De hecho, análisis filogenético realizado con la secuencia de nucleótidos de la proteína KMP-11 de *Crithidia spp.* y la secuencia de dicho gen en otros tripanosomátidos reportados en la base de datos de GenBank, mostró que las secuencias de *Crithidia spp.* se agrupan con un clado de secuencias de *T. rangeli*. De forma que la comparación de estas secuencias sitúa a *Crithidia spp.* próxima a *T. rangeli*, *T. cruzi* y *T. brucei* en lugar de a *Leishmania* como ha sido previamente reportado por análisis usando los genes codificantes para la unidad pequeña ribosomal (SSU RNA) y para la unidad grande ribosomal (LSU RNA) (Stevens *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 1993). Por tanto, los resultados obtenidos mediante el análisis filogenético de la proteína KMP-11 de *Crithidia spp.* sustentan el carácter polifilético del género, lo que coincide con estudios previos de Maslov y colaboradores (2001) analizando secuencias de ssRNA y con estudios de mínima evolución y máxima parsimonia del 18s RNA que soportan el carácter polifilético de los géneros *Leptomonas*, *Blastocrithidia*, *Herpetomonas* y *Crithidia* (Hughes y Piontkivska, 2003).

Por otro lado, teniendo en cuenta la actual discusión sobre el origen del parasitismo en insectos y vertebrados (Hughes y Piontkivska, 2003; Maslov *et al.*, 2001; Stevens *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 1993), vale la pena resaltar la alta identidad en-

contrada para la proteína KMP-11 entre *T. rangeli* (parásito digenético) y *Crithidia spp.* (parásito monogenético), especies que a pesar de mostrar estilos de vida diferentes son patógenas para el hospedero invertido que parasitan. A pesar de que la abundancia de la proteína KMP-11 es menor en *Crithidia fasciculata*, comparada con la expresión de la misma en los estadios desarrollados en el vector tanto infectivos como no infectivos en *Leishmania* y en *Trypanosoma* (Stebeck *et al.*, 1995), su presencia en *Crithidia* kinetoplastido monogenético, es indicativo de la relevancia de esta proteína en el insecto vector.

Teniendo en cuenta que al utilizar los genes *kmp-11* para el análisis filogenético, se logró agrupar a los géneros monofiléticos tripanosomas y leishmanias en clados diferentes, distinguiéndose incluso a nivel de especie en tripanosomas y de origen geográfico en leishmanias; se hace interesante continuar con la caracterización de la proteína KMP-11 en otras especies de tripanosomátidos y ampliar su búsqueda en otros kinetoplastidos.

CONCLUSIONES

Se amplificaron y secuenciaron los genes codificantes para la proteína KMP-11 de *Crithidia spp.*, evidenciándose la presencia de, al menos, dos copias diferentes en el genoma del parásito.

La comparación de esta secuencia con la de otros tripanosomátidos sitúa a *Crithidia spp.* próxima a *T. rangeli*, en lugar de a *Leishmania*, *Leptomonas* y *Endotrypanum* como ha sido reportado por los análisis filogenéticos usando los genes codificantes para la subunidad pequeña ribosomal, en el caso de *C. fasciculata*.

Los resultados obtenidos sustentan el carácter polifilético del género *Crithidia*

spp., con algunas especies aliadas a *Trypanosoma* y otras a *Leishmania*; siendo necesario ampliar el muestreo de cepas de *Crithidia* y otros kinetoplástidos con este gen para confirmar este resultado.

