

24/13

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES ZARAGOZA



AISLAMIENTO Y TRADUCCION *in vitro* DE RNAm DE *Entamoeba histolytica*; ESTUDIO COMPARATIVO DE CLONAS CON DIFERENTE GRADO DE FAGOCITOSIS



T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
MARIA EUGENIA HIDALGO LARA

MEXICO D. F.

OCTUBRE DE 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 está 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.

INDICE

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	5
1. Antecedentes históricos	5
2. Clasificación taxonómica de <u>E. histolytica</u>	7
3. Ciclo vital de <u>E. histolytica</u>	8
3.1. Trofozoíto	8
3.2. Prequiste	9
3.3. Quiste	10
3.4. Metaquiste	11
3.5. Trofozoíto metaquístico	11
4. Epidemiología de la amibiasis	11
5. Factores involucrados en la virulencia de <u>E. histolytica</u> .	12
5.1. Factores propios del parásito	14
5.1.1. Adhesión	
5.1.2. Aglutinación con Concanavalina A.	
5.1.3. Carga eléctrica de superficie	
5.1.4. Efecto citopático	
5.1.5. Fagocitosis	
5.1.6. "Actividad tóxica" de extractos amibianos	
5.1.7. Actividad de colagenasa	
5.1.8. Efecto de "porameba"	
5.1.9. Actividad mitogénica	
5.1.10. Evasión de la respuesta inmune	
5.2. Factores del medio ambiente	24
5.2.1. Asociación bacteriana	

5.2.2.	Número de subcultivos	
5.2.3.	Colesterol	
5.3.	Factores del hospedero	26
6.	Acido ribonucleico	33
6.1.	RNA mensajero	34
6.2.	Aislamiento de RNA poliadenilado	35
6.3.	RNA de <u>E. histolytica</u>	36
7.	Sistemas de traducción <u>in vitro</u>	37
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	41
IV.	OBJETIVOS	42
V.	MATERIALES Y METODOS	43
1.	Cultivo de trofozoitos de <u>E. histolytica</u>	43
2.	Aislamiento de RNA total	43
2.1.	Aislamiento de RNA de cerebro de rata	44
2.2.	Aislamiento de RNA de <u>E. histolytica</u>	46
2.2.1.	Método de LiCl/Urea	
2.2.2.	Método de Fenol/SDS	
2.2.3.	Método de DEP/SDS	
2.2.4.	Método de isotiocianato de guanidina/CsCl	
3.	Geles de agarosa	50
3.1.	Geles de agarosa no desnaturalizantes	50
3.2.	Geles de agarosa desnaturalizantes	51
4.	Aislamiento de RNA poliadenilado	42
5.	Preparación de lisado de reticulocitos de conejo	53
6.	Traducción <u>in vitro</u> de RNAm's de <u>E. histolytica</u>	54
7.	Inmunoprecipitación de productos de traducción <u>in vitro</u>	57
7.1.	Cultivo de <u>S. aureus</u>	57

7.2.	Preparación de suspensión de <u>S. aureus</u> al 10%	58
7.3.	Preparación de <u>S. aureus</u> para inmunoprecipitación	58
7.4.	Inmunoprecipitación de productos de traducción <u>in vitro</u>	59
8.	Geles de poliacrilamida - SDS	59
9.	Fluorografía de geles de poliacrilamida - SDS	61
VI.	RESULTADOS	62
1.	Aislamiento de RNA total de <u>E. histolytica</u>	62
2.	Labilidad del RNA de <u>E. histolytica</u>	72
3.	Aislamiento de RNA poliadenilado	74
4.	Preparación del lisado reticulocitos de conejo	75
5.	Actividad traduccional endógena del lisado de reticulocitos.	80
6.	Tratamiento del lisado con nucleasa micrococcal	82
7.	Incorporación de ³⁵ S-Metionina en material TCA precipitable.	86
8.	Traducción <u>in vitro</u> de RNAm's de <u>E. histolytica</u>	86
9.	Inmunoprecipitación de productos de traducción <u>in vitro</u> .	91
VII.	DISCUSION	97
VIII.	CONCLUSIONES	111
IX.	REFERENCIAS	113
	APENDICE	130

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Obtención de la clona L-6.
- Figura 2. Adhesión y eritrofagocitosis de las clonas A y L-6.
- Figura 3. Perfil densitométrico de RNA del cerebro de rata.
- Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa del RNA total aislado por el método de LiCl-Urea.
- Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa del RNA total aislado por el método de Fenol-SDS.
- Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa del RNA total aislado por el método DEP-SDS.
- Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa del RNA total aislado por el método de isotiocianato de guanidina-CsCl.
- Figura 8. Perfil densitométrico del RNA aislado por el método isotiocianato de guanidina-CsCl.
- Figura 9. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes del RNA aislado por el método de isotiocianato de guanidina-CsCl.
- Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de la mezcla de RNA de E. histolytica y RNA de cerebro de rata.
- Figura 11. Perfil densitométrico de las poblaciones de RNA poli A+ y poli A-.
- Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de las poblaciones de RNA poli A+ y poli A-.
- Figura 13. Inducción de reticulocitosis por administración de 1,2-acetilfenilhidrazina.

- Figura 14.** Fluorografía de los productos de traducción de los RNAm's endógenos de lisados digeridos y no digeridos con nucleasa micrococcal.
- Figura 15.** Fluorografía de los productos de traducción de los RNAm's de las clonas A y L-6 de E. histolytica.
- Figura 16.** Fluorografía de los productos de traducción de los RNAm's mensajeros de las clonas A y L-6 inmunoprecipitados por los sueros anti - A, anti - L-6 y anti-112 Kd.
- Figura 17.** Fluorografía de los productos de traducción de los RNAm's de la clona A inmunoprecipitados por los anticuerpos monoclonales 10, 15 y 24'.

LISTA DE TABLAS

- Tabla I. Fenotipos de las clonas A y L-6 de E. histolytica.
- Tabla II. Coeficientes de sedimentación de las especies de RNA de E. histolytica.
- Tabla III. Pureza y rendimiento de los RNAs aislados por los métodos DEP-SDS e isotiocianato de guanidina-CsCl.
- Tabla IV. Evaluación de la actividad traduccional RNAm endógena de los lisados de reticulocitos de conejo.
- Tabla V. Efecto del tratamiento con nucleasa micrococcal sobre la actividad traduccional RNAm endógena de los lisados de reticulocitos de conejo.
- Tabla VI. Incorporación de ^{35}S -Metionina en material TCA precipitable en lisados de reticulocitos de conejo incubados con RNA de las clonas A y L-6 aislados por el método isotiocianato de guanidina-CsCl.
- Tabla VII. Incorporación de ^{35}S -Metionina en material TCA precipitable en lisados de reticulocitos incubados con RNA aislado por los métodos DEP-SDS e isotiocianato de guanidina-CsCl.

LISTA DE ABREVIATURAS

Adh+	Amibas eficientes en adhesión
Adh-	Amibas deficientes en adhesión
bis-acrilamida	N,N -metilen-bis-acrilamida
BrdU	5-bromo-2-deoxiuridina
BSA	Albúmina sérica bovina
Cepa HMI:IMSS	Cepa de <u>E. histolytica</u> aislada de un paciente con disentería en el IMSS. México, 1977
CHO	Chinese Hamster Ovary (línea celular aislada de ovario de hámster chino.
Ci	Curies
Ctp+	Amibas eficientes en destruir monocapas celulares en cultivo.
Ctp-	Amibas deficientes en destruir monocapas celulares en cultivo.
Clona A	Clona de la cepa HMI:IMSS aislada por Orozco (1981).
Clona L-6	Clona de la cepa HMI:IMSS aislada por Orozco (1981).
Con A	Concanavalina A
c.p.m.	Cuentas por minuto
CR 34 Tim-	Cepa bacteriana con deficiencia en síntesis de timidina
DEP	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucleico
DOC	Desoxicolato de sodio
DTT	Ditiotreitól
EDTA	Acido etilendiaminotetracético

EGTA	Acido etilenglicol-bis (b-aminoetiléter)- N,N,N, N-tetracético.
Fag+	Amibas eficientes en fagocitosis
Fag-	Amibas deficientes en fagocitosis
HEPES	Acido N-2-hidroxiethylpiperazin-2-etanosulfónico
HRI	Inhibidor regulado por hemina
IgG	Inmunoglobulina G
IVT	Traducción <u>in vitro</u>
Kd	Kilodaltones
MDCK	Madin Darby Cell Kidney (línea celular aislada de riñón de perro).
MOPS	Acido 3-(N-morfolinopranosulfónico)
NP-40	Nonidet P-40
RNAm	Acido ribonucleico mensajero
RNAr	Acido ribonucleico ribosomal
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos
PM	Peso molecular
Poli A	Acido poliadenílico
PPO	2,5- difeniloxazol
RNA	Acido ribonucleico
RNA poli A+	Acido ribonucleico poliadenilado
RNA poli A-	Acido ribonucleico no poliadenilado
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
S	Unidades Svedberg
SDS	Laurilsulfato de sodio
TCA	Acido tricloroacético
TEMED	N,N,N, N -tetrametiletildiamina

Tox+	Amibas eficientes en "actividad de toxina"
Tox-	Amibas deficientes en "actividad de toxina"
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TYI-S-33	Medio de cultivo axénico para amibas de Diamond y col. (1978).
UI	Unidades internacionales
Vir+	Amibas eficientes en virulencia
Vir-	Amibas deficientes en virulencia

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Esther Orozco Orozco por la dirección de esta tesis, por su apoyo y confianza permanentes y por su estímulo en los momentos difíciles.

Al Dr. Federico Sánchez por su valiosa ayuda y colaboración para la realización de esta tesis.

A mis compañeros del laboratorio 8 de Genética y Biología Molecular por su apoyo y su ayuda incondicionales.

A mis profesores por haber contribuido en mi formación profesional.

RESUMEN

En este trabajo nos propusimos como objetivo general estudiar la biología molecular de la fagocitosis amibiana. Para alcanzar este objetivo se caracterizaron por traducción in vitro los RNAs mensajeros de dos clonas de Entamoeba histolytica con diferente grado de fagocitosis. Las clonas A (Fag+) y L-6 (Fag-) utilizadas en este trabajo fueron previamente aisladas y caracterizadas por Orozco (1981).

Para definir las condiciones adecuadas para el aislamiento de RNA total de los trofozoítos amibianos, se probaron varios métodos previamente descritos para la extracción de RNA de células eucarióticas. Sin embargo, con la mayoría de ellos se aisló RNA parcial o totalmente degradado. Con los métodos de extracción basados en el uso de dietilpirocarbonato e isotiocianato de guanidina se obtuvo RNA amibiano intacto; pero, sólo las preparaciones de RNA aisladas en presencia de isotiocianato de guanidina mostraron ser capaces de dirigir la síntesis de péptidos amibianos en un sistema de traducción in vitro. El análisis del RNA aislado mediante el uso de isotiocianato de guanidina en geles de agarosa, mostró la presencia de cuatro poblaciones de RNA mayoritarias, las cuales tuvieron una migración mayor a 28S, aproximadamente 25S, mayor a 18S y aproximadamente 16S. Este patrón electroforético fue muy diferente al mostrado por células eucarióticas típicas, en las cuales se observaron tres especies de RNA mayoritarias con coeficientes de sedimentación 28S, 18S y 5S. Con el método isotiocianato de

guanidina-CsCl se recuperaron de 3 a 5×10^{-5} ug de RNA por trofozoito, cantidad que correlaciona con la cantidad de RNA esperada para una célula eucariótica, que es del orden de 1×10^{-5} ug de RNA total. Por otra parte, la relación de absorbancias 260/280 nm de las preparaciones de RNA aisladas con este método de extracción fue siempre superior o igual a dos, lo que indicó un bajo índice de contaminación con proteínas. El RNA poliadenilado aislado por cromatografía de afinidad a oligo-dT celulosa, constituyó aproximadamente del 5 al 10% de la población de RNA total. Estas poblaciones de RNA, ricas en moléculas de RNA mensajero, demostraron su capacidad para dirigir la síntesis de péptidos amibianos en un sistema de traducción in vitro derivado de reticulocitos de conejo.

Los ensayos de traducción in vitro de los RNAs mensajeros de las clonas A y L-6 se realizaron en un sistema de traducción libre de células derivado de reticulocitos de conejo. Los reticulocitos se obtuvieron de conejos con anemia hemolítica inducida experimentalmente por administración de 1,2-acetilfenilhidrazina. El paquete celular rico en reticulocitos se lisó osmóticamente con agua y el sobrenadante post-mitocondrial se complementó con hemina, un sistema regenerador de energía y ³⁵S-Metionina. La traducción in vitro de los RNAs mensajeros de las clonas A y L-6 se realizó con lisados de reticulocitos con elevada actividad traduccional endógena, que fueron previamente tratados con nucleasa micrococcal para destruir los RNAs mensajeros endógenos y así evitar que se estableciera una competencia entre los RNAs mensajeros de globina endógenos y los

RNAs mensajeros amibianos. El tratamiento del lisado con esta enzima disminuyó aproximadamente 30 veces la actividad traduccional endógena, sin deteriorar notablemente su capacidad para traducir RNAs mensajeros exógenos.

Los productos de traducción in vitro se fraccionaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10% y se analizaron por fluorografía del gel que los contenía después de la exposición durante 24 a 72 horas a placas de Rayos X. Los patrones electroforéticos de los productos de traducción de la clona A (Fag+) y L-6 (Fag-1) fueron similares, sin embargo se observó consistentemente una diferencia entre ambos, que consistió en un péptido de aproximadamente 78 Kd de P.M., el cual se encontró entre los productos de traducción de la clona L-6, pero no entre los de la clona A. Por otro lado, este péptido de 78 Kd fue reconocido por un suero policlonal mono específico preparado contra una proteína de 112 Kd, que se encuentra localizada en la superficie de los trofozoítos amibianos (Orozco, 1986). Cuando el suero anti-112 se incubó con la mezcla de traducción de la clona A, reconoció específicamente dos péptidos de aproximadamente 89 y 95 Kd. Estos resultados indican que el péptido de 78 Kd de la clona L-6 y el péptido de 95 Kd de la clona A, comparten determinantes antigénicos con la proteína de 112 Kd, que se ha visto involucrada en la adhesión y la fagocitosis amibianas. Por otra parte, los anticuerpos monoclonales 10, 15 y 24' que inhiben varias propiedades biológicas de los trofozoítos y de sus extractos, reaccionaron específicamente con dos péptidos de aproximadamente 52 Kd que fueron

sintetizados por los mensajeros de la clona A. Por lo cual se sugiere que los péptidos de 52 Kd podrían corresponder a proteínas involucradas en los procesos biológicos inhibidos por los anticuerpos monoclonales.

La inmunoprecipitación de los productos de traducción in vitro por los sueros policlonales anti-A, anti-L-6 y anti-112 y por los anticuerpos monoclonales, demostró la síntesis de péptidos antigénicos amibianos codificados por los respectivos RNAs mensajeros utilizados.

II. INTRODUCCION

La amibiasis es una enfermedad infecciosa del ser humano causada por el protozooario parásito Entamoeba histolytica. En la mayoría de los individuos la infección se presenta sólo como un estado de portador asintomático, pero con frecuencia este parásito causa una enfermedad que puede ir desde la diarrea crónica ligera hasta la disentería fulminante. Puesto que este microorganismo puede invadir la mucosa intestinal y diseminarse por vía sanguínea, es potencialmente capaz de afectar cualquier tejido. La más común de las complicaciones extraintestinales es el absceso hepático, que puede extenderse al peritoneo, pleura, pulmón o pericardio.

1. Antecedentes históricos.

En 1875 Fedor Aleksandrevitch Lesh asoció por primera vez la disentería con un organismo parásito del hombre al estudiar a un paciente originario de Arkangel (San Petersburgo, Rusia), que presentaba síntomas de disentería crónica. Lesh siguió atentamente el curso de la enfermedad y estableció la relación directa entre el número de amibas en las heces del paciente y la intensidad del cuadro clínico. Al realizar la necropsia de este paciente encontró cicatrices y úlceras en el ciego, principalmente. El examen histopatológico de estas úlceras reveló la presencia de amibas infiltradas en la submucosa. Lesh describió con detalle estas amibas, en cuyo citoplasma encontró eritrocitos, entre otros cuerpos ingeridos. Después de hacer comparaciones entre estas amibas y otras especies ya conocidas, dedujo que se trataba de una nueva especie a la que denominó

Amoeba coli.

Además, con el fin de evidenciar la patogenicidad de las amibas, Lesh realizó algunos experimentos. Inoculó cuatro perros, por las vías bucal y rectal, con las heces del campesino enfermo de Arkangel y después de algunos días observó que uno de los perros presentaba síntomas de disentería; pero, como este resultado no le pareció evidencia suficiente, nunca concluyó que estos parásitos constituyeran el agente causal de la enfermedad. Más tarde, Stephanos Kartulis publicó sus observaciones acerca de 150 casos de disentería, en la mayoría de los cuales encontró amibas como las descritas por Lesh, y afirmó por primera vez el papel etiológico de las amibas en la disentería. En el siguiente año, Roberto Koch encontró amibas en los capilares hepáticos cercanos a los abscesos, con lo cual estableció que debía existir una relación etiológica entre la disentería y el absceso hepático. En 1891 Councilman y Lafleur relataron minuciosamente el cuadro clínico de la amibiasis y de las lesiones encontradas en ella, así como una descripción detallada de las amibas causales denominadas por ellos Entamoeba dysenteriae. Estos autores, también sugirieron la presencia de una amiba no patogénica en el colon humano. Posteriormente, Quincke y Roos describieron el ciclo de vida de las amibas parásitas en el intestino humano. En 1903, Shaudinn mediante estudios estructurales distinguió las dos especies de amibas conocidas hasta entonces como parásitos del ser humano: a la patógena la llamó Entamoeba histolytica y Entamoeba coli a la no patógena. (Tomado de Martínez-Báez, 1976).

2. Clasificación taxonómica de Entamoeba histolytica.

De acuerdo a la clasificación de los protozoarios recomendada por la Sociedad de Protozoólogos (Honigberg, 1964) y modificada por Levine y col. (1984), la taxonomía de E. histolytica queda como sigue:

Phylum	:	Protozoa
Subphylum	:	Sarcomastigophora
Superclase	:	Sarcodina
Clase	:	Rhizopodea
Orden	:	Amoebida
Familia	:	Endamoebidae
Género	:	<u>Entamoeba</u>
Especie	:	<u>E. histolytica</u>

El Phylum Protozoa agrupa a los organismos unicelulares, cuyo cuerpo está constituido por una sola célula que posee todas las características básicas de los metazoos. De acuerdo con esta clasificación, el Phylum Protozoa queda dividido en cinco subphyla. El primero de ellos, el Sarcomastigophora, incluye la superclase Mastigophora (los flagelados), la superclase Opalinata (los opalinidos) y la superclase Sarcodina (las amibas). Los otros subphyla son Apicomplexa (esporozoos y piroplasmas), Microspora (microsporidios), Mixospora (mixosporidios) y Ciliophora (ciliados y suctorios).

La superclase Sarcodina se divide en dos clases: Rhizopodea y Actinopodea. La mayoría de las especies parásitas pertenecen a Rhizopodea, aunque Actinopodea incluye algunas especies parásitas de plantas y animales.

Superclase Sarcodina. Generalmente presentan pseudópodos, ectoplasma relativamente indiferenciado, cuerpo desnudo, reproducción asexual binaria y, si se presenta, reproducción sexual mediada por gametos flagelados.

Clase Rhizopodea. Su locomoción asociada con la formación de lobopodios, filopodios y rizopodios; y presentan nutrición fagotrófica.

Subclase Lobosia. Presentan pseudopodos lobosos.

Orden Amoebida. Presentan cuerpo desnudo y son típicamente organismos uninucleados; muchos de sus miembros son parásitos.

Familia Endamoebide. Todos los miembros son exclusivamente parásitos.

Género Entamoeba. Incluyen numerosas especies parásitas de vertebrados e invertebrados.

Especie E. histolytica. Es sin duda la especie mejor conocida, ya que parasita al hombre, siendo el agente causal de la disentería amibiana.

3. Ciclo vital de Entamoeba histolytica.

E. histolytica posee cinco fases en su ciclo vital, que son: la de trofozoíto, la prequística, la quística, la metaquística y la de trofozoíto metaquístico.

3.1. Trofozoíto.

El trofozoíto es una célula amorfa, altamente dinámica y extremadamente sensible a cambios microambientales, tales como:

temperatura, pH, osmolaridad y potencial redox. Es típicamente uninucleada y habita en las últimas regiones del intestino delgado y en todo el intestino grueso del hombre y de otros primates, se le encuentra íntimamente adherido a la mucosa intestinal. El trofozoíto mide de 20 a 40 μm de diámetro y es típicamente monopodial. Su núcleo mide de 4 a 7 μm de diámetro y está rodeado por una capa uniforme de gránulos, lo que le da un aspecto de anillo. La masa de cromatina está distribuida generalmente en forma uniforme y en ocasiones se le encuentra adherida a la cara interna de la membrana nuclear. El cariosoma es una masa esférica pequeña de aproximadamente 0.5 μm de diámetro, localizada en la parte central del núcleo (Martínez-Palomo, 1982). En el citoplasma se distinguen dos porciones: el actoplasma y el endoplasma. El ectoplasma se caracteriza por ser hialino y abundante, mientras que el endoplasma es ligeramente granular y más escaso. El endoplasma del trofozoíto contiene vacuolas alimenticias y de digestión; así como también, eritrocitos, leucocitos, bacterias y desechos celulares en el caso de que los trofozoítos sean aislados directamente de un paciente con disentería amibiana. Sin embargo, no presenta los organelos diferenciados encontrados en células eucarióticas típicas i.e., mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso, centriolos y microtúbulos (Deutsch y Zaman, 1959; Osada, 1959).

3.2. Prequiste.

Aún no se sabe por qué en un momento dado algunos de los trofozoítos habitantes del intestino humano asumen la forma prequística, en la cual se observa que el citoplasma disminuye de

tamaño y se redondea. Las inclusiones alimenticias son expulsadas, y al mismo tiempo los cuerpos cromatoides comienzan a aparecer. Estudios de absorción ultravioleta (Barker y Svihla, 1964) y análisis preliminares de sedimentación junto con estudios de microscopía electrónica (Morgan y col., 1968) sugieren que el cuerpo cromatoide está compuesto de ribosomas o de precursores ribosomales. Barker y Swales (1972) suponen que gran número de ribosomas son sintetizados en esta fase prequística, aunque no sean utilizados hasta que existan condiciones adecuadas para que ocurran el crecimiento y la diferenciación. Kusamrarn y col. (1975) consideran que el cuerpo cromatoide, es incapaz de participar en el proceso de síntesis proteica y por tanto está relacionado con períodos de actividad metabólica reducida.

3.3. Quiste.

Los quistes de E. histolytica son esféricos y están rodeados por una pared refractaria compuesta principalmente por quitina. El tamaño varía entre 3.5 a 20 μm de diámetro. Cada quiste contiene cuatro núcleos prominentes, cada uno con un endosoma central, gránulos de glucógeno y un agregado de cuerpos cromatoides, los cuales son característicos de los quistes maduros. El citoplasma y el núcleo del quiste maduro muestran una estructura similar a la descrita anteriormente para el trofozoíto (Miller y Deas, 1971; Proctor y Gregory, 1973; Rondanelli y col., 1974). A medida que el quiste madura los depósitos de glucógeno disminuyen (Chávez y col., 1978). El enquistamiento de E. histolytica en cultivo es favorecido por el crecimiento exponencial de los trofozoítos antes de la diferenciación, la

carencia de nutrientes y la disminución de la tonicidad del medio. Mientras que in vivo el quiste se forma cuando existen condiciones adecuadas para la formación de heces sólidas normales (Mc Connachie, 1969). Los quistes son las formas infectivas, salen fuera del hospedero mediante las heces y son ingeridos por éste en alimentos o en agua contaminada. Los quistes viajan por el aparato digestivo y llegan a la región del íleon, donde se produce el desenquistamiento.

3.4. Metaquiste.

De cada quiste en proceso de desenquistamiento emerge un protoplasto desnudo tetranucleado que se divide inmediatamente dando lugar a ocho trofozoítos metaquísticos uninucleados (Cleveland y Sanders, 1930).

3.5. Trofozoíto metaquístico.

Los trofozoítos metaquísticos pasan al ciego donde se adhieren a la mucosa y maduran, dando lugar a trofozoítos, que constituyen el estadio activo de desarrollo y multiplicación de E. histolytica.

4. Epidemiología de la amibiasis.

La amibiasis es una enfermedad infecciosa con distribución mundial. Reportes de la Organización Mundial de la Salud indican que el 10% de la población mundial padece amibiasis y que el 15% de ésta sufre amibiasis sintomática (WHO, 1969). La amibiasis sintomática como la subclínica son más frecuentes en las zonas tropicales. En México, está considerada como un problema de salud pública por su elevada incidencia. Gutiérrez y col. (1976)

estimaron que el 5.95% de la población mexicana presenta anticuerpos séricos dirigidos contra E. histolytica y que la frecuencia de individuos con anticuerpos contra la amiba oscila entre 2.53% y 9.95%, dependiendo principalmente de la edad, el sexo y las condiciones sanitarias de la región estudiada. Este porcentaje corresponde a la amibiasis invasiva en la que se ven incrementados los títulos de anticuerpos, particularmente IgG (Maddison y col., 1968; Savana y Chaicumpa, 1969; Dasgupta, 1974). En lo que respecta a la proporción de pacientes sin evidencia clínica, se estima que en México hay un paciente con amibiasis invasiva por cada cuatro o cinco portadores asintomáticos (Sepúlveda, 1976). Los casos de disentería amibiana suelen ser esporádicos, aunque también se han presentado epidemias, generalmente transmitidas por el agua (Andrews y White, 1936; Basnuevo, 1959). Los quistes son transmitidos a menudo al ingerir verduras, principalmente en los países donde se usa el excremento humano como fertilizante o cuando se riegan los plantíos con aguas negras.

En los climas templados, la amibiasis sintomática es poco frecuente en niños menores de 10 años de edad, y las lesiones tanto intestinales como hepáticas predominan en los varones adultos.

5. Factores de virulencia de Entamoeba histolytica.

Los trofozoítos de E. histolytica pueden permanecer en la luz del intestino humano como comensales, pero ocasionalmente pueden invadir la mucosa intestinal produciendo disentería amibiana. En esta etapa son potencialmente capaces de diseminarse

por vía sanguínea a otros tejidos, dando lugar a lesiones extra-intestinales. Hasta el momento no es posible explicar por qué algunas cepas amebianas son capaces de invadir los tejidos del hospedero, mientras que otras permanecen en la luz intestinal, sin producir daño aparente. Estudios realizados por diversos grupos de trabajo, sugieren que la virulencia de las cepas amebianas correlaciona con ciertas propiedades biológicas de los trofozoítos y de sus extractos. Entre estas propiedades podemos mencionar: adhesión a células epiteliales en cultivo (Martínez-Palomo y col., 1980), susceptibilidad de aglutinación con Concanavalina A (Trissl y col., 1977), capacidad de producir efecto lítico sobre células en cultivo (Orozco y col., 1978; Mattern y col., 1980; Ravdin y Guerrant, 1981) y la fagocitosis de eritrocitos (Trissl y col., 1978; Orozco y col., 1983).

