

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

U. N. A. M.

**CARACTERIZACION DE PROTEINAS RIBOSOMALES
DE
Entamoeba histolytica**

T E S I S P R O F E S I O N A L
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
LICENCIATURA EN LA CARRERA DE BIOLOGIA
P R E S E N T A
MIGUEL ANGEL VARGAS MEJIA

SAN JUAN IZTACALA, MEXICO

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Esther Orozco Orozco.

Esta tesis es parte del Proyecto "Conjugación y Transformación Genética en Entamoeba histolytica", subvencionado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Esther Orozco Orozco por la dirección, colaboración apoyo y confianza en la realización de esta tesis.

A el Dr. Samuel Zinker por su asesoría y colaboración en la realización de esta tesis.

A el Biol. Pedro Chávez Olmos por su colaboración en la preparación de las muestras ribosomales para microscopía electrónica.

A el Sr. Catarino Villeda por la realización de los montajes de las fotos.

A todos los integrantes de el laboratorio No. 8 del Departamento de Genética y Biología Molecular.

A mis Maestros de la E.N.E.P.I.-U.N.A.M.

A mis Amigos y enemigos.

A Mi Madre con Amor.

A la Memoria de Mi Padre y

mi Hermano.

Con Cariño a mis Hermanos.

I N D I C E

LISTA DE REACTIVOS	iii
LISTA DE FIGURAS	V
ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
Taxonomía de <u>E. histolytica</u>	3
Ciclo biológico de <u>E. histolytica</u>	7
Epidemiología de <u>E. histolytica</u>	7
Patogenia	8
Morfología de <u>E. histolytica</u>	9
Obtención de energía y nutrición	10
Ribosomas	11
Proteínas ribosomales	15
La emetina	18
OBJETIVOS	21
MATERIALES Y METODOS	22
RESULTADOS	36
DISCUSION	55
CONCLUSIONES	60
APENDICE	62
BIBLIOGRAFIA	63

REACTIVOS

1. Acido acético glacial	Merck.
2. Acido clorhídrico	Merck.
3. Acetato de Potasio	Baker.
4. Acetona	Merck.
5. Acrilamida	Bio-Rad Laboratories.
6. Acido etilen-diamino-tetracético	Sigma.
7. Agarosa	BDH.
8. Azul de bromofenol	Merck.
9. Azul de Coomassie	Merck.
10. Biosate peptona	B B L.
11. Bis-acrilamida	Bio-Rad Laboratories.
12. Bis-tris	Sigma.
13. Brij 58	Sigma.
14. Cloruro de magnesio	Merck,
15. Cloruro de sodio	Sigma.
16. Desoxicolato de sodio	Sigma.
17. Duodecil sulfato de sodio	B D H.
18. Formaldehído	Merck.
19. Fuscina básica	Merck.
20. Glicerol	Merck.
21. Hepes	Sigma.
22. Hidróxido de sodio	Sigma.
23. 2-mercaptoetanol	Sigma.
24. Metanol	Merck.

25. Nitrato de plata	Merck.
26. Nonidel P-40	B D H.
27. Parahidroximercuribenzoato	Sigma.
28. Persulfato de amonio	Bio-Rad.
29. Sacarosa	Merck.
30. Sulfato cúprico	Baker.
31. Sulfato de sodio	Merck.
32. Tartrato de sodio y potasio	Sigma.
33. TEMED	Bio-Rad.
34. Tris-base	Sigma.
35. Tris-HCl	Sigma.
36. Urea	Sigma.
Enzimas:	
RNAse A	Sigma.
RNAse T-1	Sigma.
Suero:	
De Ternera	Laboratorios Biocel (México).
Antibióticos:	
Puromicina	Sigma.
Penicilina	Lavieside.
Estreptomina	Lavieside.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo molecular de la droga emetina.

Figura 2. Sensibilidad de E. histolytica (clona A) a emetina.

Figura 3. Sensibilidad de E. histolytica (clona C₉) a emetina.

Figura 4. Migración de proteínas de peso molecular conocido en geles de poliacrilamida SDS.

Figura 5. Análisis electroforético unidimensional de las proteínas ribosomales totales de la clona A (Emt^S).

Figura 6. Análisis electroforético unidimensional de las proteínas ribosomales totales de la clona A (Emt^S) tratadas con KCl, a una concentración de 240 mM.

Figura 7. Análisis electroforético unidimensional de las proteínas ribosomales totales de la clona A (Emt^S) tratadas con puromicina y KCl a una concentración final de 0.5 M.

Figura 8. Análisis electroforético unidimensional de las proteínas ribosomales totales de la clona A (Emt^S) tratadas con puromicina y KCl a una concentración final de 0.88 M.

Figura 9. Análisis electroforético unidimensional de las proteínas no ribosomales, extraídas de los ribosomas amibianos con KCl 0.88 M y puromicina.

Figura 10. Análisis electroforético unidimensional de las proteínas ribosomales totales de la clona A (Emt^S) tratadas con KCl 0.88 M y RNAsas.

Figura 11. Análisis electroforético unidimensional de las proteínas ribosomales totales de la clona A (Emt^S) y C₉ (Emt^R).

Figura 12. Análisis electroforético unidimensional de las proteínas ribosomales totales de la clona A (Emt^S) y C₉ (Emt^R), tratadas con KCl a una concentración final de 240 mM.

Figura 13. Análisis electroforético bidimensional pH 8.6 x pH 4.5 de las proteínas ribosomales ácidas de la clona A (Emt^S) y C₉ (Emt^R).

Figura 14. Análisis electroforético bidimensional pH 8.6 x pH 4.5 de las proteínas ribosomales básicas de la clona C₉ (Emt^R).

Figura 15. Análisis electroforético bidimensional pH 8.6 x pH 4.5 de las proteínas ribosomales básicas de Saccharomyces cerevisiae.

Figura 16. Análisis electroforético bidimensional pH 5.0 x SDS de las proteínas ribosomales básicas totales de las clonas A (Emt^S), C₉ (Emt^R) de E. histolytica y de Saccharomyces cerevisiae.

Figura 17. Microscopía electrónica de ribosomas de E. histolytica.

ABREVIATURAS

BSA	Albúmina sérica bovina.
CHO	Células de ovario de hamster.
DOC	Deoxicolato de sodio.
EDTA	Acido etilen-diamino-tetracético.
E ^S	Emetina sensible.
E ^R	Emetina resistente.
NP-40	Nonidel NP-40.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
TCA	Acido tricloro acético.
TEMED	N',N',N'-tetrametiletildiamino.
TYS-I-33	Medio para amibas.

(Ver apéndice).

RESUMEN

En este trabajo reportamos el estudio de las proteínas ribosomales de Entamoeba histolytica utilizando como modelo de estudio las clonas A, sensible a emetina (E_{mt}^S) y C_9 resistente a emetina (E_{mt}^R). Las proteínas ribosomales de ambas clonas se aislaron y se analizaron tanto en geles unidimensionales como en bidimensionales. En la electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida SDS se observó la presencia de proteínas mayores a 68,000 daltones generalmente no reportados en otros sistemas. El análisis densitométrico de los geles detectó 125 proteínas de un rango de peso molecular de 14,000 hasta 112,000 daltones. Mediante estos métodos de análisis electrofórico el patrón varía según el protocolo de extracción de las proteínas siendo más útil el protocolo propuesto por Horac y Schiffman, D. (1977), ya que las proteínas de bajo peso molecular tienen mayor resolución. En los geles bidimensionales pH 8.6 X pH 4.5 se analizaron las proteínas ribosomales ácidas y básicas pudiéndose detectar solo 4 proteínas ácidas semejantes en las dos clonas A (E_{mt}^S) y C_9 (E_{mt}^R) y 44 manchas de proteínas ribosomales totales de tipo básico en la clona C_9 (E_{mt}^R). Las proteínas ribosomales básicas de ambas clonas se analizaron también en geles bidimensionales pH 4.5 X SDS mediante la técnica propuesta por Mets y Bogorad (1974) modificado por Gorenstein y Warner (1976). Mediante esta técnica se detectaron también varias manchas de proteínas ribosomales que corresponden a cuando menos 44 proteínas ribosomales de tipo básico en las clonas A (E_{mt}^S) y C_9 (E_{mt}^R). El análisis comparativo de las proteínas ribosomales de las clonas analizadas en geles bidimensionales pH 4.5 x SDS mostró varias diferen-

cias cuantitativas y cualitativas en las clonas. Dos proteínas modificadas de 42 Kd y 18 Kd, están aparentemente modificadas en la clona mutante (Emt^R). Además, en comparación con las proteínas ribosomales básicas de Saccharomyces cerevisias se observó en Entamoeba histolytica la ausencia de una de las proteínas de la fracción 60 S, clasificada como la número dos en un sistema bidimensional pH 4.5 x SDS en la levadura por Gorenstein y Warner (1976).

INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

Clasificación Taxonómica de Entamoeba histolytica

Phylum	Protozoa
Subphylum	Sarcomastigophora
Superclase	Sarcodina
Clase	Rhizopoda
Orden	Amoebida
Familia	Entamoebidae
Género	Entamoeba
Especie	<u>Entamoeba histolytica</u> (Faust y col. 1975).

PHYLUM PROTOZOA (protos= primero, zoo= animal)

La mayor parte de los protozoarios poseen todas las estructuras celulares típicas de un eucariote: mitocondrias, núcleo, nucleolo, vacuolas, retículo endoplásmico, etc., de tal manera que aunque un protozoo sea unicelular es un organismo completo, ya que en su estructura se llevan a cabo todas las funciones propias de un animal multicelular. El cuerpo del protozoo está limitado por una membrana celular típica de células eucarióticas. En el citoplasma se pueden observar tanto el ectoplasma como el endoplasma, este último es más fluido. El núcleo es casi siempre vesiculado, contiene buena cantidad de nucleoplasma y uno o más nucleolos llamados a veces endosomas.

Los órganos locomotores pueden ser flagelos, cilios o pseudópodos. Los protozoos contienen vacuolas contráctiles, las cuales

brindan equilibrio hídrico. Pueden ser autótrofos, saprozóicos, halozóicos y la digestión ocurre intracelularmente mediante vacuolas digestivas, las cuales sufren cambios en pH, ya que las vacuolas digestivas tienen características ácidas antes de que se fusionan con el fagosoma de tal manera que al entrar las enzimas lisosomales al fagosoma, el medio de éste se alcaliniza. Los protozoos son anaerobios facultativos, su principal producto de desecho metabólico es el amoníaco.

El tipo de reproducción de los protozoos es asexual, en el cual encontramos las modalidades de fisión binaria, gemación y eziisogonia, también se puede observar en ellos reproducción sexual tal como se observa en algas. El enquistamiento es una característica del ciclo vital de muchos protozoos, que les permite sobrevivir bajo condiciones adversas en el medio ambiente, esta resistencia a las condiciones adversas esta dada por la formación de una pared rígida de quitina en los quistes de amibas, que le sirve como protección contra la temperatura, desecación o de dispersión tanto por el viento, corriente de agua así como de otros agentes de contaminación tales como la materia fecal. (Barnes, R. 1977).

SUBPHYLUM SARCOMASTIGOPHORA

Son protozoos parásitos, que poseen gametos flagelados en alguna de las fases de su ciclo vital. Dentro de los grupos de organismos que conforman este subphylum se puede incluir organismos tales como las amibas, heliozoos y radiolarios.

CLASE RHIZOPODEA

Presentan estructuras del tipo de las lobopodios, filopodios y reticulopodios que participan en su alimentación.

SUBCLASE LOBOSIA

Los pseudópodos de los organismos que pertenecen a esta subclase suelen ser lobopodios. (Barnes, R. 1977).

ORDEN AMOEBIDA

Son protozoarios sin cápsula, verbigracia Pelomyxa amoeba, Entamoeba Hidramoeba. No se ha demostrado en ellos reproducción sexual, son fagotróficos, son habitantes de agua dulce, de aguas marinas, son endozóicos y entre ellos un gran número son parásitos. Los organismos que habitan en agua dulce poseen vacuolas contráctiles, mientras que en las especies endozóicas y en las marinas no se encuentran estas estructuras. Otra estructura que distingue al orden AMOEBIDAE es que tiene la capacidad de formar quistes para su dispersión, como es el caso de Hartmanella y E. histolytica.

FAMILIA ENTAMOEBIIDAE

Son trofozoítos pequeños que habitan en el intestino de invertebrados y de vertebrados, contienen en su citoplasma vacuolas, se multiplican por fisión binaria, forman quistes y la diferencia entre los trofozoítos que parasitan a vertebrados e invertebrados está

basada principalmente en el arreglo de la cromatina nuclear.

GENERO ENTAMOEBA

La amiba responsable del padecimiento de la amibiasis en el humano pertenece al género ENTAMOEBA. Dentro de este género se encuentran un gran número de especies y que pueden clasificar según el número de núcleos del quiste maduro (Tabla I).

