



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

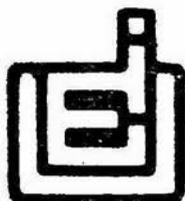
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
IZTACALA

AISLAMIENTO DE MUTANTES DE  
Entamoeba histolytica HMI-IMSS  
RESISTENTES A CITOCALASINA D.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A :  
BRIGIDO GALLEGOS SANCHEZ

DIRECTORAS DE TESIS:

DRA. ISAURA MEZA GOMEZ-PALACIO  
DRA. GUADALUPE MIREYA DE LA GARZA-AMAYA



MEXICO, D. F.

1987



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

La presente tesis se desarrolló en el Departamento de Biología Celular del Centro de investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de las Dras. Isaura Meza Gomez-Palacio y Guadalupe Mireya de la Garza-Amaya. Durante su realización fui becario por un año por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología ( CONACyT ).

ESTA TESIS LA DEDICO:

A la memoria de mi abuela Ana Maria y a la de  
mi tía María de la Luz.

Nunca ha muerto aquel que estaba  
dispuesto a morir . . . .

**\_Antifanes.**

A mi madre: la Sra. María del Consuelo Sánchez  
por su paciencia, cariño y apoyo .

El corazón de la madre es  
la escuela del niño. . . .

**\_H.W. Beecher.**

A mi hijo; Jose Humberto ( tito ).

" No es el dueño de la flor  
el que la siembra,  
sino el que la cultiva  
y lucha por verla florecer"

A mis hermanas; Elena, Angélica y Cristina, por creer en mi y porque en la culminación de esta meta influyó de manera importante nuestra integridad como hermanos.

A mis primos; Alejandrina y Javier, porque siempre han esperado más de mí.

A mis sobrinos; Carlos, Carlos Alberto, Magdalena y Silvia.

A Roberto Tapia, Javier Santos y Francisco Flores.

Amicus est tanquam alter idem . . . .

A mis amigos (as) de la 3a. generación de la Carrera de Biología (Plan Modular); ellos (as) saben quienes son.

A Beatriz Sánchez, Mercedes González, Graciela Castro y Laura Martínez; Isabel San-Pedro, María Luisa Estéves y Rosa Laura Cienfuegos.

P.D. Idalia.

Los momentos más felices que mi corazón conoce son aquellos en que derrama su afecto sobre unas cuantas personas estimadas....

\_Thomas Jefferson.

### AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Isaura Meza, por la dirección y apoyo brindados y por despertar en mi el interés por la investigación.

A la Dra. Mireya de la Garza, mi reconocimiento más profundo por su calidad humana y por dirigir y revisar esta tesis.

Al Biólogo Agustín Ruíz Cabrera, por sus críticas y sugerencias al revisar esta tesis.

A Marco Antonio Meráz, por su ayuda desinteresada al transcribir el presente trabajo.

A mis amigos y compañeros de trabajo : Myrna, Gloria, José Luis y Patricia, Haydee, Giselle y Mercedes; Febe Cázares, Leticia Neri, Angelica Aguilera y Carmen González.

Por los momentos compartidos, sus sugerencias y estímulo.

Nada en el mundo puede suplantar a  
la constancia; ni siquiera el talento.  
Es de lo más común ver hombres talentosos  
que no conocen el éxito. Tampoco el genio;  
El mundo está lleno de genios fracasados.  
Las únicas cualidades omnipotentes son la  
constancia y la determinación. El lema:  
" insiste no cejes en tu propósito ! ",  
siempre ha resuelto y resolverá los proble  
mas de la raza humana.....

\_Calvin Coolidge.

INDICE

	Página
I. LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
II. RESUMEN.....	1
III. ANTECEDENTES.....	4
i) Clasificación taxonómica de <u>E. histolytica</u> .....	4
ii) <u>Entamoeba histolytica</u> . Schaudin, 1903. Morfología y Ciclo Biológico.....	7
iii) Citoesqueleto.....	10
iv) Citocalasinas.....	15
v) Mutantes en células eucarióticas.....	18
IV. INTRODUCCION.....	23
V. OBJETIVOS.....	25
VI. MATERIAL Y METODOS.....	26
1.- Aislamiento de bacterias Thy <sup>-</sup> .....	26
a) Selección con trimetoprim en medio líquido.....	27
b) Selección por la técnica de réplica en placa.....	27
c) Pruebas de reversión de las bacterias Thy <sup>-</sup> .....	28
2.- Tratamiento del material de vidrio utilizado en el cultivo de <u>E. histolytica</u> .....	29
3.- Preparación del medio de cultivo BI-S-33.....	30
a) Medio basal BI.....	30
b) Descomplementación del suero.....	31
c) Medio Bi-S-33 completo.....	31
4.- Cultivo de <u>Entamoeba histolytica</u> .....	32