El mecanismo por el cual los trofozoítos de E. histolytica dañan los tejidos del hospedero no está completamente definido, sin embargo existen evidencias suficientes que indican que dicho mecanismo se lleva a cabo en tres etapas consecutivas: adhesión a la célula blanco, fagocitosis y efecto citopático. Este último, está definido como la capacidad de los trofozoítos para destruir monocapas de células en cultivo (Mattern y col., 1978; Orozco y col., 1980; Ravdin y col., 1980). Por otra parte, en E. histolytica como en otros microorganismos patógenos, la iniciación de la invasión tisular se presenta sólo cuando se rompe el equilibrio hospedero-parásito, en el que la ameba permanece como comensal. Los factores que participan en el rompimiento de dicho equilibrio pueden ser de tres tipos: 1) los propios del

pa esencial para la colonización y, en algunos casos, para la subsecuente invasión del tejido.

Estudios de microscopía electrónica mostraron que los trofozoítos de E. histolytica establecen contacto estrecho con células mamíferas in vitro, dejando un espacio entre ambas membranas de aproximadamente 20 μm (Martínez-Palomo, 1982). Por otro lado, estudios in vitro utilizando diferentes líneas de células epiteliales en cultivo como son células de riñón de conejo (Knight y col., 1974), células de riñón de perro de la línea MDCK (Orozco y col., 1978) y células de ovario de hámster chino (CHO) (Ravdin y Guerrant, 1981) sugieren que se requiere de contacto entre los trofozoítos y la capa celular para que los trofozoítos produzcan daño, lo cual indica que la adhesión precede a la destrucción celular.

Se sabe muy poco acerca de las moléculas de E. histolytica que participan en la adhesión de los trofozoítos a la célula blanco, pero se sugiere la presencia de receptores específicos localizados sobre la superficie amibiana (Ravdin y Guerrant, 1981; Olguín, 1984). Kobilier y Mirelman (1980), aislaron y purificaron parcialmente una lectina a partir de trofozoítos de E. histolytica cultivados axénicamente. Esta lectina tiene la

capacidad de aglutinar eritrocitos de diferentes especies, incluyendo los humanos, (Kobiler y Mirelman, 1980) y células CHO (Ravdin y Guerrant, 1981). Ambas actividades de lectina de los extractos amibianos son inhibidas por algunos carbohidratos específicos: N-acetil-glucosamina y N-acetil-galactosamina, respectivamente. Orozco y col. (1982) demostraron inhibición específica de la adhesión de los trofozoítos a la célula blanco por oligómeros de N-acetil-glucosamina y N-acetil-galactosamina. Ravdin y Guerrant (1985) encontraron que el grado de inhibición de la adhesión por N-acetil-galactosamina correlaciona con el grado de virulencia in vitro de los trofozoítos de E. histolytica. Estos mismos autores demostraron que la adhesión amibiana es inhibida por el uso de citocalasinas, drogas que tienen la propiedad de interferir con la formación de microfilamentos. Este resultado sugiere por tanto, la participación del citoesqueleto amibiano en el proceso de adhesión de los trofozoítos a la célula blanco (Ravdin y Guerrant, 1981). La adhesión si bien parece ser el primer evento del mecanismo de agresión de E. histolytica no guarda relación directa con la virulencia de las cepas amibianas, ya que clonas eficientes en adhesión mostraron grados variables en virulencia (Orozco y col., 1982, 1983, 1986, Rodríguez, 1985).

5.1.2. Aglutinación con Concanavalina A.

Trissl y col. (1977) reportaron que las cepas patógenas de E. histolytica son más fácilmente aglutinadas con Concanavalina A (Con A) que aquellas aisladas de pacientes asintomáticos. Esto parecía indicar que la mayor susceptibilidad a la aglutina-

ción con Con A era un rasgo distintivo de cepas altamente virulentas. Sin embargo, Orozco (1981) realizó este mismo estudio en tres cepas de diferente virulencia y no encontró diferencias en su capacidad para aglutinarse con Con A, con lo cual mostró que no existe correlación entre esta propiedad y la virulencia de las cepas. No obstante, no se descarta que las glicoproteínas reconocidas por con A pueden estar involucradas en la relación huésped-parásito.

5.1.3. Carga eléctrica de superficie.

Se sabe que la mayoría de las superficies celulares que participan en la adhesión presentan carga negativa neta. Trissl y col. (1977) midieron la carga eléctrica de superficie de cepas patógenas y no patógenas. En las cepas patógenas no detectaron carga negativa sobre la superficie amibiana, mientras que en las cepas no patógenas, sí. Esta propiedad extraordinaria de las cepas patógenas de E. histolytica podría favorecer la unión de los trofozoítos a la célula blanco.

5.1.4. Efecto citopático.

El efecto citopático se define como la capacidad de los trofozoítos para destruir monocapas celulares en cultivo. Estudios realizados por diferentes grupos de trabajo han mostrado que el efecto citopático correlaciona directamente con la virulencia de E. histolytica, ya que sólo las cepas patógenas producen daño a las monocapas celulares (Orozco y col., 1978; Ravdin y Guerrant, 1981; Bracha y Mirelman, 1984).

5.1.5. Fagocitosis.

La fagocitosis es una característica biológica de los trofozoítos de E. histolytica que se ha visto involucrada tanto en la citopatogenicidad in vitro como en la invasión de los tejidos in vivo (Trissl y col., 1978; Orozco y col., 1980, 1982, 1983). Estudios microscópicos han mostrado trofozoítos amibianos fagocitando activamente células blanco (Chávez y col., 1974).

E. histolytica presenta aparentemente dos tipos de fagocitosis: Uno altamente específico, mediado por receptores de superficie no identificados llamados adhesinas, las cuales participan en la adhesión de los trofozoítos a la célula blanco. Su especificidad se ha demostrado por las diferentes afinidades de los trofozoítos para ingerir eritrocitos de varias especies mamíferas y diferentes cepas bacterianas (Ravdin y Guerrant, 1981; Bracha y col., 1982; Olguín, 1984). El otro mecanismo por el cual los trofozoítos hacen contacto con partículas fagocitables, puede ser un mecanismo físico no específico mediado por fuerzas electrostáticas, como ocurre con la ingestión de partículas de almidón, de látex, de fierro, etc. Bracha y col. (1982) observaron que los trofozoítos de E. histolytica ingieren rápidamente bacterias no fagocitables cuando éstas están cubiertas con Con A o con anticuerpos antibacteria. Por lo cual, ellos postulan que la adhesión del anticuerpo o de la bacteria cubierta con Con A a la superficie amibiana está mediada por glicoproteínas manosiladas y por otros tipos de moléculas específicas presentes en la membrana plasmática, la cual interacciona fuertemente con moléculas IgG (Bracha y col., 1982). Aparentemente, el enlazamiento de anticuerpos y de la Con A genera una señal, la cual origina

su rápida introducción al citoplasma.

Orozco y col. (1980) reportaron que la velocidad de eritrofagocitosis correlaciona directamente con la virulencia de varias cepas estudiadas. A su vez, la velocidad de eritrofagocitosis puede estar determinada por el número y la afinidad de las adhesinas específicas y de otros receptores capaces de interactuar con la célula blanco. Estudios recientes realizados por García-Rivera y col. (1982) utilizando mutantes deficientes en adhesión mostraron que la deficiencia en adhesión se refleja en una disminución de la velocidad de fagocitosis, así como también en la disminución de la virulencia in vivo e in vitro de los trofozoítos. Sin embargo, otros factores tales como las deficiencias para emitir la señal que induce la ingestión, para desacoplar las proteínas del citoesqueleto y/o para digerir las partículas ingeridas, pueden afectar la velocidad de fagocitosis y la capacidad de los trofozoítos para producir daño.

Adhesión en ingestión. La adhesión de microorganismos a células epiteliales es un evento crucial en la colonización e invasión de tejidos (Smith, 1977). La adhesión de E. histolytica a células epiteliales ha sido definida como una etapa fundamental para que ocurran los mecanismos de destrucción celular y fagocitosis (Orozco y col., 1980; Ravdin y col., 1980). Sin embargo, la adhesión es insuficiente para expresar la eficiencia de fagocitosis y la virulencia; ya que cepas amebianas que difieren en virulencia y en velocidad de fagocitosis, se adhieren con eficiencia similar a epitelio intestinal, a monocapas celulares en cultivo y a eritrocitos (Orozco y col., 1982), indicando que

existen otros factores que junto con el mecanismo de adhesión determinan la patogenicidad del parásito.

Una vez que las partículas se adhieren a la membrana plasmática, los pseudopodios amibianos las comienzan a rodear hasta que las envuelven completamente. Este tipo de adherencia se ha denominado "Adherencia circunferencial" (Griffin y col., 1976).

Quimiotaxis en la ingestión. Aunque la adhesión es la primera etapa común en los procesos de fagocitosis y efecto citopático, éstos pueden ser precedidos por quimiotaxis. Se han definido varios agentes quimioatrayentes para macrófagos, entre ellos: diferentes factores bacterianos, proteínas plasmáticas, sistemas de complemento, de coagulación y fibrinolíticos; así como varias células, especialmente neutrófilos polimorfonucleares (Sbarra y col., 1981). No se conoce la forma en que estos factores interaccionan con la superficie celular y más aún, la atracción de las amibas por ellos también es meramente especulativa.

Endocitosis. Ravdin y Guerrant (1981) reportaron la participación de microfilamentos de actina en la locomoción y fagocitosis de E. histolytica, los cuales fueron inhibidos cuando los trofozoítos fueron incubados en presencia de Actinomicina B y D, drogas que inhiben la polimerización de la actina y por tanto, la función de los microfilamentos.

Es probable que la membrana amibiana presente sitios endocíticos especializados constituyendo las áreas en las cuales se pueden generar vesículas pinocíticas o fagocíticas. Estos si-

tios pueden estar distribuidos al azar sobre la superficie celular, o agrupados principalmente en el uroide.

Digestión y Exocitosis. No hay evidencia directa que sugiera la presencia de lisosomas típicos en E. histolytica y tampoco se han estudiado apropiadamente los procesos de digestión y exocitosis en este parásito. Aley y col. (1984) sugieren que ambos procesos se llevan a cabo en el interior de dos compartimentos vesiculares fácilmente distinguibles. El primero de ellos consiste en dos grandes vacuolas (mayores a 2 μm de diámetro que están intercambiando constantemente sus contenidos con el medio ambiente. Estas vacuolas se distinguen de los lisosomas eucarióticos típicos porque no son capaces de acidificar ni de degradar los marcadores que se utilizaron en este estudio. El otro compartimento vacuolar está compuesto por pequeñas vesículas (menores a 2 μm de diámetro), las cuales sí acidifican los contenidos, como se indicó en experimentos realizados con naranja de acridina.

La exocitosis no se ha estudiado apropiadamente en E. histolytica. Sin embargo, se han propuesto dos procesos exocíticos para amibas de vida libre. En el primero, la amiba expulsa el material no digerido y la membrana vacuolar se reincorpora a la superficie por fusión. En el segundo, la membrana vacuolar se inserta o se intercala en el polo cóncavo del aparato de Golgi. Es muy probable que este segundo mecanismo no se presente en E. histolytica, puesto que se trata de un eucariote atípico que no presenta aparato de Golgi.

5.1.6. "Actividad de toxina" de los extractos amibianos.

La capacidad de los extractos amibianos crudos para destruir monocapas celulares en cultivo ha sido reportada por varios grupos (Lushbaugh y col., 1979; Bos y van der Eijk, 1980; Mattern y col., 1980). Los factores amibianos responsables de la lisis celular no han sido identificados, aunque sin duda se trata de uno o más factores solubles que exhiben una actividad semejante a proteasa. Varios grupos reportaron simultáneamente la purificación parcial de una molécula parecida a una toxina (Lushbaugh y col., 1979); Mattern y col., 1980; Bos y van der Eijk, 1980). Bos (1979) demostraron que la actividad de toxina está restringida a proteínas cuyo peso molecular va de 35 a 45 Kd y parece ser de naturaleza glicoprotéica, ya que es capaz de unirse a Con A. Aun cuando esta citotoxina tiene actividad enterotóxica, demostrada por la inducción de exudado en una porción de íleon ligada (Lushbaugh y col., 1979), el papel patogénico de la toxina es desconocido.

Por otra parte, Rodríguez (1985) observó que los extractos amibianos provenientes de mutantes de E. histolytica deficientes en virulencia mostraron alta actividad de toxina. Por lo que se sugiere que los factores de los extractos amibianos que causan daño a las monocapas celulares no son suficientes para la expresión de la virulencia.

5.1.7. Actividad de colagenasa.

Muñoz y col. (1982) reportaron en E. histolytica la presencia de una enzima proteolítica que digiere fibras de colágena tipos I y III. Esta enzima aparentemente está localizada en la

membrana plasmática de los trofozoítos y se requiere de contacto directo entre la amiba y el sustrato para que ocurra la digestión de la colagena. Muñoz y col. (1984) midieron la actividad colagenolítica en cepas de E. histolytica con diferente virulencia y encontraron que las cepas patógenas presentan mayor actividad de colagenasa que las cepas no patógenas. Estos resultados sugieren que la actividad de colagenasa puede jugar un papel importante en la invasión de los tejidos del hospedero y por tanto en la expresión de la virulencia amibiana.

5.1.8. Efecto de "porameba".

Dos grupos de investigación han reportado recientemente la existencia de proteínas de la membrana plasmática, capaces de formar poros en la membrana (PFM) de macrófagos y linfocitos (Linch y col., 1982; Young y col., 1982). Las proteínas PFM inducen una rápida despolarización de la membrana de las células mencionadas e inducen el rápido flujo de iones a través de la membrana de vesículas de fosfatidilcolesterol, las cuales fueron utilizadas como modelo para estudiar este fenómeno. Las proteínas PFM son secretadas al medio sólo después de exponer las amibas al ionóforo de Calcio A-23187, Con A y un lipopolisacárido de Escherichia coli. El papel de las proteínas PFM en la patogénesis de la amibiasis no está definido, pero se cree que participan en los eventos citolíticos observados en las células mamíferas que estuvieron en contacto con las amibas.

5.1.9. Actividad mitogénica.

Diamantstein y col. (1981) reportaron que los extractos amibianos crudos inducen la proliferación de linfocitos T en indi-

viduos normales. Salata y Ravdin (1985) estudiaron esta propiedad en varias cepas amibianas, y encontraron que la actividad mitogénica de los extractos de la cepa HMI:IMSS fue inhibida por asialofetaina, molécula que presenta tres residuos terminales de N-acetilgalactosamina. Esta observación correlaciona con la lectina de superficie inhibible por N-acetilgalactosamina, así como también con la virulencia de cuatro cepas estudiadas (Salata y Ravdin, 1985). Sin embargo, se requieren algunos estudios más para determinar si la misma molécula de la superficie amibiana es responsable de las dos actividades: mitogénica y de lectina, y determinar su papel en el mecanismo in vivo de los trofozoítos de E. histolytica.

5.1.10. Evasión de la respuesta inmune.

Estudios inmunológicos recientes han mostrado que las cepas patógenas de E. histolytica presentan resistencia a la lisis por el complemento (Calderón y Tovar-Gallegos, 1980; Reed y col., 1983), redistribuyen sus antígenos de superficie (Pinto da Silva y col., 1975; Trissl y col., 1978; Calderón y col., 1980), desprenden de su membrana plasmática antígenos enlazados a anticuerpos e internalizan una cantidad importante de los antígenos redistribuidos (Aust-Kettis y Sundquist, 1980; Calderón y col., 1980). Además, se ha observado que los trofozoítos también presentan resistencia a la lisis por leucocitos polimorfonucleares (Tsutsumi y col., 1984; Ravdin y col., 1985). Por otra parte, Kretschmer y col. (1985) detectaron un producto amibiano en el sobrenadante de trofozoítos crecidos axénicamente, el cual es capaz de inhibir la motilidad in vivo e in vitro de fagocitos

mononucleares humanos. Estos podrían ser factores de virulencia importantes que favorecerían la supervivencia de los trofozoítos en el hospedero, mediante la evasión de los mecanismos inmunológicos tanto humorales como celulares.

5.2. Factores del medio ambiente.

Algunas condiciones de cultivo pueden condicionar o modificar la expresión de la virulencia de los trofozoítos de E. histolytica.

5.2.1. Asociación bacteriana.

Durante mucho tiempo se pensó que la flora bacteriana era indispensable para la expresión de la virulencia amibiana. Phillips y col. (1972) reportaron que las cepas de E. histolytica cultivadas axénicamente por tiempo prolongado perdieron irreversiblemente su capacidad de producir lesiones amibianas. Vincent y Neal (1960) describieron la pérdida gradual de la virulencia de cepas patógenas cultivadas axénicamente. Bos y Hage (1975) observaron que la virulencia de los trofozoítos crecidos con flora bacteriana disminuyó cuando las bacterias fueron separadas del medio de cultivo, mientras que la reasociación con bacterias resultó en la readquisición de la patogenicidad. Bos (1975 y Bos van de Gried (1977) estudiaron la virulencia de varias cepas amibianas y encontraron que aquellas que se cultivaron con bacterias presentaron mayor virulencia que las que se cultivaron axénicamente. Sin embargo, Tanimoto y col. (1971) demostraron que inoculando un número elevado de trofozoítos axénicos, es posible producir absceso hepático en hámsteres. Este resultado fue confirmado por varios autores (Diamond y col., 1974; Martínez-

Palomo, 1978; Gharidian y Meerovich, 1979; Lushbaugh y col., 1981) quienes encontraron que los trofozoítos cultivados sin asociación bacteriana pueden producir absceso hepático. Mattern y Keister (1977) lograron producir abscesos hepáticos con inóculos muy pequeños en hámsteres recién nacidos, los cuales son mucho más susceptibles a las lesiones hepáticas amibianas que los hámsteres adultos.

Hasta el momento no se conoce la naturaleza de la relación amiba-bacteria. Sin embargo, parece ser un fenómeno altamente específico en el que intervienen componentes de la superficie de E. histolytica con actividad de lectina y residuos de N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina presentes en la superficie bacteriana (Bracha y col., 1982; Kobilier y Mirelman, 1984).

5.2.2. Número de subcultivos.

El número y la forma en que se llevan a cabo los subcultivos de los trofozoítos de E. histolytica también pueden modificar la expresión de la virulencia de las cepas patógenas. En 1957 Neal reportó que las cepas patógenas de E. histolytica pierden su virulencia después de cultivarlas por tiempo prolongado con flora bacteriana mixta. Sin embargo, otros autores no han observado cambios notables en la virulencia del mismo tipo de cepas cultivadas por tiempo prolongado en condiciones axénicas (Diamond, 1974; Gharidian y Meerovitch, 1979; Orozco, 1981). Los pasajes repetidos de cultivos amibianos a través del hígado de animales experimentales incrementan la virulencia de cultivos xénicos (Bos, 1977), así como de cultivos axénicos (Lushbaugh y

col., 1978). En el último caso, es probable que el aumento en la virulencia de las cepas estudiadas se deba a que durante la serie de pasajes a través del hígado, se esté favoreciendo el crecimiento de subpoblaciones altamente fagocíticas y virulentas.

5.2.3. Colesterol.

Las condiciones de cultivo pueden modular la virulencia de las cepas de E. histolytica. Sharma (1959) observó incremento en la virulencia de los trofozoítos después de la adición de colesterol al medio de cultivo. Varios autores reportaron que la virulencia de cultivos amibianos que la habían perdido, puede ser reestablecida por 10 a 20 subcultivos en presencia de colesterol (Das y Ghosal, 1976; Bos y van de Gried, 1977; Meerovitch y Gharidian, 1978). Puesto que el colesterol es adicionado al medio en forma sólida, es probable que durante este procedimiento se seleccionen a aquellas amibas con alto índice de fagocitosis y virulencia.

5.3. Factores del hospedero.

Existen algunos factores del hospedero y del medio ambiente que se han visto involucrados en el establecimiento de la infección amibiana. Entre éstos se encuentran: colesterol sérico aumentado, baja aportación de ácido ascórbico en la dieta, consumo elevado de carbohidratos, dieta baja en proteínas, ausencia de exposición previa a las amibas; así como también factores climáticos, emocionales y genéticos (Pérez-Tamayo y Brandt, 1971). Por otra parte, es bien sabido que la incidencia de la amibiasis en el mundo es paralela al nivel sanitario y a la higiene de la

comunidad (Elsdon-Dew y col., 1968).

Hasta ahora hemos descrito algunos factores que se han correlacionado con la virulencia de las cepas de E. histolytica, entre los cuales han destacado diversas propiedades biológicas de los trofozoítos amibianos. Sin embargo, aún no se ha definido cuáles son los factores directamente involucrados en la expresión de la virulencia amibiana y cuáles de ellos sólo participan en forma indirecta mediante la asociación a verdaderos factores de virulencia. Una forma práctica de abordar este problema fue el empleo de una estrategia genética que permitió obtener mutantes de E. histolytica deficientes en diferentes etapas del mecanismo de agresión de los trofozoítos sobre la célula blanco. Orozco y col. (1983) se interesaron en particular por estudiar la relación que guarda la fagocitosis con el grado de virulencia presentado por diferentes cepas de E. histolytica, para lo cual aislaron clones con un grado de fagocitosis atenuada en relación con el de la cepa silvestre. La estrategia seguida por estos autores fue previamente descrita por Clarke (1978) para aislar mutantes en motilidad de Dictyostelium discoideum, la cual consistió en eliminar trofozoítos altamente fagocíticos por envenenamiento con bacterias E. coli cepa CR34 Tim-, crecidas en medio suplementado con bromodeoxiuridina (BrdU). Los trofozoítos se irradiaron posteriormente con luz de 310 nm, la cual rompe el DNA en los sitios donde se incorporó BrdU. Las amibas que ingerieron suficiente cantidad de bacterias-BrdU para ser sensibilizadas mueren en el momento de la replicación, mientras que los trofozoítos que no fagocitaron bacterias-BrdU en alto grado, sobreviven al tratamiento. Los sobrevivientes se

cultivaron en medio TYI-S-33 descrito por Diamond (1978), y el tratamiento se repitió por tres ocasiones. A partir de la población tres veces tratada, se obtuvo una clona, la L-6 (Fig. 1), con propiedades biológicas diferentes a las de la cepa original (Tabla 1).

El índice de fagocitosis de la clona L-6 fue 10 veces menor que el de la cepa original HMI:IMSS, mientras que la adhesión a eritrocitos humanos fue semejante a la de la cepa silvestre (Fig. 2). El efecto citopático de los trofozoítos de L-6 sobre células en cultivo fue menor en 35% que el de la cepa original. Los trofozoítos de L-6 inoculados intrahepáticamente no produjeron absceso hepático y tampoco se detectó "actividad de toxina" de los extractos amibianos de L-6 sobre monocapas celulares de MDCK después de 12 horas de incubación. Más tarde, Rodríguez (1985) obtuvo diez clonas más con fagocitosis atenuada mediante mutagénesis de la clona A con etilmetanosulfonato, seguida por selección de poblaciones deficientes en fagocitosis de acuerdo a la metodología implementada por Orozco (1980). A las clonas así obtenidas se caracterizaron en base a su respuesta en los siguientes cuatro parámetros: velocidad de eritrofagocitosis, eficiencia de adhesión a eritrocitos humanos, capacidad de producir efecto lítico sobre células epiteliales en cultivo, "actividad de toxina" de los extractos amibianos y virulencia in vivo, medida como la capacidad de los trofozoítos para producir absceso hepático cuando son inoculados intrahepáticamente en hámsteres. Todas las mutantes deficientes en fagocitosis mostraron ser deficientes en virulencia y en capacidad para destruir monocapas

Figura 1

Obtención de la clona L-6

Trofozoítos de la cepa HMI:IMSS se pusieron a interactuar con bacterias E. coli CR 34 Tim- crecidas en medio suplementado con BrdU durante 3h. Al término de este tiempo, los trofozoítos se lavaron y se incubaron 24 h a 37°C, para permitir que el BrdU se incorporara en el DNA amibiano. Posteriormente, los trofozoítos se irradiaron con luz de 310 nm por 2h y los sobrevivientes se clonaron en medio líquido.

(Tomado de: "Virulencia y propiedades de superficie de Entamoeba histolytica" Orozco 1981).

FIGURA 1

OBTENCION DE LA CLONA L-6

HMI : IMSS

+

E. coli CR34/BrdU

↓
3 h
37°C

HMI : IMSS - E. coli CR34/BrdU

↓
24 h
37°C

HMI : IMSS CON BrdU EN SU DNA

↓
Luz 310 nm
2 h

SOBREVIVIENTES

↓
Clonación

CLONA L - 6

Figura 2

Adhesión y eritrofagocitosis de las clonas A y L-6

Trofozoítos de las clonas A y L-6 se pusieron en contacto con eritrocitos humanos. Las preparaciones se incubaron:

- a) A 37°C (A+F),
- b) A 37°C y se agregó agua antes de fijar con glutaraldehído (F), y
- c) A 0°C.

Se contrastaron con diaminobencidina y se contaron los eritrocitos adheridos Y/o ingeridos por trofozoíto.

(Tomado de: "Virulencia y propiedades de superficie de Entamoeba histolytica" Orozco, 1981).