TABLA I.

1. Grupo octanucleado.

E. coli que parásita al hombre.

E. musis que parásita al ratón.

2. Grupo tetranucleado.

E. histolytica que parásita al hombre.

E. invadens que parásita a réptiles.

E. ranarum que parásita a ranas.

3. Grupo uninucleado.

E. bovis que parásita al ganado.

E. jeblickin que parásita la cabra.

E. polecki que parásita a los puercos.

4. Especie que no enquista.

E. gingivalis que parásita al hombre.

CICLO BIOLÓGICO DE ENTAMOEBAS HISTOLYTICAS

El ciclo de vida de E. histolytica comprende dos estadios, la forma trofozoítica que normalmente vive en el intestino del ser humano y la forma quística. El trofozoíto se multiplica mediante el proceso de fisión binaria, el cual se lleva a cabo en el intestino del ser humano. El trofozoíto puede pasar del estado vegetativo o trofozoítico al estadioprequistico, éste último al igual que el trofozoíto presenta movilidad, con la diferencia de que el prequiste es de un tamaño menor que el trofozoíto. Bajo ciertas circunstancias aún no definidas el trofozoíto es capaz de invadir el epitelio intestinal y puede de esta forma diseminarse en el organismo del huésped.

Asimismo, el trofozoíto puede enquistarse en el colon del huésped lo que permite que los quistes pueden ser excretados con las heces fecales y que las amibas abandonen al portador e infecten a otro huésped. Por vía oral los quistes llegan nuevamente al intestino en donde pierden su cubierta protectora, liberándose con esto los trofozoítos, completándose de esta forma su ciclo de vida (Arroyo-Begovich, 1981).

EPIDEMIOLOGIA

Se ha reportado que la infección por E. histolytica tiene una distribución universal, afectando en promedio al 20% de la población en el mundo. En México, esta parasitosis se presenta entre el 2% y el 9% de la población (Gutiérrez y col., 1976), predominando en los medios pobres de condiciones sanitarias inadecuadas. El muestreo

de individuos en zonas marginadas mostró, que una gran proporción de personas son portadores sanos y sólo una minoría presentó síntomas de amibiasis, como consecuencia de la invasión tisular amibiana. Por otro lado en 1974 se realizó una encuesta serológica de 20,000 individuos de toda la República Mexicana, se encontró que el 5.95% de las personas poseen anticuerpos contra E. histolytica siendo el grupo más afectado los niños de 5 a 9 años de edad entre los cuales el 6.84% presentó reacción serológica positiva a E. histolytica. La fuente de contagio fue siempre las heces fecales del ser humano enfermo o portador de quistes de E. histolytica y el mecanismo de transmisión se estableció por la ingestión de alimentos o de agua contaminada. (Gutiérrez y col., 1976)

PATOGENIA

Como ya se dijo la infección por E. histolytica se adquiere por la ingestión de quistes. En la mayoría de los casos no se produce enfermedad, pues el parásito vive como comensal inocuo en la luz del intestino, bajo la forma prequística. En determinados casos y por causas desconocidas el trofozoíto es capaz de invadir los tejidos y de producir enfermedad. Diversos factores se han propuesto para explicar porque el trofozoíto puede comportarse como un organismo patógeno o virulento en determinadas circunstancias. Para ello se ha sugerido la existencia de diferentes cepas con diferente grado de virulencia (Sergeant y Williams, 1973), las cuales en determinado momento pueden invadir el epitelio intestinal del huésped, siendo éste favorecido en individuos mal alimentados o desnutridos, (Gutiérrez y Kumate, 1980). También se ha propuesto que la invasión amibiana del huésped, esté in-

timamente relacionada con la coexistencia de trofozoítos de E. histolytica con bacterias enteropatógenas, (Witter y Rosenbeau, 1970). Recientemente se ha propuesto que ciertos factores genéticos e intrínsecos de clonas de E. histolytica tienen un papel muy importante en la Virulencia amibiana (Orozco y col., 1985).

MORFOLOGIA

El trofozoíto de E. histolytica tiene un diámetro aproximado de 22μ , (Martínez-Palomo, 1982). Presenta una membrana plasmática de un grosor de 12μ (González-Robles y Martínez-Palomo, 1983). El citoplasma por su aspecto se divide en ectoplasma y endoplasma. El ectoplasma es de aspecto translúcido, está íntimamente en contacto con la parte interior de la membrana plasmática y se encuentra libre de granulaciones, ocupando una porción reducida del citoplasma. Por el contrario, el endoplasma es granulado y en él se encuentran los fagolisosomas, los cuerpos cromatoides y partículas de glucógeno (Martínez-Palomo y col., 1982). E. histolytica carece de mitocondrias, retículo endoplásmico y de aparato de Golgi (Rosenbaum y Wittner, 1970). El núcleo es esférico y vesiculado, está constituido por una membrana nuclear que presenta en su superficie interna cromatina (Cervantes, 1980). Por otro lado el quiste en fase madura contiene cuatro núcleos. El tamaño es variable, los quistes pequeños miden de 6 a 8μ y de 10 a 14μ los quistes grandes. El quiste está protegido con una pared celular rica en quitina, la cual es fluorescente a la luz ultravioleta. A diferencia del trofozoíto el quiste es altamente resistente a las condiciones ambientales, dado que el quiste puede vivir de 4 a 5

semanas a temperatura ambiente, de 2 a 3 meses de 4°C y 4 meses a 2°C (Elspeth y McConnachie, 1969).

OBTENCION DE ENERGIA Y NUTRICION DE E. HISTOLYTICA

E. histolytica es un protozooario anaerobio facultativo, el producto final de la glicólisis anaerobia en E. histolytica es CO₂ y etanol, pero bajo condiciones aerobias se incrementan la producción de acetato con un consecuente decaimiento en la producción de etanol (Weinbach y Daimond, 1970). Bajo estas mismas condiciones aerobias, Weinbach y col., en 1976 realizaron estudios que demostraron que E. histolytica es capaz de oxidar glucosa, galactosa, etanol, isopropanol, serina, piruvato, NADH y NADPH. Este parásito carece de mitocondrias (Rosebaum y col., 1970), por lo que no se puede pensar en un sistema de transporte de electrones clásico. Igualmente se ha demostrado que este parásito no posee ciclo de Krebs (Weinbach y Daimond, 1974). Sin embargo se han encontrado flavo-proteínas implicadas en un transporte de electrones primitivo. Hsin-Sheng Lo y Richard E. Reves, en el año de 1980 estudiaron la flavin oxidoreductasa de E. histolytica encontrada que tienen una masa relativa de 40,000 daltones y 38,000 daltones de peso molecular, estimado por electroforesis y por filtración en columna. Estos resultados en comparación con lo reportado en otros sistemas eucarióticos demuestran, que las oxidoreductasas de E. histolytica son de un peso mayor (Yubisoi y col., 1977), ya que por ejemplo en eritrocitos se ha encontrado que estas enzimas tienen un peso molecular de 22,000 a 23,000 daltones de masa relativa. Por otro lado se sabe la nutrición de E. histolytica es halozoica y

se lleva a cabo por procesos de fagocitosis y pinocitosis. La degradación de alimentos se efectúa en los fagolisosomas, donde se encuentran diversas enzimas, como lipasas, proteasas, ribonucleasas, etc. (Kudo, 1966).

RIBOSOMAS

Los estudios realizados por Brachet, (1930) y Caspersson, (1940) demostraron que en las células existen partículas diminutas que contienen RNA. Posteriormente Brachet aisló estas partículas diminutas puras, a partir de un extracto celular y encontró que además de contener RNA son ricas en proteínas. Este mismo investigador propuso que el papel de estas partículas denominadas RIBOSOMAS tienen la función dentro de la célula de sintetizar proteínas. Estos resultados fueron más tarde confirmados por otros investigadores quienes observaron los ribosomas mediante microscopía electrónica (Schachman, Parter y Stanier, 1940). Posteriormente Watson y Tissieres a fines de la década de 1950, realizaron estudios cuantitativos de la composición básica del ribosoma, encontrando que el ribosoma está constituido por un 64% de RNA y de 36% de proteínas en células procarióticas. Estos conocimientos dieron la pauta para definir un ribosoma, desde el punto de vista bioquímico, como un agregado multimolecular, cuyas estructuras principales son RNA, proteínas ácidas y proteínas básicas. Esta característica multimolecular ha permitido identificar y aislar los ribosomas puros, ya que estas estructuras absorben luz ultravioleta a 260 nm. Warner y col., 1963 estudiaron las unidades ribosomales de organismos eucarióticos y procarióticos, encontrando diferencias en el

coeficiente de sedimentación de los sistemas estudiados, ya que los ri bosomas de los eucariotes tienen una constante de sedimentación 80 S mientras que de los procariotes tienen constante de sedimentación 70 S. Los ribosomas están constituidos por dos subunidades ribosomales. Sherton y Wool (1974), demostraron que los ribosomas están formados por dos subunidades cuya interacción es sensible al efecto de la fuerza iónica, fundamentalmente a la concentración de magnesio. Es decir, que a bajas concentraciones de magnesio (10^{-5} M) se favorece la disociación de las subunidades que conforman el ribosoma y con altas concentraciones de magnesio (10^{-2} M) se detectan las unidades ribosomales sin disociar. Las constantes de sedimentación de las subunidades ribo somales, varían dependiendo del protocolo de aislamiento. Cuando se utiliza EDTA, las constantes de sedimentación de las subunidades ribosomales eucarióticos, son 50 S y 30 S (Girarde y col., 1965), y en pre sencia de alta concentración de sal las subunidades ribosomales tienen una constante de sedimentación de 60 S y 40 S (Martin y col., 1968). Por otro lado, se han caracterizado los RNAs y las proteínas ribosomales tanto de procariotes como de eucariotes. La caracterización de es tas moléculas está basada principalmente en sus masas relativas y en su secuencia de nucleótidos, así como en las características ácidas y básicas de las proteínas que conforman el ribosoma, como por ejemplo en procariotes la fracción 30 S tienen una molécula de RNAr 16 S forma do por 1600 nucleótidos y 21 proteínas diferentes con pesos moleculares que fluctúan entre 65,000 a 10,000 daltones. La fracción 50 S posee dos moléculas de RNAr, una con 3200 nucleótidos (RNAr 23 S) y otra menor con 120 nucleótidos (RNAr 5 S) así como 33 proteínas

(García y Vázquez, 1977). Asimismo en eucariotes se han encontrado 3 moléculas de RNAr en la fracción 60 S que se han denominado, de acuerdo a su coeficiente de sedimentación, como el 28 S con un peso molecular aproximado a 1.7×10^6 , el 5 S y el 5.8 S tienen un peso molecular aproximado a 0.9×10^6 daltones. Mientras que en la fracción 40 S se encuentra un RNAr 18 S con un peso molecular 0.7×10^6 . El número de proteínas ribosomales que están en la fracción 60 S es de 40, cuyos pesos moleculares fluctúan 11,500 a 41,000 daltones de peso molecular en promedio, mientras que en la fracción 40 S se encuentran 30 proteínas que tienen pesos aproximados de 11,200 a 39,000 daltones (Wool, 1979). Recientemente se han estudiado los ribosomas de organismos eucarióticos, como por ejemplo en hongos, amibas de vida libre, amibas parásitas de poiquiloterms y en células de mamíferos entre otros (Ver más adelante). El estudio de los ribosomas en los diferentes organismos es muy importante desde el punto de vista evolutivo y filogenético, ya que el conocimiento de estas estructuras a un nivel molecular daría más información sobre la posible relación filogenética entre los organismos menos complejos (procariotes) y los más complejos (eucariotes). Ya que se tiene conocimiento de que los coeficientes de sedimentación de los ribosomas cercanos a 80 S pertenecen a los ribosomas típicos de células eucarióticas, mientras que los ribosomas de procariotes tienen un coeficiente de sedimentación cercano a 70 S de la unidad ribosomal. Asimismo se han encontrado ribosomas de mitocondrias y de cloroplastos, que presentan un coeficiente de sedimentación muy bajos (50 S) en relación con lo reportado en otros organismos, lo que apoya la hipótesis de que este tipo de estructuras u organelos de las células eucarió

ticas podría ser algún tipo de célula primitiva (Endosimbiontes). Recientemente se han reportado estudios de ribosomas de hongos que durante su ciclo de vida presenta una fase ameboide, como son en Dictyostelium discoideum y Dictyostelium purpureum, (Ceccarin y Moggio, 1968), encontraron que los coeficientes de sedimentación para la unidad ribosomal de D. purpureum es de 78 S, mientras que para las subunidades ribosomales mayor y menor son de 56.6 S y 36.0 S respectivamente. En D. discoideum, la unidad ribosomal presentó una constante de sedimentación de 86 S y para las subunidades presentó una constante de sedimentación de 60.4 para la fracción mayor y 37.6 para la menor. Los ribosomas de estos hongos son sensibles a las bajas concentraciones de magnesio, siendo estas de 5×10^{-5} M para D. purpureum y de 2.5×10^{-4} M para D. discoideum.