5.- Mutagenésis de los trofozoítos de <u>E. histolytica</u> y selecció n para fagocitosis negativa.....	32
a) Mutagé nesis.....	33
b) Preparació n de las bacterias.....	34
c) Interacció n de amibas y bacterias.....	34
d) Irradiació n de <u>E. histolytica</u> que incorporó en su DNA BrdUrd.....	36
6.- Aislamiento de poblaciones amibianas resistentes a citocalasina D.....	37
7.- Clonació n de <u>E. histolytica</u> en agar semisolido.....	37
8.- Ciné ticas de crecimiento en presencia de citocalasina D o emetina.....	39
9.- Eritrofagocitosis de <u>E. histolytica</u> .....	39
10.- Efecto citopá tico de <u>E. histolytica</u> sobre células MDCK en cultivo.....	42
11.- Mé todos de separació n electroforé tica.....	43
A. Electroforesis unidimensional.....	43
a) Preparació n de los extractos amibianos.....	43
b) Preparació n de los geles.....	44
B. Electroforesis bidimensional.....	45
a) Primera dimensió n.....	45
b) Segunda dimensió n.....	46
12.- Cinética de incorporació n de metionina <sup>35</sup> S <u>in</u> <u>vivo</u> .....	47
i) Medida de la radioactividad incorporada en macromoléculas precipitadas con TCA.....	48
ii) Procesamiento de los geles para fluorografí a.....	49

VII. RESULTADOS.....	50
1. Selección de las bacterias Thy <sup>-</sup> .....	50
2. Obtención de los trofozoítos deficientes en fagocitosis.....	54
3. Aislamiento de poblaciones amibianas resistentes a citocalasina D.....	54
4. Crecimiento de <u>E. histolytica</u> en medio semisólido.....	59
5. Crecimiento poblacional de <u>E. histolytica</u> en presencia o ausencia de CD o emetina.....	61
6. Eritrofagocitosis.....	61
7. Efecto citopático.....	66
8. Patrones electroforéticos de proteínas totales de las clonas X1 y G3.....	68
a) Electroforesis unidimensional.....	68
b) Electroforesis bidimensional.....	70
9. Incorporación de metionina <sup>35</sup> S en las clonas X1 y G3.....	70
10. Análisis electroforético unidimensional de los extráctos proteínicos marcados con metionina <sup>35</sup> S en las clonas X1 y G3.....	73
VIII. DISCUSION DE RESULTADOS.....	75
IX. CONCLUSIONES.....	84
X. APENDICE.....	86
XI. BIBLIOGRAFIA.....	94
XII. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	115

## I. LISTA DE ABREVIATURAS

AN+Thy	Caldo nutritivo, agar y timina (50µg/ml)
Bacterias BrdUr	Bacterias que han incorporado BrdUr
Bacterias Thy <sup>-</sup>	Bacterias Auxótrofas para Timina (50µg/ml)
BrdUr	5-bromo-2'-desoxiuridina
CD	Citocalasina D
c.p.m.	Cuentas por minuto
Davis N	Ver apéndice
DIFP	Disopropilfluorofosfato
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucleico
Gmin	Davis, agua, agar y glucosa
Gmin+Thy	Davis, agua, agar, glucosa y timina
h	Horas
MDCK	Madin Darvie Canadian Cells
Medio G.D.	Medio de mantenimiento para amibas (Gilllin y Diamond, 1980)
NEM	N-etilmaleimida
NTG	N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina
NZcase	Hidrolizado de caseína
p-HMB	Parahidriximercuribenzoato
PPD	2,5,-difeniloxazol
r.p.m.	revoluciones por minuto
SA1	Solución de antibioticos 1 penicilina-estreptomicina
SDS	Dodecil sulfato de sodio

SDS	Dodecil sulfato de sodio
SS	NaCl 0.15 Molar
TCA	acido tricloroacético
TEMED	N,N,N'-tetrametil-etilen diamida
Thy	Timina
Tris	Tris-hidroximetilaminometano (Trizma base)

## II. RESUMEN.

Con el objeto de contar con un sistema experimental que permita estudiar la relación de las proteínas del citoesqueleto, actina principalmente, con la motilidad del protozoario parásito Entamoeba histolytica, hemos obtenido mutantes resistentes a citocalasina D (CD).

Los trofozoítos de Entamoeba histolytica se mutagenizaron con nitrosoguanidina y se seleccionaron mediante un procedimiento específico para mutantes defectuosas en fagocitosis, obteniéndose una población heterogénea enriquecida en trofozoítos deficientes en movilidad con una capacidad eritrofagocítica disminuida. Dichas mutantes se cultivaron en el medio BI-S-33x durante 19 pasajes alternados en ausencia o presencia de CD (5µg/ml), de donde se obtuvo una subpoblación resistente a esta concentración de la droga (Subpoblación "B").