ADHESION Y ERITROFAGOCITOSIS

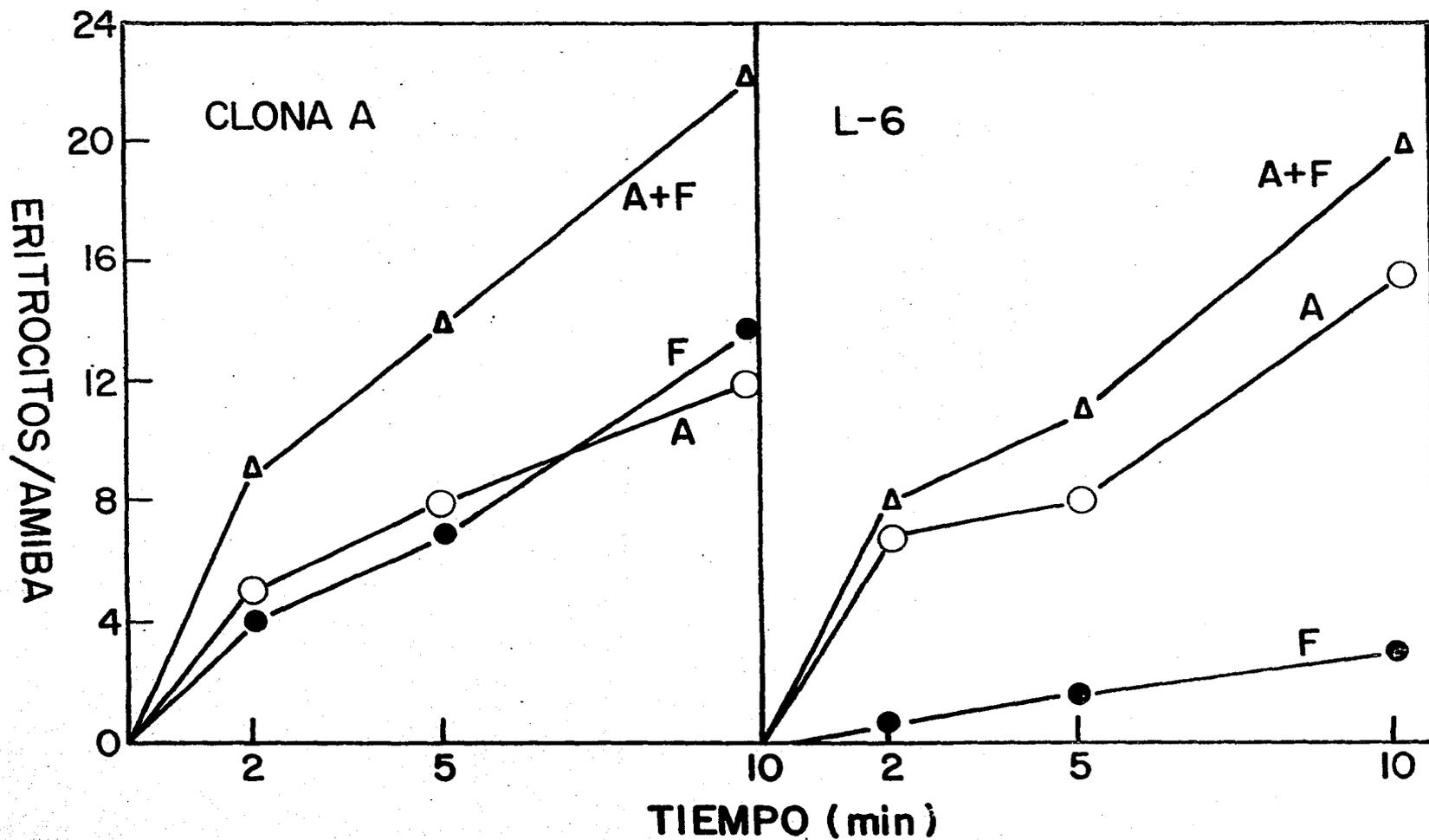


TABLA I

Fenotipos de las clonas A y L-6 de E. histolytica

Cepa	Adh	Fag	Ctp	Ctx	Vir
Hm1:IMSS	100	100	100	100	100
Clona A	100	90	100	100	100
Clona L-6	100	15	20	0	0

1. Los fenotipos se tomaron como porcentaje de aquellos mostrados por la cepa Hm1:IMSS. Adh.= Adhesión de eritrocitos a 4°C, 10 min incubando una amiba por 100 eritrocitos. Fag = Fagocitosis de eritrocitos a 37°C, 10 min, incubando una amiba por cada 100 eritrocitos. Ctp = Capacidad de eritrocitos vivos para destruir monocapas celulares en cultivo. Ctx = Destrucción de monocapas celulares por extractos amibianos crudos. Vir = Virulencia medida como la capacidad de los trofozoítos para producir absceso hepático en hámsteres jóvenes.

2. Las clonas A y L-6 fueron aisladas de la cepa Hm1:IMSS.

(Tomado de: "Virulence -related properties in E. histolytica". Orozco y col., 1986b).

celulares, mientras que sólo tres de ellas mostraron ser deficientes en adhesión y otras tres presentaron escasa "actividad de toxina". Estos resultados sugieren que la fagocitosis es un factor directamente involucrado en la expresión de la virulencia amibiana, mientras que la participación de la adhesión y de la "actividad de toxina" parece ser necesaria pero no indispensable para la expresión de la misma. Siendo por tanto la fagocitosis un evento fundamental en el mecanismo de agresión de E. histolytica sobre la célula blanco, resulta sumamente interesante conocer las bases moleculares que rigen este proceso. En la actualidad, este tipo de estudios se ha visto relativamente simplificado gracias al desarrollo de metodología en los campos de Ingeniería Genética y Biología Molecular.

Una estrategia que podría ser utilizada para el estudio de macromoléculas involucradas en la fagocitosis amibiana, sería el aislamiento de los RNAs mensajeros de E. histolytica, los cuales podrían ser posteriormente caracterizados de acuerdo al tipo y/o cantidad de péptidos sintetizados en un sistema de traducción in vitro - RNA dependiente. El siguiente paso, sería seleccionar del conjunto de productos de traducción, sólo aquellos péptidos involucrados en la fagocitosis. Esto podría llevarse a cabo por inmunoprecipitación de los productos de traducción con anticuerpos monoclonales y/o policlonales. Eventualmente, los RNAs mensajeros específicos podrían ser purificados y utilizados para identificar y caracterizar la expresión de los genes que codifican para proteínas relacionadas con la fagocitosis, mediante la construcción de cDNA marcado radioactivamente.

6. Acido ribonucleico.

El ácido ribonucleico (RNA) es una macromolécula que participa junto con el ácido desoxirribonucleico (DNA) en el almacenamiento y en la transferencia de la información genética. Ambos son componentes importantes de las células, y constituyen en conjunto entre el 5 y 15% de su peso seco. Cada tipo de ácido nucleico se distingue por la secuencia de bases heterocíclicas características de sus monómeros nucleotídicos. El DNA está constituido por cadenas de deoxirribonucleótidos unidos covalentemente, y el RNA está integrado por cadenas de ribonucleótidos. El DNA y el RNA tienen en común cierto tipo de propiedades químicas y físicas debido a que en ambos, las unidades nucleotídicas se hallan unidas covalentemente de idéntica manera mediante puentes fosfodiéster establecidos entre el grupo 5'-hidroxilo de un nucleótido y el grupo 3'-hidroxilo del siguiente. De este modo, el esqueleto de ambos, DNA y RNA, está constituido por grupos alternantes de fosfato y pentosa, en los que los puentes fosfodiéster proporcionan una continuidad covalente. Las bases de purina y pirimidina de las unidades nucleotídicas no se encuentran en la estructura del esqueleto, sino que constituyen cadenas laterales diferenciadas.

Una célula eucariótica típica contiene aproximadamente 1×10^{-5} ug de RNA, 80-85% del cual es RNA ribosomal, 10 al 15% está formado por una variedad de especies de bajo peso molecular (RNA de transferencia, RNAs nucleares pequeños, etc.); mientras que el RNA mensajero constituye 1 a 5% del RNA celular total.

6.1. RNA mensajero.

El RNA mensajero contiene las bases: Adenina, Guanina, Citosina y Uracilo. Se sintetiza en el núcleo durante el proceso de transcripción, en el que la secuencia de bases de una hebra del DNA cromosómico se transcribe enzimáticamente en forma de una sola hebra de RNAm; cierta cantidad de RNAm se sintetiza también en la mitocondria. La secuencia de bases de la hebra de RNAm es complementaria a la hebra de DNA de la cual fue transcrito. Después de la transcripción el RNA pasa al citoplasma y luego a los ribosomas, en donde actúa como una plantilla para la ordenación secuencial de los aminoácidos durante la síntesis de proteínas. Aunque el RNAm constituye sólo una pequeña parte del RNA total de la célula, aparece sin embargo en muchas formas diferentes que pueden variar muchísimo en peso molecular y en secuencia de bases. Cada una de las miles de proteínas diferentes sintetizadas por la célula, es codificada por un RNAm específico o por un segmento de una molécula de RNAm (Lehninger, 1981).

Los RNAs mensajeros de las células eucarióticas se caracterizan por tener un casquete de nucleótidos metilados en el extremo 5', así como una cola de ácido poliadenílico (poli A) en el extremo 3'. Ambas modificaciones son encontradas en los precursores nucleares del RNAm y son introducidas post-transcripcionalmente por actividades enzimáticas independientes de la RNA polimerasa. La cola de poli A no está codificada en el genoma, pero es adicionada después de la transcripción, aún en el núcleo. La inhibición de la poliadenilación evita la aparición del RNAm en

el citoplasma. Esto sugiere que su función es la de favorecer el transporte del RNAm del núcleo al citoplasma. Otras posibles funciones están relacionadas con la estabilidad del RNAm o en la unión de los mensajeros a las membranas. La cola de poli A está constituida por aproximadamente 200 restos de adenilato sucesivos (Lewis, 1980).

En el RNAm de células eucarióticas el extremo 5' se encuentra bloqueado por la formación de una unión 5'-5' pirofosfato y un racimo de grupos metilo unidos covalentemente a la estructura (Perry y Kelly, 1974). Esta modificación post-transcripcional vuelve inaccesible la base terminal original. Se cree que tiene dos funciones obvias: proteger al mensajero contra la degradación del extremo 5', y proveer una característica para su reconocimiento por el ribosoma. Este casquete de grupos metilo no se ha encontrado en el RNAm mitocondrial (Lewis, 1980).

6.2. Aislamiento de RNA poliadenilado.

La presencia de la cola poli A en los RNAm's eucarióticos tiene gran importancia práctica, ya que gracias a ella es posible aislar poblaciones RNA poli A+ del resto de poblaciones RNA poli A-. Esta última formada principalmente por RNAr y RNAt.

Las técnicas más comúnmente usadas se basan en el apareamiento de la región poli A a oligo U o dT, el cual se encuentra enlazado químicamente a un soporte sólido, por ejemplo: Sefarosa o Celulosa. El RNA poli A+ retenido se recupera tratando la columna con una solución salina de fuerza iónica baja, que rompa los enlaces de hidrógeno establecidos entre la cola poli A y

el oligo U o dT, y de esta manera libere el RNAm (Aviv y Leder, 1972).

6.3. RNA de Entamoeba histolytica.

Existen numerosos reportes concernientes al aislamiento y caracterización del RNA en protozoarios, especialmente RNAr. En algunos protozoarios, el RNAr asociado a la subunidad mayor es, aparentemente, un polinucleótido intacto (Hyde y col., 1981); Sherman, 1977; Trigg, 1975). Sin embargo, en muchos protozoarios y en algunos eucariotes inferiores, el RNAr de la subunidad mayor es lábil (Davis y Musselman, 1980) y se disocia bajo condiciones desnaturalizantes en dos fragmentos de aproximadamente el mismo tamaño, comparables en tamaño al RNAr asociado a la subunidad menor (Castro y col., 1981; Hernández y Castañeda, 1981). El RNA del género Entamoeba ha sido escasamente estudiado. Es posible que esto se deba en parte a las dificultades que se presentan en el aislamiento de RNA no degradado de las especies de Entamoeba. Quizá dicha dificultad estribe fundamentalmente en la presencia de una RNasa citoplásmica muy potente, cuya actividad no puede ser eliminada con extracciones fenólicas (Barker, 1976). En particular, las cepas de E. histolytica presentan numerosas RNasas solubles (Ahzar y Mohan, 1975) y una RNasa unida a los ribosomas y a las subunidades ribosomales (Prachayasittikul y Albach, 1982). Morgan y col. (1968) detectaron una RNasa en los quistes de E. invadens a la cual son sumamente sensibles los ribosomas de tales quistes (Morgan y col., 1968). A pesar de estas dificultades técnicas, ya se ha reportado el aislamiento y caracterización del RNA de quistes y trofozoítos de E. invadens

(Barker y Swales, 1972; Barker, 1976). En el caso de E. histolytica, Albach y col. (1977) presentaron evidencias que sugieren un alto grado de labilidad del RNAr in vivo. Dichas evidencias consistieron en la rapidez con la cual el RNA citoplásmico marcado con 3H-Uridina sufrió recambio. En 1984 este mismo grupo de autores reportó el aislamiento y caracterización del RNA de los trofozoítos de este parásito mediante algunas modificaciones hechas a la técnica descrita por Solimosy y col. (1970). Las poblaciones mayoritarias encontradas fueron de 4S, 5S, 17S y 25S (Tabla II). La estabilidad de dichas poblaciones fue examinada por incubación de los extractos de RNA a varias temperaturas y posterior análisis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes. El RNA 25S se distinguió de los RNAs 4S, 5S y 17S por ser especialmente inestable a temperaturas superiores a 37°C, dando lugar a las poblaciones 16S y 17S.

7. Sistemas de traducción in vitro.

Los sistemas de traducción in vitro (IVTs) han sido ampliamente utilizados para la caracterización de RNAm's eucarióticos. Este tipo de sistemas han permitido probar la existencia de identidad de RNAm's específicos, así como también ha sido posible delinear el mecanismo de muchos eventos de la síntesis de proteínas.

El lisado de reticulocito es quizá el sistema de traducción in vitro más eficiente y más comúnmente utilizado. Se prepara a partir de eritrocitos inmaduros, reticulocitos, de conejos hechos anémicos por inyección de 1,2-acetilfenilhidrazina, el cual es un potente agente hemolítico. Cuando el lisado de reticulocitos se

TABLA II

. Coeficientes de sedimentación de las especies de RNA de
de E. histolytica

Espece	Peso Molecular
25 S	1.31×10^{-6}
17 S	8.03×10^{-5}
17 S ¹	7.00×10^{-5}
16 S ¹	6.14×10^{-5}
5.8 S ²	4.80×10^{-4}
5 S	4.00×10^{-4}
4 S	2.50×10^{-4}

1. La especie de RNA 25S se disocia bajo condiciones desnaturalizantes suaves (entre 37°C y 55°C) en RNAs 17S y 16S.
2. En electroforesis de RNA total llevadas a cabo bajo condiciones completamente desnaturalizantes, se observó una especie adicional de 5.8S.

(Tomado de: Aislamiento y caracterización del RNA de
E. histolytica Albach y col., (1984).

complementa con hemina, un sistema generador de energía y un aminoácido radioactivo continúa la síntesis de cadenas de alfa y beta globinas a partir de RNAm endógeno a velocidades muy semejantes a las que ocurren en la célula intacta. El lisado de reticulocitos contiene cantidades importantes de RNAs mensajeros endógenos. Esta característica limitó por muchos años el uso de este extracto para la síntesis de proteínas libre de células a partir de RNAs mensajeros exógenos. Sin embargo, este inconveniente fue superado con el procedimiento descrito por Pelham y Jackson (1976) para eliminar la actividad RNAm endógeno de globina, por digestión del lisado de reticulocitos con nucleasa micrococcal (proveniente de Staphylococcus aureus). La actividad de esta enzima depende completamente de la presencia de calcio y se inactiva posteriormente por adición de EGTA (un agente quelador de iones Ca^{2+}). Con este tratamiento el lisado de reticulocitos se convierte en un sistema RNAm-dependiente, conservando además, arriba del 70% de su actividad de síntesis proteica original (Perbal, 1984).

Recientemente se han preparado dos sistemas IVT derivados de germen de trigo (Shih y Kaesberg, 1973; Marcus y col., 1974) y de células de ascitis de ratón (Matthews y Korner, 1970; Aviv y col., 1971). Estos sistemas tienen la ventaja de tener baja actividad de RNAm endógena, pero sólo traducen 1 - 5 veces cada RNAm, mientras que el lisado de reticulocitos de conejo es capaz de hacerlo más de 50 veces (Brawerman, 1974). Además, ambos sistemas son relativamente ineficientes para producir productos de traducción completos de RNAs muy largos.

Existe un segundo tipo de IVTs en el que se utilizan células enteras, oocitos de Xenopus (Gurdon y col., 1971). En este sistema se microinyecta el RNAm junto con el aminoácido radioactivo en el citoplasma del oocito. La principal ventaja de este sistema es que el RNAm inyectado puede ser traducido más de 100,000 veces en un período aproximado de dos semanas; sólo que requiere un equipo muy sofisticado para la micromanipulación y la microinyección. En este sistema ha sido posible acoplar la transcripción y la traducción de DNA inyectado (Lane y col., 1971; Marbaix y Lane, 1972; Berns y col., 1972; De Robertis y Mertz, 1977).

En ninguno de los dos tipos de sistemas parece haber especificidad de tejido o especie. Los RNAm's de una amplia variedad de sistemas eucarióticos han sido traducidos exitosamente. Esto por sí mismo demuestra la carencia general de controles traduccionales en forma de factores de iniciación capaces de discriminar entre diferentes mensajeros.

Otro uso importante de los IVTs heterólogos es la identificación de precursores que puedan ser inestables in vivo, pero que pueden acumularse debido a la falta de procesamiento in vitro. El sistema de oocito de Xenopus no es adecuado para este propósito, ya que en algunos casos es capaz de procesar precursores proteicos (Berridge y Lane, 1976; Laskey y col., 1972; Ghysdael y col., 1977). La fuente de proteasas responsables no es conocida, pero existe la posibilidad de que cuando menos algunas reacciones de procesamiento proteico sean comunes a oocitos y a otros tejidos o especies.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La fagocitosis es una de las principales funciones celulares que determinan la virulencia del protozoario parásito E. histolytica (Trissl y col., 1978; Orozco y col., 1980, 1983), y por ello resulta sumamente interesante e importante estudiar las bases moleculares que rigen este fenómeno. El mejor conocimiento de las propiedades biológicas de E. histolytica nos permitirá bloquear su mecanismo de agresión sobre el hospedador en sus fases tempranas y de esta forma colaborar en el control de esta enfermedad parasitaria de primera importancia en México.

IV, OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue detectar la presencia de una o más proteínas involucradas en el proceso de fagocitosis amibiano. Con tal fin, nos propusimos los siguientes objetivos particulares:

1. Aislar RNA total de trofozoítos de las clonas de A y L-6 de E. histolytica.
2. Aislar RNA poliadenilado, que está enriquecido en especies de RNA mensajero, a partir del RNA total de las clonas antes mencionadas.
3. Montar un sistema de traducción in vitro derivado de reticulocitos de conejo.
4. Traducir in vitro los RNAs mensajeros de las clonas A y L-6 y determinar si hay diferencias en los patrones electroforéticos de los productos de traducción.
5. Montar un sistema para inmunoprecipitar los productos de traducción in vitro.
6. Inmunoprecipitar los productos de traducción in vitro de los RNAs mensajeros de las clonas A y L-6 con anticuerpos policlonales y monoclonales y determinar si estos anticuerpos reconocen cuando menos una proteína involucrada en el proceso de fagocitosis amibiano.

V. MATERIALES Y METODOS

1. Cultivo de trofozoítos de Entamoeba histolytica.

Los trofozoítos de las clonas A y L-6 se cultivaron en condiciones axénicas a 37°C en el medio TYI-S-33 descrito por Diamond y col. (1978), suplementado con 15% de suero bovino (Hyclone Laboratories, USA) previamente inactivado por calentamiento a 56°C, 30 min. 3% de mezcla de vitaminas de Diamond (Noth Biolog., USA), 4 UI de penicilina/ml y 57 ug de estreptomicina/ml. Las células en fase logarítmica de crecimiento se recolectaron por incubación en baño de hielo por 5 a 10 min y centrifugación a 360 X g por 10 min (en centrífuga Beckman TJ-6). La pastilla celular obtenida se lavó 3 a 4 veces con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.0 con objeto de eliminar los restos de medio.

2. Aislamiento de RNA total.

En todas las operaciones en las que se manejó RNA se guardaron las siguientes precauciones con objeto de evitar contaminación por ribonucleasas exógenas: todo el material de vidrio utilizado se lavó con mezcla crómica y se calentó cuanto menos 4 horas a 200°C, el material de plástico empleado siempre fue nuevo y estéril, las soluciones se prepararon con reactivos de la mejor calidad disponible utilizadno agua tridestilada estéril. Todas las soluciones se esterilizaron en autoclave (120°C, 20 min), excepto aquellas soluciones termosensibles, las cuales se filtraron inmediatamente después de su preparación a través de membranas con tamaño de poro 0.22 µm (Millipore Co., USA). En todos los procedimientos que involucraron el empleo de RNA se

utilizaron guantes de plástico desechables para proteger las soluciones de las ribonucleasas de la piel. El fenol utilizado para la extracción de RNA fue previamente redestilado y almacenado en alícuotas a -20°C .

2.1. Preparación de RNA polisomal de cerebro de rata.

El RNA polisomal de cerebro de rata se preparó por una combinación de los métodos de Schreirer y Staehelin (1973) y Gozes y col. (1975). Los cerebros de ratas de 8 días de nacidas se lavaron tres veces con PBS pH 7.0 y se homogenizaron con un ml de solución a (NH_4Cl 0.1 M, acetato de magnesio 5 mM, sacarosa 0.2 M, DTT 1.0 mM y Tris-HCl 20 mM pH 7.6) por cada cerebro, utilizando un homogenizador teflón-vidrio. El homogenizado se centrifugó 20 min a 17,000 X g (rotor HB4 de la centrifuga Sorvall RC-5B) y al sobrenadante se le adicionó 0.1 volumen de desoxicolato de sodio (DOC) al 10%. Alícuotas de 30 ml de este sobrenadante se colocaron cuidadosamente sobre un gradiente de sacarosa discontinuo formado por 4 ml de sacarosa 1.8 M en solución A y 4 ml de sacarosa 1.0 M en solución A. Los gradientes se centrifugaron 18 h a 25,000 rpm a 4°C en el rotor SW 28 de la ultracentrifuga Beckman L5-50. Cada pastilla se resuspendió en 1.0 ml de solución B (NaCl 0.1M, EDTA 1 mM y Tris-HCl 0.1M pH 9.0). Las suspensiones se reunieron y se ajustaron a una concentración final de SDS al 1%. Se añadió un volumen igual de Cloroformo / Fenol / Alcohol isoamilico, 24 : 24 :1 (CFI) y se agitó durante 5 min a temperatura ambiente. Las fases acuosa y orgánica se separaron por centrifugación a 8,000 X g (rotor HB4 de la centrifuga Sorvall RC-5B) durante 5 min a temperatura ambiente. La fase acuosa se

recuperó y se guardó en baño de hielo, mientras que la fase orgánica se reextrajo con un volumen igual de solución B. Se centrifugó nuevamente para separar las fases orgánica y acuosa. Se reunieron las fases acuosas y se reextrajeron con un volumen igual de CFI a temperatura ambiente, hasta que la interfase entre las fases orgánica y acuosa se observó completamente libre de proteínas desnaturalizadas. Finalmente, la fase acuosa se extrajo dos veces con CI (Cloroformo / Alcohol isiamílico 24 : 1) para eliminar restos de fenol. Para precipitar el RNA, la fase acuosa se ajustó a una concentración final de acetato de sodio 0.3M y se le adicionaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. Se dejó precipitar toda la noche a -20°C . El RNA precipitado se recuperó por centrifugación a $17,000 \times g$ (rotor HB4 de la centrífuga Sorvall RC-5B) durante 30 min a -10°C . La pastilla se secó durante 10 min con vacío y se lavó dos veces con etanol al 70%, se secó nuevamente y se resuspendió en 1.0 ml de agua desionizada estéril. Se tomó una alícuota para determinar su concentración y se midió su absorbancia a 260 nm. El RNA se almacenó en alícuotas a -70°C a una concentración de 5.0 mg de RNA/ml de solución.

2.2. Aislamiento de RNA de Entamoeba histolytica.

2.2.1. Método de LiCl 3M, Urea 6M.

En este caso se siguió el procedimiento descrito por Auffray y Rougeon (1979). Una pastilla congelada de trofozoítos se homogenizó en 10 volúmenes de LiCl 3M, Urea 6 M durante 1 min a 4°C con agitación vigorosa en Vortex. El homogenizado se colocó en tubos de polialómero SW 41 y se dejó 32 horas en hielo. Los tubos se centrifugaron 1 hora a 25,000 rpm en rotor SW 41 a 2°C. La pastilla de RNA se disolvió en Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 10 mM, SDS 0.1% y proteinasa K 50 ug/ml. Esta mezcla se incubó 15 min a 37°C y posteriormente se extrajo dos veces con un volumen igual de CFI y dos veces con CI. Las fases acuosa y orgánica se separaron después de cada extracción por centrifugación a 8,000 X g 10 min a temperatura ambiente. El RNA se precipitó de la fase acuosa por adición de 0.1 volumen de acetato de sodio 3M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. El RNA se disolvió en agua y se reprecipitó dos veces más. Finalmente, la pastilla de RNA se disolvió en agua y se almacenó en alícuotas a -20°C.

2.2.2. Método de fenol - SDS.

Esta extracción se basó en el método descrito por Rosen y col. (1975). La pastilla de trofozoítos previamente lavada con solución salina 0.89% se homogenizó en un homogenizador de vidrio con 10 volúmenes de SDS 0.5%, EDTA 25 mM, NaCl 75 mM pH 8.0 y 10 volúmenes de fenol recién destilado saturado con Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 en baño de hielo durante 3 min. La emulsión resultante se incubó 30 min en baño de hielo y se centrifugó a 17,000 X g 20 min a 4°C. La fase acuosa y la interfase se re-

extrajeron con un volumen igual de CFI (cloroformo/fenol/álcohol isoamílico 24 : 24 : 1) 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó 10 min a 8,000 X g a 20°C. La fase acuosa se separó cuidadosamente y se adicionó proteinasa K a una concentración de 20 ug/ml. Esta mezcla se incubó 15 min a 37°C y se extrajo 3 veces más con CFI y dos veces con CI (cloroformo/alcohol isoamílico 24 : 1). El RNA se precipitó de la fase acuosa por adición de 0.1 volumen de acetato de sodio 3M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Se dejó precipitando toda la noche y posteriormente se recuperó por centrifugación a 17,000 X g a -10°C por 30 min. La pastilla de RNA se secó con vacío, se resuspendió en agua y se reprecipitó en dos ocasiones sucesivas. Finalmente el RNA se resuspendió en agua y se almacenó en alícuotas a -20°C.

2.2.3. Método DEP-SDS.

Se utilizó el método descrito por Albach y col. (1984). Las amibas se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron en solución amortiguadora de extracción (Tris-HCl 0.05M pH 7.5, NaCl 0.5M, MgSO₄ 5 mM) a una concentración de 1×10^6 trofozoítos por ml. Se agregó SDS a una concentración final de 1% e inmediatamente después se adicionó 0.02 ml de dietilpirocarbonato (DEP) por cada ml de suspensión. Las células se homogenizaron en frío utilizando tubos con tapa de rosca. El homogenizado amibiano se incubó 5 min a 30°C con agitación ocasional y se enfrió rápidamente en hielo. Posteriormente, esta mezcla se centrifugó 5 min a 8,000 X g (rotor HB4 de la centrífuga Sorvall RC-5B), se recuperó el sobrenadante y a éste se le adicionó NaCl a una concentración final de 0.1 g/ml. La mezcla se incubó 5 min a 30°C y después se enfrió rápidamente en hielo durante 5 min. El homogenizado se

centrifugó a 10,000 X g (rotor HB4 de la centrífuga Sorvall RC-5B) 10 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y éste fue re-centrifugado a 4°C, 20 min a 23,000 X g (rotor HB4 de la centrífuga Sorvall RC-5B). El RNA se precipitó adicionando 0.1 volumen de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. El RNA se ajustó a una concentración de 5 mg/ml en agua y se almacenó en alícuotas a -20°C.