AGRADECIMIENTOS

A Marleny Montilla y al doctor Rubén Santiago Nicholls del Instituto Nacional de Salud (INS) de Bogotá, DC, por proporcionar la cepa de *Crithidia spp.*

LITERATURA CITADA

- ALTSCHUL S.F., MADDEN, T.L., SCHÄFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. y LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25, 3389-402.
- APPEL, R.D., BAIROCH, A. Y HOCHSTRASSER, D.F. A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExPASy WWW server. *Trends in Biochemical Sciences*, 1994, 19, 258-60.
- BERBERICH, C., FUERTES, M.A., MACHADO, G. y ALONSO, C. KMP-11, una proteína abundante en la superficie de los kinetoplástidos. *Ars Pharmaceutica*, 1997a, 38, 237-44.
- BERBERICH, C., REQUENA, J. y ALONSO, C. Cloning of genes and expression and antigenicity analysis of the *Leishmania infantum* KMP-11 protein. *Experimental Parasitology*, 1997b, 85, 105-8.
- BRIDGE, M.A., ZHOU, Q., KOOP, B.F. y PEARSON, T.W. Cloning and characterization of the kinetoplastid membrane protein-11 gene locus of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1998, 91, 359-63.
- BRIONES, M.R.S., NELSON, K., BEVERLEY, S.M., AFFONSO, H.T., CAMARGO, E.P. y FLOETER-WINTER, L.M. *Leishmania tarentolae* taxonomic relatedness inferred from phylogenetic analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1992, 53, 121-8.
- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16, 10881-90.
- DÍEZ, H., LÓPEZ, M.C., THOMAS, M.C. y PUERTA, C. KMP-11, Proteína 11 de membrana de kinetoplástidos. *Universitas Scientiarum*, 2004, 9, 29-44.
- DÍEZ, H., THOMAS, M.C., URUEÑA, C.P., SANTANDER, S.P., CUERVO, C.L., LÓPEZ, M.C. y PUERTA, C.J. Molecular characterization of the kinetoplastid membrane protein-11 genes from the parasite *Trypanosoma rangeli*. *Parasitology*, 2005, 130, 643-51.
- FERNÁNDEZ, A.P., NELSON, K. y BEVERLEY, S.M. Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: perspectives on the age and origins of parasitism. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 1993, 90, 11608-12.
- FUERTES, M.A., PÉREZ, J.M., SOTO, M., LÓPEZ, M.C. y ALONSO, C. Calcium-induced conformational changes in *Leishmania infantum* kinetoplastid membrane protein-11. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2001, 6, 107-17.
- GARNIER, J., GIBRAT, J.F. y ROBSON, B. GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid

- sequence. *Methods in Enzymology*, 1996, 266, 540-53.
- GASTEIGER, E., GATTIKER, A., HOOGLAND, C., IVANYI, I., APPEL, R.D. y BAIROCH, A. ExpASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31, 3784-8.
- GASTEIGER, E., HOOGLAND, C., GATTIKER, A., DUVAUD, S., WILKINS, M.R., APPEL, R.D. y BAIROCH, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExpASy Server, en: Walker, J.M (ed.). *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press, 2005, 571-607.
- GÓMEZ, E., VALDÉS, A.M., PINERO, D. y HERNÁNDEZ, R. What is a genus in the *Trypanosomatidae* family? Phylogenetic analysis of two small rRNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 1991, 8, 254-9.
- HERNÁNDEZ, R., RÍOS, P., VALDÉS, A.M. y PINERO, D. Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1990, 41, 207-12.
- HUGHES, A.L. y PIONTKIVSKA, H. Phylogeny of *Trypanosomatidae* and *Bodonidae* (Kinetoplastida) Based on 18S rRNA: Evidence for Paraphyly of *Trypanosoma* and Six Other Genera. *Molecular Biology and Evolution*, 2003, 20, 644-52.
- HULO, N., BAIROCH, A., BULLIARD, V., CERUTTI, L., DE CASTRO, E., LANGENDIJK-GENEVAUX, P.S., PAGNI, M. y SIGRIST, C.J. *The PROSITE database*. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34, D227-30.
- JARDIM, A., HANSON, S., ULLMAN, B., MCCUBBIN, W.D., KAY, C.M. y OLAFSON, R.W. Cloning and structure-function analysis of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11. *The Biochemical Journal*, 1995a, 305, 315-20.
- JARDIM, A., FUNK, V., CAPRIOLI, R.M. y OLAFSON, R.W. Isolation and structural characterization of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein. *The Biochemical Journal*, 1995b, 305, 307-13.
- KLINGBEIL, M.M., DREW, M.E., LIU, Y., MORRIS, J.C., MOTYKA, S.A., SAXOWSKY, T.T., WANG, Z. y ENGLUND, P.T. Unlocking the secrets of Trypanosome kinetoplast DNA network replication. *Protist*, 2001, 152, 255-62.
- KLINGBEIL, M.M. y ENGLUND, P.T. Closing the gaps in kinetoplastid DNA network replication. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 2004, 13, 4333-4.
- LUKES, J., GUILBRIDE, D.L., VOTYPKA, J., ZIKOVA, A., BENNE, R. y ENGLUND, P.T. Kinetoplast DNA network: Evolution of an improbable structure. *Eukaryotic Cell*, 2002, 4, 495-502.
- MASLOV, D.A., PODLIPAEV, S.A. y LUKES, J. Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2001, 96, 397-402.
- MORRIS, J.C., DREW, M.E., KLINGBEIL, M.M., MOTYKA, S.A., SAXOWSKY, T.T., WANG, Z. y ENGLUND, P.T. Replication of kinetoplastid DNA: an update for the new millennium. *International Journal for Parasitology*, 2001, 31, 453-8.