En ausencia de la droga, tanto la cepa silvestre como la subpoblación "B", mostraron un tiempo medio generacional de 17 y 18 horas, respectivamente. En presencia de 5 µg/ml de CD, la cepa silvestre no mostró crecimiento alguno, mientras que la subpoblación "B" creció morfológicamente sin alteraciones aunque mas lentamente con un tiempo de generación de 25h.

Tanto la cepa silvestre como la subpoblación "B", se clonaron en agar semisolido aislándose la clona XI de la cepa

silvestre, así como de la subpoblación "B" las clonas: G3, 31, 33, 51, 53 y 54. En la presente tesis, se hizo la caracterización de la clona mutante G3 tomando como control la clona X1 de la cepa silvestre.

En presencia de CD (5µg/ml), la clona X1 mostró una evidente sensibilidad, desprendiéndose del substrato a las primeras horas de cultivo y lisanándose posteriormente. En ausencia de la droga tuvo un crecimiento normal mostrando un tiempo de generación de 20h. La clona mutante G3 creció más lentamente pero perfectamente bien: en ausencia de CD mostró un tiempo generacional de 22h mientras que en presencia de la droga fue de 29h. No obstante ambas clonas fueron igualmente sensibles a emetina (10µg/ml).

Caracterizamos parcialmente la virulencia de la mutante G3, midiendo su eritrofagocitosis y efecto citopático. La eritrofagocitosis mostrada por la clona X1 medida a diferentes tiempos (0,5,10,15 y 30min.) y que aumentó en forma gradual, fue inhibida de manera considerable en presencia de CD. La clona mutante G3 mostró una tasa eritrofagocítica disminuida en aproximadamente un 65%. Este porcentaje de inhibición se mantiene en presencia de CD (5µg/ml) o en ausencia de la droga.

En lo que respecta a la destrucción de monocapas de células MDCK o efecto citopático, a los 60 min. de interacción, la clona X1 destruyó en su totalidad la monocapa, mientras que la clona G3 mostró una disminución considerable porcentual en el grado de

destrucción. En presencia de CD, hay una inhibición completa en la clona X1, no así en la clona G3 que mostró el mismo comportamiento que en ausencia de la droga.

La velocidad de síntesis de proteínas se midió por la incorporación de metionina- $^{35}\text{S}$  a proteínas y fue comparable en ambas clonas. Asimismo, no se encontraron cambios en el comportamiento electroforético de la actina la clona mutante G3 en electroforesis uni y bidimensional, inclusive marcando las proteínas con metionina- $^{35}\text{S}$ . No obstante al verificar el patrón electroforético unidimensional de las proteínas provenientes de un extracto total de la clona mutante G3, tiene disminuido un péptido de 87,000 daltones y tiene incrementado un péptido de 21,000.

A raíz de los resultados anteriores, del presente trabajo concluimos que hemos aislado una mutante proveniente de Entamoeba histolytica HM1-IMSS que crece perfectamente en ausencia o en presencia de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de CD. La disminución en sus características de eritrofagocitosis y efecto citopático, aunado a la alteración en su patrón de proteínas podrían estar relacionados con la resistencia a CD mostrada por dicha mutante y probablemente se deben a una alteración en la superficie membranal de la amiba.

III. ANTECEDENTES.

1. Clasificación taxonómica de Entamoeba histolytica .

De acuerdo al esquema propuesto por Page(1976) y Levine y col.,(1980), la ubicación taxonómica de Entamoeba histolytica se sitúa de la siguiente manera:

Reino:	Protista
Subreino:	Protozoa
Phylum:	Sarcomastigophora
Subphylum:	Sarcodina
Superclase:	Rhizopoda
Clase:	Lobosea
Subclase:	Gymnamoebia
Orden:	Amoebida
Familia:	Endamoebidae
Genero:	Entamoeba
Especie:	<u>Entamoeba histolytica</u>

El subreino protozoa está constituido esencialmente por todos los organismos eucarióticos unicelulares. Miden desde 1 a 50µm o mas, el rango de la mayoría se encuentra entre 5 y 250µm. Casi todos son holozoicos o saprozoicos aunque tambien se encuentran organismos holofíticos.

La principal línea de evolución en el grupo ha sido a través de especializaciones subcelulares u organelos, los cuales funcionan en alimentación, locomoción, osmoregulación y reproducción. Muchos son uninucleados o con núcleos vesiculados, algunos son multinucleados o heterocarióticos como los pertenecientes al phylum Ciliophora. Su tipo de reproducción es sexual o asexual dependiendo del grupo.