2.2.4. Método de Isotiocianato de guanidina - CsCL.

Se utilizó una combinación de los métodos propuestos por Glisin y col. (1974) y Ullrich y col. (1977) con algunas modificaciones propuestas por el Dr. Federico Sánchez (comunicación personal). Una pastilla celular que contenía aproximadamente 8×10^7 trofozoítos se lavó tres veces con PBS e inmediatamente se congeló en nitrógeno líquido. A la pastilla congelada se le adicionó 1 ml de solución amortiguadora de homogenización (isotiocianato de guanidina 5M, Tris-HCl 50 mM pH 7.6, EDTA 25 mM, Sarkosil 2% y 2-mercaptoetanol) por cada 1×10^7 células y se homogenizó por agitación vigorosa en Vortex durante 1 min a 4°C. El lisado celular se centrifugó 20 min a 17,000 X g a 20°C. Se desechó la pastilla y al sobrenadante se le adicionaron 2.2 volúmenes de solución amortiguadora de homogenización y 0.85 volúmenes de CsCL 5.7 M en EDTA 5 mM. Esta preparación se depositó cuidadosamente sobre un colchón de 5 ml de CsCl 5.7 M, EDTA 50 mM y se centrifugó durante 22 horas a 20°C a 25,000 rpm en rotor SW 28 de la ultracentrífuga Beckman L5-B. La pastilla transparente de RNA se resuspendió en 8 ml de agua y se precipitó por adición de 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M y 2.5 vo-

lúmenes de etanol absoluto. Esta RNA se dejó precipitando toda la noche y al día siguiente se recuperó por centrifugación a 17,000 X g a -10°C durante 30 min. La pastilla obtenida se secó por 5 - 10 min con bomba de vacío y posteriormente se lavó de 3 a 5 veces con 3 ml de LiCl 2 M, EDTA 5 mM a 4°C . Después de cada lavado la suspensión se centrifugó a 17,000 X g, 10 min a 4°C . Finalmente el RNA se reprecipitó en dos ocasiones sucesivas por adición de 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. La concentración de RNA se determinó espectrofotométricamente, teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 ug/ml de RNA.

3. Geles de agarosa.

La integridad del RNA extraído con cada uno de los métodos mencionados anteriormente se verificó por análisis en geles de agarosa al 1.5% en condiciones no desnaturizantes y en geles de agarosa al 1.0% en condiciones desnaturizantes.

3.1. Geles de agarosa no desnaturizantes.

3.1.1. Preparación de las muestras.

El RNA fue analizado en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Las muestras se prepararon mezclando 2 μ l de RNA en agua (aproximadamente 10 μ g de RNA), 16 μ l de agua desionizada y 2 μ l de buffer de muestra 10X que contenía : azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25% y Ficoll 400 25%. Las muestras se centrifugaron 2 segundos en la microcentrífuga Eppendorf y se depositaron alícuotas de 5 a 20 μ l en los pozos del gel.

3.1.2. Preparación del gel de agarosa.

Para preparar el gel se adicionaron 10 ml de solución de agarosa al 1.5% en TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1mM) que contenía 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio, a una cámara de lucita de 5.5 X 7.5 cm. Inmediatamente después se introdujo un peine de lucita el cual forma poros de aproximadamente 2.5 mm de largo x 1 mm de ancho. Esta cámara se dejó reposar por 30 a 45 min a temperatura ambiente. Se retiró el peine y la cámara se sumergió en un tanque de electroforesis de 15 cm de largo X 6 cm de ancho que contenía 60 ml de buffer TAE y 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio. Los geles se corrieron a 30 V durante el tiempo necesario (1.5 - 2.0 hr) para que el azul de bromofenol migrara hasta 2 cm antes de llegar al final del gel.

Para fotografiar los geles se utilizó un transiluminador de luz ultravioleta de onda larga, con la cual el bromuro de etidio que se intercaló entre los pares de bases, fluoresce intensamente. Para este tipo de fotografías se utilizaron películas Polaroid tipo 57.

3.2. Geles de agarosa desnaturalizantes.

Los geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes se prepararon de acuerdo a la técnica descrita por Lehrach y col. (1977).

3.2.1. Preparación de las muestras.

Las muestras de RNA se desnaturalizaron por calentamiento en presencia de formaldehído y formamida. Alícuotas de 4.5 μ l que contenían 20 μ g de RNA se mezclaron con 2 μ l de solución amortiguadora de corrida 5 X (MOPS 0.2M pH 7.0, acetato de sodio 50 mM y EDTA 5 mM pH 8.0), 3.5 μ l de formaldehído al 37% y 10.0 μ l de formamida previamente desionizada con AG 501-X8 (Bio-Rad). Esta mezcla se incubó 15 min a 55°C y al final de la incubación se adicionaron 2 μ l de solución amortiguadora de muestra (glicerol al 50%, EDTA 1 mM, azul de bromofenol 0.4% y xilencianol 0.4%). Estas muestras se depositaron en los pozos del gel de agarosa preparado con formaldehído, como se describe a continuación.

3.2.2. Preparación del gel.

El gel de agarosa al 1% que contenía formaldehído se preparó y se corrió con el mismo equipo descrito anteriormente para los geles no desnaturalizantes.

La solución de agarosa se preparó fundiendo 100 mg de agarosa en 6.2 ml de agua en baño María. Esta solución se enfrió a 60°C y se mezcló con 2ml de solución amortiguadora de corrida 5 X 1.8 ml de formaldehído al 37%. Esta mezcla se depositó en la cámara de lucita e inmediatamente después se colocó el peine para formar los pozos. Se dejó gelificar por 30 a 45 min a temperatura ambiente y posteriormente se introdujo la cámara en el tanque de electroforesis, que contenía 60 ml de solución amortiguadora de corrida 1 X. El gel se corrió durante 2 a 2.5 horas a 45 V. Al término de la electroforesis se tiñeron los geles con bromuro de etidio (0.5) mg/ml durante 30 a 45 min. Las fotografías se tomaron bajo iluminación con luz ultravioleta de onda larga utilizando películas Polaroid tipo 57.

4. Aislamiento de RNA poliadenilado.

El aislamiento de poblaciones de RNA poliadeniladas se realizó por cromatografía de afinidad a oligo-dT (celulosa) de acuerdo al método descrito por Aviv y Leder (1972). El extracto de RNA total se resuspendió en agua a una concentración de 2 mg/ml, se calentó 30 segundos a 70°C, se adicionó un volumen igual de solución de carga 2 X (Tris-HCl 20 mM pH 7.5 EDTA 2mM, NaCl 1M, SDS 1%) y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La muestra de RNA se aplicó a una columna de oligo-dT celulosa previamente equilibrada con solución de carga, teniendo en cuenta que 1 g de oligo-dT celulosa es capaz de enlazar de 0.2 a 0.5 mg de RNA poliadenilado. La muestra se colectó lentamente a una velocidad de flujo aproximada de 0.5 ml/ml, se calentó 30 seg a 70°C, se enfrió a temperatura ambiente y se aplicó nuevamente a la columna. De es-

ta forma la muestra fue recirculada 5 veces. La columna se lavó lentamente con 30 volúmenes-columna de buffer de carga para eluir el material poli A menos y enseguida se lavó con 4 volúmenes - columna de Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM y SDS 0.2%. Ambas fracciones se precipitaron por adición de 0.1 volumen de acetato de sodio 3M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Se dejó precipitando toda la noche a -20°C y al día siguiente el RNA se recuperó por centrifugación a $17,000 \times g$ 30 min a -10°C . El RNA se resuspendió en agua a una concentración final de 1 mg/ml.

5. Preparación del lisado de reticulocitos de conejo.

Este lisado se preparó por una combinación de los métodos previamente propuestos por Darnbrought (1973) y Hunt y Jackson (1974). Se utilizaron conejos jóvenes de 2 a 2.5 Kg de peso a los cuales se les indujo anemia severa por inyección intramuscular de 2.5 ml de acetilfenilhidrazina durante 5 días consecutivos. En el primer día de tratamiento también se les administró 1 ml de solución de vitaminas (10 mg vitamina B12 y 100 mg de ácido fólico en 100 ml de NaCl 0.89%). El progreso de la anemia se siguió por cuantificación de reticulocitos en sangre periférica durante todo el tratamiento, para lo cual se tomaron diariamente muestras de sangre de la vena marginal de la oreja del conejo. La tinción se hizo mezclando una gota de sangre (con EDTA como anticoagulante) con dos gotas de colorante para reticulocitos (nuevo azul de metileno 0.5%, oxalato de potasio 1.4% en NaCl 0.89%) e incubando 15 min a 37°C . Posteriormente, se hizo una extensión en portaobjetos y se observó con objetivo de inmersión 100X. Los conejos que al quinto día de tratamiento presentaron de 90 a 100% de reticulocitos se sacrificaron dos días después, mientras que aque-

llos que presentaron cuentas más bajas se les aplicaron una o dos inyecciones más. La sangre con alto contenido de reticulocitos se obtuvo por punción cardíaca en la que se utilizaron agujas del no. 14 adaptadas a jeringas heparinizadas de 20 ml. La sangre de cada conejo se colectó en 50 ml de solución salina fisiológica (NaCl 0.14 M, KCl 5 mM y acetato de magnesio 7.5 mM) que contenía 1,000 UI de heparina. Posteriormente se filtró a través de gasa estéril y se centrifugó a 2,500 rpm (centrífuga Beckman TJ-6) 15 min a 4°C. El plasma se eliminó por aspiración y el paquete celular se lavó 3 veces con cuatro volúmenes de solución salina fisiológica, centrifugando cada vez 5 min a 2,500 rpm (centrífuga Beckman TJ-6) a 4°C

Se hizo un cuarto lavado, sólo que ahora se centrifugó a 7,000 rpm (rotor HB4 de la centrífuga Sorvall RC-5B) durante 5 min a 4°C. En este último lavado se eliminó por completo la capa de leucocitos. Las células se lisaron osmóticamente por adición de 1 volumen de agua destilada fría. Esta suspensión se centrifugó 15 min a 17,000 X g a 4°C. El sobrenadante se decantó cuidadosamente y se almacenó inmediatamente después en alícuotas de 400 µl en nitrógeno líquido.

6. Traducción in vitro de RNAm de Entamoeba histolytica.

Los ensayos de síntesis proteica se realizaron en un sistema de traducción in vitro derivado de reticulocitos de conejo de acuerdo al método descrito por Pelham y Jackson (1976). Inmediatamente después de descongelar el lisado (400 µl) se le adicionaron 91 µl de solución A la cual contenía: 10 µl de solución de hemina 1 mM en Tris-HCl pH 8.2, KCl 50 mM y etilenglicol 90%; 5

μ l de CPK (creatinfosfoquinasa) 5 mg/ml en glicerol al 50% ; 25 μ l de mezcla de KCL 2M y MgCl₂ 10 mM ; 25 μ l de fosfato de creatina 0.2 M ; 25 μ l de mezcla de todos los aminoácidos (excepto metionina) a una concentración 5 mM, neutralizados con 0.05 volúmenes de HEPES 1 M pH 7.0 ; 1 μ l de CaCl₂ 0.5M y 10 μ l de nucleasa micrococcal 1 mg/ml (9,000 U/mg). Esta mezcla se incubó 15 min a 20°C, y enseguida se le adicionaron 10 μ l de EGTA 0.2M pH 7.0 para detener la actividad de la nucleasa. Esta preparación se dividió en alícuotas y se almacenó en nitrógeno líquido.

Cabe hacer notar que para este tipo de experimentos sólo se utilizaron aquellos lisados que presentaron un alto índice de traducción para sus propios mensajeros, ya que esto garantizó una traducción eficiente de los RNAs mensajeros amibianos. Un buen lisado de reticulocitos de conejo fue aquel que, sin previa digestión con nucleasa micrococcal y en ausencia de RNA amibiano, fue capaz de incorporar 1×10^6 cpm de ³⁵S-Metionina en cada 5 μ l de mezcla de traducción precipitada con TCA caliente. Para iniciar la síntesis de proteínas se mezclaron 24 μ l de mezcla de traducción predigerida con nucleasa micrococcal (9,000 UI/mg), 3 μ l de ³⁵S-Metionina (1120 Ci/mmol) y 3 μ l de RNA (10 μ g/ μ l) en agua. La mezcla de reacción se incubó 90 min a 30°C en baño María. Después de este período se procedió a determinar incorporación del aminoácido radioactivo en material TCA caliente precipitable. Se tomaron alícuotas de 5 μ l de mezcla de reacción y se depositaron en tubos de ensayo que contenía 1 ml de agua y 50 μ l de albúmina sérica bovina (2 mg/ml). Se adicionó 1 ml de TCA al 20% y los tubos se incubaron 20 min en baño María a 90°C y después se

enfriaron en hielo 30 min. El material precipitado se recuperó por filtración al vacío en filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/C). Los filtros se lavaron 3 veces con TCA frío al 5% y por último se lavaron una vez con etanol frío. Se secaron 5 min a 100 C y se colocaron en viales que contenían 4 ml de líquido de centelleo (5 g PPO/l de tolueno). Los viales se contaron en un contador de centelleo en el canal de ^{14}C con una eficiencia del 70%.

7. Inmunoprecipitación de productos de traducción in vitro.

7.1. Cultivo de S. aureus.

Se preparó el siguiente medio de cultivo: (*)

	(g/litro)
Extracto de carne	2.5
Peptona de caseína	5.0
Extracto de levadura	4.0
Gelatina	30.0
Lactosa	2.0
D-Manitol	10.0
NaCl	30.0
K ₂ HPO ₄	4.82
KH ₂ PO ₄	1.32
Niacinamida (**)	0.004
Tiamina (**)	0.002

(*) Se esterilizan en autoclave 20 min a 120°C.

(**) Se prepararon soluciones por separado (2 mg/ml) y se esterilizaron por filtración en membrana 0.2 μ m (Millipore Co, USA).

El medio se inoculó con 0.1 volumen de cultivo de S. aureus y se incubó 18 horas a 37°C con agitación constante (aproximadamente 200 rpm).

7.2. Preparación de suspensión de S. aureus al 10%.

Las células se centrifugaron 5 min a 8,000 x g y se lavaron dos veces con PBS - NaN_3 al 0.05%. La pastilla celular se resuspendió a una concentración del 10% (peso/volumen) y posteriormente se le adicionó formaldehído a una concentración final de 1.5%. La suspensión se agitó inmediatamente después durante 90 min a temperatura ambiente. Las bacterias así fijadas se centrifugaron 5 min a 8,000 X g y se resuspendieron nuevamente en PBS - NaN_3 0.05% a una concentración del 10% (peso/volumen). Posteriormente, se transfirieron a un matraz Erlenmeyer grande con objeto de que la suspensión de S. aureus no ocupara más de 2 cm de altura y se incubó 5 min a 80°C en baño María agitando rápida y continuamente. La suspensión bacteriana se enfrió en baño de hielo durante 10 min y se centrifugó 5 min a 8,000 X g. La pastilla se lavó dos veces con PBS - NaN_3 0.05% y finalmente se resuspendió en PBS - NaN_3 0.05% a una concentración de 10% (peso/volumen). Esta suspensión se almacenó en alícuotas a -20°C.

7.3. Preparación de S. aureus para inmunoadsorción.

La suspensión de S. aureus al 10% se centrifugó 15 segundos en microcentrífuga Eppendorf (12,000 rpm) y la pastilla se resuspendió en el mismo volumen en buffer NET - NP 40 0.5% que contenía NaN_3 0.02%. Se incubó 15 min a temperatura ambiente con agitación ocasional y posteriormente se lavó una vez con buffer NET - NP 40 0.05% que contenía NaN_3 0.02%. Se centrifugó 15 segundos en la microcentrífuga Eppendorf y se resuspendió en el volumen original en NET -NP 40 0.05% que contenía NaN_3 0.02%, L-Metionina 2 mM y albúmina sérica bovina 1 mg/ml).

NOTA: Esta suspensión se almacena a 4°C y se utiliza dentro de las 24 horas siguientes a su preparación.

7.4. Inmunoprecipitación de productos de traducción in vitro.

A 30 µl de mezcla de traducción (aproximadamente 500,000 cpm) se le adicionaron 120 µl de PBS pH 7.2, 150 µl de Buffer NET 2x (pH 7.4 para suero de conejo o pH 8.0 para suero de ratón) y 50 µl de suero no inmune de conejo. Esta mezcla se incubó 2 horas a 4°C y enseguida se adicionaron 100 µl de S. aureus al 10%, continuando la incubación por 30 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 15 segundos en la microcentrífuga Eppendorf y al sobrenadante se le adicionaron 50 µl de suero inmune. Esta mezcla se dejó interaccionar toda la noche a 4°C, posteriormente se adicionaron 150 µl de S. aureus al 10% y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Al término de la incubación, la mezcla se diluyó por adición de 1 ml de buffer NET - NP 40 0,05% y se centrifugó 15 segundos en la microcentrífuga Eppendorf. La pastilla se lavó dos veces con 1 ml de buffer NET - NP 40 0.05% y una vez con 1 ml de buffer de lavado que contenía NaCl 300 mM, Tris-HCL 50 mM pH 8.6, SDS 0.1%, NP - 40 0.05 y finalmente se resuspendió en 70 µl de buffer de muestra para geles de poliacrilamida - SDS. Esta suspensión se calentó 3 min a 100°C y se centrifugó 5 min en microcentrífuga Eppendorf (12,000 rpm). Se recuperó el sobrenadante y se depositó sobre geles de poliacrilamida - SDS.

8. Geles de poliacrilamida - SDS.

8.1. Preparación de las muestras.

Muestras alícuotas de las mezclas de traducción in vitro fueron diluídas con un volumen igual de buffer de muestra dos veces concentrado (2X), que contenía: Tris-HCl 0.125M pH 6.8, SDS 4%, glicerol 20% y 2-mercaptoetanol 10%. Los tubos se colocaron en un baño de agua hirviendo durante 90 segundos y después se enfriaron rápidamente en baño de hielo. A cada tubo se le adicionó una gota de rojo de fenol al 0.1%. El volumen depositado en los pozos del gel dependió en cada caso del número de cuentas que presentaba la muestra, puesto que los geles fueron corridos manteniendo las cpm constantes.

8.2. Preparación de los geles.

La electroforesis de las proteínas radioactivas se hizo en geles de poliacrilamida de 10.0 x 14.0 cm y de 1.5 mm de espesor, preparadas de acuerdo al procedimiento descrito por Laemmli (1970).

El gel resolutivo fue preparado con las siguientes concentraciones finales: acrilamida 10%, bisacrilamida 0.9%, Tris-HCl 0.375M pH 8.8, SDS 0.1%. El gel fue polimerizado mediante la adición de 0.05% de persulfato de amonio y 0.003% de TEMED. Las concentraciones finales del gel concentrador fueron las siguientes: acrilamida 4%, bisacrilamida 0.36%, Tris-HCl 0.125M pH 6.8, SDS 0.1%, persulfato de amonio 0.05% y TEMED 0.005%. El buffer de electroforesis contenía: Tris base 0.025M pH 8.3, glicina 0.192M y SDS 0.1%. La electroforesis se hizo manteniendo una corriente constante de 25 mA durante el tiempo necesario para que el rojo de fenol alcanzara el fondo del gel (aproximadamente 6 horas).

8.3. Tinción y distinción de los geles.

Los geles de poliacrilamida se tiñeron durante 4 horas con la siguiente solución: azul de Coomassie R-250 0.125%, metanol 50%, ácido acético 10%. Posteriormente se destiñeron durante una hora con metanol 50% y ácido acético al 10% y durante tres horas más con metanol 5% y ácido acético al 7%.

9. Fluorografía de los geles de poliacrilamida - SDS.

Los geles se colocaron dos veces, una hora cada vez, en aproximadamente 20 volúmenes de dimetilsulfóxido (DMSO). Después se trataron durante una hora con PPO al 22.5% en DMSO y por último una hora en glicerol al 1%. Los geles se secaron durante 1.5 hr. con calor y vacío y se expusieron a placas de Rayos X a diferentes tiempos, dependiendo del número de cpm que presentaron las muestras analizadas, a - 70°C.

VI. RESULTADOS

1. Aislamiento de RNA polisomal de cerebro de rata.

Como referencia para evaluar la integridad de las preparaciones de RNA amibianos aisladas por diferentes métodos de extracción se utilizó el RNA de cerebro de rata. El método para el aislamiento del RNA polisomal de cerebro de rata se basó en una combinación de los descritos por Schrerier y Staehelin (1973) y Gozes y col. (1975). El perfil del análisis densitométrico de las preparaciones de RNA de rata aisladas con este método se muestra en la figura 3. El trazo densitométrico del RNA aislado de cerebro de rata presentó las tres poblaciones mayoritarias típicas de los organismos eucariontes superiores que presentan 28S, 18S y 5S de coeficiente de sedimentación. Estos resultados demostraron que el RNA obtenido estaba íntegro.

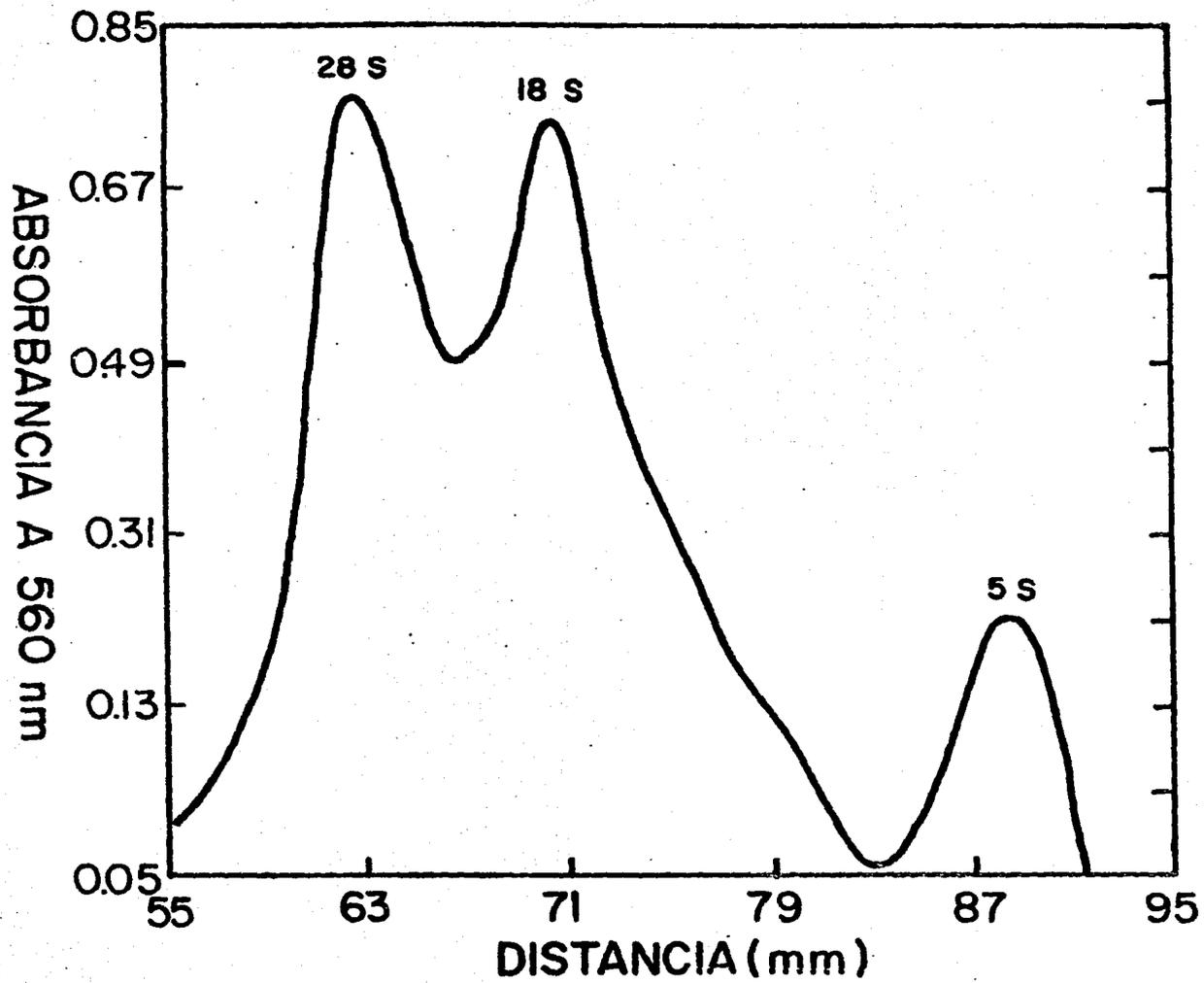
2. Aislamiento de RNA total de Entamoeba histolytica.

Con objeto de definir las condiciones óptimas para el aislamiento de RNA intacto y biológicamente activo de trofozoítos de E. histolytica, se probaron diversos procedimientos previamente publicados para el aislamiento de RNA de células eucarióticas (Rosen y col., 1975; Shore y Tata, 1977; Ullrich y col., 1977; Auffray y Rougeon, 1979; Albach y col., 1984; Glisin y col., 1974). En este trabajo se reportan los resultados obtenidos con cuatro de ellos: a) Método de LiCl - Urea, b) Método de fenol - SDS, c) Método de DEP - SDS y d) Método de isotiocianato de guanidina - CsCl. El RNA obtenido con cada uno de estos métodos se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% con el

Figura 3

Perfil densitométrico del RNA de cerebro de rata

El RNA polisomal de cerebro de rata se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. Las muestras se corrieron de 2 a 2.5 h a 35 V y los geles se tiñeron con bromuro de etidio (5 ug/ml) durante 30 a 45 min. Las fotografías se tomaron bajo luz ultravioleta con películas Polaroid 57. El negativo de esta fotografía se utilizó para hacer el análisis densitométrico de las poblaciones de RNA por absorbancia a 560 nm.



fin de verificar su integridad. Como referencia se utilizó siempre RNA de cerebro de rata.

El patrón electroforético del RNA amibiano aislado con el método de LiCl-Urea (Auffray y Rougeon, 1979) sólo presentó especies de muy bajo peso molecular con coeficientes de sedimentación inferiores a 4S (Fig. 4). Esto es indicativo de que el RNA sufrió degradación durante el proceso de extracción. El RNA amibiano aislado con el método fenol SDS (Rosen y col., 1975) también presentó degradación, aunque en menor proporción que la ocurrida en el RNA aislado con LiCl - Urea (Fig. 5). En los gels teñidos con bromuro de etidio se observó un barrido de material fluorescente desde la región correspondiente a 18S hasta la región 5S del RNA de cerebro de rata. Con los métodos DEP - SDS (Albach y col., 1984) e isotiocianato de guanidina - CSCl (Glisin y col., 1974' Ulrich y col., 1977) se obtuvo RNA amibiano no degradado. El patrón electroforético del RNA aislado con el método DEP-SDS presentó cuando menos cuatro bandas (Fig. 6), las cuales tuvieron una migración mayor a 28S, aproximadamente 25S, mayor a 18S y mayor a 5S (Fig. 6). Con este método se aisló menor cantidad de la especie de RNA mayor a 28S y una mayor cantidad de la especie mayor a 18. Es posible que esto se deba a que se produce una mayor disociación del RNA mayor a 28S en RNAs de menor coeficiente de sedimentación (Albach y col., 1984). Si esto fuera cierto se reflejaría en una disminución de la especie mayor a 28S y el subsecuente aumento en la cantidad de RNAs más pequeños. Por otra parte, cabe hacer notar que con el método que involucra el uso de isotiocianato de guanidina se aislaron cuando menos

Figura 4

Electroforesis en gel de agarosa de RNA total aislado por el método LiCl-Urea.

El RNA de los trofozoítos de la clona A se extrajo con el método que involucra el uso de LiCl-Urea. Las muestras se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. Las muestras se corrieron de 2 a 2.5 h a 35 V y se tiñeron con bromuro de etidio (5. ug/ml) durante 30 a 45 min. Las fotografías se tomaron bajo luz ultravioleta con películas Polaroid 57. Se utilizó RNA de cerebro de rata como referencia.