Boublic y Ramagopal, en el año de 1980, también estudiaron los ribosomas de D. discoideum durante dos estadios de su ciclo de vida, tanto en la fase de espora como en la forma vegetativa, encontrando diferencias estructurales en los ribosomas, estas diferencias fueron detectadas mediante estudios de difracción circular óptica y desnaturalización térmica de los ribosomas enteros y de las subunidades.

Para las subunidades en estadio de espora la desnaturalización térmica es de 42°C mientras que en el estadio ameboide es de 45°C. Asimismo, la unidad ribosomal en el estadio de espora presentó una mayor estabilidad, ya que se desnaturalizó hasta los 58°C, mientras que los ribosomas en la fase ameboide se desnaturalizaron hasta los 54°C. Por otro lado, mediante difracción circular óptica, se de-

terminó que los ribosomas del hongo en el estadio vegetativo poseen mayor enrollamiento, de un 40% a 50% más que en el estadio de espora, lo que demuestra que existe un arreglo molecular diferente de los ribosomas en los diferentes estadios del ciclo de vida de D. discoideum.

PROTEINAS RIBOSOMALES

Se han realizado estudios de las proteínas ribosomales en diferentes organismos, tanto en procariotes como en eucariotes. El interés del estudio de estas proteínas, radica principalmente en el hecho de que están íntimamente relacionadas con los procesos de regulación y de síntesis de las proteínas celulares. Las proteínas ribosomales son macromoléculas altamente conservadas a través de los procesos evolutivos (Nomura, 1968), ya que el análisis electroforético unidimensional y bidimensional de las proteínas ribosomales de diferentes organismos y que a su vez pertenecen a diferentes reinos muestran que existe gran similitud entre las diferentes proteínas ribosomales analizadas (Nomura y Held, 1974) (DeLaunary y col., 1973). Las proteínas que conforman el ribosoma tanto de procariotes como de eucariotes son principalmente básicas (Wittman, 1974; Sherton y Wool, 1972). Sin embargo, se pueden encontrar proteínas ribosomales ácidas como las L 35, L 36, L 37, S 26, S 27, S 28, S 29 y S 30, siendo de este grupo las más ácidas la L 35 y L 36, en Saccharomyces cerevisiae. Además se sabe que estas dos últimas proteínas (L 35 y L 36) están fosforiladas en la levadura (Zinker y Warner, 1976). En E. coli se pueden encontrar también proteínas identificadas a la L 35 y L 36 de levadura, correspondiendo la L 7 y L 12, que tienen la misma secuencia de aminoácidos

(Wool y Staffler, 1974). Las proteínas ribosomales ácidas fueron descritas inicialmente en E. coli, presentan características peculiares que las distinguen de las demás, como es su punto isoeléctrico menor de 5.0, pesos moleculares bajos y se extraen selectivamente del ribosoma con 0.5 a 1.0 M de cloruro de amonio y etanol (Hammel y col., 1972). La función de las diferentes proteínas que constituyen el ribosoma es multifacética (Bielca y col., 1978). En procariotes se ha demostrado que las proteínas ácidas intervienen en los procesos de hidrólisis de GTP durante la síntesis de proteínas, la cual es dependiente de factores solubles como el factor EF-2 (Nomura, 1974).

Por otro lado Jantzen, H. (1981) analizó las fosfoproteínas en Acanthamoeba castellanii, y encontró que están implicadas en los procesos de regulación de la expresión del RNAm (Lastick y col., 1977). Las fosfoproteínas varían en los diferentes organismos, como por ejemplo en Tetrahymena pyriformis, se ha descrito una fosfoproteína ribosomal de peso molecular de 38,000 daltones y está misma proteína en Saccharomyces cerevisiae tiene un peso de 31,000 daltones, en Physalium polycephalum tiene un peso molecular de 55,000 daltones, en los ribosomas de hígado de rata es de 31,000 daltones y en Acanthamoeba castellanii se encuentra una proteína ribosomal fosforilada que tiene un peso molecular de 45,000 daltones.

Recientemente, se han realizado estudios de proteínas ribosomales de varios tipos de protozoarios parásitos de vida libre y de hongos que en su ciclo de vida presentan una fase amebode, como lo es en D. discoideum, Ochiai y col., en 1972 analizaron las proteínas ribosomales de este hongo separándolas por electroforesis unidimensio-

nal, mostrando que las proteínas ribosomales en la fracción 60 S tienen pesos moleculares entre 13,000 a 73,000 daltones mientras que la 40 S son de 16,900 a 84,000 daltones. Ramagopal y Ennis en 1981, también analizaron las proteínas ribosomales de este hongo, tanto en la fase ameboide como en la de espora, encontrando 12 proteínas diferentes entre los dos estadios. Estas diferencias se mantienen usando diferentes concentraciones de cloruro de potasio y en presencia y ausencia de inhibidores de proteasas como el PMSF. Por lo que se sugiere que están implicadas en la modulación de los estados específicos en el desarrollo del hongo (Ramagopal y Ennis, 1981). También se han realizado estudios de los ribosomas y de las proteínas ribosomales en amibas parásitas de réptiles, como es el caso de Entamoeba invadens (Price y col., 1983). Los estudios de los ribosomas mostraron que tienen constantes de sedimentación parecidos a otros sistemas estudiados ya que presentan constantes de sedimentación de 77 S para la unidad ribosomal, 53 S para la fracción ribosomal mayor y 36 S para la fracción menor.

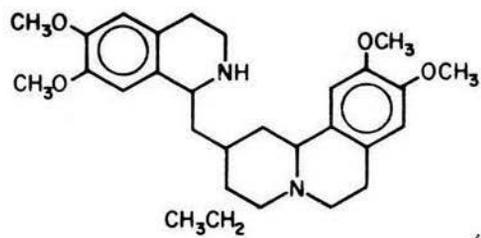
Uno de los resultados que mostro el análisis electroforético unidimensional de las proteínas ribosomales de esta amiba, es que presentó proteínas de alto peso molecular que no se encuentran en los ribosomas hasta la fecha estudiados, dichas proteínas fluctúan entre un peso molecular de 10,000 a 100,000 daltones.

EMETINA

La emetina es un alcaloide (figura 1) que se obtiene de la raíz de la planta Uragoga ipecacuanha (Janot, 1953). Este alcaloide tiene centros asimétricos en los carbonos de las posiciones 1', 2', 3' y 11', por lo que da lugar a la existencia de 16 estereoisómeros de la emetina. Es una droga que se emplea contra la infección de diversos parásitos, entre ellos se puede mencionar a Entamoeba histolytica.

Se ha determinado que esta droga es un fuerte inhibidor de la síntesis de proteínas en células de mamíferos (Vernon y Caskey, 1979) y en parásitos (Orozco y col., 1985). Por otro lado Radhey y col., (1976 y 1977) demostraron que en mutantes de la línea celular CHO resistentes a emetina la resistencia está dada por la modificación de algunas de las proteínas ribosomales de la fracción 40 S. Estos resultados fueron corroborados por Vernon y Caskey en el año de 1979, quienes demostraron que, la resistencia de las células CHO a emetina está dada por la modificación de la proteína ribosomal de la fracción 40 S, numeradas como 22 en un sistema electroforético bidimensional pH 5.0 x SDS (Mets, L y Bogorad L., 1974). Por otro lado Entner en 1979 estudió el efecto de la emetina y de la isoemetina en cepas de Entamoeba histolytica (F-22 y L-A), encontrando que la emetina se une de una manera no covalente a las proteínas ribosomales, dado que este compuesto puede ser extraído con tolueno. Mediante el uso de isómeros moleculares de la emetina. Etner sugirió que los sitios activos de la droga son por lo menos dos, estando éstos en la región del carbono C-1' y C-2' en la emetina mientras que en la isometina presenta un so-

Figura 1. Estructura molecular de la droga emetina.



EMETINA (URAGOGA IPECACUANHA)

lo sitio activo, estando éste en el carbono C-1. Esta forma isomérica de la emetina es fácilmente desplazada por la emetina en el ribosoma. Sin embargo, hasta la fecha no se conoce con claridad el mecanismo de acción de la droga en E. histolytica además de que se desconocen las características de las proteínas ribosomales en este parásito, por lo que sería de gran interés el estudio de las proteínas ribosomales en Entamoeba histolytica y en mutantes de este parásito resistentes a emetina que ya han sido aisladas (Orozco y col., 1985). Estos estudios ayudaría a definir si Entamoeba histolytica presenta un patrón electroforético ribosomal propio o semejante al de otros sistemas estudiados y a esclarecer el mecanismo de acción de la emetina en E. histolytica.

O B J E T I V O S

Los objetivos de este trabajo fueron:

- 1). Caracterizar las proteínas ribosomales de E. histolytica.
- 2). Verificar si existen diferencias entre el patrón electroforético de las proteínas ribosomales de clonas E. histolytica sensibles a emetina (clona A) y resistentes a emetina (C₉).

MATERIALES Y METODOS

Material Biológico

Para el aislamiento de las proteínas ribosomales de E. histolytica se utilizaron las clonas A y C₉, las cuales son altamente virulentas y fagocíticas (Orozco y col., 1982) con la diferencia de que la clona A es sensible a emetina (Fig. 2), mientras que la clona C₉ es resistente a emetina (Fig. 3) (Orozco y col., 1985).

Cultivos de Trofozoítos de E. histolytica

Los trofozoítos de las clonas A y C₉ se cultivaron axénicamente a 37°C en el medio TYS-S-33 descrito por Diamond y col. (1978), suplementado con: 15% de suero bovino (In vitro, México), inactivado a 56°C durante 30 minutos, en baño maría, mezcla de vitaminas (3%) y antibióticos, penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (0.71 µg/ml). Los cultivos de trofozoítos se incubaron a 37°C hasta fase logarítmica de crecimiento y en el momento de usarse se incubaron en agua-hielo durante 5 a 10 minutos, para despegar las amibas y fueron lavadas dos veces con PBS y centrifugadas entre cada lavado a 360 x g durante 7 minutos.

Aislamiento de Proteínas Ribosomales de E. histolytica Warner y col. (1965).

Se cultivaron 4×10^7 trofozoítos de la clona A y C₉. Las amibas se resuspendieron (previamente lavadas) en una solución

Figura 2. Sensibilidad de E. histolytica a emetina.

La clona A fue sometida a diferentes concentraciones de emetina (●—●) control (○—○) 0.85 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Δ — Δ) 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (□—□) 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y (■—■) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. (Orozco y col., 1985).

EFFECTO DE LA EMETINA SOBRE
E. histolytica (Clona A)

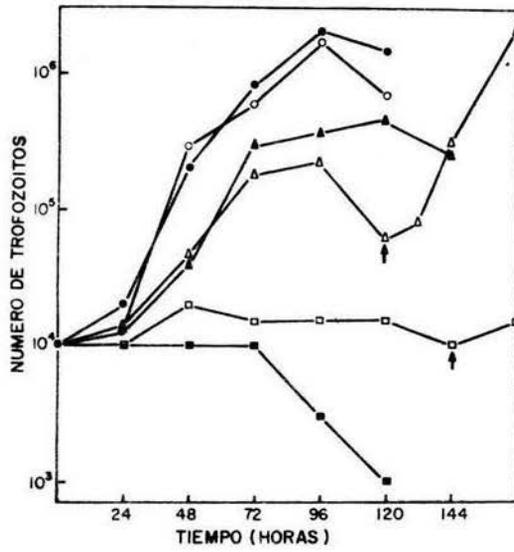
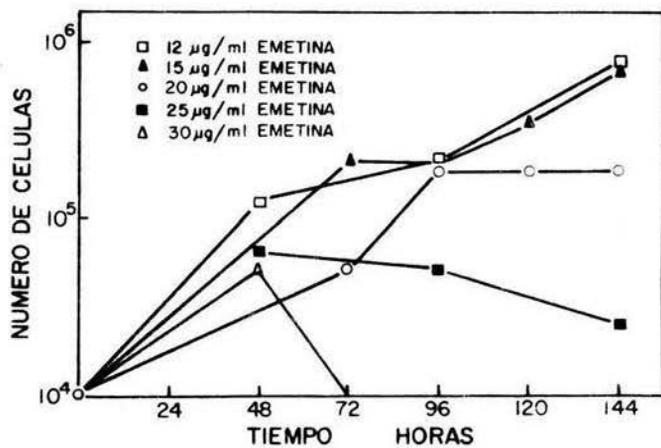


Figura 3. Sensibilidad de E. histolytica a emetina.