El subreino Protozoa incluye alrededor de 65,000 especies identificadas, de las cuales más de la mitad son fósiles y cerca de 10,000 son parásitos. Entre las especies vivientes, de los sarcodarios están incluidos 250 parásitos, 11,300 de vida libre (cerca de 4,600 son foraminíferos); de los flagelados alrededor de 1,800 son parásitos y 5,100 son de vida libre; de los esporozoarios 5,600 son parásitos (incluyendo los phyla Apicomplexa, Microspora, Myxospora y Ascetospora); de los ciliados son cerca de 2,500 parásitos y 4,700 son de vida

libre. Indudablemente aun hay muchos cientos que no han sido clasificados. El subreino protozoa se compone de siete phyla entre los que se encuentran : SARCOMASTIGOPHORA, LABYRINTHOMORPHA, APICOPLEXA, MICROSPORA, ASCETOSPORA, MIXOSPORA Y CILIOPHORA (Levine y col., 1980).

El phylum Sarcomastigophora comprende a todos los organismos unicelulares, excepto los foraminíferos heterocarióticos; cuando hay reproducción sexual esencialmente es por singamia; los órganos locomotores pueden ser flagelos, pseudopodos, o ambos

(Honigberg y Balamuth, 1963).

Los miembros del subphylum sarcodina tienen seudópodos, o flujo protoplásmico locomotor sin seudópodos separados; cuando contienen flagelos los presentan en algún estadio temporal de desarrollo o usualmente están restringidos, presentan cuerpo desnudo o testa, esqueleto interno o externo, reproducción sexual por fisión; en el caso de que haya sexualidad está asociada con gametos flagelares o raramente gametos ameboides. Este subphylum abarca a varias especies de vida libre (Schmarda, 1871).

Dentro de la superclase Rhizopoda se encuentran los organismos que llevan a cabo su locomoción a través de lobopodios, o bien por medio de flujos protoplásmicos sin la producción de seudópodos separados (von Siebold, 1845).

Los protozoarios de la clase Lobosea, son aquellos que presentan seudópodos con carácter loboso o más o menos filoso, el cual se produce a partir de un amplio lóbulo hialino, no anastomoso; la célula usualmente es uninucleada aunque existen algunas formas multinucleadas; no poseen sorocarpos, esporangios, o cuerpos fructíferos similares (Carpenter, 1961).

La subclase Gymnamoebia abarca a los organismos que no tienen testa (Haeckel, 1862).

Tres características distinguen los organismos

pertenecientes al orden Amoebida: 1) son típicamente uninucleados, 2) se caracterizan por tener mitocondrias y 3) no presentan un estadio flagelar (Ehrenberg, 1830). Cabe mencionar que ya se ha demostrado que E. histolytica no contiene mitocondrias (Rosenbaum y Wittner 1970).

La familia Endamoebidae comprende a cuatro géneros : Entamoeba, Endamoeba, Iodamoeba y Endolimax . Esta familia está constituida por amibas parásitas que en su ciclo de vida presentan dos fases, la de quiste y la de trofozoíto. Los trofozoítos son generalmente pequeños y viven en el canal alimenticio de varios animales hospederos. El enquistamiento es un fenómeno común (Singh, 1975).

Los criterios que se han usado para establecer la división taxonómica en géneros y especies son: las características nucleares, las características de los trofozoítos y quistes, la especificidad en cuanto al hospedero y a la patogenicidad (Cervantes, 1980).

## **2. Entamoeba histolytica Schaudin, 1903. Morfología y ciclo biológico.**

El ciclo de vida completo del protozoo parásito intestinal de humanos del genero Entamoeba\_\_ (Endoentos, gr. adentro, amebein, gr. cambiar transformar) y de la especie

histolytica (gr. destructora de tejidos; hystos tejido, lisis, disolución), consiste de cuatro estadios consecutivos: trofozoíto, prequiste, quiste y metaquiste. El trofozoíto o forma móvil de E. histolytica, es una célula altamente dinámica y pleomórfica cuya forma y motilidad es extremadamente sensible a cambios en el medio ambiente fisicoquímico. A temperaturas menores de 37°C, dá como resultado una lentitud progresiva en este; tiende a redondearse y se despega fácilmente del substrato. Las variaciones locales en el pH, osmolaridad y potencial redox también pueden alterar la forma y motilidad de las células. El pleomorfismo, la movilidad activa y su adhesión al tubo de cultivo o a otras amibas formando grumos, son indicadores excelentes de la viabilidad de los trofozoitos en cultivo. Bajo condiciones adversas tales como las que se encuentran en los cultivos viejos, las amibas esféricas se desprenden de la superficie de crecimiento o cesan de aglutinarse con las amibas contiguas mostrando poca evidencia de movilidad interna y de translación (Martínez-Palomo,1982). De acuerdo a Deschiens (1965), los trofozoítos se pueden mover a una velocidad de 50µm por segundo. La célula vegetativa se reproduce por fisión binaria, lo que ya ha sido confirmado por microcinefotografía (Shaffer, y col.1961), no tiene una forma fija y usualmente se mueve de manera unidireccional por medio de desplazamientos peculiares a traves de claros pseudópodos ectoplásmicos que se pueden extender repentinamente. El tamaño de los trofozoítos varia de 10 a 60µm pero la mayoría son de 15 a 30µm dependiendo de la cepa y estadio de desarrollo (Dobell,1928). Las amibas

obtenidas directamente de hígado o de lesiones intestinales son generalmente grandes, midiendo alrededor de 20-40  $\mu\text{m}$  de diámetro, mientras que las encontradas en heces no disintéricas o en cultivos, miden entre 7 y 30  $\mu\text{m}$  (Martínez-Palomo, 1982).