Carriles 1 y 2: RNA polisomal de cerebro de rata.

Carriles 3 y 4: RNA total de E. histolytica.



Figura 5

Electroforesis en gel de agarosa de RNA total aislado por el método Fenol-SDS.

El RNA de los trofozoítos de la clona A se extrajo de acuerdo al método Fenol/SDS. Las muestras se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. Las muestras se corrieron de 2 a 2.5 h a 35 V y el gel se tiñó con bromuro de etidio (5 ug/ml) durante 30 a 45 min. Las fotografías se tomaron bajo luz ultravioleta con películas Polaroid 57. El RNA de cerebro de rata se utilizó como referencia.

Carriles 1 y 2: RNA polisomal de cerebro de rata.

Carriles 3 y 4: RNA de E. histolytica.



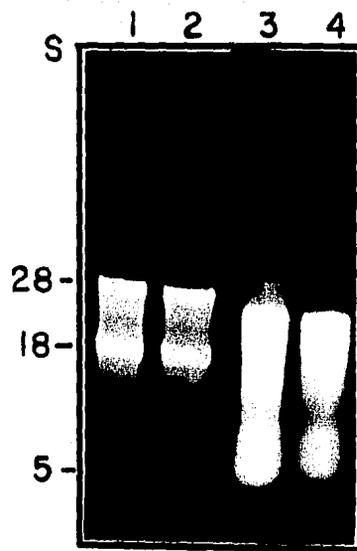
Figura 6

Electroforesis en gel de agarosa de RNA total aislado por el método DEP-SDS.

Los trofozoítos de la clona A se lisaron con SDS en presencia de un potente inhibidor de nucleasas, DEP. Las muestras de RNA se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. Las muestras se corrieron de 2 a 2.5 h a 35 V. Las fotografías del gel teñido con bromuro de etidio se tomaron bajo luz ultravioleta con películas Polaroid 57.

Carriles 1 y 2: RNA polisomal de cerebro de rata.

Carriles 3 y 4: RNA de E. histolytica.



cuatro poblaciones que migraron en la posición mayor a 28S, aproximadamente 25S, mayor a 18S y otra de aproximadamente 16S (Fig. 7). Como se puede observar en el perfil densitométrico, este método no se aislaron poblaciones de RNA de bajo peso molecular (Fig. 8). Este tipo de moléculas requieren de tiempos extremadamente largos de ultracentrifugación para sedimentar a través del gradiente de CsCl y esto podría ser la explicación de por qué no se observan las bandas correspondientes a RNAs 4S o 5S.

La población de RNA de alto peso molecular que migra un poco menos que la población 28S no se observó cuando esta misma preparación de RNA se analizó en geles de agarosa preparados en condiciones desnaturalizantes (Fig. 9). Este resultado sugiere que la banda de RNA amibiano con coeficiente de sedimentación superior al RNA 28S de cerebro de rata es un agregado estructural formado durante el proceso de extracción. Aunque no podemos descartar la posibilidad de que se trate de un precursor de RNA. El análisis electroforético de las preparaciones de RNA obtenidas por los cuatro métodos antes mencionados, mostró que tanto el método DEP-SDS como el método isotiocianato de guanidina-CsCl fueron adecuados para el aislamiento de RNA amibiano no degradado. Sin embargo, era necesario saber si con estos métodos se obtenían preparaciones de RNA puras. Por otra parte, fue importante para la elección del método de aislamiento y purificación del RNA de E. histolytica determinar la eficiencia de estos métodos, medida como la cantidad de RNA obtenido por trofozoíto. La pureza de las preparaciones de RNA se evaluó en base a la re-

Figura 7

Electroforesis en gel de agarosa del RNA total aislado por el método isotiocianato de guanidina-CsCl.

Los trofozoítos de la clona A se lisaron en presencia de isotiocianato de guanidina y el lisado celular se centrifugó a través de un gradiente de CsCl. Las muestras de RNA se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. Las muestras se corrieron 2 a 2.5 h a 35 V. Las fotografías del gel teñido con bromuro de etidio se tomaron bajo luz ultravioleta con películas Polaroid 57.

Carriles 1 y 2: RNA polisomal de cerebro de rata.

Carriles 3 y 4: RNA de E. histolytica.

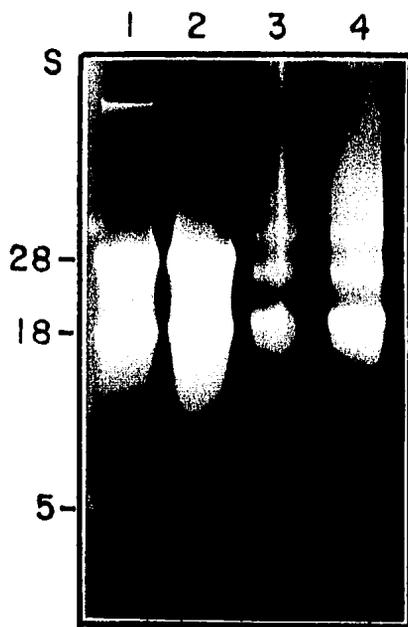


Figura 8

Perfil densitométrico del RNA aislado por el método isotiocianato de guanidina-CsCl.

El RNA amibiano total aislado en presencia de isotiocianato de guanidina y por centrifugación en gradiente de CsCl, se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Las muestras se corrieron de 2 a 2.5 h. a 35 V y el gel se tiñó con bromuro de etidio (5 ug/ml) durante 30 a 45 min. Las fotografías se tomaron bajo luz ultravioleta con películas Polaroid 57. El negativo se utilizó para hacer el análisis densitométrico de las poblaciones de RNA por absorbancia a 560 nm.

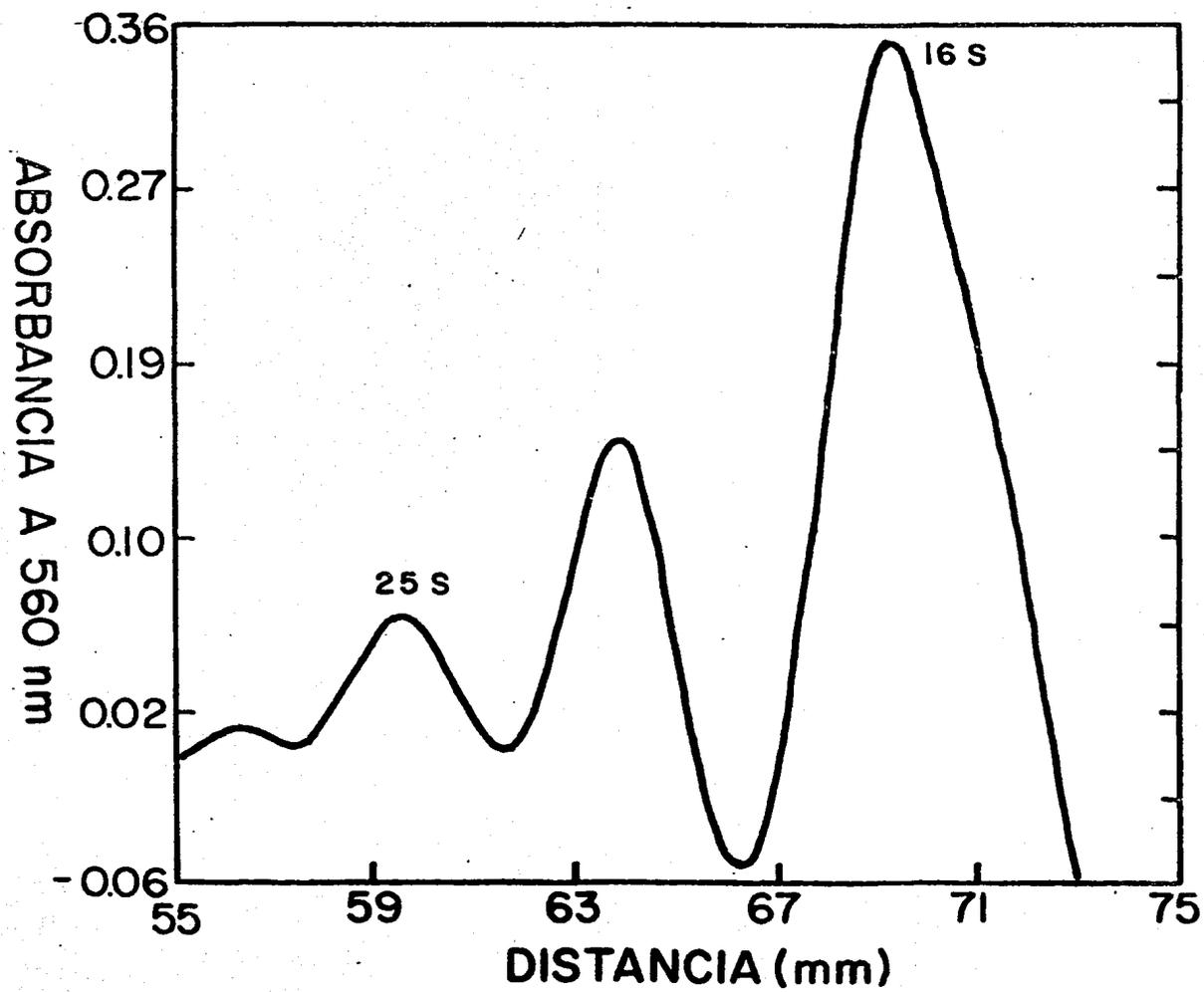


Figura 9

Electroforesis en condiciones desnaturizantes del RNA aislado por el método isotiocianato de guanidina-CsCl.

Las muestras de RNA amibiano aisladas de acuerdo al método de isotiocianato de guanidina-CsCl se desnaturizaron por incubación a 55°C durante 15 min en presencia de formaldehído y formamida. Las muestras se corrieron de 2 a 2.5 h a 45 V en geles de agarosa que contenían formaldehído. Las fotografías del gel de agarosa teñido con bromuro de etidio se tomaron bajo luz ultravioleta con películas Polaroid 57.

Carril A: RNA polisomal de cerebro de rata no desnaturizado.

Carril a: RNA polisomal de cerebro de rata desnaturizado.

Carril B: RNA total de S. cerevisiae no desnaturizado.

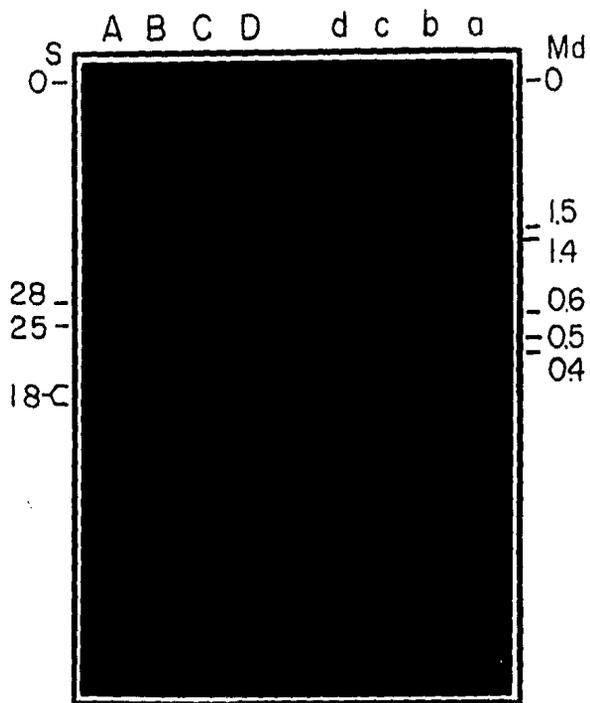
Carril b: RNA total de S. cerevisiae desnaturizado.

Carril C: RNA de E. histolytica no desnaturizado.

Carril c: RNA de E. histolytica desnaturizado.

Carril D: RNA de E. invadens no desnaturizado.

Carril d: RNA de E. invadens desnaturizado.



lación de absorbancia 260/280 nm. Esta tiene un valor igual o mayor a dos en preparaciones de RNA puras. Los resultados de las determinaciones de pureza y rendimiento de RNA por trofozoítos aparecen en la Tabla III. Con el método de isotiocianato de guanidina-CsCl se obtuvieron preparaciones de RNA muy puras, ya que la relación de absorbancias siempre fue igual o mayor que dos. Por otra parte, con este método se recuperaron de 3.5 a 4.0×10^{-5} μg de RNA total por trofozoíto. Con el método DEP-SDS, sin embargo, sólo se recuperaron 1.5 a 2.0×10^{-5} μg de RNA por trofozoíto. Por lo tanto, hasta este paso, el método de elección para aislar y purificar RNA de E. histolytica fue el método de isotiocianato de guanidina - CsCl.

2. Labilidad del RNA de Entamoeba histolytica.

Como se dijo en la sección anterior, antes de elegir el método de isotiocianato de guanidina como el adecuado para el aislamiento del RNA amibiano se probaron varios métodos de extracción basados en el uso de fenol como agente desnaturizante de proteínas e inhibidor de nucleasas (Rosen y col., 1975; Maniatis y col., 1982), pero con ninguno de ellos se logró aislar RNA intacto. Para definir si el problema de la degradación radicaba en que el fenol no inhibía la actividad ribonucleasa de los trofozoítos de E. histolytica, se realizaron experimentos de coextracción. Estos experimentos consistieron en mezclar trofozoítos de E. histolytica con RNA de cerebro de rata para posteriormente coextraer los RNAs de amiba y de rata bajo las mismas condiciones. En este mismo tipo de experimento, se aislaron por separado los RNAs de cerebro de rata y de los trofozoítos bajo las mismas condiciones que en la mezcla anterior. El RNA de cerebro de

TABLA III

Pureza y rendimiento de los RNAs aislados por los métodos
DEP-SDS e isotiocianato de guanidina-CsCl

METODO	260 / 280 nm ³	x 10 ⁻⁵ ug/trofozoíto ⁴
DEP - SDS ¹	1.851	1.96
Isotiocianato de ² guanidina-CsCl	2.272	3.46

1. DEP-SDS. Método de extracción de RNA basado en el uso de dietilpirocarbonato como inhibidor de nucleasas.
2. Isotiocianato de guanidina-CsCl. Método de extracción basado el uso de isotiocianato de guanidina como inhibidor de nucleasas, en el que el RNA se obtiene por centrifugación en gradiente de CsCl.
3. 260/280 nm = relación de las absorbancias de las muestras de RNA a 260 y 280 nm, que se utilizó para estimar la pureza de las preparaciones de RNA.
4. La cantidad de RNA por trofozoíto se determinó espectrofotométricamente, teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm contiene 40 ug/ml de RNA. La cantidad de RNA recuperado se dividió entre el número de trofozoítos utilizados.

rata aislado tanto en mezcla con los trofozoítos (Fig. 10 carriles 3 y 4) como en forma individual presentó el patrón típico (Fig. 10 carriles 5 y 6), lo que sugirió que este RNA se aisló intacto. Sin embargo, el RNA de E. histolytica aislado individualmente presentó degradación parcial. La especie de RNA más afectada fue la población asociada a la subunidad ribosomal mayor (Fig. 10 carriles 1 y 2). Estos resultados sugieren que las ribonucleasas liberadas al medio durante la homogenización de los trofozoítos amibianos no son capaces de hidrolizar las especies de RNA de cerebro de rata o bien, que la especie de RNA ribosomal mayor de E. histolytica es especialmente sensible a las condiciones desnaturalizantes de los métodos de extracción que involucran el uso de fenol.

3. Aislamiento de RNA poliadenilado.

Para obtener el RNA poliadenilado se utilizó el método de oligo-dT (Aviv y Leder 1972). Este procedimiento ha sido ampliamente utilizado para enriquecer las poblaciones RNA poli A⁺, las cuales están integradas principalmente por moléculas de RNA mensajero. Para aislar las poblaciones poliadeniladas se utilizó RNA aislado tanto por el método que utilizó DEP-SDS como por el de isotiocianato de guanidina, ya que el uso de estos métodos produjo RNA con un alto grado de integridad de acuerdo al análisis en geles de agarosa. El RNA total se pasó a través de una columna de oligo-dT celulosa de acuerdo a la técnica descrita en Materiales y Métodos. En la figura 11 se muestra el perfil de elución del RNA total pasado por la columna de oligo-dT. Aproximadamente del 90 al 95% del RNA no se unió a la columna (RNA

Figura 10

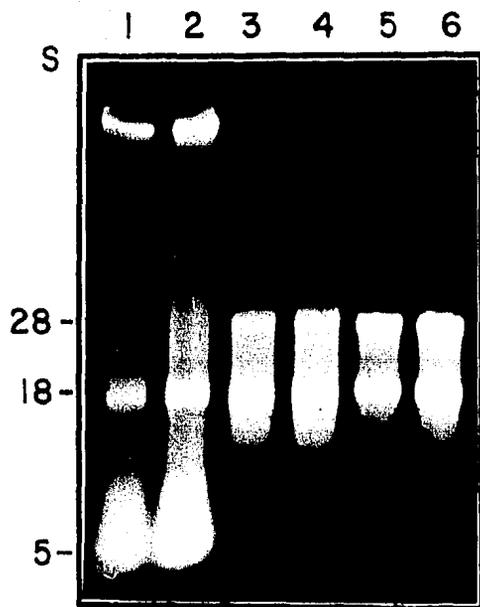
Electroforesis en gel de agarosa de la mezcla de RNA de E. histolytica y RNA de cerebro de rata.

Los trofozoítos de la clona A de E. histolytica se mezclaron con RNA polisomal de cerebro de rata y se extrajeron de acuerdo al método Fenol-SDS. Simultáneamente, se extrajo RNA de trofozoítos de la clona A y RNA de cerebro de rata por separado. Las muestras de RNA obtenidas en cada caso se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. Las muestras se corrieron de 2 a 2.5 h a 35 V y los geles se tiñeron con bromuro de etidio (5 ug/ml) durante 30 a 45 min. Las fotografías se tomaron bajo luz ultravioleta con películas Polaroid 57.

Carriles 1 y 2: RNA de E. histolytica.

Carriles 3 y 4: Mezcla de RNA de E. histolytica y RNA de cerebro de rata.

Carriles 5 y 6: RNA de cerebro de rata.



poli A-) y se eluyó al frente con amortiguador de alta concentración salina (Fig. 11), mientras que el 5 - 10% restante formado principalmente por RNA poli A+ se unió a la columna y se eluyó de ésta con solución amortiguadora de baja concentración salina (Fig. 11). Las fracciones de RNA poli A- y poli A+ así separadas se analizaron por electroforesis en geles de agarosa y los patrones obtenidos se muestran en la figura 12. Como se puede observar en esta figura, el patrón electroforético de la fracción poli A- (Fig. 12 carriles 3 y 4) es muy parecido al mostrado por el RNA total. Esto se debe fundamentalmente a que ambas preparaciones contienen los RNAs ribosomales, los cuales constituyen las especies más abundantes de RNA. En cambio, el patrón obtenido con la fracción de RNA poli A+ se distinguió de los patrones de RNA total y de RNA poli A- por presentar escasa contaminación con poblaciones de RNA ribosomal y aparecer como un barrido que representó los diferentes tamaños de los mensajeros obtenidos (Fig. 12 carriles 5 y 6).

4. Preparación del lisado de reticulocitos de conejo.

El lisado de reticulocitos de conejo es el más antiguo y probablemente el más eficiente sistema de traducción in vitro de RNA de células eucarióticas. Este sistema fue descrito por Pelham y Jackson en 1976. En este trabajo, los reticulocitos se obtuvieron de conejos con anemia hemolítica experimental inducida por inyección de 1,2-acetilfenilhidrazina de acuerdo al procedimiento descrito por Merrick (1981). Los conejos utilizados se inyectaron con acetilfenilhidrazina al 1% (10 mg/Kg) durante 5 a 7 días consecutivos para causar reticulocitosis y, posteriormente, se dejaron recuperar durante dos días antes de sangrarlos.

Figura 11

Perfil densitométrico de las poblaciones de RNA
poli A+ y poli A-

Las muestras de RNA total se fraccionaron en una columna de oligo-dt-celulosa. Las poblaciones de RNA poli A- se eluyeron con solución amortiguadora de alta concentración salina hasta que la absorbancia del eluido a 260 nm estuvo muy cercana a 0. Las poblaciones de RNA poli A+ que se unieron a la columna de oligo-dt-celulosa se eluyeron con solución amortiguadora de baja concentración salina.

Pico A: poblaciones de RNA poli A-

Pico B: poblaciones de RNA poli A+

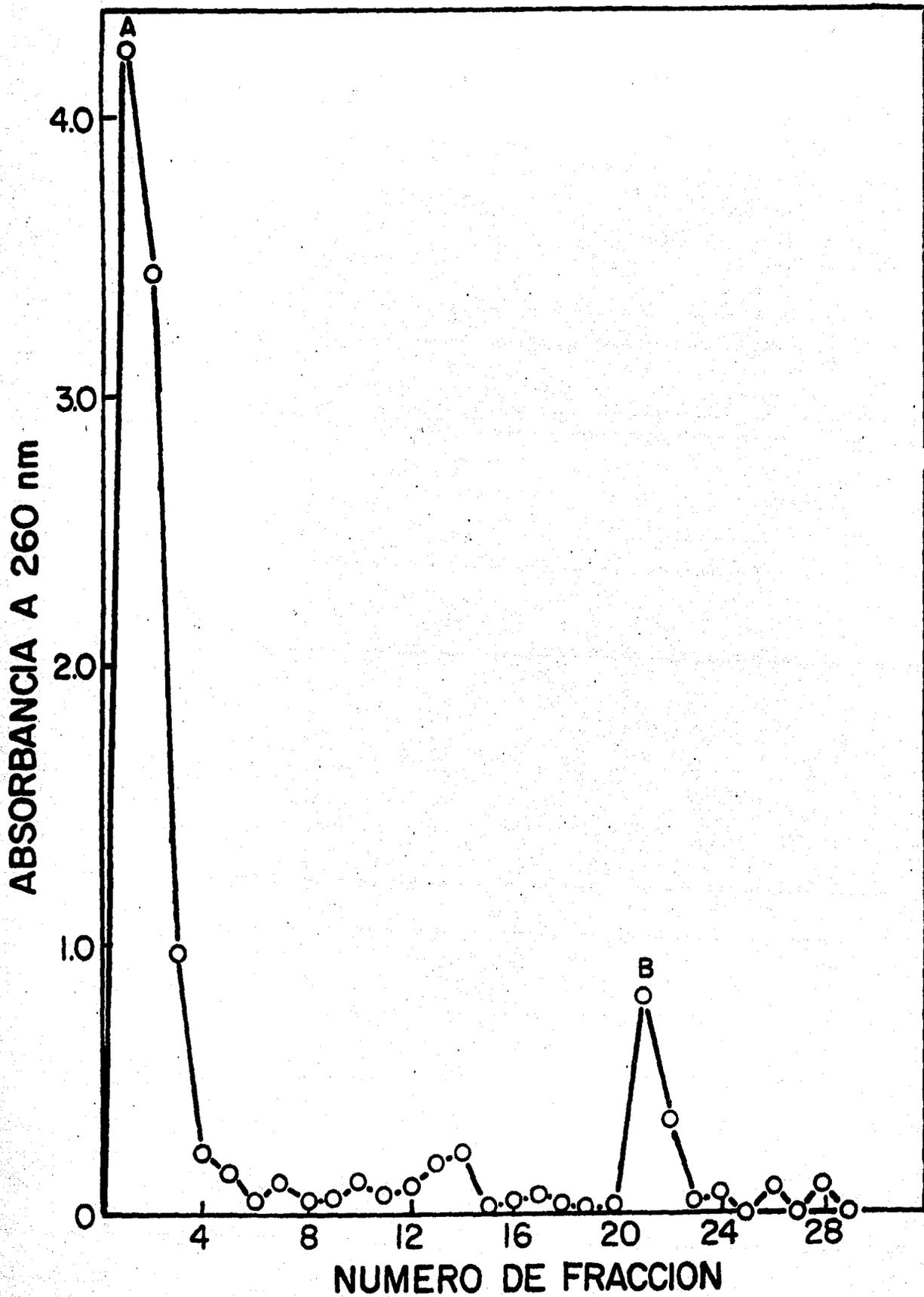


Figura 12

Electroforesis en gel de agarosa de las poblaciones de RNA poli A- y poli A+.

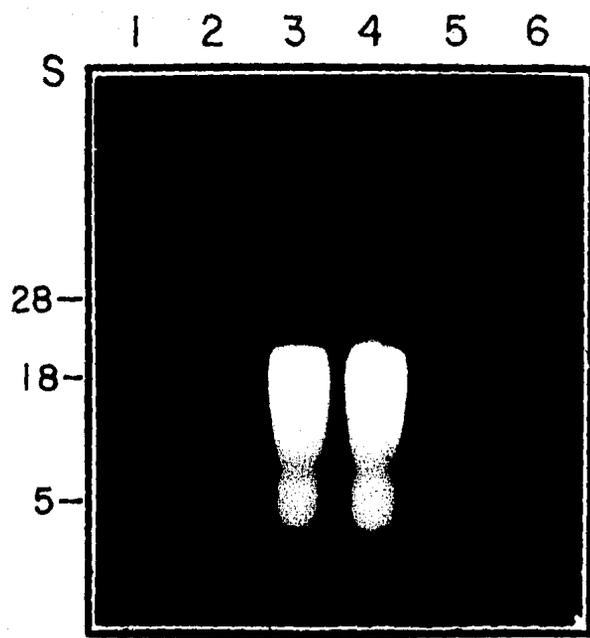
Las poblaciones de RNA poli A- y RNA poli A+ separadas por cromatografía de afinidad a oligo-dt-celulosa, se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. Las muestras se corrieron de 2 a 2.5 h a 35 V y los geles se tiñeron con bromuro de etidio (5 ug/ml) durante 30 a 45 min. Las fotografías de los geles se tomaron bajo luz ultravioleta con películas Polaroid 57.

Carriles 1 y 2: poblaciones de RNA poli A+

Carril 3 : poblaciones de RNA poli A-

Carril 4 : RNA total de E. histolytica.

Carriles 5 y 6: RNA polisomal de cerebro de rata.



El progreso de la anemia del conejo se siguió por observación al microscopio de preparaciones de sangre periférica teñidas con nuevo azul de metileno, el cual tiñe intensamente complejos de ribonucleoproteína (Fig. 13). Antes de iniciar el tratamiento la mayoría de los conejos presentaron 0 a 1.5% de reticulocitosis (Fig. 13 A). En el tercer día del tratamiento, la reticulocitosis alcanzó 90 a 95%, sólo que la mayoría de las células teñidas fueron reticulocitos maduros (Fig. 13 B). A partir del cuarto día de tratamiento comenzaron a aparecer reticulocitos jóvenes (Fig. 13 C) y en los días quinto al séptimo se observó de 90 al 100% de reticulocitos jóvenes, los cuales presentaron en su interior grandes cantidades de material ribonucleoproteico (Fig. 13 D). La sangre de los animales que presentaron este tipo de reticulocitosis se utilizó para preparar el lisado de reticulocitos, de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Este criterio, sin embargo, no fue suficiente para garantizar la funcionalidad del lisado, ya que no se observó correlación entre la cuenta de reticulocitos y la actividad traduccional del lisado obtenido.