La clona C₉ fue sometida a diferentes concentraciones de emetina, 12 µg/ml (□—□), 15 µg/ml (▲—▲), 20 µg/ml (○—○), 25 µg/ml (■—■) y 30 µg/ml (△—△). (Orozco y col., 1985).



amortiguadora (LHB), la cual se preparó con NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 30 mM, tris-HCl 10 mM pH 7.4. 20 ml. Se le agregó como inhibidor de proteasas p-hidroximercuriobenzoato a una concentración final de 2.5 mM. Las amibas se lizaron por congelación y descongelación con hielo seco en acetona. Se le agregó posteriormente 50 μ l/ml de desoxicolato de sodio al 10% y se dejó reposar durante 5 minutos, se añadió posteriormente detergente brij 58 (50 μ l/ml de LHB) al 10%, la suspensión se dejó reposar durante 10 minutos. El lisado se centrifugó a 10,000 durante 10 minutos en un rotor SS-34 a 4°C. El sobrenadante se transfirió a tubos de el rotor 60 TI y se centrifugó a 50,000 rpm durante 4 horas a través de 4 ml de un colchón de sacarosa al 15% en $(NH_4)_2SO_4$ al 5% en LHB. Después de la centrifugación la pastilla se resuspendió en 0.5 ml de una solución amortiguadora 10^{-5} (NaCl 100 mM, hepes 10 mM $MgCl_2$ 10^{-5} M). La suspensión se centrifugó a 360 X g durante 7 minutos y el sobrenadante se trató con ácido acético glacial y $MgCl_2$ (2 volúmenes de ácido acético concentrado y 0.1 volumen de $MgCl_2$ 1M por cada mililitro de solución amortiguadora 10^{-5}), se dejó reposar durante 30 minutos en frío y posteriormente se centrifugó a 10,000 revoluciones por minuto durante 15 minutos en un rotor SS-34 a 4°C. El sobrenadante se dializó contra ácido acético 0.5 M durante 24 horas con cambios cada 8 horas. Las proteínas ribosomales totales se precipitaron con acetona a -20°C para su análisis electroforético.

Aislamiento de Proteínas Ribosomales de E. histolytica

Horak y Schiffman (1977).

Un cultivo de células de amibas (1×10^8) se resuspendieron (después de lavarlas con salino 0.9%) en una solución amortiguadora de tris-HCl 20 mM, KCl 10 mM, $MgCl_2$ 5 mM, B-mercaptoetanol 5 mM pH 7.5.

Se agregó como inhibidor de proteasas P-hidroximercuribenzoato a una concentración final de 2.5 mM y las amibas se lisaron por homogenización en un homogenizador de vidrio tipo Elvehem-Potter dando 30 golpes sin agregar detergente, posteriormente se añadió NP-40 a una concentración final de 0.5% y se homogenizaron dando otros 30 golpes. La suspensión se centrifugó a 30,000 X g por 15 minutos. El sobrenadante se colocó sobre un colchón de sacarosa de 3 ml al 30% (p/p) en una solución amortiguadora de tris-HCl 20 mM pH 7.5, KCl 240 mM, $MgCl_2$ 7.5 mM, B-mercaptoetanol 5 mM y se centrifugó a 40,000 rpm durante 16 horas en un rotor 50 TI. La pastilla ribosomal se lavó dos veces con la solución amortiguadora empleada para el colchón de sacarosa y posteriormente se resuspendió la pastilla ribosomal en una solución amortiguadora denominada 10^{-5} (NaCl 100 mM, Hepes 10 mM $MgCl_2$ 10^{-5} M) o en una solución tampón de tris-HCl 20 mM pH 7.5, KCl 240 mM $MgCl_2$ 7.5 mM y B-mercaptoetanol 5 mM para que posteriormente los ribosomas amibianos sean tratados con KCl 0.5 M, 0.88 M o RNAsas tipo A y T-I.

La extracción de las proteínas amibianas totales se realizó bajo la técnica propuesta por Hardy y col. (1969). La pastilla

ribosomal se resuspendió en un volumen adecuado de la solución amortiguadora 10^{-5} y se añadió 0.1 volumen de $MgCl_2$ 1M y dos volúmenes de ácido acético glacial simultáneamente por cada mililitro de solución tampón 10^{-5} . Las proteínas se incubaron en un baño de hielo durante 30 a 40 minutos en agitación y se centrifugó la suspensión a 10,000 rpm durante 10 minutos a $4^{\circ}C$ en un rotor SS-34 utilizando una centrifuga Sorvall (Modelo RCA-B). El sobrenadante que contenía las proteínas solubles se dializó contra 4 litros de ácido acético glacial 0.5 M a $4^{\circ}C$ durante 24 horas. Posteriormente las proteínas se liofilizaron para el análisis electroforético.

Cuantificación de Proteínas

La proteína total ribosomal precipitada con acetona o liofilizada se resuspendió en una solución tampón para la electroforesis la cual se preparó con tris-HCl 0.0625 M pH 6.3, SDS al 2.3% y glicerol al 10%. Una vez disueltas las muestras se sometieron a ebullición durante 3 minutos para inactivar las proteasas. Posteriormente se sacó una muestra para cuantificación de proteínas por el método de Lowry y col. (1951) sin B-mercaptoetanol. Se tomó una alícuota de 5 μ l de la muestra problema y se resuspendió en 1.25 ml de solución B la cual se formó a partir de la solución A, que consta de carbonato de sodio al 2% en NaOH 0.1 N y de sulfato cúprico 0.5% en una relación 1:1 (solución A), 1 ml de A se resuspendió en 50 ml de tartrato de sodio y potasio al 2% (50:1) formando la solución B. La mezcla de la solución B con el problema (5 μ l) se dejó reposar durante 10 minutos posteriormente se agregó 0.125 ml del reactivo de folin diluido en agua

bidestilada (1:1) y se dejó reposar durante 30 minutos y se leyó la densidad óptica a 760 nm de longitud de onda. Posteriormente la lectura resultante de la solución problema se comparó con la correspondiente curva de referencia, para calcular la concentración de la proteína. La proteína que se usó como referencia fue la albúmina sérica bovina y la densidad óptica se midió en un espectrofotómetro M4QIII Carl Zeiss Germany.

Preparación de Geles Unidimensionales

El análisis electroforético se llevó a cabo en geles de poliacrilamida con SDS, según el método descrito por Laemmli (1970) modificado el gel resolutorio se preparó con las siguientes concentraciones finales de reactivos: 10% de acrilamida, 0.26% de N,N bis-metilenacrilamida, 0.1% de SDS, 0.05% de persulfato de amonio, 0.03% de TEMED, glicerol al 10%, 0.54 M de tris-HCl pH 8.8. Para cada gel se empleó un volumen de 32 ml de la mezcla. El gel concentrador se preparó con 3% de acrilamida, 0.08% de N,N bis-metilenacrilamida, 0.1 M de tris HC pH 6.8, 0.1% de SDS, 0.01% de persulfato de amonio y 0.05% de TEMED. Para cada gel se utilizó un volumen de 8 ml de la mezcla.

Preparación de las Muestras para la Electroforesis en Primera Dimensión de los Geles en SDS.

Una vez disueltas las muestras en amortiguador para electroforesis (ver cuantificación de proteínas), se les añadió B-mercaptoetanol a una concentración final de 5% y se sometieron nuevamente a ebullición durante 1 minuto.

Condiciones de la Corrida para la Electroforesis en Primera Dimensión de Geles en SDS.

La solución amortiguadora de los electrodos se preparó con tris-base 0.025 M, glicina 0.16 M, SDS 0.1%, pH 8.3. Se depositaron las muestras en los pozos del gel y se aplicó un voltaje constante de 100 volts hasta que el azul de bromofenol migró aproximadamente hasta un centímetro del extremo inferior del gel.

Tinción de los Geles en SDS.

Las proteínas de los geles en placa se tiñeron durante 60 minutos a temperatura ambiente con azul de Coomasie tipo R al 0.25% en metanol al 50% y ácido acético al 7%. Para desteñir los geles se lavaron con metanol al 5%, ácido acético al 7% a temperatura ambiente.

Preparación de las Muestras para los Geles Bidimensionales pH 8.6 por pH 4.5 (Wittman, 1974).

700 μ g de la proteína total ribosomal amibiana se disolvieron en 100 μ l de solución tampón (100 ml de urea 8 M, 0.0085 g de EDTA, 0.32 g de ácido bórico, B-mercaptoetanol al 15%) y se dejaron reposar durante 60 minutos a temperatura ambiente antes de colocarlas sobre el gel.

Preparación de los Geles Bidimensionales pH 8.6 X pH 4.5.

Los geles bidimensionales se realizaron según la técnica descrita por Wittman (1974). En el que se analizaron las proteínas ribosomales ácidas y básicas. Para los geles cilíndricos se preparó una solución madre que se formó con 6.0 g de acrilamida, 0.225 g de bis-acrilamida, 0.8 g de EDTA, 3.2 g de ácido bórico, 4.85 g de tri-base pH 8.6, 75 ml de urea 8 M. Para la polimerización de 10 ml de acrilamida se añadió 15 μ l de TEMED y 30 μ l de persulfato de amonio al 10% se mezcló vigorosamente y se colocó dentro de un tubo de vidrio de dimensiones de 0.4 cm x 15 cm, para la polimerización de el gel de un tamaño de 10 cm. Posteriormente a la polimerización de el gel se procedió a montar los tubos en la cámara de electroforesis colocando las muestras para su análisis sobre el gel.

Condiciones de la Corrida en Primera Dimensión pH 8.6 X pH 4.5.

La solución amortiguadora para la corrida constó de 2.4 g de EDTA, 9.6 g de ácido bórico y 14.55 g de tris-base aforado a 1000 ml con agua bidestilada ultra pura. Para las proteínas ácidas se colocó el electrodo positivo en el reservorio inferior de la cámara de electroforesis y se aplicó un voltaje de 50 volts, durante 20 horas; se usó azul de bromofenol al 0.1% como colorante. Para las proteínas básicas se colocó en el reservorio inferior de la cámara de electroforesis el electrodo negativo, se aplicó una corriente de 110 volts du-

rante 20 horas, se usó fuschina básica como colorante indicador de la corrida. Después de terminada la electroforesis en la primera dimensión el gel se equilibró para la segunda dimensión. Los geles se incubaron a temperatura ambiente en una solución de urea 8 M con HCl (2.5 ml de HCl más 100 ml de urea 8 M) durante 60 minutos con el fin de permitir el cambio en la carga eléctrica en las proteínas, después se incubó el gel en otra solución (50 ml) formada de 0.074 ml de ácido acético, 0.24 ml de KOH 5N y 100 ml de urea 8 M durante otros 60 minutos. Posteriormente se colocó el gel cilíndrico en la cámara de electroforesis en placa para la segunda dimensión.

Preparación de los Geles para la Segunda Dimensión pH 8.6 X pH 4.5.

El gel para la segunda dimensión se preparó con 160 g de acrilamida, 5 g de bis-acrilamida, 53.3 g de ácido acético, 9.6 ml de KOH 5 N, 750 ml de urea 8 M desionizada y se aforó con agua bidestilada hasta 1000 ml. Para la polimerización de 80 ml de la solución madre se agregaron 0.45 ml de TEMED y 1.32 ml de persulfato de amonio al 10%. Para solución amortiguadora de la corrida para la segunda dimensión se formó con 14 g de glicina y 1.5 ml de ácido acético, se aforó hasta 1000 ml con agua bidestilada. Tanto a las proteínas ácidas como básicas se les aplicó una corriente constante de 85 volts durante 20 horas. Terminada la electroforesis se procedió a la tinción del gel con 0.25% de azul de Coomassie en ácido acético al 7% y metanol al 50% durante 45 minutos y se destiñeron los geles con cambios repetidos de la solución destiñadora, la cual se formó con ácido acético al 7% y me

tanol al 30%.

Análisis Electroforético Bidimensional pH 5.0 X SDS.

Gorenstein y Warner (1976).