El prequiste es un estadio intermedio entre los estadios de trofozoíto y quiste. La forma prequística se da cuando el trofozoíto muestra una actividad retardada sin refringencia, de forma oval o redondeada, siendo mas pequeño que el trofozoíto pero mas grande que el quiste debido a las inclusiones alimenticias; su acción pseudopodial es lenta y no hay movimiento progresivo; durante la maduración o quistes, secreta una delgada pared celular (Cleveland y Sanders, 1930). Aunque la morfología nuclear de los trofozoítos teñidos con hematoxilina es de valor diagnóstico, no es el caso tal con la morfología nuclear del prequiste, ya que hay una reorganización de la estructura nuclear durante este estadio (Larsh, 1972).

La fase quística es el estadio infectivo de la amiba. El quiste usualmente es redondo (algunas veces oval), inmóvil y posee una pared celular la cual es muy resistente a diferentes condiciones ambientales (Cleveland y Sanders, 1930), aunque los quistes son resistentes a secreciones gástricas, no pueden resistir por periodos prolongados a la desecación, a temperaturas superiores a 50°C, a la luz solar o al agua clorinada (Kott y Kott, 1970). La pared del quiste mide 0.5 $\mu\text{m}$  de grueso y es la mitad del grosor de la pared quística de Entamoeba Coli; son en

promedio mas pequeños que los trofozoítos, es decir de 8 a 20µm (Chávez y col. 1978) y poseen secuencialmente durante la maduración del prequiste uno, dos o, cuando son maduros hasta cuatro núcleos; estos núcleos son mas pequeños que el núcleo del trofozoíto, aunque similares morfológicamente. En estadios tempranos de la formación del quiste, puede poseer una vacuola de glucógeno y uno o más cuerpos cromatoides densamente basófilos los cuales característicamente tienen terminales redondeadas. Los cuerpos cromatoides están constituidos de agregados cristalinos de ribosomas y posiblemente algo de glucógeno, estos cuerpos cromatoides, desaparecen en los quistes viejos (Martínez-Palomo, 1982).

El estadio de metaquiste se da cuando el quiste pierde su pared compuesta de quitina (Arroyo-Begovich y col. 1980) y entonces el citoplasma se divide tantas veces como existan núcleos y a veces un número mayor. Los pequeños trofozoítos producidos de estas divisiones, aumentan de tamaño, completando así el ciclo biológico.

### **3. Citoesqueleto.**

El citoesqueleto de las células eucarióticas se encuentra conformado como un sistema fibroso tridimensional ramificado, constituido de cuatro componentes fibrilares citoplásmicos

principales: microtúbulos, microfilamentos delgados y gruesos, filamentos intermedios y las microtrabéculas. Estos elementos, funcionando de manera coordinada, mantienen la arquitectura y por consiguiente la integridad estructural de la célula (Porter, 1984). Los estudios bioquímicos de estas estructuras han demostrado que los microtúbulos están constituidos por dímeros de las proteínas tubulinas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) con un peso molecular de 110,000 daltones (Snyder y McIntosh, 1976), tienen un diámetro externo de alrededor de 24nm y atraviezan el citoplasma de la célula desde el área perinuclear hasta la periferia (Weber y Osborn, 1979; Brinkley y col. 1980). Los microfilamentos de actina o delgados miden de 5-7 nm de diámetro (Clarke y Spudich, 1977), son de longitud variable y con frecuencia se encuentran como haces que tienen de 0.1 $\mu$ m a 0.2 $\mu$ m de diámetro; se encuentran en las células musculares y no musculares y en ocasiones se asocian con la membrana plasmática. Es posible visualizarlos como fibras de tensión que surcan el citoplasma en células que están en movimiento activo (Lazarides y Weber, 1974; Goldman y col., 1975). Son polímeros de una proteína principal que tiene un peso molecular de 42,000 daltones denominada actina. La actina es la proteína contráctil encontrada comúnmente y con relativa abundancia dentro del citoplasma de todas las células eucarióticas (Korn, 1978; Pollard, 1981).