La preparación del lisado de reticulocitos es un procedimiento relativamente simple, pero sin embargo requiere que la técnica sea realizada guardando todas las precauciones posibles para evitar la contaminación con nucleasas exógenas y en el menor tiempo posible para evitar la inactivación del extracto celular. Por otra parte, se observó que la respuesta de los conejos al tratamiento con 1,2-acetilfenilhidrazina, así como la actividad biológica de los lisados obtenidos varió mucho de animal a animal,

Figura 13

Inducción de reticulocitos por administración de
1,2- acetilfenilhidrazina.

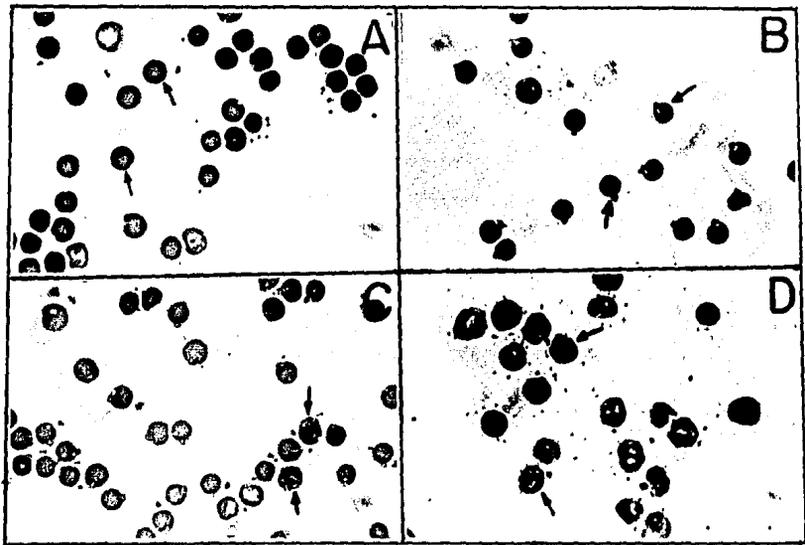
Los conejos se inyectaron durante 5 - 7 días con 1,2-acetilfenilhidrazina por vía intramuscular. En el primer día de tratamiento se administró vitamina B12 y ácido fólico. El progreso de la anemia de los conejos se siguió por cuantificación diaria de reticulocitos de sangre obtenida de la vena marginal de la oreja del conejo. La sangre se tiñó con nuevo azul de metileno durante 15 min a 37°C. Con esta sangre se prepararon extensiones en portaobjetos y se observaron con objetivo 100X.

Cuadro A: muestra de sangre tomada antes de iniciar el tratamiento.

Cuadro B: muestra de sangre tomada en el tercer día de tratamiento.

Cuadro C: muestra de sangre tomada en el cuarto día de tratamiento.

Cuadro D: muestra de sangre tomada en el quinto a séptimo día de tratamiento.



por lo que se trataron varios conejos simultáneamente para aumentar así la posibilidad de obtener un lote de lisado de reticulocitos con alta actividad de síntesis proteica.

5. Actividad traduccional endógena de los lisados de reticulocitos.

El lisado de reticulocitos de conejo contiene gran cantidad de RNAs mensajeros endógenos principalmente para alfa y beta-globinas, los cuales pueden ser traducidos bajo condiciones adecuadas a velocidades muy cercanas a las que se presentan en las células intactas. Sin embargo, entre cada lote de lisado de reticulocitos existe una considerable variación de eficiencia traduccional para los RNA mensajeros endógenos, y por consiguiente para RNA mensajeros exógenos (Perbal, 1984). Por esta razón, antes de emplearlos en los ensayos de traducción in vitro procedimos a determinar la actividad traduccional para RNA mensajeros endógenos de los 12 lotes de lisado obtenidos. Para ello, el lisado de reticulocitos de conejo se complementó con las sustancias que le permiten efectuar eficientemente traducción in vitro, incluyendo la ^{35}S -Metionina de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, sólo que en estos experimentos se omitió el tratamiento con nucleasa micrococcal. Los resultados de estas determinaciones se muestran en la Tabla IV. Cabe aclarar que se adoptó como criterio el utilizar sólo aquellos lisados de reticulocitos cuya actividad de síntesis proteica endógena en 5 μl de mezcla de traducción precipitada con TCA presentara más de 1×10^{-6} c.p.m. de ^{35}S -Metionina después de 90 min de incubación a 30 C.

Como podemos observar en la Tabla IV, sólo tres de los 12

TABLA IV

Evaluación de la actividad traduccional RNAm endógena de los lisados de reticulocitos de conejo.

Lote	cpm/5 ul de mezcla de ¹ traducción	
	0 min	90 min
R - 1	68 782	560 576
R - 2	134 539	509 114
R - 3	191 633	1 172 685
R - 41	146 802	344 598
R - 43	142 056	456 292
R - 44	12 023	16 637
R - 51	12 347	37 877
R - 52	115 791	534 136
R - 61	20 532	38 448
R - 62	23 021	189 394
R - 71	120 365	1 060 276
R - 72	104 266	1 180 446

1. cpm de ³⁵S-Metionina en 5 ul de mezcla de traducción precipitados con TCA al 10%, antes (0 min) y después de la incubación (90 min) a 30°C.

lisados de reticulocito presentaron una alta eficiencia traduccional endógena. Estos lisados corresponden a los lotes R-3, R-71 y R-72, los cuales fueron utilizados para la traducción in vitro de los RNAs mensajeros amibianos.

6. Tratamiento con nucleasa micrococcal.

La elevada actividad de RNAm de globina endógena de los lisados de reticulocitos de conejo fue eliminada por digestión del lisado con nucleasa micrococcal, de acuerdo al procedimiento descrito por Pelham y Jackson (1976). Para verificar la eficiencia de destrucción de los RNAs mensajeros endógenos por el tratamiento del lisado de reticulocitos con nucleasa micrococcal, se determinó la incorporación de ^{35}S -Metionina en material TCA precipitable en lisados digeridos y sin digerir después de efectuar los experimentos de traducción in vitro. Los resultados de estas determinaciones se muestran en la Tabla V. Como puede observarse la digestión del lisado de reticulocitos de conejo con nucleasa micrococcal disminuyó notablemente el nivel de síntesis proteica endógena, siendo ésta 30 veces menor que la original. Esto se debió a la hidrólisis de los RNAm de globina endógenos por acción de la nucleasa micrococcal. Los productos de traducción obtenidos con lisados previamente digeridos y sin digerir con nucleasa micrococcal se analizaron por fluorografía de los geles de poli-acrilamida - SDS al 10%. En la figura 14 carril 1 se muestran las proteínas que aparecen como productos de traducción endógena después de la digestión con nucleasa micrococcal. Una de estas bandas es muy prominente y tiene un peso molecular aparente de 47 Kd y aparecen otras bandas de 17 y 102 Kd. Estas bandas, sin

TABLA V

Efecto del tratamiento con nucleasa micrococcal sobre la actividad traduccional RNAm endógena de los lisados de reticulocitos de conejo

Lote	cpm/5 ul de mezcla de traducción ¹		Disminución ² relativa
	sin digerir	digerido	
R - 3	1 328 967	35 821	37.1
R - 71	1 187 955	42 023	28.3
R - 72	1 120 361	31 290	35.8

1. cpm de ³⁵S-Metionina en 5 ul de mezcla de traducción, con lisados digeridos y no digeridos con nucleasa micrococcal, precipitados con TCA al 10%.
2. Relación de las cpm de ³⁵S-Metionina incorporadas en la mezcla de traducción con lisado no digerido entre las incorporadas en la mezcla de traducción preparada con lisado digerido con nucleasa micrococcal.

Figura 14

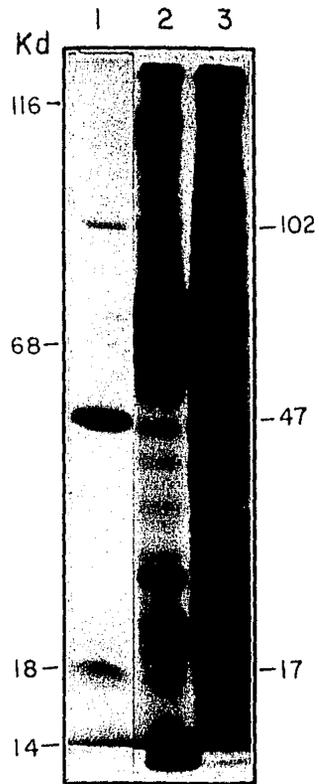
Fluorografía de los productos de traducción de los RNAm's endógenos de lisados digeridos y no digeridos con nucleasa micrococcal.

El lisado de reticulocitos se complementó con hemina, un sistema regenerador de energía y ^{35}S -Metionina. Una porción de este lisado se digirió con nucleasa micrococcal, mientras que a otra se le adicionó agua en lugar de la enzima. Al lisado digerido se le adicionó agua o RNA total de S. cerevisiae y al lisado no digerido se le adicionó agua en lugar de RNA. Estas mezclas de traducción se incubaron 90 min a 30°C. Los productos de traducción in vitro se fraccionaron en geles de poliacrilamida-SDS al 10%. Los geles se trataron con PPO/DMSO y se secaron con calor y vacío. El gel se expuso a una placa de Rayos X por 36 h a - 70°C.

Carril 1: lisado digerido + agua.

Carril 2: lisado no digerido + agua.

Carril 3: lisado digerido + RNA de S. cerevisiae.



embargo pueden considerarse como un fondo aceptable y en general puede decirse que no interfieren con el análisis de las proteínas sintetizadas in vitro a partir de RNAs mensajeros exógenos. En el carril 2 de la figura 14 se muestran los péptidos sintetizados con el lisado sin digerir, los cuales son codificados por los RNAs mensajeros endógenos de los reticulocitos. Por otra parte, para comprobar que el tratamiento con nucleasa micrococcal no había deteriorado la actividad traduccional del lisado de reticulocitos. Se adicionó un RNAm exógeno al sistema de traducción in vitro. En este caso se utilizó RNA celular total de Saccharomyces cerevisiae. Los productos de traducción codificados por este RNA se muestran en el carril 3 de la figura 14. Como puede observarse el lisado de reticulocitos fue capaz de sintetizar proteínas cuyos pesos moleculares fluctuaron entre 14 y 116 Kd. Esto fue indicativo de que el lisado de reticulocito de conejo era altamente eficiente para traducir los RNAs mensajeros exógenos de nuestro interés.

7. Incorporación de ^{35}S -Metionina en material TCA caliente precipitable.

Para estimar la eficiencia de la traducción in vitro dirigida por los RNAs aislados de las clonas A (Fag+, Adh+, Ctp+, Tox+, Vir+) y L-6 (Fag-, Adh-, Ctp-, Tox-, Vir-) de E. histolytica después de la incubación con la mezcla de traducción, se determinó la incorporación de ^{35}S -Metionina en material TCA precipitable. Como control se empleó un lisado al que se agregó agua en lugar de RNA, el cual se incubó bajo las mismas condiciones que el lisado mezclado con RNA. La incorporación de ^{35}S -Metionina en material TCA precipitable en la mezcla de traducción fue de 8 a 11 veces mayor que en el control sin RNA (Tabla VI).

8. Traducción in vitro de RNAm de Entamoeba histolytica.

Para examinar las proteínas codificadas por los RNAs mensajeros de las clonas A y L-6, eficiente y deficiente en fagocitosis respectivamente, se realizaron experimentos de traducción in vitro en un sistema libre de células derivado de reticulocitos de conejo de acuerdo al procedimiento descrito por Pelham y Jackson (1976). En este tipo de ensayos se utilizó RNA amibiano aislado con los métodos que de DEP-SDS o isotiocianato de guanidina. La eficiencia de la traducción in vitro dirigida por los dos tipos de preparaciones de RNA se estimó en base a la incorporación de ^{35}S -Metionina en material TCA precipitable. Como se muestra en la Tabla VII, el RNA aislado con el método DEP-SDS no mostró actividad biológica, mientras que el RNA preparado de acuerdo al método de isotiocianato de guanidina - CsCl incorporó 11 veces más cuentas que el lisado control, el cual se incubó

TABLA VI

Incorporación de ^{35}S -Metionina en material TCA precipitable en lisados de reticulocitos incubados con RNA de las clonas A y L-6 aisladas por el método isotiocianato de guanidina-CsCl

Muestra	cpm/5 ul de mezcla ¹ de traducción	incorporación ² relativa
Control (-RNA0)	45 168	-
Clona A	381 217	8.44
Clona L-6	486 911	10.78

1. cpm de ^{35}S -Metionina en 5 ul de mezcla de traducción precipitados con TCA al 10%.
2. Relación de las cpm incorporadas en 5 ul de mezcla de traducción con RNA (Clonas A o L-6) entre las cpm incorporadas en el mismo volumen de mezcla de traducción control, pero con agua en lugar de RNA.

TABLA VII

Incorporación de ^{35}S -Metionina en material TCA precipitable en lisados de reticulocitos incubados con RNA aislado por los métodos DEP-SDS e isotiocianato de guanidina-CsCl

Muestra	cpm /5 ul de ¹ mezcla de traducción	incorporación ² relativa
Control (-RNA)	21 138	-
DEP-SDS	13 433	0.635
Isotiocianato de guanidina-CsCl	243 682	11.528

1. cpm de ^{35}S -Metionina en 5 ul de mezcla de traducción precipitados con TCA al 10%.
2. Relación de las cpm incorporadas en 5 ul de mezcla de traducción programada con preparaciones de RNA (obtenidas con los métodos DEP-SDS o Isotiocianato de guanidina-CsCl) entre las incorporadas en 5 ul de lisado control.

con agua. Por esta razón, todos los experimentos de traducción in vitro siguientes se realizaron con RNA aislado por centrifugación en un gradiente de cloruro de cesio en presencia de isotiocianato de guanidina. Los productos de la traducción in vitro de los RNAs mensajeros de las clonas A y L-6 de E. histolytica se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y las fluorografías de estos geles se muestran en la figura 15. Como se puede observar, el lisado control (Fig. 15 carril 1), incubado con agua destilada en lugar de RNA, presenta dos péptidos con peso molecular aparente de 47 y 102 Kd cuya significancia se discutió anteriormente; mientras que las fluorografías de los lisados incubados con los RNAs de las clonas A y L-6 (Fig. 15 carriles 2 y 3) muestran la presencia de una gran variedad de péptidos, cuyos pesos moleculares aparentes se encuentran entre 15 y 110 Kd. Al comparar las fluorografías de ambas clonas, se puede notar que los patrones electroforéticos de los productos de traducción in vitro son muy semejantes entre sí. Sin embargo, existe una diferencia particularmente interesante. En el carril 3 correspondiente a los péptidos codificados por el RNA de la clona L-6, deficiente en fagocitosis, se observa un péptido de aproximadamente 78 Kd, el cual no encuentra entre los péptidos sintetizados en la mezcla de traducción programada con RNA de la clona A con alta velocidad de fagocitosis. Este péptido podría corresponder a una de las proteínas amibianas que se encuentran modificadas estructuralmente en la clona L-6 y que le confieren a los trofozoítos de esta clona la deficiencia en fagocitosis.

Figura 15

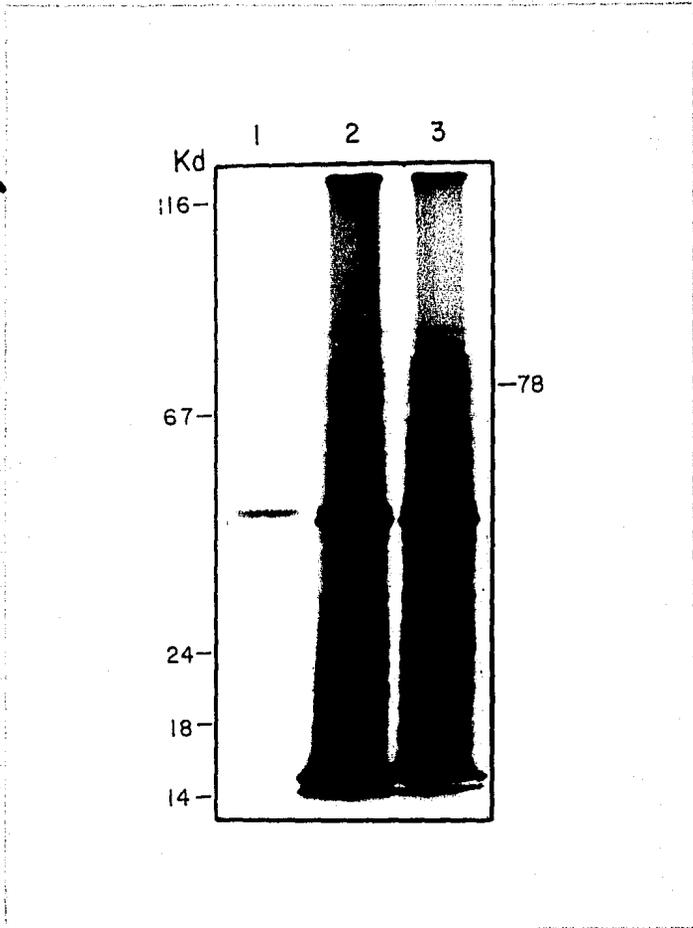
Fluorografía de los productos de traducción in vitro de los RNAm's de las clonas A y L-6 de E. histolytica.

La traducción in vitro de los RNAs mensajeros de las clonas A y L-6 de E. histolytica se efectuaron con lisado de reticulocitos previamente digerido con nucleasa micrococcal. Las mezclas de traducción in vitro se incubaron 90 min a 30°C y los productos obtenidos se fraccionaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10%. La mezcla de traducción control contenía agua estéril en lugar de RNA. Las muestras se corrieron durante 5 a 6 h a 25 mA y posteriormente se trató con PPO/DMSO. El gel secado por calor y vacío se expuso a una placa de Rayos X durante 36 a 48 h a - 70°C.

Carril 1: lisado digerido + agua.

Carril 2: lisado digerido + RNA clona A.

Carril 3: lisado digerido + RNA clona L-6.



9. Inmunoprecipitación de los productos de traducción in vitro.

Para determinar si durante la traducción in vitro se habían sintetizado péptidos antigénicos codificados por los RNAs de las clonas A y L-6 de E. histolytica, las mezclas de traducción se inmunoprecipitaron con sueros policlonales y monoclonales anti-amiba. Estos ensayos se llevaron a cabo de acuerdo al método descrito por Kessler (1975), el cual se basa en el uso de bacterias de S. aureus, portadoras de grandes cantidades de proteína A en su pared celular, como inmoadsorbente para remover los complejos inmunes formados en la reacción de inmunoprecipitación. Las mezclas de traducción in vitro programadas con RNA de las clonas A y L-6 se incubaron con sueros inmunes de conejo anti-clona A, anti-clona L-6 y con un suero anti-112, el cual es un suero policlonal monoespecífico que reconoce una proteína amibiana de 112 Kd. Esta proteína está aparentemente involucrada en el mecanismo de adhesión y fagocitosis de los trofozoítos de E. histolytica a la célula blanco (Orozco y col., 1986). Los controles se incubaron bajo las mismas condiciones, sólo que en este caso se utilizaron sueros normales de conejo. Al término de la incubación se adicionaron las bacterias de S. aureus y los complejos antígeno - anticuerpo unidos a las bacterias se recuperaron por centrifugación. Las proteínas enlazadas no específicamente se eliminaron lavando la pastilla bacteriana con cambios bruscos de pH, concentración salina y detergente. Finalmente, los complejos antígeno - anticuerpo se liberaron del inmoadsorbente por ebullición de la pastilla bacteriana en solución amortiguadora de muestra para geles de poliacrilamida - SDS. La fluorografía del gel de poliacrilamida - SDS que contenía los

polipéptidos antigénicos inmunoprecipitados se muestra en la figura 16. Como se puede observar los sueros policlonales anti-amiba reconocieron un gran número de productos de traducción, los cuales no fueron enlazados por sueros normales de conejo. En los carriles 2, 3, 6 y 7 de la figura 16 se muestra que los sueros policlonales anti - A y anti - L-6 reconocieron específicamente varios polipéptidos con peso molecular aparente entre 17 - 95 Kd. Los sueros normales de conejo utilizados como control, reaccionaron con un triplete de péptidos de aproximadamente 50 Kd (Fig. 16 carriles 1 y 5). Un antisuero de conejo mono-específico preparado en contra de la proteína amibiana de 112 Kd precipitó específicamente dos bandas de 89 y 95 Kd cuando se incubó con la mezcla de traducción de la clona A, pero cuando este mismo antisuero se incubó con la mezcla de traducción de la clona L-6 no apareció la banda de 95 Kd y en cambio se insinuó una banda de 78 Kd. Este resultado es muy interesante porque el péptido 95 Kd podría ser el precursor no glicosilado de la proteína de superficie de 112 Kd, la cual parece jugar un papel muy importante en el proceso de adhesión amibiana a la célula blanco (Rodríguez, observación personal).

Por otra parte, para saber si alguna de las proteínas sintetizadas por los RNAs in vitro podría ser reconocida por anticuerpos monoclonales dirigidos en contra de antígenos de superficie amibianos, las mezclas de traducción programadas con las RNAs mensajeros de las clonas A y L-6 se inmunoprecipitaron con los anticuerpos monoclonales (Mabs) 10, 15 y 24', los cuales tienen la propiedad de inhibir propiedades biológicas de los trofo-

Figura 16

Fluorografía de los productos de traducción in vitro de los RNAm's de las clonas A y L-6 inmunoprecipitados con los sueros anti-A, anti-L-6 y anti-112 Kd.

Los productos de traducción in vitro de los RNAm's de las clonas A y L-6 se pusieron a interaccionar con anticuerpos policlonales dirigidos contra trofozoítos de las clonas A y L-6 y contra la proteína de 112 Kd de la superficie amibiana. Los complejos antígeno-anticuerpo se recuperaron de la mezcla de traducción por adición de S. aureus al 10%. Los péptidos radioactivos inmunoprecipitados se fraccionaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. Los geles se trataron para fluorografía con PPO/DMSO y se secaron con calor y vacío. El gel se expuso a una placa de Rayos X durante 48 - 72 h a - 70°C. Los complejos inmunes se liberaron de las bacterias S. aureus por ebullición en solución amortiguadora de muestra para electroforesis en geles de PAGE-SDS.

Carril 1: péptidos de la clona A + suero normal de conejo.

Carril 2: péptidos de la clona A + anti-A.

Carril 3: péptidos de la clona A + anti-L-6.

Carril 4: péptidos de la clona A + anti-112 Kd.

Carril 5: péptidos de la clona L-6 + suero normal de conejo.

Carril 6: péptidos de la clona L-6 + anti-A.

Carril 7: péptidos de la clona L-6 + anti-L-6.

Carril 8: péptidos de la clona L-6 + anti-112 Kd.

zoítos de E. histolytica relacionadas con la virulencia. Los Mabs 10 y 15 inhiben la eritrofagocitosis y la actividad de toxina de extractos amibianos sobre células en cultivo, mientras que el Mab 24' sólo inhibe actividad de toxina (Orozco y col., 1986). Los productos de traducción de la clona A y L-6 inmunoprecipitados con los anticuerpos monoclonales 10 y 24' se fraccionaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y la fluorografía de este gel se muestra en la figura 17. En este tipo de experimentos se utilizó como control suero de ratones no inmunizados, con los cuales inmunoprecipitaron siete péptidos con pesos moleculares aparentes de 18 a 110 Kd. Sin embargo, destaca el reconocimiento de un par de bandas de aproximadamente 52 Kd precipitadas por los tres monoclonales utilizados, las cuales no fueron enlazadas por los sueros de ratón normal.

Los resultados obtenidos hasta este momento indican que se logró aislar RNA puro e intacto a partir de las clonas A y L-6 de E. histolytica. Estas preparaciones de RNA estimularon la incorporación de ³⁵S-Metionina en material TCA precipitable, con lo cual demostraron conservar su actividad de RNA mensajero. Al comparar los productos de traducción codificados por los RNAs mensajeros de estas dos clonas se detectó un péptido con peso molecular aparente de 78 Kd, el cual podría estar involucrado en la fagocitosis de los trofozoítos amibianos. Los sueros policlonales anti - A y anti - L-6 reconocieron específicamente una variedad de antígenos amibianos sintetizados in vitro, con lo cual se demostró la eficiencia de la traducción in vitro. Un

Figura 17

Fluorografía de los productos de traducción in vitro de los RNAm's de la clona A inmunoprecipitados con los anticuerpos monoclonales 10, 15 y 24'.

Los productos de la traducción in vitro de los RNAs mensajeros de la clona A se incubaron con los anticuerpos monoclonales 10, 15 y 24'. Los complejos antígeno-anticuerpo se removieron de la mezcla de traducción por adición de S. aureus al 10%. Los péptidos radioactivos inmunoprecipitados se fraccionaron por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. Los geles se trataron para fluorografía con PPO/DMSO y se secaron con calor y vacío. El gel seco se expuso a una placa de Rayos X por 48 - 72 h a - 70°C.

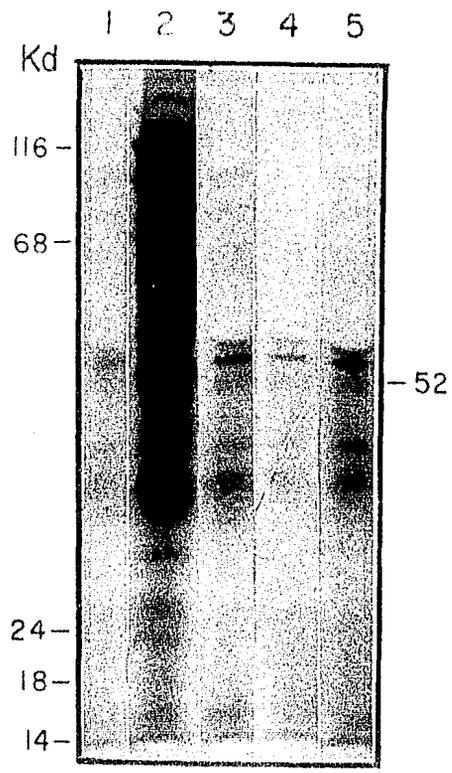
Carril 1: péptidos de la clona A + suero normal de ratón.

Carril 2: péptidos de la clona A + suero anti-A.

Carril 3: péptidos de la clona A + Mab 10.

Carril 4: péptidos de la clona A + Mab 15.

Carril 5: péptidos de la clona A + Mab 24'.



suero policlonal mono-específico dirigido contra la proteína amibiana de 112 Kd reconoció un péptido con peso molecular aparente de 95 Kd. Este péptido podría corresponder al precursor no glicosilado de la proteína de 112 Kd. Finalmente, los anticuerpos monoclonales 10, 15 y 24', que inhiben propiedades amibianas relacionadas con la virulencia (Orozco y col., 1986) reaccionaron específicamente con un par de péptidos con peso molecular aproximado de 52 Kd. Estos péptidos podrían jugar un papel importante en la adhesión y la fagocitosis de los trofozoítos de E. histolytica sobre la célula blanco.