1000 μg de proteína ribosomal amibiana se disolvió en 100 μl de una solución tampón formada de B-mercaptoetanol al 10%, glicerol al 10%, ácido acético 1%, fuscina básica 0.01% y urea 8 M. El gel para la primera dimensión se preparó en tubos cilíndricos de 4 mm X 10 cm., conteniendo 4% de acrilamida, 0.1% de bis-acrilamida, urea 8 M, 0.057 M de bis-tris pH 5.0, ajustado con ácido acético. Para la polimerización de la acrilamida de la solución anterior se agregó por cada mililitro 3 μl de persulfato de amonio al 10% y 1 μl de TEMED y se aplanó la superficie del gel en el tubo con agua bidestilada. Después de la polimerización se colocó la muestra de proteínas en el tubo del gel y se colocó el tubo en el aparato de electroforésis para tubos, el cual contenía 0.01 M de bis-tris pH 4.0 en el reseptáculo superior y 0.179 M de KOAc pH 5.0 en el reseptáculo inferior. Dado que las proteínas que se analizaron eran básicas entonces las proteínas corrieron hacia el polo negativo colocado en el receptáculo inferior y el polo positivo se colocó en el receptáculo superior. La electroforésis se llevó a un voltaje constante a 900 volts-hora hasta que la fuschina básica llegó al fondo del gel. El gel se sacó del tubo rotándolo con una jeringa con agua y se equilibró con 50 ml de una solución amortiguadora que constó de urea 4 M, tris-base 0.5 M, SDS 1% pH 6.8 ajustada con HCl. El equilibrio se realizó durante 120 minutos. Posteriormente se preparó el gel en placa mediante la técnica descrita por

Maizel (1971). El gel resolutivo se preparó con: acrilamida 12%, 0.45% de bis-acrilamida, 0.1% de SDS, 0.175 M de tris-base pH 8.8. Para la polimerización de 1 ml de la solución se requirieron 6 μ l de persulfato de amonio al 10% y 0.5 μ l de TEMED.

La superficie del gel se aplanó con 1 ml de isopropanol. Posteriormente a la polimerización se lavó la superficie del gel con agua y agregó el gel concentrador que consistió de 4% de acrilamida, 0.11%, de bis-acrilamida, 0.1% de SDS, 0.0625 M de tris-base pH 6.8. Se colocó simultáneamente el gel cilíndrico equilibrado sobre el gel en placa esperando a polimerizar, posteriormente se agregó agarosa al 1% (disuelto en el amortiguador de corrida para la segunda dimensión) sobre el gel cilíndrico. La solución amortiguadora de corrida de la segunda dimensión se formó con: 0.05 M de tris-base, 0.38 M de glicina, 0.05% de SDS. La electroforesis se llevó a un voltaje constante de 1,100 volts-hora hasta que el citocromo C alcanzó una marca de 1 cm del fondo del gel. Los geles se tiñeron con 0.2% de azul de Coomassie en 50% metanol y ácido acético al 7%. Los geles se destiñeron con lavados con metanol al 30% y ácido acético al 7%.

Migración de Proteínas de Peso Molecular Conocido.

Se usaron como marcadores de peso molecular las siguientes proteínas: citocromo C PM 12,300; lisosima PM 14,300; B-lactoglobulina PM 18,000; tripsinógeno PM 24,000; quimotripsinógeno PM 25,700; albúmina de huevo PM 45,000; albúmina de bovino PM 66,000; fosforilasa b PM 97,400; miosina PM 200,000 daltones.

El Rf fue la distancia recorrida por la proteína dividida entre la distancia recorrida por el colorante indicador (Fig. 4).

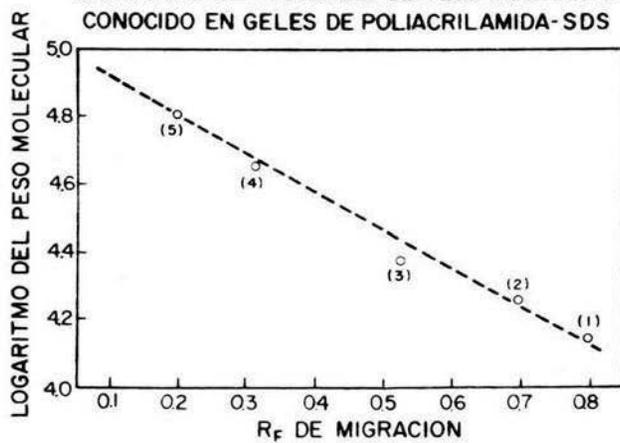
Preparación de Biomacromoléculas para Microscopía Electrónica.

Dubochet y col., (1979).

Las rejillas para microscopía se lavaron con agua bidestilada, se cubrieron con carbón y se dejaron secar a temperatura ambiente, posteriormente las rejillas se colocaron en un evaporador de pentilamina, se hizo ionización con pentilamina y se hizo vacío hasta 10^{-1} tors, se dejó entrar el pentilamino hasta que bajó el vacío hasta 2×10^{-1} tors; posteriormente se sacaron las rejillas y se colocaron las muestras de los ribosomas amibianos sobre ellas, resuspendidos en una solución amortiguadora 10^{-5} (NaCl 100 mM, HEPES 10 mM, $MgCl_2$ $10^{-5}M$) diluída la muestra problema) se dejó reposar las rejillas durante 2 minutos, se lavaron con AcU al 25 y luego se cubrieron con AcU (1 gota), se dejaron reposar durante 2 minutos, posteriormente se sombrearon con platino-paladio (8:20) con un ángulo de 8° durante 6 segundos en un evaporador al vacío, posteriormente las muestras se observaron en el microscopio electrónico.

Figura 4. Migración de proteínas de peso molecular conocido en geles de poliacrilamida SDS.

MIGRACION DE PROTEINAS DE PESO MOLECULAR
CONOCIDO EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS



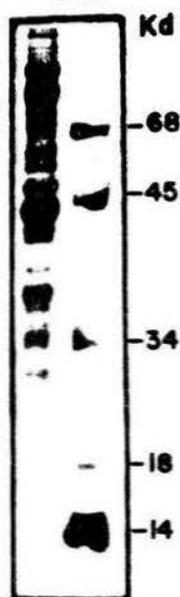
RESULTADOS

Análisis Electroforético Unidimensional en SDS

Las proteínas ribosomales totales de la clona A (Emt^S) extraídas mediante la técnica propuesta por Warner y col. (1971) y analizadas en electroforé^usis unidimensional en SDS (Fig. 5). Mostraron un patrón electroforético atípico, ya que se detectaron por densitometría de los geles 125 proteínas ribosomales entre un rango de masa relativa de 14,000 a 112,000 daltones en la clona de E. histolytica, y que por lo general en la mayoría de los sistemas estudiados tanto de procariotes como eucariotes no se reportan proteínas ribosomales de pesos moleculares mayores a 68,000 daltones, (Nomura, M. y Held, W.A., 1974). Asimismo se pudo observar en este mismo resultado que las proteínas ribosomales totales amibianas de peso molecular menores a 14,000 daltones fueron pocas, ya que por lo general en otros sistemas estudiados muestran los patrones electroforéticos unidimensionales un gran número de proteínas ribosomales en la región de pesos moleculares de 14,000 a 34,000 daltones (Rauvier y col., 1980). Dado que el análisis electroforético unidimensional de las proteínas ribosomales amibianas mostró proteínas de alto peso molecular se decidió extraer las proteínas ribosomales totales amibianas mediante otro protocolo en el que se utilizó altas concentraciones de KCl (Horac y col., 1975). Este protocolo permite obtener los ribosomas libres de contaminantes principalmente de proteínas de alto peso molecular asociadas a los ribosomas.

Figura 5. Análisis electroforético unidimensional de las proteínas ribosomales totales de la clona A (Emt^S) en geles de poliacrilamida SDS.

C-A



Los resultados obtenidos utilizando KCl a una concentración de 240 mM, fueron similares los resultados obtenidos anteriormente, es decir, se encontraron también en el análisis electroforético unidimensional proteínas de altos pesos moleculares (Fig. 6). Sin embargo, mediante el uso de este protocolo de extracción se obtuvo una mayor definición y resolución de las proteínas ribosomales amibianas, de masas relativas menores a 68,000 daltones (rango en que se encuentran las proteínas ribosomales). Se incrementó aún más la concentración de KCl hasta 0.5 y 0.88 molar en presencia de puomicina para limpiar los ribosomas de agregados de altos pesos moleculares (mayores a 68 Kd).

Los resultados obtenidos mostraron que aún en presencia de estas altas concentraciones de KCl, las proteínas de altos pesos moleculares, permanecen unidas a los ribosomas amibianos (Fig. 7 y 8). Sin embargo se pudo corroborar que el uso de KCl y de puomicina, permitió limpiar los ribosomas amibianos de algunas de las proteínas de altos pesos moleculares, ya que el análisis electroforético de los lavados de los ribosomas amibianos mostró una gran cantidad de proteínas cuyas masas relativas fluctúan entre 14 a 112 Kd, las cuales no son ribosomales (Fig. 9). El único inconveniente de el uso de estas altas concentraciones de sal es de que las proteínas pierden definición en el análisis electroforético unidimensional (Fig. 7 y 8). Resultados similares se obtuvieron cuando las proteínas ribosomales de E. histolytica (clona A) fueron tratadas con KCl, puomicina y RNAsas tipo A y T-1 (Fig. 10) en donde se pudo observar la baja definición de las proteínas ribosomales amibianas. Las proteínas ribosomales totales

Figura 6. Análisis electroforético unidimensional de las proteínas ribosomales totales de la clona A (Emt^S) tratadas con KCl, a una concentración de 240 mM.

C-A

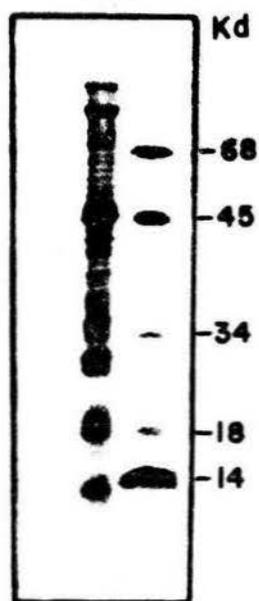


Figura 7. Análisis electroforético unidimensional de las proteínas ribosomales totales de la clona A (Emt^S) tratadas con KCl a una concentración final de 0.5 M.

C - A

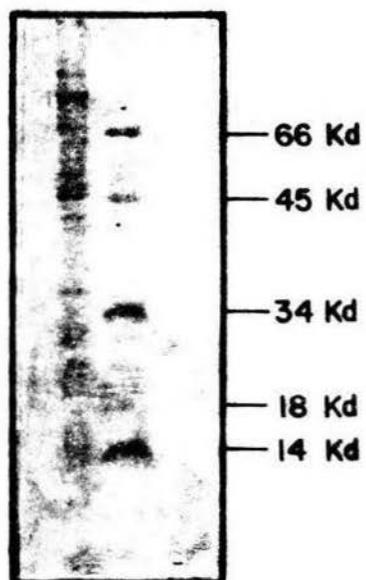


Figura 8. Análisis electroforético unidimensional de las proteínas ribosomales totales de la clona A (Emt^S) tratadas con puromicina y KCl a una concentración final de 0.88 M.

C-A

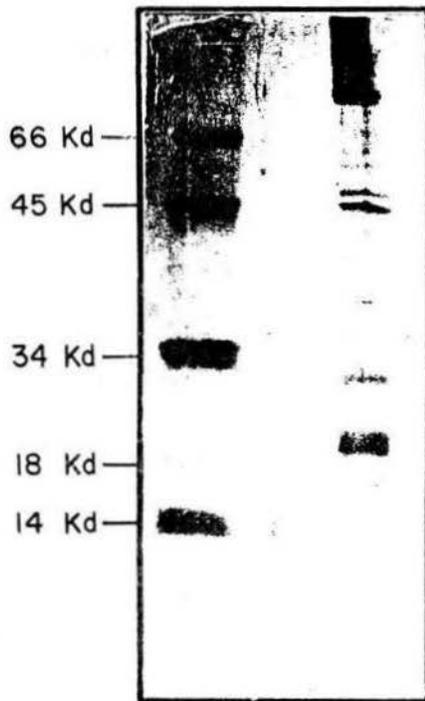


Figura 9. Análisis electroforético unidimensional SDS, de las proteínas no ribosomales, extraídas de los ribosomas amibianos (clona A y C₉) con KCl 0.88 M y puromicina 1 mM.

C-A C-9

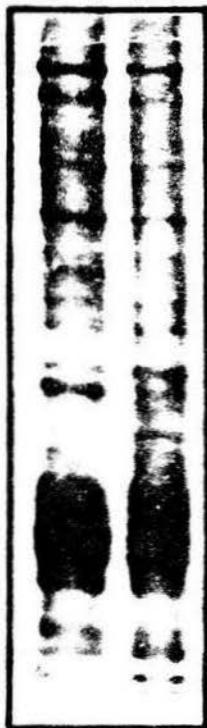
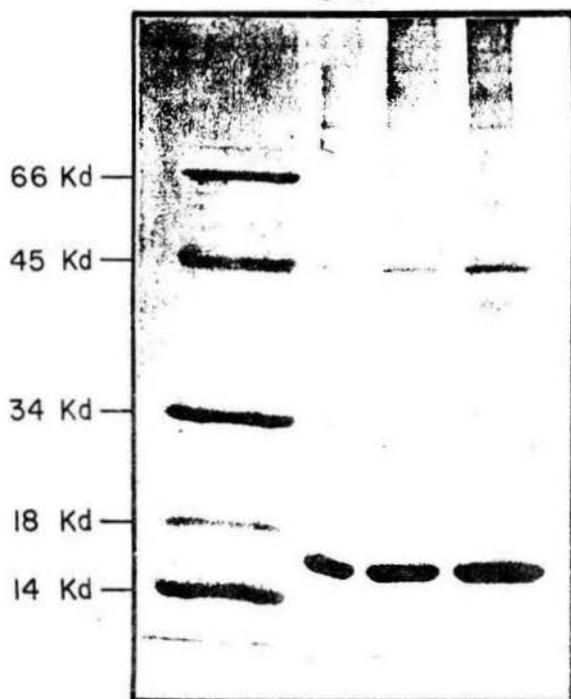


Figura 10. Análisis electroforético unidimensional SDS de las proteínas ribosomales totales de la clona A (Emt^S), tratadas con KCl 0.88 M y RNAsas.