La actina al igual que las tubulinas son proteínas altamente conservadas dentro de la escala filogenética donde existen como diferentes isoformas. Esto se ha demostrado determinando la

estructura primaria de las actinas y tubulina, obtenidas de diversas fuentes, encontrándose que cuando menos hay seis actinas diferentes y tubulinas que tienen cambiados algunos aminoácidos del extremo amino terminal (Vanderkerhove y col. 1978), lo que produce algunas diferencias en el punto isoelectrico de estas proteínas. La actina de las células musculares tiene un punto isoelectrico de 5.4 y se le ha denominado alfa ( $\alpha$ ); las células no musculares tienen dos isoactinas diferentes y tienen un punto isoelectrico ligeramente más básico que la actina ( $\alpha$ ) y se les ha denominado beta ( $\beta$ ) y gamma ( $\gamma$ ) (Garrels Gibson, 1976).

El tercer componente del citoesqueleto son los filamentos intermedios; reciben este nombre ya que su tamaño es intermedio entre los microtúbulos y los microfilamentos. Tienen un diámetro de 10 nm, su longitud es variable y a veces se asocian en manojos; son estructuras filamentosas que no se ramifican y se han identificado en una gran variedad de células animales (Lazarides, 1980). Existen cinco tipos diferentes de filamentos intermedios los cuales se encuentran formando parte de células mesenquimatosas (Franke y col. 1978), células nerviosas (Leim y Hutchinson 1982; Shaw y col. 1984), células de la glia (Goldman y col. 1978), células musculares (Lazarides y Hubbard, 1976) y células epiteliales (Moll y col. 1982).

Finalmente, la matriz citoplasmática es el componente menos estudiado del citoesqueleto, sobre el cual existe controversia.

La matriz citoplasmática se ha descrito en una variedad de células con la técnica de microscopía de alto voltaje, como redes finas de delicados filamentos de 3 a 6 nm de diámetro que se han denominado microtrabéculas (Wolosewick y Porter, 1979). Estos filamentos se interconectan entre si y forman una fina red o malla tridimensional que aparentemente conecta estructuras celulares tales como microtúbulos, cisternas del retículo endoplásmico, polisomas y fibras de tensión. A la fecha no se conoce la naturaleza molecular de este componente del citoesqueleto; sin embargo se ha sugerido una naturaleza proteínica para el mismo y el espacio que queda entre la malla, llamado substancia fundamental, se ha pensado que está constituido por agua y metabolitos de bajo peso molecular (Schiwa y col. 1981).

A pesar de la extensa literatura sobre la ultraestructura de los trofozoítos de E. histolytica y de la sorprendente movilidad y plasticidad de este protozoario, se conoce muy poco acerca de la organización estructural y características bioquímicas de su citoesqueleto. Aunque microtúbulos y microfilamentos son elementos del citoesqueleto que se consideran universales de las células eucarióticas, actualmente no hay pruebas bioquímicas concluyentes de la presencia de microtúbulos en este parásito. Sin embargo, existe la evidencia de la participación de estas estructuras en las principales etapas de la mitosis de E. histolytica tipo Laredo (Gicquaud, 1979), que de alguna forma indica aproximaciones al conocimiento de la funcionalidad de los

microtúbulos. En el caso de la actina, se han identificado estructuras filamentosas en el citoplasma de los trofozoítos de E. histolytica con el uso de la técnica de microscopía electrónica a temperatura ambiente (Martínez-Palomo y col. 1974 ; Michel y Schupp 1975). También se ha observado agregados al parecer de microfilamentos, bajo la membrana plasmática de E. histolytica, en regiones donde la superficie celular esta especializada para formar canales fagocíticos o macropinocíticos (Martínez-Palomo, 1982).

Con técnicas de inmunofluorescencia usando tanto sueros antiactina (Aust'Kettis y col. 1977) o con anticuerpos anti- $\alpha$ -actina y falatoxina fluoresceinada; se ha demostrado la presencia de actina aunque no en forma filamentososa sino como agregados en el citoplasma y la membrana (Sabanero y Meza, 1982). Gadasi en 1982, reportó que del 15-20% de la proteína total amibiana, está compuesta de una proteína similar a actina que activa la meromiosina dependiente de ATPasa de conejo. Dicha molécula con propiedades de actina fue aislada y caracterizada por Meza y col. (1983), usando un procedimiento que minimiza los niveles extremadamente altos de proteólisis encontrados en los extractos amibianos. La actina aislada tiene un peso molecular de 45,000 daltones y un punto isoelectrico de 5.4, ligeramente mas ácido en comparación con el de la actina de músculo. Una característica especial de esta actina aislada es la deficiencia para unirse y activar a la enzima DNAasa I probablemente debido a modificaciones en su composición peptídica y en su conformación.

Se desconoce totalmente como se regula la polimerización de actina en amibas, si hay proteínas asociadas a ella o si actina es responsable de fenómenos de superficie que a su vez determinen la conducta invasiva de este parásito, la cual puede estar directamente relacionada con motilidad.