VII. DISCUSION

La fagocitosis parece ser una de las funciones celulares más importantes que participan en la agresividad de E. histolytica hacia la célula blanco (Trissl y col., 1978; Orozco y col., 1980; Orozco y col., 1983). Por lo tanto, el conocimiento de las bases moleculares que rigen este fenómeno permitirá definir algunos de los factores de virulencia amibianos. La estrategia utilizada en el presente trabajo para el estudio de las biomoléculas involucradas en la fagocitosis de E. histolytica consistió en el aislamiento y traducción in vitro de los mensajeros totales de dos clonas con diferente grado de virulencia y fagocitosis, las clonas A y L-6, para posteriormente inmunoprecipitar los antígenos amibianos codificados por los RNAs mensajeros de ambas clonas. Se utilizaron anticuerpos policlonales y monoclonales con el fin de detectar péptidos que pudieran estar relacionados con el proceso de la fagocitosis.

1. Aislamiento de RNA de Entamoeba histolytica.

El primer paso para llevar a cabo esta estrategia fue necesariamente el aislamiento de RNA de E. histolytica intacto y biológicamente activo. Para ello, se probaron varios métodos previamente publicados para la extracción de RNA de células eucarióticas. Durante la realización de estos experimentos se observó el mayor número de precauciones posibles para evitar la contaminación por RNAsas exógenas y por lo tanto la degradación del RNA. Sin embargo, se encontró que los métodos de extracción que involucraron la homogenización de los trofozoítos amibianos en LiCl - Urea o Fenol/Cloroformo no fueron adecuados para la

extracción de RNA de los trofozoítos de E. histolytica, ya que el RNA que se obtuvo con este tipo de métodos estuvo parcial o totalmente degradado (Figs. 4 y 5). Varios autores han coincidido en que es sumamente difícil aislar RNA intacto del género Entamoeba mediante este tipo de métodos de extracción (Barker, 1976; Barker y Swales, 1976; Albach y col, 1984). Dicha dificultad se ha atribuido fundamentalmente a la presencia de una potente RNasa asociada a los ribosomas de E. histolytica (Prachayasittikul y Albach, 1982), así como a la presencia de una gran cantidad de nucleasas citoplasmáticas solubles que caracterizan al género Entamoeba (Ahzar y Mohan, 1975).

Por otra parte, con objeto de definir si el uso de fenol era suficiente para inactivar las RNasas amibianas, se realizaron experimentos de coextracción de RNA amibiano y RNA de cerebro de rata utilizando diferentes métodos que involucran el uso de fenol. Se observó que el RNA de cerebro de rata no perdió su integridad, aún después de ponerlo en contacto con un extracto celular amibiano (Fig. 10 carriles 3 y 4); mientras que el RNA de los trofozoítos apareció parcialmente degradado, ya que no se aisló la especie de RNA asociada a la subunidad ribosomal mayor (Fig. 10 carriles 5 y 6). Estos resultados sugieren que la degradación del RNA de E. histolytica no se debe a la incapacidad del fenol para inhibir la acción de las ribonucleasas endógenas de los trofozoítos, ya que de lo contrario también se hubiera degradado el RNA de cerebro de rata. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que las RNasas amibianas no sean capaces de actuar sobre el RNA de cerebro de rata. La degradación

del RNA ribosomal mayor amibiano también podría ser debida a la inestabilidad del RNA ribosomal mayor de E. histolytica a la acción desnaturalizante del fenol, lo cual originaría que esta especie se disociara en RNAs de menor coeficiente de sedimentación. Esta segunda posibilidad parece ser la más acertada, ya que Albach y col. (1984) observaron que el RNA ribosomal mayor 25S es sumamente sensible a la temperatura y se disocia completamente en dos polinucleótidos de 16 y 17S cuando se incubaba a 56°C por tiempos cortos.

Por otra parte, varios autores han encontrado que en la mayoría de los protozoarios y en algunos otros eucariontes inferiores, el RNA ribosomal asociado a la subunidad mayor se disocia bajo condiciones desnaturalizantes en dos fragmentos de aproximadamente el mismo tamaño, semejantes en tamaño al RNA ribosomal asociado a la subunidad menor (Davis y Mullersman 1981, Ishikawa 1973, Payne y Loening 1970, Shine y Dalgarno 1973). Este tipo de fenómeno no se ha observado en diferentes células animales y vegetales estudiadas, en las cuales el RNA ribosomal mayor (28S) consiste en un complejo formado por una molécula de RNA que sedimenta ligeramente por abajo de 28S y otra de bajo peso molecular (Pene y col., 1968; King y Gould, 1970; Prestayko y col., 1970). Sy y McCarty (1970) sugieren que las diferencias en composición y estabilidad de la molécula de RNA asociada a la subunidad mayor podría representar a su vez una diferencia evolutiva entre procariontes y eucariontes.

Bajo nuestras condiciones experimentales, sólo con los métodos de extracción basados en el uso de DEP e isotiocianato de gua-

midina se aisló RNA amibiano intacto (Figs. 6 y 7), el cual en condiciones no desnaturalizantes presentó 4 bandas de coeficientes de sedimentación mayor a 28S, aproximadamente 25S, mayor a 18S y otra de aproximadamente 16S. En condiciones desnaturalizantes estas bandas se resolvieron en 5 bandas de 1.59, 1.47, 0.63, 0.49 y 0.44 Md de peso molecular (Fig. 9). Sin embargo, aún cuando estas dos preparaciones de RNA mostraron en común un alto grado de integridad, también presentaron grandes diferencias en sus propiedades físicas y biológicas. Con el método DEP - SDS descrito por Albaugh y col. (1984) para el aislamiento del RNA de E. histolytica se obtuvo RNA amibiano intacto, sin embargo mostró un elevado índice de contaminación con proteínas (260/280 nm menor a 2) (Tabla II) y SDS, así como ausencia total de actividad biológica en síntesis proteica en un sistema de traducción in vitro (Tabla VI). Es probable que la carencia de actividad RNAm en las preparaciones de RNA aisladas de acuerdo al método DEP - SDS se deba en gran parte al uso de DEP, ya que este compuesto además de inhibir efectivamente la actividad ribonucleasa (Ehrenberg y Solymosy, 1976), ataca ácidos nucleicos de cadena sencilla y bases de adenina (Ehrenberg y Solymosy, 1976; Jost y col., 1978; Mendelshon y Young, 1978; Rhoads y col., 1973).

Por otra parte, con las modificaciones propuestas por el Dr. Federico Sánchez (comunicación personal) al método isotiocianato de guanidina - CsCl (Urlich y col., 1974; Glisin y col., 1977) previamente descrito para el aislamiento de RNA eucariótico a partir de tejidos ricos en nucleasas, se obtuvieron prepa-

raciones de RNA amibiano de excelente calidad. El índice de absorbancias 260/280 nm para estas muestras fue superior a 2 en todos los casos, lo cual indicó un bajo nivel de proteína en el RNA total. Este índice de absorbancias no se observó con ninguno de los otros métodos ensayados, incluyendo el método DEP - SDS (Tabla II). Además, a diferencia con el RNA aislado de acuerdo al método DEP - SDS, el RNA aislado en presencia de isotiocianato de guanidina conservó su actividad RNA mensajero, según demostraron los ensayos de traducción in vitro, en los cuales la adición de este RNA al sistema resultó en la estimulación de la incorporación de ³⁵S-Metionina en material TCA precipitable.

Sin duda el éxito para aislar RNA amibiano puro, intacto y biológicamente activo con el método isotiocianato de guanidina - CsCl depende de los siguientes tres pasos críticos:

- 1) El uso de isotiocianato de guanidina durante la homogenización celular, el cual tiene la propiedad de desnaturalizar rápidamente ribonucleasas y de disociar completamente complejos de ribonucleoproteína, permitiendo así la extracción de RNA no degradado de la mezcla.
- 2) La sedimentación del RNA a través de un gradiente de CsCl para separarlo del DNA y de las proteínas contaminantes y
- 3) El lavado de extracto crudo de RNA con LiCl y EDTA para solubilizar residuos de DNA y proteínas asociadas, glucógeno y otros carbohidratos que pudieran interferir con la actividad traduccional del RNA.

Por otra parte, la eficiencia de recuperación de RNA total

por trofozoito con el método de isotiocianato de guanidina - CsCl fue superior a aquella observada con el método DEP - SDS (Tabla II). Aunque cabe hacer notar que con ambos métodos aislamos de 2 - 4 veces más cantidad de RNA del esperado para una célula eucariótica típica, la cual se sabe que contiene 1×10^{-5} ug de RNA total.

2. Aislamiento de RNA poliadenilado.

Las poblaciones de RNA poliadenilado, compuestas principalmente por RNAm se aislaron por cromatografía de afinidad a oligo-dT celulosa, de acuerdo al método descrito por Aviv y Leder (1971). El RNA poli A+ se aisló a partir de preparaciones de RNA total obtenidas con los métodos DEP - SDS e isotiocianato de guanidina - CsCl. En ambos casos, el RNA poli A+ constituyó entre 5 a 10% del RNA aplicado a la columna. Este porcentaje representa un exceso de cuando menos el 100% en la cantidad de RNA poliadenilado esperado para una célula eucariótica típica, la cual contiene aproximadamente 1 a 5% de RNA poli A+ (Lehninger, 1981). Este excedente podría ser debido a que la fracción de RNA poliadenilado contiene especies de RNA ribosomal como contaminantes, las cuales se encuentran en mayor proporción en la célula (80 a 85%), y por ello difícilmente pueden ser separadas por completo de los RNAs poli A+.

Las preparaciones de RNA poliadenilado, ricas en poblaciones RNAm, se utilizaron para dirigir la síntesis de proteínas en un sistema de traducción in vitro derivado de reticulocitos de conejo. La eficiencia de la traducción in vitro medida en base a la cantidad de ^{35}S -Metionina incorporada en material TCA

precipitable, mostró ser 1 a 1.5 veces más alta que cuando se utilizaron preparaciones de RNA total.

3. Preparación del lisado de reticulocitos de conejo.

El lisado de reticulocitos de conejo es sin duda el sistema de síntesis proteica libre de células más comúnmente utilizado para la caracterización de RNAs mensajeros heterólogos. Este lisado puede ser obtenido de diferentes casas comerciales del extranjero, pero es sumamente caro y además se corre el riesgo de que se inactive durante el transporte. Por esta razón, decidimos prepararlo en el laboratorio. El protocolo que se siguió para su preparación fue el descrito por Pelham y Jackson (1976). Los reticulocitos se obtuvieron de conejos jóvenes con anemia experimental inducida por inyección del agente hemolítico 1,2-acetilfenilhidrazina. Al tercer día de tratamiento con este fármaco, los conejos presentaron 90 a 95% de reticulocitosis, sólo que la mayor parte de estas células eran reticulocitos maduros. El uso de este tipo de células para la preparación del lisado de reticulocitos no es conveniente, ya que la actividad de síntesis proteica endógena está bastante disminuida en comparación con los reticulocitos jóvenes. Estas células se comenzaron a observar a partir del cuarto día de tratamiento. En el quinto a séptimo día se encontró 90 a 100% de reticulocitos jóvenes en los frotis de sangre periférica. Estas células se distinguen de los eritrocitos y de los reticulocitos maduros por presentar una gran cantidad de agregados de material ribonucleoproteico en su interior, cuando se tiñen con colorantes básicos tales como el nuevo azul de metileno (Fig. 13 D). El único inconveniente que presen-

ta el uso de reticulocitos jóvenes para preparar el lisado utilizado en los experimentos de traducción in vitro, es que el lisado obtenido está saturado con RNAm de globina endógenos y por tanto, los RNAs exógenos son traducidos sólo en la extensión en la que ellos compiten con los endógenos. Por esta razón, es indispensable digerir este extracto celular con nucleasa micrococcal.

Los conejos utilizados para la preparación del lisado de reticulocitos mostraron amplias diferencias en su respuesta al tratamiento con acetilfenilhidrazina. En general, se observó que los conejos jóvenes respondieron más rápidamente a la inducción de la reticulocitosis que los conejos maduros. Es probable que esto se deba a que los conejos jóvenes presentan mayor diferenciación celular en médula ósea que los conejos maduros, en los cuales la médula ósea roja ha sido reemplazada en gran parte por médula ósea amarilla (inactiva en diferenciación celular). Por otra parte, se observó que los conejos jóvenes, a los cuales se les administró ácido fólico y Vitamina B12 en el primer día de tratamiento, necesitaron de 7 a 9 dosis de acetilfenilhidrazina para presentar 90 - 100% de reticulocitos jóvenes. Sin embargo, dos de los tres lisados que mostraron los más altos índices de actividad traduccional endógena (Tabla IV) se obtuvieron de conejos a los cuales se les administró esta mezcla de vitaminas.

4. Actividad traduccional endógena del lisado de reticulocitos.

Como se mencionó anteriormente, la actividad traduccional de los RNAs mensajeros endógenos varió considerablemente entre cada lote de lisado de reticulocitos. Con el fin de estandarizar

zar condiciones y garantizar la traducción eficiente de los RNAs exógenos amibianos, se adoptó como criterio el utilizar sólo aquellos lisados que mostraran amplia capacidad para traducir sus propios mensajeros. Para ello, se determinó la incorporación de ^{35}S -Metionina en lisados de reticulocitos sin digerir con nucleasa micrococcal. De los 12 lisados probados sólo 3 de ellos mostraron una elevada actividad traduccional, éstos fueron los lotes R-3, R-71 y R-72 (Tabla IV). Existen varias causas por las cuales el lisado de reticulocitos puede ser incapaz de efectuar síntesis de proteínas in vitro. Entre ellas destacan:

- 1) El uso excesivo de heparina como anticoagulante, ya que este compuesto inhibe la síntesis de proteínas.
- 2) La acumulación del factor HR1 (inhibidor de la traducción), la cual puede ser evitada por la adición de hemina inmediatamente después de descongelar el lisado.
- 3) La inactivación de factores de iniciación por manipulación inadecuada del lisado de reticulocitos.
- 4) Contaminación del lisado con nucleasas exógenas durante su preparación, o por
- 5) Liberación de nucleasas leucocitarias durante la lisis de paquetes de reticulocitos con glóbulos blancos contaminantes, las cuales degradan los mensajeros endógenos de globina.
5. Tratamiento con nucleasa micrococcal.

El siguiente paso en la preparación del sistema de traduc-

ción in vitro RNA-dependiente derivado de reticulocitos de conejo, consistió en digerir el lisado de reticulocitos con nucleasa micrococcal para eliminar así los RNAs de globina. La incorporación de ³⁵S-Metionina en material TCA precipitable obtenida en los lisados de reticulocitos digeridos fue 30 veces menor que la observada en los lisados sin digerir (Tabla V). Esto nos indicó que el tratamiento con la enzima había sido muy eficiente. Sin embargo, también era importante determinar cuántos y cuáles eran los péptidos que aparecían antes y después de digerir el lisado con la nucleasa micrococcal. Para ello, se fraccionaron los productos de traducción in vitro de lisados digeridos y sin digerir, en geles de poliacrilamida-SDS. El análisis por fluorografía de los productos de traducción in vitro del lisado de reticulocitos digerido con nucleasa micrococcal, mostró la síntesis de tres péptidos con pesos moleculares aparentes de 17, 47 y 102 Kd (Fig. 14 carril 1); mientras que en el lisado no digerido se sintetizaron una gran variedad de péptidos, cuyos pesos moleculares fluctuaron entre 14 y 110 Kd (Fig. 14 carril 2). Este resultado nos confirmó la eficiencia del tratamiento con nucleasa para la eliminación de los RNAs endógenos. Los péptidos de 17, 47 y 102 Kd, que aparecen como productos de traducción en lisados digeridos con nucleasa micrococcal (Fig. 14 carril 1), ya han sido reportados por otros autores. Pelham y Jackson (1976) suponen que estos péptidos no son productos de la traducción de RNAs endógenos, ya que se siguen observando aún en presencia de inhibidores de la traducción. Estos autores sugieren que estos péptidos se marcan específicamente por tener alta afinidad por la ³⁵S-Metionina. Por otro lado, no se puede descartar la posibili-

dad de que los mensajeros que codifican para los péptidos de 17, 47 y 102 Kd sean resistentes al tratamiento con nucleasa micrococcal o bien, que no se haya adicionado suficiente cantidad de nucleasa para destruir todos los mensajeros endógenos.

Con el fin de verificar que el tratamiento con la nucleasa micrococcal no había deteriorado la actividad traduccional del lisado de reticulocitos, se hizo un experimento de traducción in vitro en el que se utilizó como control positivo RNA total de Saccharomyces cerevisiae. La fluorografía de los productos de traducción obtenidos en este ensayo (Fig. 14 carril 3) muestra la síntesis de una gran variedad de péptidos, cuyos pesos moleculares aparentes fluctúan entre 14 y 116 Kd. Este resultado nos sugirió que las condiciones utilizadas para el tratamiento del lisado y para la subsecuente inactivación de la nucleasa micrococcal fueron adecuadas, ya que de lo contrario no se hubiera observado la síntesis de péptidos de alto peso molecular.

6. Traducción in vitro de RNAm de Entamoeba histolytica.

Hasta este momento, ya se contaba con un sistema de síntesis proteica libre de células - RNA dependiente. A continuación se procedió a probar la actividad biológica de las preparaciones de RNA obtenidas con los métodos basados en el uso de DEP e isotiocianato de guanidina. Como se mencionó anteriormente, el RNA aislado con el método DEP - SDS no presentó actividad de RNA mensajero; mientras que el RNA aislado por centrifugación en gradiente de CsCl en presencia de isotiocianato de guanidina estimuló de 8 a 11 veces más la incorporación de ³⁵S-Metionina en material TCA precipitable que el control negativo, el cual se incubó

con agua destilada en lugar de RNA (Tabla VII). Por esta razón, elegimos el método de isotiocianato de guanidina-CSCl para aislar y purificar el RNA amibiano.

Los ensayos de traducción in vitro de los RNAM's de las clonas A y L-6 de E. histolytica se efectuaron siguiendo el protocolo descrito por Pelham y Jackson (1976), en el cual el lisado de reticulocitos de conejo es complementado con hemina, un sistema generador de energía y un aminoácido radioactivo, ³⁵S-Metionina para seguir las proteínas sintetizadas de novo. El análisis por fluorografía del gel de poliacrilamida-SDS que contenían las proteínas radioactivas codificadas por los RNAM's adicionados mostró la síntesis de numerosos péptidos con un rango muy amplio de pesos moleculares, entre 15 y 110 Kd (Fig. 15). Al comparar el patrón electroforético de los productos de traducción in vitro de los RNAM's de las clonas A y L-6 de E. histolytica, se observó una diferencia muy interesante. En el carril 2 de la Fig. 15, correspondiente a los productos de traducción de los mensajeros de la clona L-6, se observó un péptido de 78 Kd de peso molecular, el cual no se encontró entre los productos de traducción de los mensajeros de la clona A. Por otro lado, este péptido de 78 Kd fue inmunoprecipitado de la mezcla de traducción de la clona L-6 por el suero policlonal monoespecífico anti-112, el cual reconoce una proteína de la superficie amibiana de 112 Kd que parece estar involucrada en los procesos de adhesión y fagocitosis (Orozco y col., 1986). Este resultado sugiere que el péptido de 78 Kd podría corresponder a un precursor de la glicoproteína de 112 Kd sintetizada in vivo,

ya que comparte con ella cuando menos un determinante antigénico. Por otro lado, experimentos de marcaje con $^{125}\text{-I}$ han mostrado que los trofozoítos de la clona A presentan en su superficie celular la proteína de 112 Kd, por lo cual es lógico suponer que debe existir un precursor para esta proteína entre los productos de traducción de los mensajeros de esta clona. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, el péptido de 78 Kd no fue inmunoprecipitado de la mezcla de traducción de la clona A; pero en cambio el suero anti-112 reconoció específicamente un péptido de 95 Kd, el cual no fue inmunoprecipitado de los productos de traducción de los mensajeros de la clona L-6. Estos resultados sugieren que ambos péptidos de 78 y 95 Kd son precursores no glicosilados de la proteína de 112 Kd. La diferencia en el corrimiento electroforético de ambos péptidos, podría ser debido a que son productos de traducción in vitro con diferente grado de terminación o bien, debido a la presencia de alteraciones en la estructura primaria de alguno de los péptidos, lo cual podría modificar a su vez la carga eléctrica neta de la molécula y probablemente también su actividad biológica.

Ya que el péptido de 78 Kd fue reconocido específicamente como producto de traducción de los mensajeros de la clona L-6 deficiente en fagocitosis y virulencia, pero no fue identificado como producto de traducción de los RNAm's de la clona A (altamente fagocítica y virulenta), suponemos que este péptido podría estar relacionado con la deficiencia en fagocitosis de los trofozoítos de la clona L-6. Si esto fuera cierto, este péptido de 78 Kd también podría estar involucrado en la deficiencia en

otras propiedades biológicas de los trofozoítos de esta clona, ya que se ha reportado que el grado de fagocitosis correlaciona con propiedades tales como la virulencia y efecto citopático amibiano sobre células en cultivo.

Por otra parte, cuando se inmunoprecipitaron los productos de traducción in vitro de los RNAm's de la clona A con los anticuerpos monoclonales 10, 15 y 24', se observó que los tres monoclonales reconocieron dos péptidos de aproximadamente 52 Kd. Como se había mencionado anteriormente, los anticuerpos monoclonales 10 y 15 inhiben la fagocitosis y el efecto citotóxico, mientras que el anticuerpo monoclonal 24' sólo inhibe efecto citotóxico. Este resultado sugiere que los péptidos de aproximadamente 52 Kd podrían ser precursores de proteínas que participan en los fenómenos de fagocitosis y efecto citotóxico. Hasta el momento, no se conoce qué tipo de relación existe entre estos dos procesos. Rodríguez (1985) aisló 10 mutantes de E. histolytica deficientes en fagocitosis y encontró que tres de ellas también fueron deficientes en efecto citotóxico. La fagocitosis es un fenómeno muy complejo en el cual participan un gran número de proteínas estructurales y funcionales. Por tanto, es probable que algunas de las proteínas que participan en los eventos de la fagocitosis, por ejemplo en la digestión, también jueguen un papel importante en el efecto citotóxico.

VIII. CONCLUSIONES

Entre las conclusiones obtenidas durante la realización de esta tesis se pueden anotar como las más importantes las siguientes:

Conclusiones generales.

1. Por los resultados obtenidos en los experimentos de síntesis de proteínas in vitro utilizando las clonas A (Fag+) y L-6 (Fag-), se sugiere que el péptido de 78 Kd que aparece enriquecido en la clona L-6 esté relacionado con la deficiencia en fagocitosis, así como en otras propiedades biológicas que se relacionan con la fagocitosis, tales como: adhesión, virulencia y efecto citopático.
2. Se sugiere que los dos péptidos de aproximadamente 52 Kd reconocidos específicamente por los anticuerpos monoclonales 10, 15 y 24', inhibidores de la fagocitosis y de la actividad de toxina amibiana, podrían corresponder a proteínas involucradas en la fagocitosis, efecto citopático o citotóxico de E. histolytica.

Conclusiones particulares.

1. Se montaron las condiciones adecuadas para el aislamiento de RNA puro e intacto de trofozoítos de E. histolytica.
2. Se aislaron poblaciones de RNA poli A+ a partir de RNA total. Estas poblaciones de RNA demostraron su capacidad para dirigir la síntesis in vitro de péptidos amibianos.

3. Se preparó un sistema de traducción in vitro libre de células a partir de un extracto celular de reticulocitos de conejo.
4. Se corroboró la eficiencia de la nucleasa micrococcal para destruir los RNAs mensajeros endógenos del lisado de reticulocitos, sin deteriorar su actividad traduccional.
5. Los ensayos de traducción in vitro confirmaron la presencia de actividad RNA mensajero en las preparaciones de RNA total y RNA poli A+ de E. histolytica.
6. Se encontraron condiciones adecuadas para la inmunoprecipitación de los productos de traducción de los mensajeros de las clonas A y L-6 por anticuerpos policlonales.
7. Los resultados obtenidos en los ensayos de inmunoprecipitación de productos de traducción con sueros policlonales anti-amiba demostraron la síntesis de varios antígenos amibianos con pesos moleculares de 14 a 110 Kd.

IX. REFERENCIAS

- Ahzar, S. y Mohan-Roa, V.K. (1975). Ribonuclease activity of Entamoeba histolytica. Zbl. Bakteriol. Hyg., I. Abt. Orig. A. 230:270.
- Albach, R.A., Booden, T., Boonlayangoor, P. y Downing, S. (1977). Entamoeba histolytica: Autoradiographic analysis of nuclear sites of RNA synthesis. Exp. Parasitol. 42:248.
- Albach, R.A., Prachayasittikul, V. y Heabner, G.M. (1984). Isolation and characterization of RNA of Entamoeba histolytica. Mol. Biochem. Parasitol., 12:261.
- Aley, S.B., Cohn, Z.A. y Scott, W.A. (1984). Endocytosis in Entamoeba histolytica. Evidence for a unique non-acidified compartment. J. Exp. Med. 160:724.
- Andrews, J.M. y White, H.F. (1936). Epidemiological study of protozoa parasites in wild rats in Baltimore, with special reference to Entamoeba histolytica. Am. J. Hyg. 24:184.
- Auffray, C. y Rougeon, F. (1979). Purification of mouse immunoglobulin heavy-chain messenger RNAs from total myeloma tumor RNA. Eur. J. Biochem., 107, 303.
- Aust-Kettis, A. y Sundqvist, K.G. (1980). Dynamics of the interactions between Entamoeba histolytica and components of the immune response. II. On the distinction of surface bound and internalized anti-amoeba antibodies. Scand. J. Imm. 12:443.
- Aviv, H., Boime, I. y Leder, P. (1971). Protein synthesis directed by encephalomyocarditis virus RNA: Properties of a transfer RNA-dependent system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 68:2303.

- Aviv, H. y Leder, P. (1972). Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69:1408.
- Barker, D.C. (1976). Differentiation of Entamoeba patterns of nucleic acids and ribosomes during encystment and excystation. In: Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationships. Van den Bossche, H. (ed.). Elsevier/North Holland Biomedical Press., Amsterdam.
- Barker, D. C. y Svihla, G. (1964). Localization of cytoplasmic nucleic acid during growth and encystment of Entamoeba invadens. J. Cell Biol. 20:389.
- Barker, D.C. y Swales, L.S. (1972). Characteristics of ribosomes during differentiation from trophozoite to cyst in axenic Entamoeba sp. Cell Diff. 1:297.
- Basnuevo, J.G. (1959). Epidemiologic features of amebiasis in Cuba. Proc. World Cong. Gastroenterology, Baltimore. Williams and Wilkins Co. pp. 778.
- Berns, A.J.M., Van Kraikamp, M., Bloemendal, H. y Lane, C.D. (1972). Calf crystallin synthesis in frog eggs: the translation of lens cell 14S RNA in oocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69:1606.
- Berridge, M.V. y Lane, C.D. (1976). Translation of Xenopus liver mRNA in Xenopus oocytes: vitellogenin synthesis and conversion to yolk platelet proteins. Cell 8:283.
- Bos, H.J. (1975). Monoxenic and axenic cultivation of carrier and patient strains of Entamoeba histolytica. Zeit. f. Parasit. 47:119.
- Bos, H.J. (1979). Entamoeba histolytica: Citopathogenicity of intact amebae and cell-free extracts: Isolation and characterization of an intracellular toxin. Exp. Parasitol. 47:369.