C-A



de la clona C₉ (Emt^R) fueron extraídas mediante la técnica propuesta por Warner y col. (1971) y con la de Horak y Shiffman, (1975) utilizando KCl a una concentración final de 240 mM con el fin de realizar un análisis comparativo con los resultados obtenidos en el análisis electroforético unidimensional de las proteínas ribosomales de la clona A (Emt^S) y para verificar si existen alteraciones en las proteínas ribosomales totales de la clona C₉ (Emt^R). El análisis comparativo entre las proteínas ribosomales de la clona A (Emt^S) y C₉ (Emt^R), aisladas mediante el uso de el protocolo propuesto por Warner y col. (1971) (Fig. 11) y Horak, I y Shiffman, D. (1977) (con una concentración de KCl 240 mM) (Fig. 12), se pudieron observar varias diferencias entre las dos clonas de E. histolytica. Sin embargo, nosotros nos enfocamos en aquellas diferencias cuyas modificaciones pudieran estar relacionadas con la resistencia a emetina ya que se ha reportado que las proteínas ribosomales que están implicadas con la resistencia a emetina en la línea celular CHO, tienen una masa relativa de 18,000 daltones (Reichenbecher y col., 1979).

Los resultados muestran que si existen diferencias entre las proteínas ribosomales totales, entre la clona A y la clona C₉, en la región cercana a 18,000 daltones, (Fig. 11, 12). Esta modificación fue más evidente en los experimentos en los cuales se utilizó KCl 240 mM, la figura 12 muestra que las proteínas ribosomales amibianas de masas relativas cercanas a 18 Kd presentaron una mayor definición con respecto a las proteínas ribosomales analizadas en la figura 11. Sin embargo, el análisis comparativo entre las proteínas ribosomales de la clona A y C₉ mediante electroforésis unidimensional es muy grueso por

Figura 11. Análisis electroforético unidimensional de las proteínas ribosomales totales de la clona A (E_{mt}^S) y C₉ (E_{mt}^R).

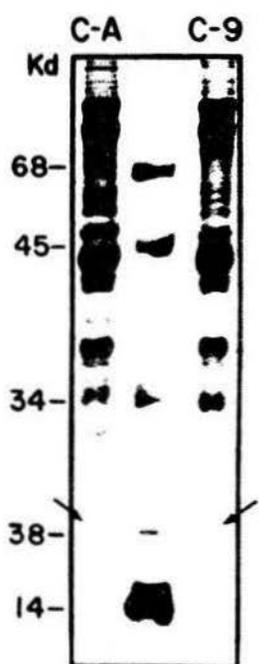
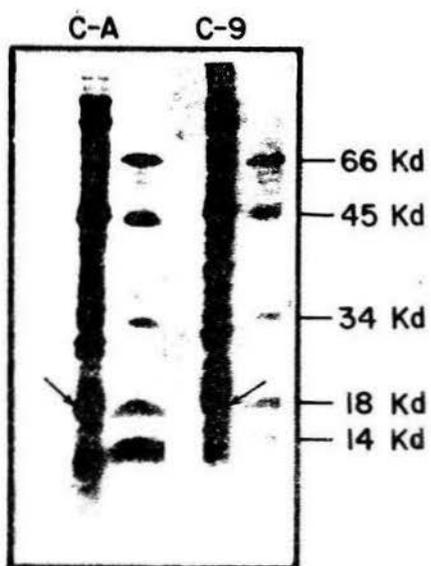


Figura 12. Análisis electroforético unidimensional de las proteínas ribosomales totales de la clona A (E_{mt}^S) y C_9 (E_{mt}^R), tratadas con KCl a una concentración final de 240 mM.



lo que se decidió utilizar la técnica de electroforésis bidimensional, lo que nos permitió hacer un análisis comparativo de estas proteínas a un nivel más fino.

Electroforésis Bidimensional pH 8.6 X pH 4.5

Las proteínas ribosomales ácidas y básicas amibianas se analizaron a partir de la proteína ribosomal total, extraída mediante el uso de el protocolo compuesto por Horak y Schiffman (1977), utilizando una concentración de KCl de 240 mM. En el análisis electroforético bidimensional de las proteínas ribosomales ácidas de la clona A y de la clona C₉ (Fig. 13), se detectaron 4 manchas. Mientras que en el análisis electroforético bidimensional de las proteínas ribosomales básicas de la clona C₉, mostró varias manchas de proteínas que corresponden a cuando menos a 44 proteínas ribosomales básicas amibianas teñidas con nitrato de plata (Fig. 14).

El análisis comparativo entre las proteínas ribosomales básicas de Saccharomyces cerevisiae y de Entamoeba histolytica (Fig. 14, 15) mostraron poca similitud, ya que como se puede observar que las proteínas ribosomales básicas de la clona C₉ migraron poco en la segunda dimensión, con respecto a las proteínas ribosomales básicas de la levadura, lo que sugiere que existe una gran diferencia en la carga eléctrica entre las proteínas ribosomales básicas de S. cerevisiae y las de la clona de E. histolytica.

El análisis electroforético bidimensional pH 8.6 X pH 4.5 de las proteínas ribosomales de E. histolytica, presentó dificult-

Figura 13. Análisis electroforético bidimensional pH 8.6 x pH 4.5, de las proteínas ribosomales ácidas de las clonas A (Emt^S) y C₉ (Emt^R).

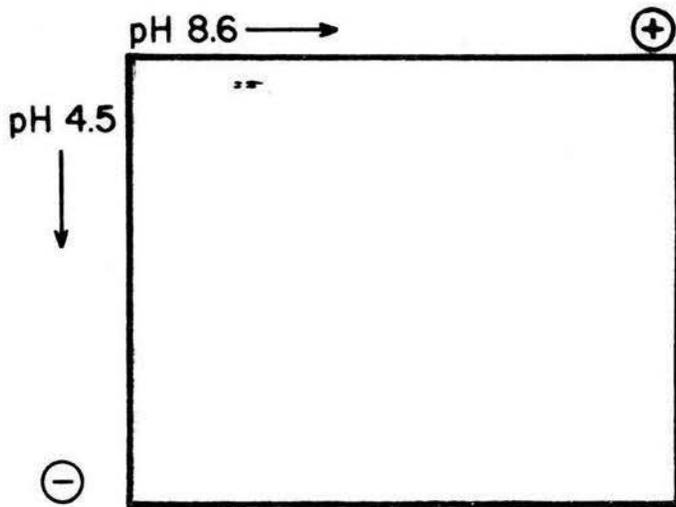


Figura 14. Análisis electroforético bidimensional pH 8.6 x pH 4.5, de las proteínas ribosomales básicas de la clona C₉ (Emt^R).

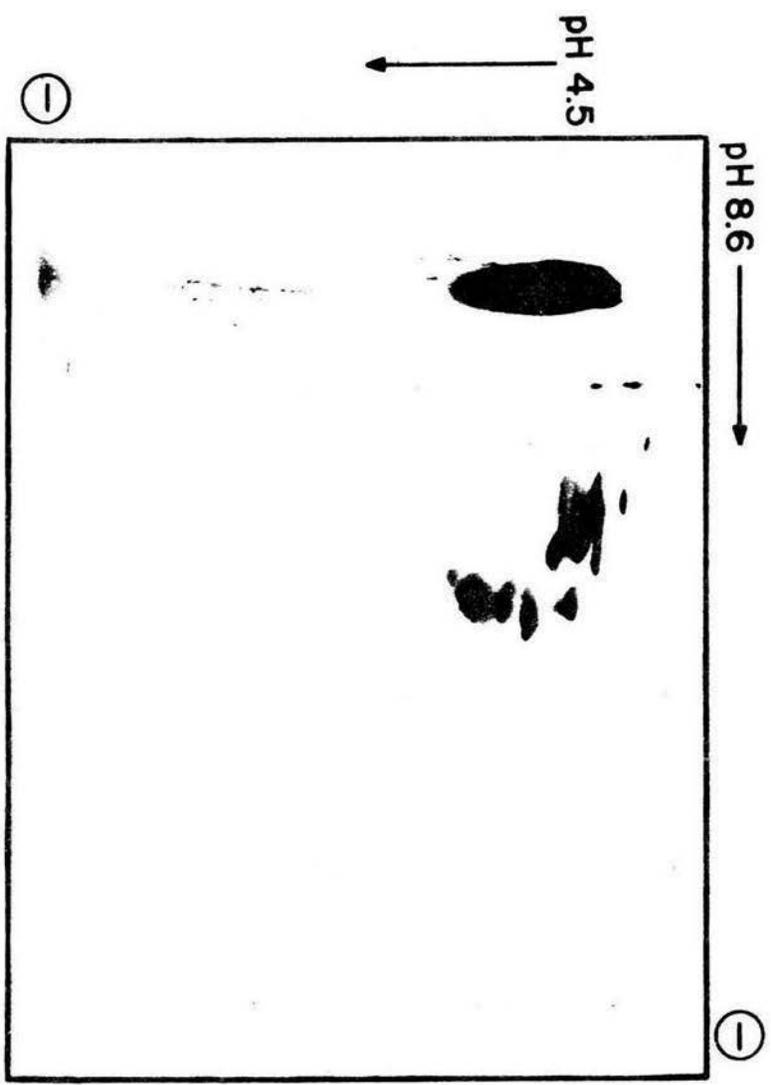
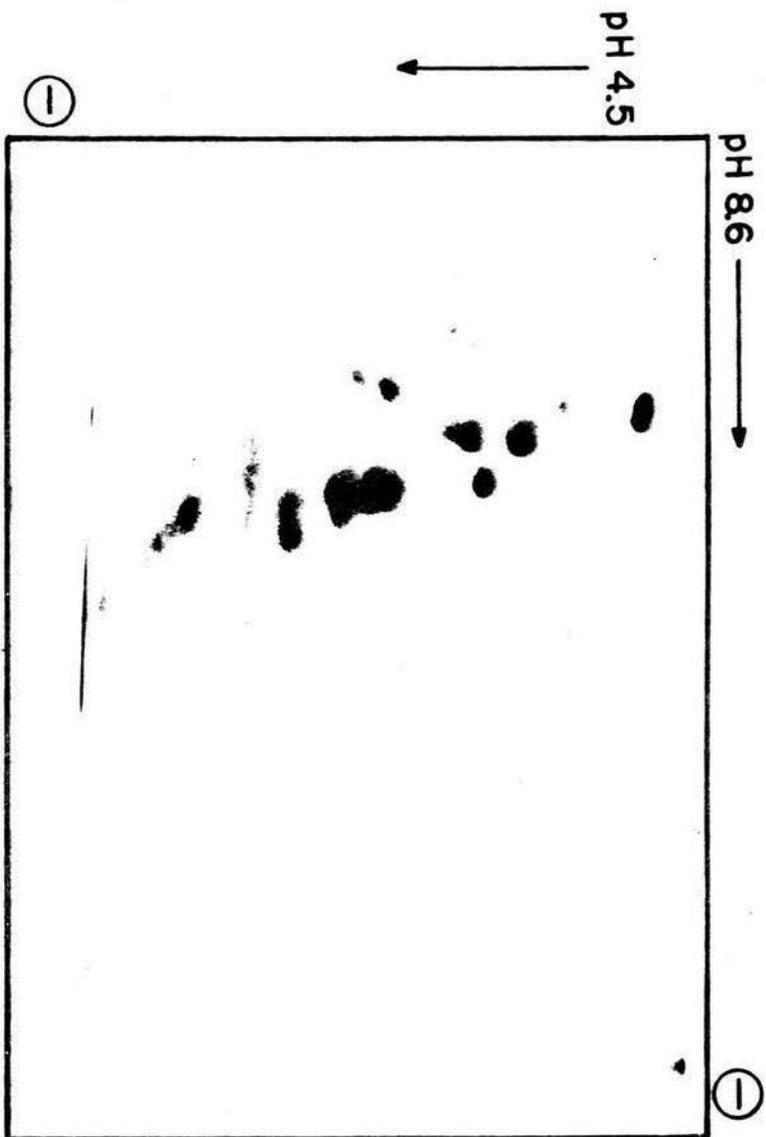


Figura 15. Análisis electroforético bidimensional pH 8.6 x pH 4.5, de las proteínas ribosomales básicas de Saccharomyces cerevisiae.



tades, ya que éstas se precipitaron a pH 8.6. Por lo que se decidió analizar las proteínas ribosomales de tipo básico, mediante electroforesis bidimensional pH 5.0 X SDS.