- PEARSON, W.R. Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods in Enzymology*, 1990, 183, 63-98.
- PLANELLES, L., THOMAS, M.C., ALONSO, C. y LÓPEZ, M.C. DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* HSP70 fused to the KMP11 protein elicits a cytotoxic and humoral immune response against the antigen and leads to protection. *Infection and Immunity*, 2001, 69, 6558-63.
- PUERTA, C. y URUEÑA, C.P. *Prácticas de biología molecular*, 1ª edición, Editorial Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, DC, 2005, 104.
- RAMÍREZ, J.R; BERBERICH, C., JARAMILLO, A., ALONSO, C. y Vélez, I.V. Molecular and antigenic characterization of the *Leishmania (Viannia) panamensis* kinetoplastid membrana protein-11. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1998, 93, 247-54.
- SANGER, F., NICKLEN, S. y COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 1977, 74, 5463-7.
- SAMBROOK, J.F. y RUSSELL, D.W. Gel electrophoresis of DNA and pulsed-field agarose gel electrophoresis, en: *Molecular cloning. A laboratory manual*, Third ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 2001, 5.4-13.
- SINHA, K.M; HINES, J.C., DOWNEY, N. y RAY, D.S. Mitochondrial DNA ligase in *Crithidia fasciculata*. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 2004, 101, 4361-6.
- STEBECK, C.E., BEECROFT, R.P., SINGH, B.N., JARDIM, A., OLAFSON, R.W., TUCKEY, C., PRENEVOST, K.D. y PEARSON, T.W. Kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) is differentially expressed during the life cycle of African trypanosomes and is found in a wide variety of kinetoplastid parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1995, 71, 1-13.
- STEVENS, J.R., NOYES, H.A., SCHOFIELD, C.J. y GIBSON, W. The molecular evolution of *Trypanosomatidae*. *Advances in Parasitology*, 2001, 48, 1-56.
- TANOWITZ, H.B., KIRCHHOFF, L.V., SIMON, D., MORRIS, S.A., WEISS, L.M. y WITTNER, M. Chagas' disease. *Clinical Microbiology Review*, 1992, 5, 400-19.
- THOMAS, M.C., GARCÍA-PÉREZ, J.L., ALONSO, C. y LÓPEZ, M.C. Molecular characterization of KMP11 from *Trypanosoma cruzi*: a cytoskeleton-associated protein regulated at the translational level. *DNA and Cell Biology*, 2000, 19, 47-57.

Recibido: 15-02-2007

Aprobado: 30-08-2007