Bos, H.J. y Hage, A.J. (1975). Virulence of bacteria-associated, crithidia-associated and axenic Entamoeba histolytica: Experimental hamster liver infections with strains from patients and carriers. Zeit. f. Parasit. 47:79.

Bos, H.J. y Van de Gried, R.J. (1977). Virulence and toxicity of axenic Entamoeba histolytica. Nature, 265:341.

Bosh, H.J. y Van der Eijk, A. (1980). Serum-inhibited toxicity of Entamoeba histolytica. Arch. Inv. Med. (Mex) 11 (supl. 1): 135.

Bracha, R., Kobilier, D. y Mirelman, D. (1982). Attachment and ingestion of bacteria by trophozoites of Entamoeba histolytica. Infect. Immun. 36:396.

Bracha, R. y Mirelman, D. (1984). Virulence of Entamoeba histolytica trophozoites. Effects of bacteria, microaerobics conditions, and metronidazole. J. Exp. Med. 160:353.

Brawerman, G. (1974). Eucaryotic messenger RNA. Ann. Rev. Biochem. 43:621.

Calderón, J. y Tovar-Gallegos, G.R. (1980). Resistance to immune lysis induced by antibodies in Entamoeba histolytica. In: The Host-Invader Interplay. Van den Bossche (ed.). Elsevier/North Holland, Amsterdam. pp. 227.

Calderón, J., Muñoz, M. L. y Acosta, H.M. (1980). Surface re-distribution and release of antibody-induced caps in Entamoeba. J. Exp. Med. 151:184.

Castro, C., Hernández, R. y Castañeda, M. (1981). Trypanosoma cruzi ribosomal RNA; internal break in the large-molecular mass species and number of genes. Mol. Biol. Parasitol. 2:219.

Chávez, B., Martínez-Palomo, A. y de la Torre, M. (1978). Estructura ultramicroscópica de la pared de quistes de Entamoeba invadens, E. histolytica y de E. coli. Arch. Inv. Med. (Méx.) 9 (supl.) 1:113.

Chávez, A., Segura, M., Díaz, J. y Sepúlveda, B. (1974). Actividad eritrofágica de los trofozoítos de Entamoeba histolytica sobre los hematíes de diferentes especies animales. Arch. Inv. Med. (Méx.) 9 (supl.) 1:113.

Clarke, M. (1978). A selection method for isolating motility mutants of Dictyostelium discoideum. In: Cell Reproduction. Academic Press. New York, pág. 621.

Cleveland, L.R. y Sanders, E.P. (1930). Encystation, multiple fission without encystment, excystation, metacystic development and variation in a pure line and nine strains of Entamoeba histolytica. Arch. f. Protis. 70:15-261.

Darnbrough, C., Legon, S., Hunt, T. y Jackson, R.J. (1973). Initiation of protein synthesis: Evidence for messenger-RNA independent binding of methionyl-transfer RNA to the 40S ribosomal subunit. J. Mol. Biol. 76:379.

Das, S.R. y Ghoshal, S. (1976). Restoration of virulence to rat of axenically grown Entamoeba histolytica by cholesterol and hamster liver passage. Annals. Trop. Med. Parasitol. 70:439.

Dasgupta, A. (1974). Immunoglobulin in health and disease III. Immunoglobulins in the sera of patients with amoebiasis. Clin. Exp. Immunol., 86-163.

Davis, F.C. y Mullersman, R.W. (1981). Processin of the ribonucleic acid in the large ribosomal subunits in Urechis caupo. Biochem. 20:3554.

- De Robertis, E.M. y Mertz, J.E. (1977). Coupled transcription - translation in DNA injected Xenopus oocytes. Cell 12:175.
- Deutch, K. y Zaman, V. (1959). An electron microscopic study of Entamoeba invadens. Rodhain 1934. Exp. Cell Res. 17:310.
- Diamanstein, T.J., Klos, M., Gold, D. y Hahn, H. (1981). Interaction between Entamoeba histolytica and immune system. I. Mitogenicity of Entamoeba histolytica, extracts for human peripheral T Lymphocytes. J. Immunol. 126:2084.
- Diamond, L.S., Phillips, B.P. y Bartgis, I.L. (1974). A comparasion of the virulence of nine strains of axenically cultivated E. histolytica in hamster liver. Arch. Inv. Med. (Méx.) 5 (supl. 2): 423.
- Diamond, L.S., Harlow, D.R. y Cunnick, C.C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 72:431.
- Ehrenberg, L., Fedorcsack, I. y Solymosy, F. (1976). En: Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. Vol. 16.
- Cohn, W.E. (ed.) Academic Press, Inc. Ny and London. p. 189.
- Elsdon - Dew, R. (1968). The epidemiology of amoebiasis. Adv. Parasitol. 6:1.
- García-Rivera, G., Sánchez, T., Orozco, E. y Guarneros, G. (1982). Aislamiento de clonas de E. histolytica deficientes en adhesión a eritrocitos humanos. Arch. Inv. Med. (Méx.) 13 (supl. 3): 129.
- Gharidian, E. y Meerovitch, E. (1979). Pathogenicity of the axenically cultivated Entamoeba histolytica, strain 200:NIH in the hamster. J. Parasitol. 65:768.

Ghysdael, J., Hubert, E., Travnicek, M., Bolognesi, D.P., Burny, A., Clueter, Y., Huez, G., Kettmann, R., Marbaix, G., Portetelle, D. y Chantrenne, H. (1977). Frog oocytes synthesis and completely process the precursor polypeptide to virion structural proteins after microinjection of AMV RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74:3230.

Glisin, V., Crkvenjakov, R. y Byus, C. (1974). Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. Biochem. 13:2633.

Gozes, I., Schmitt, H. y Littauer, U.Z. (1975). Translation in vitro of rat brain messenger RNA coding for tubulin and actin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72:701.

Griffin, F.M., Griffin, J.A. y Siverstein, S.C. (1976). Studies on the mechanism of phagocytosis. II. The interaction of macrophages with anti-immunoglobulin IgG coated bone marrow derived lymphocytes. J. Exp. Med. 144:788.

Gurdon, J.B., Lane, C.D., Woodland, H.R. and Marbaix, G. (1971). Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. Natur. 233:177.

Gutiérrez, G., Ludlow, A., Espinoza, G., Herrera, S., Muñoz, O., Rattoni, N., y Sepúlveda, B. (1976). Encuesta Serológica Nacional. II. Investigaciones de anticuerpos contra Entamoeba histolytica en la República Mexicana. In: Proceedings of the International Conference on Amebiasis. B. Sepúlveda y L.S. Diamond (eds). Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City. 599-608.

Hernández, R., Nava, G. y Castañeda, M. (1981). Small-size ribosomal RNA species in Trypanosoma cruzi. Mol. Biochem. Parasitol. 8:297.

Honigberg, B.M., Balamuth, W., Bovee, E.C., Corliss, J.O., Gojdics, M., Hall, R.P., Kudo, R.R., Levine, N.D., Loeblich, A.R. Jr., Weiser, J. u Wenrich, D.H. (1964). A revised classification

of the phylum Protozoa. J. Protozool. 11:7.

Hunt, T.C. y Jackson, R.J. (1974). En: Moderns trends in human leukaemia. (Neth, R., Gallo, R.C., Spiegelman, S. y Stohlman, F. (eds). J.F. Lehmanns Verlag, Munich. pp. 300-307.

Hyde, J.E., Zolg, J.W. y Scaife, J.G. (1981). Isolation and characterization of ribosomal RNA from the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Mol. Biochem. Parasitol. 4:283.

Ishikawa, H. (1973). Primary and secondary nicks in the ribosomal RNA in insects. Biochem. Biophys. Res. Commun. 54:301.

Jost, J.P. Pehling, P., Panyim, S. y Ohno, T. (1978). An improved method for isolation of active vittelogenin messenger RNA from chicken liver. Use of diethylpyrocarbonate. Biochim. Biophys. Acta 517:338.

Kessler, S.W. (1975). Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A.J. Immunol. 115:1617.

King, H.W.S. y Gould (1970). Low molecular weight ribonucleic acid in a rabbit reticulocyte ribosomes. J. Mol. Biol. 51:687.

Knight, R., McCaul, T.F. y Bird, R.G. (1974). The interaction between Entamoeba histolytica and rabbit cell (RK 13) monolayers. Trans. R. Soc. Med. Hyg. 67:1.

Kobiler, D. y Mirelman, D. (1980). Lectin activity in Entamoeba histolytica trophozoites. Infect. Immun. 29:221.

Kobiler, D. y Mirelman, D. (1984). Lectin activity in Entamoeba histolytica trophozoites. Inf. Immun. 29:221.

Kretschmer, R., Collado, M.L., Pacheco, M.G., Salinas, M.C., Lopesozu, M., Lecuona, M., Castro, E.M. y Arellano, J. (1985). Inhibition of human monocyte locomotion by products of axenically grown E. histolytica. Parasite Immunol. 7:527.

Kusamrarn, T., Sobhon, P. y Bailey, G. (1975). The mechanism of inhibition-induced ribosome helices in Entamoeba invadens. J. Cell Biol. 65:529.

Lane, C.D., Marbaix, G. y Gourdon, J.B. (1971). Rabbit hemoglobin synthesis in frog eggs. The translation of reticulocyte 9S RNA in oocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69:1606.

Laskey, R.A., Gurdon, J.B. y Crawford, L.V. (1972). Translation of EMC RNA in oocytes of X. laevis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69:1408.

Lehninger, A.L. (1981). Bioquímica: Las bases moleculares de la estructura y la función celular. Ediciones Omega, S. A. pp. 315-328.

Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M. y Boedtker, H. (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. Biochem. 16:4743.

Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Ieedale, G.F., Leoblich, A.R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljanskyj, G., Sprague, V., Vavra, J. y Wallace, F.G. (1980). A new revised classification of the protozoa. J. Protozool. 27:37.

Lewis, B. (1982). Gene Expression 2: Eucariotic Chromosomes. Wiley - Interscience (ed.) Second edition. pp. 653.

Linch, E.C., Rosenberg, I.M. y Gitler, C. (1982). An ion-channel forming protein produced by Entamoeba histolytica. EMBO J. 1:801.

Lushbaugh, W.B., Kairalla, A.B., Loadholt, C.B. y Pittman, F.E. (1978). Effect of hamster liver passage on the virulence of axenically cultivated Entamoeba histolytica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 27:248.

Lushbaugh, W.B., Kairalla, A.B., Cantey, J.R., Hofbauer, A.F. y Pittman, F.E. (1979). Isolation of a cytotoxin-enterotoxin from Entamoeba histolytica. J. Infect. Dis. 139:9.

Lushbaugh, W.B., Kairalla, A.B., Hofbauer, A.F. y Pittman, F.E. (1981). Sequential histopathology of cavitory liver abscess formation induced by axenically grown Entamoeba histolytica. Arch. Inv. Med. (Méx.) 11 (supl. 1). 163:168.

Mac Connachie, E.W. (1969). The morphology, formation and development of cysts of Entamoeba. Parasitol. 52B-477.

Maddison, S.E., Kagan, I.G. y Norman, L. (1968). Reactivity of human immunoglobulins in amebiasis. J. Immunol. 100:217.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (eds), (1982). Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.

Marbaix, G. y Lane, C.D. (1972). Rabbit hemoglobin synthesis in frog cells. II. Further characterization of the products of translation of reticulocyte 9S RNA. J. Mol. Biol. 67:517.

Marcus, A., Efron, D. y Weeks, D.P. (1974). En: Methods in Enzymology, Vol. 30F. K. Moldave and L. Grossman (eds.) Academic Press, New York, pp. 754.

Martínez-Báez, M. (1976). The history of amebiasis. En: Proceedings of the International Conference on Amebiasis. B. Sepúlveda y L. S. Diamond (eds.). Instituto Mexicano del Seguro Social. Mexico City. pp. 53.

- Martínez-Palomo, A. (1978). Inducción de inmunidad protectora antiamebiana con "nuevos antígenos" en el hámster lactante. Arch. Inv. Med. (Méx.) 9 (supl. 1): 321.
- Martínez-Palomo, A., Tanimoto-Weki, M. y Tena-Betancourt, B.E. (1980). Evolución de las lesiones producidas en hámsteres por inoculación de Entamoeba histolytica. Arch. Inv. Med. (Méx.) II (supl. 1): 169.
- Martínez-Palomo, A. (1982). The biology of Entamoeba histolytica. Research Studies Press, John Wiley and Sons, Ltd. Sussex, England. pp. 161.
- Mattern, C.F.T. and Keister, D.B. (1977). Experimental amebiasis. II. Hepatic amebiasis in the newborn hamster. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 26:402.
- Mattern, C.F.T. Kesiter, D.B. y Caspar, P.A. (1978). Experimental amebiasis III. A rapid in vitro assay for virulence of Entamoeba histolytica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 27:882.
- Mattern, C.F.T., Keister, D.B. y Caspar Natovitz, P. (1980). Entamoeba histolytica "toxin": Fetuin neutralizable and lectin-like. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 29:26.
- Matthews, M.B. y Korner, A. (1970). Mammalian cell-free protein synthesis directed by viral ribonucleic acid. Eur. J. Biochem. 67:247.
- Mendelsohn, S.L. y Young, D.A. (1978). Inhibition of ribonuclease. Efficacy of sodium dodecylsulfate, diethylpyrocarbonate, proteinase K and heparin using a sensitive ribonuclease assay. Biochim. Biophys. Acta 519:461.
- Meerovitch, E. y Gharidian, E. (1978). Restoration of virulence of axenically cultivated Entamoeba histolytica by cholesterol. Canad. J. Microbiol. 24:63.

- Merrick, W.C. (1983). Translation of exogenous mRNAs in reticulocyte lysates. En: Methods in Enzymology Vol. 101 K. Moldave and L. Grossman (eds.) Academic Press, New York, pp. 606.
- Miller, J.H. y Deas, J.E. (1971). Observations on the cysts of Entamoeba histolytica. Proceed. Ann. Electr. Microsc. Soc. Amer. Meet. 28:124.
- Morgan, R.S., Slater, H.S. y Weller, D.L. (1968). Isolation of ribosomes from cysts of Entamoeba invadens. J. Cell Biol. 36:45.
- Muñoz, M.L., Calderón, J. y Rojkind, M. (1982). The collagenase of Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 155:42.
- Muñoz, M.L., Rodkind, M., Calderón, J., Tanimoto, M., Arias-Negrete, S. y Martínez-Palomo, A. (1984). Entamoeba histolytica: Collagenolytic activity and virulence. J. Protozol. 31:468.
- Neal, R.A. (1957). Virulence of Entamoeba histolytica. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 51:313.
- Olguín, T. (1984). Estudio comparativo de la fagocitosis en dos clones de Entamoeba histolytica de diferente virulencia. Tesis de licenciatura en Biología. ENEP Iztacala, UNAM.
- Orozco, E., Martínez-Palomo, A., y López-Revilla, R. (1978). Un modelo in vitro para el estudio cuantitativo de la virulencia de Entamoeba histolytica. Arch. Inv. Med. (Méx.) 9 (supl. 1): 257.
- Orozco, E., Martínez-Palomo, A. y Guarneros, G. (1980). Virulencia y propiedades de superficie de Entamoeba histolytica. Arch. Inv. Med. (Méx.) 11 (supl. 1): 153.
- Orozco, E. (1981). Virulencia y propiedades de superficie de Entamoeba histolytica. Tesis para obtención del grado de Doctor en Ciencias. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del

I.P.N. Sección de Patología Experimental.

Orozco, E., Martínez-Palomo, A., González-Robles, A., Guarneros, G. y Mora Galindo, J. (1982). Las interacciones lectina-receptor median la adhesión de E. histolytica a células epiteliales. Relación de la adhesión con la virulencia de las cepas. Arch. Inv. Med. (Méx.) 13 (supl. 3): 159.

Orozco, E., Guarneros, G., Martínez-Palomo, A., y Sánchez, T. (1983). Entamoeba histolytica phagocytosis as a virulence factor. J. Exp. Med. 158:1511.

Orozco, E., Arroyo, R., Rodríguez, M.A. y García-Rivera, G. (1986). Identification of an Entamoeba histolytica adhesin using adhesion deficient-mutants and monoclonal antibodies: Molecular strategies of parasitic invasion. UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology. Alan R. Inc., New York (en prensa).

Orozco, E., Hernández, F.C. y Rodríguez, M.A. (1986b) Virulence-Related properties in Entamoeba histolytica. En: Human infection by Entamoeba histolytica. (en prensa).

Osada, M. (1959). Electron-microscopic studies on protozoa. I. Fine structure of Entamoeba histolytica. K. J. Med. 8:99.

Payne, P.I., y Loening, U.E. (1970). RNA breakdown accompanying the isolation of pea root microsomes. Biochem. Biophys. Acta 224:128.

Pelham, H.R.B. y Jackson, R.J. (1976). An efficient mRNA dependent translation system from reticulocyte lysates. Eur. J. Biochem. 67:247.

Pene, J., Knigh, E. y Darnell, J.E. (1968). Characterization of a new low molecular weight RNA in HeLa cell ribosomes. J. Mol. Biol. 33:609.

- Perbal, B. (1984). In vitro translation of eucaryotic mRNAs. In: A practical guide to molecular cloning. John Willey and Sons (eds.) USA. pp. 520-543..
- Pérez-Tamayo, R., y Brandt, H. (1971). Pathology of protozoal and helminthic diseases. Baltimore, Williams and Wilkins (eds.). P. 145.
- Perry, R.P. y Kelly, D.E. (1974). Existence of methylated mRNA in mouse L cells. Cell 1:37.
- Phillips, B.P., Diamond, L.S., Bartigis, I.L. y Stuppler, S.A. (1972). Results of intracecal inoculation of germfree and conventional guinea pigs and germfree rats with axenically cultivated Entamoeba histolytica. J. Protozool. 19:498.
- Pinto da Silva, P., Martínez-Palomo, A. y González-Robles, A. (1975). Membrane structure and surface coat of Entamoeba histolytica. Topochemistry and dynamics of the cell surface: Cap formation and microexudate. J. Cell. Biol. 64:538.
- Prachayasittikul, V. and Albach, R.A. (1982). RNA depolymerase in Entamoeba histolytica: soluble vs. ribosomal. Arch. Invest. Med. (Méx.) 13 (supl. 3): 29.
- Prestayko, A.W., Tonato, M. y Busch, H. (1970). Low molecular weight RNA associated with 28S nucleolar RNA. J. Mol. Biol. 47:505.
- Proctor, E.M. y Gregory, M.A. (1973). The surface active lysosome of Entamoeba histolytica. Intern. J. Parasitol. 3-274.
- Ravdin, J.I., Kroft, B.Y. y Guerrant, R.L. (1980). Cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 152:377.

- Ravdin, J. I. y Guerrant, R. L. (1981). Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 152:377.
- Ravdin, J.I., Murphy, C.F., Salata, R.A., Guerrant, R.L., y Hewlett, E.L. (1985). The N-Acetyl-D-Galactosamine inhibitable adherence lectin of Entamoeba histolytica. I. Partial purification and relationship to amebic in vitro virulence. J. Infect. Dis. 141:816.
- Reed, S.L., Sargeant, P.G., Braude, A.I. (1983). Resistance of lysis by human serum of pathogenic Entamoeba histolytica. Trans. R. Trop. Med. Hyg. 77:248.
- Rhoads, R.E., McKnight, G.S., y Schimke, R.T. (1973). Quantitative measurement of ovalbumin messenger ribonucleic acid activity. J. Biol. Chem. 238:2031.
- Rodríguez, M.A. (1985). Mutantes en propiedades de superficie: Una herramienta para el estudio de la virulencia de Entamoeba histolytica. Tesis de Licenciatura en Biología. ENEP Iztacala, UNAM.
- Rondanelli, E.G., Carosi, G., Filice, C. y de Carneri, I. (1974). Observations of surface active lysosomes and other organelles in monoxenically cultivated trophozoites of Entamoeba histolytica and Entamoeba coli. Internat. J. Parasitol. 4:433.
- Rosen, J.W., Woo, S.L., Holder, J.W., Means, A.R. y O'Malley, B.M. (1975). Preparation and preliminary characterization of purified ovalbumin messenger RNA from the hen oviduct. Biochemistry 14:69.
- Salata, R.A. y Ravdin, J.I. (1985). The N-Acetyl-D-Galactosamine inhibitable lectin of Entamoeba histolytica. II. Mitogenic activity for human lymphocytes. J. Infect. Dis. 151:816.

- Savana, T. y Chaicumpa, W. (1969). Immuno-electrophoresis test for amoebiasis. Bull. WHO. 40-343.
- Sbarra, A.J., Selvaraj, R.L., Paul, B.B. (1981). Relationships between metabolic activities and physiological function. In: Pathophysiology of reticuloendotelial system. B.M. Altura y T.M. Saba (ed.) New York, pp. 9.
- Schreirer, M.H. y Staehelin, T. (1973). Initiation of mammalian protein synthesis: the importance of ribosome and initiation factor quality for the efficiency of in vitro systems. J. Mol. Biol. 73:329.
- Sepúlveda, B. (1976). Immunology of amebiasis. En: Proceedings of the International Conference on Amebiasis. B. Sepúlveda y L.S. Diamond (eds.). Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, pp. 687.
- Sharma, R. (1959). Effect of cholesterol on growth and virulence of E. histolytica. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 53:278.
- Sherman, I.W. and Jones, L.A. (1977). The Plasmodium lophurae (avian malaria) ribosome. J. Protozool. 24:331.
- Shine, J. y Dalgarno, L. (1973). Occurrence of heat dissociable ribosomal RNA in insects: The presence of three polynucleotide chains in 26S RNA from cultured Aedes aegypti cells. J. Mol. Biol. 75:57.
- Shih, D.S. y Kaesberg, P. (1973). Translation of brome mosaic viral ribonucleic acid in a cell-free system derived from wheat embryo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70:1799.
- Shore, G.C. y Tata, J.R. (1977). Two fractions of rough endoplasmic reticulum from rat liver. II. Cytoplasmic messenger RNA's which code for albumin and mitochondrial proteins are distributed differently between the two fractions. J. Cell Biol. 72:726.

Smith, H. (1977). Microbial surfaces in relation to pathogenicity. *Bacteriol. Rev.* 41:475.

Solimosy, R., Lazar, G. and Bagi, G. (1970). An improved version of the diethyl pyrocarbonate method for extracting ribosomal nucleic acids. *Anal. Biochem.* 38:40.

Sy, S. y McCarty, K.S. (1970). Characterization of 5.8S RNA from a complex with 28S ribosomal RNA from Arbacia punctulata. *Biochem. Biophys. Acta* 199:86.

Tanimoto, M., Sepúlveda, B., Vázquez-Saavedra, J.A. y Landa, L. (1971). Lesiones producidas en el hígado de hámster por inoculación de Entamoeba histolytica cultivada en medio axénico. *Arch. Invest. Med. (Méx.)* 2 (supl. 1): 179.

Trigg, P.I., Shakespeare, P.G., Burt, S.J., and Kyd, S.I. (1975). Ribonucleic acid synthesis in Plasmodium knowlksi maintained both in vivo and in vitro. *Parasitol.* 71:99.

Trissl, D., Martínez-Palomo, A., Arguello, C., De la Torre, M. y de la Hoz, R. (1977). Surface properties related to concanavalin A-induced agglutination. A comparative study of several Entamoeba strains. *J. Exp. Med.* 145:652.

Trissl, D., Martínez-Palomo, A., De la Torre, M., de la Hoz, R. y Pérez de Suárez, E. (1978). Surface properties of Entamoeba: Increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. *J. Exp. Med.* 148:1137.

Tsutsumi, V., Mena-López, R., Anaya-Velázquez, F. y Martínez-Palomo, A. (1984). Cellular basis of experimental amebic liver abscess formation. *Am. J. Pathol.* 117:81.

Ullrich, A., Shine, J., Chrigwin, J., Pictet, R., Tischer, E., Rutter, W.J. y Goodman, H.M. (1977). Rat insulin genes: Construction of plasmids containing the coding sequences.

Science 196:1313.

Vincent, P. y Neal, R.A. (1960). Duration of invasiveness of Entamoeba histolytica maintained in vitro. Parasitol. 50:449.

World Health Organization. (1969). Amoebiasis. Report of a WHO Expert committee. World Health Organization Technical Report Series, No. 421.

Young, J.D.F., Young, T.M., Lu, L.P., Unkeless, J.G. y Cohn, Z.A. (1982). Characterization of membrane pore-forming protein from Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 156:1677.

APENDICE

Medio TYI-S-33

Biosate	30.0	g
D-glucosa	10.0	g
NaCl	2.0	g
KH_2PO_4	0.6	g
K_2HPO_4	1.0	g
L-cisteína-HCL	1.25	g
L-ácido ascórbico	0.25	g
Citrato férrico de amonio	0.025	g

Se ajusta a pH 6.8 con NaOH 0.1 N y se afora a 870 ml con agua bidestilada. Se esteriliza por autoclave (15 lb, 20 min).

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

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

Se ajusta a pH 7.0 con NaOH 0.1N y se afora a 1,000 ml con agua bidestilada.

Fuentes de reactivos más importantes.

- A. Aldrich Chemical Co. : Sacrosa, Urea.
- B. Amersham Research Products : ^{35}S -Metionina.
- C. BD Chemicals Ltd Pople England. : Nonidet P-40, SDS.
- D. Becton Dickinson, Co. : Biosate.
- E. Bethesda Research Laboratories. : Isotiocianato de guanidina, Oligo-dT celulosa.
- F. Bio-Rad Laboratories : Acrilamida, bis-acrilamida, Azul de Coomassie, Persulfato de amonio, Resina AG 501-XB, TEMED.
- G. Bioxon de México, S. A. : Biosate, Extracto de levadura.
- H. DIFCO Laboratories : Extracto de carne, Peptona de aseína.
- I. Hy-Clone Laboratories : Suero bovino.
- J. Merck de México, S. A. : Acido acético, Acido Tricloro-acético, Alcohol isoamílico, Cloroformo, Cloruro de Calcio, Cloruro de litio, Cloruro de sodio, D-glucosa, Dimetilsulfóxido, Etanol absoluto, Fenol, Formaldehído, Fosfato monobásico de sodio, Fosfato dibásico de sodio, Glicerol, 2-mercaptotanol, Sulfato de magnesio, Tolueno.
- K. New England Nuclear : 2,5-difeniloxazol.
- L. North American Biologicals : Mezcla de vitaminas de Diamond.
- M. PL. Biochemicals : Nucleasa micrococcal (9000 UI/mg).

N. Sigma Chemical Company : Acetato de magnesio, Acetato de Sodio, 1,2-acetilfenilhidrazina, L-ácido ascórbico, clorhidrato, Acido fólico, Albúmina serica bovina, L-aminoácidos, Azida de sodio, Azul de bromofenol, Bromuro de etidio, Cloruro de amonio, Cloruro de magnesio, Cloruro de potasio, Creatinfosfato, Creatinfosfoquinasa, Citrato férrico de amonio, Desoxicolato de sodio, Dietilpirocarbonato, Ditiotreitól, EDTA, EGTA, Etilenglicol, Ficoll 400, Formamida, Gelatina, Hemina, Heparina, HEPES, Lactosa, D-manitol, MOPS, Niacinamida, Oxalato de potasio, Proteínasa K, Rojo de metilo, Sarkosyl, Tris-base, Tiamina, Vitamina B12, Xilencianol.