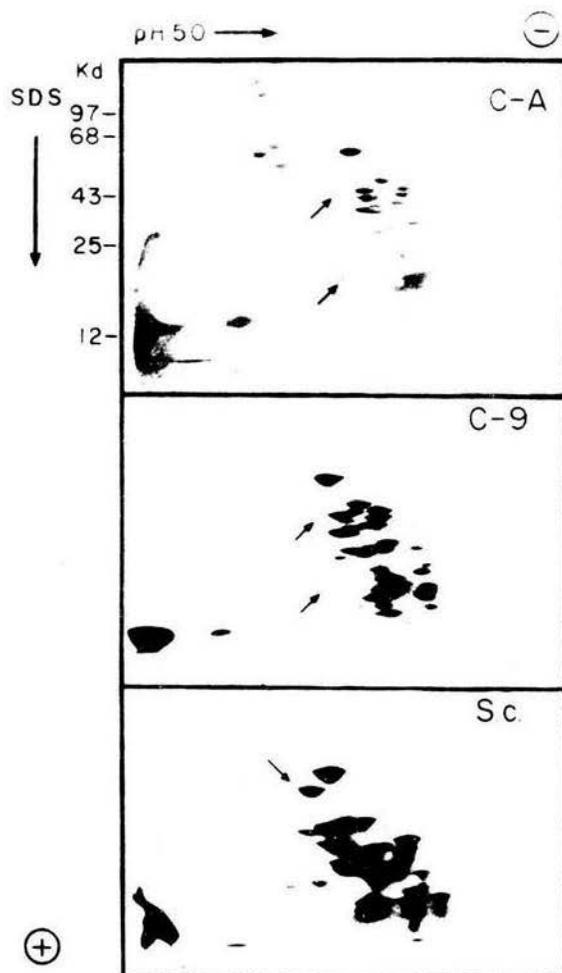
Electroforesis Bidimensional pH 5.0 X SDS

El patrón electroforético de las proteínas ribosomales básicas de Entamoeba histolytica (clona A y C₉) en comparación con las proteínas ribosomales básicas de Saccharomyces cerevisiae (Fig. 16) mostró la ausencia de una de las proteínas ribosomales que es común en el patrón electroforético bidimensional de las proteínas ribosomales de células procarióticas y eucarióticas y que pertenece a la fracción 60 S del ribosoma, siendo esta proteína ribosomal básica y clasificada como número dos por Gorenstein y Warner (1976).

Las proteínas ribosomales básicas de la clona A (sensible a emetina) y de la clona C₉ (resistente a emetina) analizadas mediante esta técnica electroforética, se resolvieron varias manchas que corresponden a cuando menos 44 proteínas ribosomales amibianas, tanto en la clona A como en la clona C₉ (Fig. 16).

El análisis comparativo entre las proteínas ribosomales de la clona A y de la clona C₉ analizadas mediante esta técnica, mostró dos diferencias entre las proteínas ribosomales básicas de la clona mutante y de la clona silvestre (Fig. 16), dichas diferencias están localizadas en aquellas proteínas que están indicadas con las flechas en las figuras correspondientes, cuyos Rf son 0.48, 0.76 y que tienen una masa relativa de 42 Kd y 18 Kd respectivamente. Como se puede

Figura 16. Análisis electroforético bidimensional pH 5.0 x SDS, de las proteínas ribosomales básicas totales de las clonas A, C₉ de E. histolytica y de Saccharomyces cerevisiae.

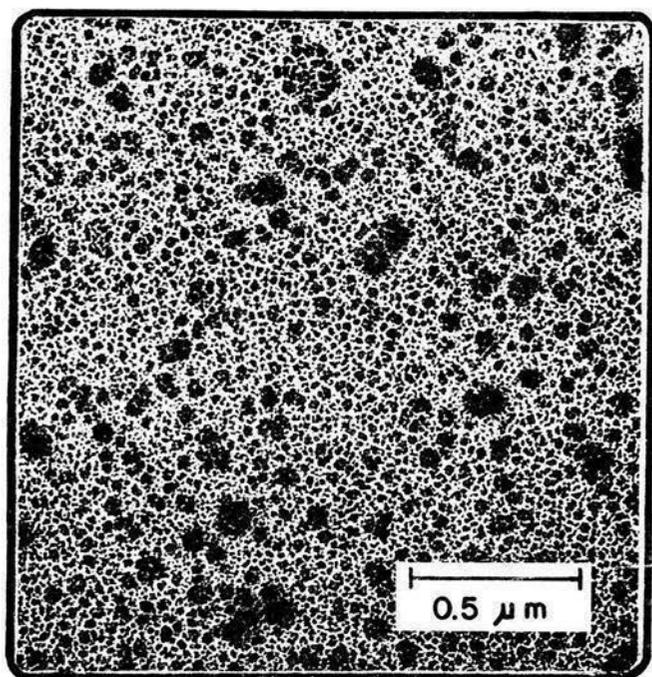


observar en la figura 16 las proteínas modificadas en la clona C₉ de 42 Kd y de 18 Kd están muy disminuídas en comparación con lo encontrado en el análisis electroforético de las proteínas ribosomales básicas de la clona A.

Microscopía Electrónica

Con el objeto de demostrar la pureza de la muestra ribosomal, se prepararon los ribosomas amibianos para microscopía electrónica (Fig. 17). Las micrografías mostraron la homogenidad de la muestra sin la presencia de fragmentos contaminantes celulares.

Figura 17. Microscopía electrónica de ribosomas de E. histolytica, sombreados con platino-paladio.



DISCUSION

Electroforésis Unidimensional

Las electroforésis unidimensionales de las proteínas ribosomales de la clona A (E_{mt}^S) y C_9 (E_{mt}^R) (Figs. 5, 6 y 7) mostraron un patrón electroforético atípico, es decir, se encontraron proteínas de altos pesos moleculares no reportados en la mayoría de los sistemas conocidos (Nomura, M. y Held, W. 1974), las cuales aún después de lavar los ribosomas con KCl 0.5 M y 0.88 M en presencia de puromicina permanecieron constantes en el análisis electroforético. Esto podría sugerir que algunas proteínas de altos pesos moleculares podrían ser ribosomas y concordar con algunos de los resultados reportados por Price y col. (1983), para E. invadens en donde se encuentran proteínas con pesos moleculares mayores a 100,000 daltones. Igualmente Ochiai y col. (1972) reportaron proteínas ribosomales de Dictyostelium discoideum con pesos moleculares de 73,000 y 69,000 daltones en la fracción 60 S de D. discoideum, mientras que en la fracción 40 S se encontraron proteínas de 84,000, 72,400 y 62,000 daltones. Sin embargo, algunas proteínas de alto peso molecular podrían ser de membrana y están fuertemente unidas a los ribosomas, ya que los ribosomas están anclados en estas estructuras. Si esto fuera cierto, este sistema sería un buen modelo para el estudio de la interacción membrana ribosoma. Por otro lado se observaron diferencias entre los patrones de las proteínas ribosomales extraídas mediante el uso de los diferentes protocolos utilizados. Con la técnica de aislamiento de ribosomas propuesta por Warner y col. (1971), se observó que las proteínas ribosomales me-

nores a 68 Kd están poco definidas (Fig. 5) con el protocolo propuesto por Horak y col. (1977), utilizando una concentración de KCl de 240 mM, (Fig. 6), se pudo observar que las proteínas de bajos pesos moleculares presentaron una mejor definición, por lo que éste último método fue el más indicado para realizar los experimentos de extracción de las proteínas ribosomales amibianas, con su posterior análisis electroforético bidimensional.

Cuando se trataron los ribosomas amibianos con una molaridad más alta de sal (0.5 M y 0.88 M de KCl), se obtuvo una baja definición de las proteínas ribosomales en el análisis electroforético unidimensional (Fig. 8 y 10), por lo que no fue muy recomendable el uso de estos protocolos para extraer las proteínas ribosomales amibianas. Resultados similares se obtuvieron cuando las proteínas ribosomales amibianas se trataron con RNAsas para extraerlas del ribosoma, es decir, que cuando las proteínas ribosomales amibianas se analizaron en geles unidimensionales la definición de ellas fue muy pobre y por otro lado la extracción o recuperación de proteínas mediante este protocolo fue menor (en peso seco) en comparación con los otros protocolos mencionados anteriormente. Este último resultado concuerda con lo reportado por Sherton y col. (1974) quienes demostraron que la eficiencia de extracción de las proteínas ribosomales de células eucarióticas tratadas con RNAsas T-1 es pobre, mientras que con RNasa T-2 es más alta.

Por otro lado, en lo que corresponde a las alteraciones de las proteínas ribosomales totales pertenecientes a la clona C₉

(Emt^R) y detectadas en el análisis electroforético en la región de peso molecular de 18 Kd, se puede decir de que si existen alteraciones en las proteínas ribosomales que tienen esta masa relativa, además de que dicho resultado está a su vez apoyado por los resultados obtenidos más finamente, mediante técnica de análisis electroforético bidimensional pH 5.0 X SDS de las proteínas ribosomales básicas de la clona C₉, en donde se demostró que al menos una proteína de 18 Kd está alterada en la clona mutante.

Electroforésis Bidimensional pH 8.6 X pH 4.5

Detectaron varias manchas de proteínas que corresponden a cuando menos 14 proteínas ribosomales de tipo básico en la clona C₉ (Emt^R) (Fig. 14). Los patrones de las proteínas ribosomales de tipo básico de E. histolytica comparadas con las proteínas ribosomales básicas de Saccharomyces cerevisiae, mostraron poca similitud ya que las proteínas amibianas migraron en la segunda dimensión muy poco con respecto a la migración que presentaron las proteínas ribosomales de la levadura. Sin embargo, el patrón electroforético bidimensional de las proteínas ribosomales amibianas mostró una gran similitud en comparación con las proteínas ribosomales básicas de Acanthamoeba castellanii, reportados por Jantzen (1978). Encontrándose similitud entre las proteínas ribosomales de E. histolytica y las de A. castellanii a nivel de carga eléctrica.

Mediante el sistema de análisis electroforético, se detectaron también 4 proteínas ácidas tanto en la clona A como en la clona C₉ (Fig. 13)

sin cambios aparentes entre las dos clonas de E. histolytica.

La detección pobre de las proteínas ribosomales ácidas amibianas, aún después de teñirlas con nitrato de plata, se debe posiblemente a la poca cantidad de la proteína ribosomal ácida presente en el ribosoma amibiano, ya que por lo menos en la levadura se conoce que la cantidad de las proteínas ribosomales ácidas representan solamente el 1% de la proteína ribosomal total.

Electroforesis Bidimensional pH 4.5 X SDS

Mediante el sistema se obtiene una buena resolución de las proteínas ribosomales básicas de las clonas de E. histolytica: clona A (E_{mt}^S) y de las proteínas ribosomales de S. cerevisiae, lo que permitió distinguir y analizar las proteínas ribosomales básicas a un nivel fino. El análisis comparativo entre las proteínas ribosomales de las amibas con las de levadura mostraron similitud en el mapa total de las proteínas, es decir, migraron en forma semejante en la segunda dimensión sin embargo, se observó la ausencia de una de las proteínas ribosomales en E. histolytica y que es clásica en cualquier sistema eu cariótico y procariótico hasta la fecha estudiados (Fig. 16) siendo esta proteína correspondiente a la subunidad 60 S del ribosoma en la levadura y que es clasificada como la número dos por Gorenstein y Warner (1976). Sería interesante la búsqueda o rastreo del sustituto de esta proteína en E. histolytica y por consecuencia la búsqueda de su significancia biológica.

El análisis comparativo entre las proteínas ribosomales

básicas de la clona A (E_{mt}^S) y la clona C_9 (E_{mt}^R) permitió diferenciar a ambas clonas, en las proteínas de una masa relativa de 44,000 daltones las cuales están modificadas en la en la clona C_9 resistente a emetina. Lo que sugiere que posiblemente estas proteínas están implicadas en los procesos de resistencia a la emetina, ya que por lo menos en peso molecular las diferencias que se han encontrado en otros sistemas celulares, como es el caso en células CHO resistentes a emetina, esta dada por la modificación de la proteína ribosomal S 22 con un peso molecular de 18,000 daltones, (Reichenbecher y col., 1979).

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, se concluye que:

1. Por primera vez se reportaron las proteínas ribosomales ácidas y básicas de Entamoeba histolytica.

2. Por densitometría de los geles unidimensionales de las proteínas ribosomales amebianas se detectaron 125 bandas que fluctúan entre 14,000 y 112,000 daltones.