#### 4. Citocalasinas.

Las citocalasinas son metabolitos secundarios de hongos que inhiben una amplia variedad de movimientos celulares, incluyendo división celular, motilidad, secreción, fagocitosis y cambios en la forma celular (Tanenbaum, 1978). Se ha encontrado que la mayoría de las citocalasinas existentes por lo menos inhiben el transporte de azúcares al competir con sitios de unión de alta afinidad en la membrana plasmática (Atlas y Lin, 1978; Rampal y col., 1980), además se ha visto que la inhibición del transporte de azúcares por estas drogas no está relacionada con el efecto producido en las estructuras celulares que contienen actina u otras proteínas contráctiles (Atlas y Lin, 1978; Lin, D. y Lin, S., 1979).

Debido a los profundos efectos sobre la morfología y la motilidad y a raíz de las numerosas observaciones de los efectos drásticos sobre las estructuras filamentosas, se sugirió que el

sitio de acción inicial de las citocalasinas se encuentra en la maquinaria contráctil celular (Godman y Miranda, 1978). En efecto, la sensibilidad de las células a las citocalasinas con frecuencia se toma como un indicador de la participación de un sistema contráctil compuesto de actina, dentro de ciertas actividades celulares, aunque no este apoyado por evidencias morfológicas y fisiológicas. El mecanismo de acción de las citocalasinas aun no esta muy claro, pero su efecto hasta hace poco se ha delucidado en diferentes estudios *in vitro* usando actina purificada, los que claramente demuestran la inhibición de la tasa de polimerización de los filamentos de actina (Brenner y Korn, 1979; Brown y Spudich, 1979; Lin y col., 1980; MacLean-Fletcher y Pollard, 1980; Flanagan y Lin, 1980), sugiriendo que lo anterior se debe a que las citocalasinas bloquean la elongación de los filamentos al unirse a estos impidiendo a su vez la formación de la red filamentososa. La acción inhibitoria involucra la unión de las citocalasinas a sitios de alta afinidad directamente sobre los filamentos de actina (Brenner y Korn, 1980; Flanagan y Lin, 1980).

Otros estudios han demostrado los efectos drásticos de las citocalasinas sobre los extractos de geles citoplásmicos (Weihsing, 1976), en mezclas de actina y factores de gelación purificados (Hartwing y Stossel, 1976, 1979; MacLean-Fletcher y Pollard, 1980), sobre microtúbulos y en la interacción con filamentos de actina y/o proteínas asociadas (Griffith y Pollard, 1978). Supuestamente, todos estos efectos tambien ocurren en las

células en experimentos *in vivo*, pero la diferencia de los efectos de las citocalasinas en estas condiciones experimentales, en comparación con los que se han observado empleando actina pura *in vitro*, es que hay un rearrreglo en masa de los componentes del citoesqueleto (Godman y col., 1980a, 1980b). Dicho rearrreglo es dependiente de energía metabólica (Schliwa, 1982), y puede estar acompañado o no de la despolimerización de actina celular; un caso específico, son los eventos observados con citocalasina D (Morris y Tannenbaum, 1980).

De todas las citocalasinas existentes, la citocalasina B (CB) y la citocalasina D (CD), son las más estudiadas actualmente en diversas líneas celulares y, debido a esto, se han obtenido aproximaciones más convincentes de los efectos causados por estas drogas. Por ejemplo, en el caso de la CD, Schliwa (1982) ha encontrado que muchos de los efectos causados por esta droga sobre la morfología celular, probablemente son el resultado de la combinación directa de la droga con los componentes filamentosos y de reacciones celulares secundarias, además, que el tratamiento con CD puede causar una destrucción muy severa de la malla filamentososa tridimensional sin causar alteraciones ya sea en la forma celular o en la desintegración de las fibras de tensión.

Por otra parte, Yahara y col. (1982) ha comparado el efecto de 24 diferentes citocalasinas a nivel celular y molecular; los resultados de esta investigación sugieren que la inhibición de los procesos de motilidad celular causados por las citocalasinas,

se pueden atribuir a la unión de estas drogas a la actina, sin embargo, la evidencia de la localización intracelular de los sitios de unión biológicamente activos por las citocalasinas no se sabe hasta la fecha.

En organismos unicelulares, particularmente en *E. histolytica*, se ha encontrado que dentro de los mecanismos que requieren contacto y que dan como consecuencia la muerte de las células blanco por parte de la amiba, se manifiestan tres actividades principales: adhesión, citólisis y fagocitosis, dichos eventos son inhibidos por citocalasinas (Ravdin y Guerrant, 1981; Kobiler y Mirelman 1981; López-Revilla y Cano-Mancera, 1982), indicando la participación dinámica de la amiba y per se la de su citoesqueleto en donde la proteína actina juega un papel importante.