3. Entre las diferencias que se detectaron en el análisis electroforético unidimensional de las proteínas ribosomales entre la clona A sensible a emetina y la clona C₉ resistente a emetina, destaca modificación de las proteínas que pertenecen a la región cercana a 18,000 Kd la cual está modificada en la clona C₉ (E^R).

4. Se detectaron en los geles bidimensionales 4 proteínas ribosomales ácidas en la clona A como en la clona C₉.

5. El análisis electroforético bidimensional de las proteínas ribosomales básicas mostró la presencia de 39 a 44 manchas de proteínas.

6. Se detectaron diferencias entre las proteínas ribosomales básicas de la clona A y la clona C₉, dichas diferencias se localizaban en las proteínas cuya masa relativa corresponde a 44,000 y 18,000 daltones, las cuales están modificadas en la clona C₉.

7. El patrón electroforético de las proteínas ribosomales de Entamoeba histolytica mostró la ausencia de una de las proteínas ribosomales que es común en procariotes y eucariotes, la cual es clasificada como la número dos en Saccharomyces cerevisiae.

APENDICE

Medio TY1 - S - 33

Biosate	30.0 g
Dextrosa	10.0 g
NaCl	2.0 g
KH_2PO_4	0.6 g
Cisteína	1.0 g
K_2HPO_4	1.0 g
Citrato férrico	0.0236 g
Acido ascórbico	0.2 g

pH 6.8 en 820 ml de agua tridestilada.

Solución Salina Amortiguadora de Fosfatos (PBS)

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na_2HPO_4	1.15 g
KH_2PO_4	0.2 g

pH 7.3 en 1000 ml de H_2O tridestilada.

BIBLIOGRAFIA

1. Arroyo-Begovich, A. 1981. Temas selectos de fisiología celular E. d. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 159-161.
2. Bielka, H. 1978. The eukaryotic ribosomes. TIBS. July. 156-158.
3. Boublik, M. y Ramagopal, S., 1980. Conformation of ribosomes from the vegetative amoeba and spores of Dictyostelium discoideum. Mol. Gen. Genet., 179:483-488.
4. Brandt, H. y Pérez, R., 1970. Pathology of human amebiasis. Human - Path., 1:351.
5. Ceccarini, C. y Maggio, R., 1968. Studies on the ribosomes from the cellular slime molds, Dictyostelium discoideum and Dictyostelium purpureum. Biochimica et Biophysica Acta, 166:139-141.
6. Cervantes, A., 1980. Estudio de los procesos de división celular y nuclear en Entamoeba. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología Celular). Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., pág. 25.
7. Delaunay, J., Creusot, F., y Schapira, G., 1973. Evaluation of ribosomal proteins. Eur. J. Biochem., 39:305-312.
8. Diamond, D. L.S., Hoslow, D.R. y Cunnick, C-C., 1978. A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 72:431.
9. Dubochet, J. Ducommun, M. Zollinger, M. y Kellenberger, E., 1971. A new preparation method for Dark-field electron microscopy of biomacromolecules. D. Ultrastructure Research 35:147-167.
10. Eaton, R.D., Meerovitch, E. y Losterton, J.W., 1969. A surface

active lysosome in E. histolytica. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 63:678.

11. Elspeth, W., y McConnachie, 1969. The morphology, formation and development of Cysts of Entamoeba. Parasitology 59:41-53.
12. Entner N., 1979. Emetine binding to ribosomes of Entamoeba histolytica - inhibition of protein synthesis and amebicidal action 26(2):324-328.
13. Faust, C.E., Beaver, C.P., Jung, C.R., 1975. Animal agents and vectors of human disease. Turth edition. Lea y febiger. Philadelphia 63-66.
14. García, P.J. y Vázquez, D., 1977. Genética microbiana. Ed. Alhambra. pp. 54-85.
15. González-Robles, A. y Martínez-Palomo, A., 1963. Scannig electron microscopy of attached trophozoites of pathogenic Entamoeba histolytica, J. Protozool. 30: 642-700.
16. Girard, M., Latham, H-J Penman, S. y Darnell, J.E., 1965. Entrance of newly formed messenger RNA and ribosomes into Hela Cell Cytoplasm. J. Mol. Biol. 11:187.
17. Gorenstein, C.J. y Warner, J.R., 1976. Coordinate regulation of the synthesis of eukaryotic ribosomal proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73:1547-1551.
18. Grollman, A.P. 1968. Inhibition of protein biosynthesis. V. Effects of emetine on protein and nucleic acid biosynthesis in Hela cells. J. Biol. Chem. 243:4089.
19. Gutiérrez, G., Ludlow, A., Espinosa, G., Herrera, S. y Sepulveda, B. 1976. Encuesta serológica nacional. II. Investigación de anti-

- cuerpos contra E. histolytica en la República Mexicana. Memorias de la conferencia Internacional sobre Amibiasis. IMSS, México. p. 559.
20. Gutiérrez, G. y Kumate. 1980. Amibiasis Manual de Infectología. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México. Pág. 58.
 21. Hamel, E., Koka, M. Nakamoto, T. 1972. Requirement of an Escherichia coli 50 S ribosomal protein component for effective interaction of the ribosome with T and G factors and with guanosine triphosphate. J. Biol. Chem. 247:805.
 22. Hans-Peter, R. y Gordon, J. 1977. Evaluation y microdivergence of and rat liver ribosomal proteins. J. Biol. Chem. 252:9065.
 23. Hardy, J.S. Kurland, C.G., Voynow, P. y Mora, G. 1969. The ribosomal proteins of Escherichia coli. Purification of the 30 S ribosomal proteins. Biochemistry 8:2897.
 24. Horack, I. y Schiffmann, D. 1977. Acidic phosphoproteins of the 60 S ribosomal. Eur. J. Biochem. 79:375.
 25. Hsin-Sheg lo y Reeves, E.R. 1980. Purification and properties of NADPH: Flavin oxidoreductase from Entamoeba histolytica. Mol. Biochem. Parasitol. 2:23.
 26. Janot, M.M. 1953. The ipecac alkaloids, vol. 111 (Manske, R.H.P., Ed.) New York Academic Press.
 27. Jantzn, H. 1981. Ribosomal phosphoproteins in Acanthamoeba-Castellani. Eur. J. Biochem. 119:397-352.
 28. Kudo, R.R. 1976. Protozoología. Cuarta impresión. Charles C. Thomas. Ed. Continental.

29. Maizel, J.V. Jr. 1971. *Methods vir.* 5:179-246.
30. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. *Nature* 227:680.
31. Lastick, S.M., Nielsen, P.J. y McConkey, E.H. 1977. Phosphorylation of ribosomal protein S 6 in suspension cultured HeLa cells. *Mol. Genet.* 152:223.
32. Lowry, O.H.N.J. Rosebraugh, A.L. 1951. Protein measurement with the foliphenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265.
33. Martin, T.E. y Wool, I.G. 1968. Formation of active hybrids from subunits of muscle ribosomes from normal and diabetic rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 60:569.
34. Martínez, B.M. 1975. Historia de la amibiasis. Memorias de la conferencia Internacional sobre Amibiasis. IMSS, México, pág. 42.
35. Martínez, Palomo, A. 1982. The biology of *E. histolytica*. Research studies press/John Wiley & Sons Ltd. p. 11-15.
36. Mets, L., y Bofrad, L. 1974. Two dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis an improved method for ribosomal proteins. *Anal. Biochem.* 57:200.
37. Nomura, M. y Held, W.A. 1974. (Nomura, M., Tissieres, A. y Lengyel, P. eds.). Coldspring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York.
38. Nomura, M., Traub, P., y Beclmann, A. 1968. Hybrid 30 S ribosomal particles reconstituted from components of different bacterial origins. *Nature* 219:793.
39. Ochiai, H. Kanda, F., y Iwabuchi, M. 1973. The number and size of

ribosomal proteins in the cellular slime mold Dictyostelium discoideum. J. Biochem. 73:163-167.

40. Openshaw, H.T. 1970. The ipecacuanha alkaloids. In: Chemistry of the alkaloids (Pelletier, S.W., ed.) New York: Reinhold Book Co.
41. Orozco, M.E., Guarneros, G. y Martínez-Palomo, A. 1982. Clonas, de E. histolytica deficientes en fagocitosis presentan deficiencia en virulencia. Arch. Invest. Med. (Méx.), 13 (Supl. 3.0) 137-143.
42. Orozco, M.E., Hernández, F. y Rodríguez, M. 1985. Isolation and characterization of Entamoeba histolytica mutants resistant to emetine. Molecular and Biochemical Parasitology 15:49-59.
43. Osawa, S. y Hori, H. 1980. The ribosomes: structure, function and genetics (G. Chamblis, G.R. Graven), Davies, V. Davis, K. Davis, L. Kahan y M. Nomura, Eds.). University Park Press, Baltimore.
44. Prince, M. y Specht, C., 1983. Preliminary characterization of ribosomes of Entamoeba histolytica. Molecular and Biochemical Parasitology. 8:137-143.
45. Radhey, S. Siminovich, L. 1976. The isolation and preliminary characterization of somatic cell mutants resistant to the protein synthesis inhibitor emetine. Cell 9:213-219.
46. Ramagopal, S. y Ennis, L. 1980. Studies on ribosomal proteins in the cellular slime mold Dictyostelium discoideum. Eur. J. Biochem. 105:245-258.
47. Ramagopal, S. y Ennis, L. 1981. Regulation of synthesis of Cell-specific ribosomal proteins during differentiation of Dictyostelium discoideum. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1981.
48. Rodhain, J. 1943. E. invadens N. Sp., Parasite de serpents. C.R.

Soc. Biol. Paris. 117:1195-1199.

49. Rosombaum, R.M. y Wither, M. 1970. Ultrastructure of bacterizes and axenic trophozoites of E. histolytica with particular reference to helical bodies. J. Cell Biol. 45:367-381.
50. Sargeaunt, P.G. y Williams, J.E. Electrophoretic isoenzyme patterns of E. histolytica and E. coli. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 72: 164.
51. Serton, C. y Wool, I.G. 1974. The extraction of proteins eukaryotic ribosomes and subunits. Molec. Gen. Genet. 135:101.
52. Takeuchi, A. y Phyllips, P.B. 1975. Electron microscopic studies of experimental Entamoeba histolytica. Infection in the intestinal epithelium by trophozoites. Ann. J. Trop. H y G. 24:34.
53. Tolan, R.D. y Lambert, M.J. 1980. Radiorodination of microgram quantities of ribosomal proteins from polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry 103:101-109.
54. Vernon, E., Reichenbecher, Jr. y Caskey, T. 1979. Emetine resistant Chinese Hamster Cells. The Journal of Biological Chemistry 254: 6207.
55. Warner, R.J. 1971. The assembly of ribosomes in yeast. The Journal of Biological Chemistry 216:447-454.
56. Weinbach, E.C. y Diamond, L.S. 1974. E. histolytica: Aerobic metabolism. Exp. Parasitol. 35:232-243.
57. Weinbach, E.C., Diamond, L.S., Claggett, C.E., y Kon, H. 1976. Iron sulfur proteins of Entamoeba. J. Parasitol. 62:127-128.
58. Wittman, H.G. y Wittman Liembold, B. 1974. The ribosomes, ed.

- Nomura, M. Tissieres, A. Legiel, P., Col. Spring Harbor, N.Y. 115
59. Wittman, H.G. 1974. In "Methods in Enzymology" (L. Grossman and P. Moldave Fds.), Vol. 30, pp. 497-518, Academic Press, New York.
 60. Wittner, M. y Rosebaum, R.M. 1970. Role of bacterial in modifying virulence of Entamoeba histolytica. J. Trop. Med. Hyg. 19:755.
 61. Wool, I.G. 1974. Ribosomes, structure and function (Nomura, A. Tissieres, Fds.) Col. Spring Harbor Laboratory, pag. 417-461.
 62. Wool, I.G. 1979. The structure and function of eukaryotic ribosomes. (Chambliss, G. Graven, Davies, K. Pavis, L. Kahan y Nomura, M. Fds.) University Park Pressipa, 797-818.
 63. Wray, W., Poulikas, T., Wray, P.V. y Hancock, R. 1981. Silver staining of proteins in poliacylamide gels. Analytical Biochemistry 118: 197-203.
 64. Yubisui, T., Matsuki, T., Tanishima, K., Takeshita, M. and Yoneyama, Y. 1977. NADPH-flavin reductase in human erythrocytes and the reduction of methemoglobin through flavin by the enzyme. Biochem. Biophys. Res. Commun. 76: 147-182.
 65. Zinker, S. y Warner, J.R. 1976. The ribosomal proteins of Saccharomyces Cerevisiae. J. Biol. Chem. 251: 1792-1807.