##### **5. Mutantes en células eucarióticas.**

Una mutación es un proceso mediante el cual la información genética de un organismo sufre un cambio estructural. El mismo término describe a un gen modificado que produce el proceso mutacional, sin embargo en la mayoría de los casos el término mutación se refiere a un cambio fenotípico causado por un gene modificado. El término mutante se utiliza para identificar a un organismo que expresa el cambio fenotípico producido por la

mutación, en donde los cambios mutacionales por lo general ocurrieron en nucleótidos (mutones) o unidades mas grandes de DNA o RNA (Averbach,1962).

Los genes mutados lo mismo que los no mutados, tienden a autopropagarse, ya que el proceso de duplicación génica precede a cada división celular. Una vez que se establecen algunos genes mutados, son tan estables como los genes originales que sufrieron una mutación, aunque otros pueden ser más susceptibles de continuar modificandose. Las mutaciones pueden ocurrir en cualquier célula y en cualquier etapa del ciclo celular, asimismo el efecto inmediato de una mutación y su capacidad para producir un cambio fenotípico lo determinan su dominancia, el tipo de célula en que ocurre y el ciclo vital del organismo (Drake,1970).

El aislamiento de mutantes ha sido el punto de partida en el análisis de un gene. Hasta muy recientemente, los genes se han identificado solo por la caracterización de mutaciones que pueden ser letales o que bloqueen el desarrollo de alguna característica visible. El mapeo de mutaciones dio lugar al concepto actual de que si en un grupo de mutaciones todas afectan la misma característica y permanecen juntas (esto ha sido demostrado con pruebas de complementación), el grupo constituye una unidad genética funcional. A partir del descubrimiento de que el DNA es el material genético, el concepto de mutación es el de un cambio en la secuencia de pares de bases, un cambio en la secuencia nucleotídica puede dar lugar a un cambio en la secuencia de

aminoácidos y de este modo alterar o abolir la actividad de una proteína (Lewin, 1985).

El empleo de mutantes en células procarióticas y eucarióticas como modelos experimentales, ha permitido un mejor conocimiento de los procesos biológicos elementales tanto bioquímicos como genéticos. La aplicación metodológica de la biología molecular en mutantes de células eucarióticas está respaldada principalmente por las investigaciones realizadas en los últimos años. En células de mamífero en cultivo se han demostrado fenómenos de aparición de mutantes, espontáneas o inducidas (Gupta y Siminovitch, 1976), de pasaje de información genética por medio de transferencia, usando DNA desnudo o cromosomas metafásicos (Corsaro y Pearson, 1981) y fenómenos de recombinación (Wasmuth y col., 1980). Entre los tipos de mutantes más utilizados, se encuentran las mutantes resistentes a drogas.

Se han aislado un gran número de mutantes resistentes a drogas como por ejemplo a colchicina en células somáticas en cultivo (Thompson y Baker, 1973; Minor y Roscoe, 1975; Siminovitch, 1976), metotrexato (Flintoff, 1980), compactina (Masuda y col., 1982), emetina (Gupta y Siminovitch, 1976) y citocalasina (Toyama y Toyama 1984). Las mutantes resistentes a drogas son herramientas muy valiosas que sirven como modelo experimental para estudiar la naturaleza bioquímica y genética de procesos celulares específicos o asociar algún cambio fenotípico de la célula con la resistencia adquirida. Por ejemplo, en

células de ovario de hamster chino (CHO), se han aislado mutantes resistentes a colchicina, colcemida y griseofulvina (Cabral y col., 1980), indicando que la resistencia a estas drogas está asociada con una alteración en la subunidad  $\beta$  de la proteína tubulina. De igual modo, en este mismo sistema celular, se han aislado mutantes resistentes a maytansina, dicha mutación está asociada con una alteración en la proteína  $\alpha$ -tubulina (Matthew y col., 1985), mostrando que el sitio de acción de esta droga se encuentra en el sistema de microtúbulos. Toyama y Toyama (1984), aislaron y caracterizaron en una línea celular de carcinoma humano (células KB), mutantes resistentes a citocalasina B; en dicho estudio se encontró una alteración en la subunidad  $\beta$  de la proteína actina sugiriendo que esta alteración puede ser el resultado de una mutación en el gene que codifica para la  $\beta$ -actina, a una modificación post-traducciona l de esta o a una activación de un gene silencioso para la  $\beta$ -actina.

Los ejemplos anteriores nos indican, que específicamente se puede estudiar la funcionalidad de una proteína en particular asociándola con la resistencia adquirida por la célula o por cualquiera de las múltiples manifestaciones fenotípicas que pueda mostrar la misma.

La resistencia a drogas en protozoarios parasitos ya se ha descrito desde el inicio del presente siglo (Ehrlich, 1908) y desde entonces, se han reportado diversos trabajos concernientes a ello (Browning, 1954; Peters, 1974; Rollo, 1980; Santi y

col.,1984). En especies de Entamoeba , se han aislado mutantes resistentes a varios antibióticos o drogas (Jeffrey y Thomas,1978; Injeyan y col.,1979; Orozco y col.,1985a). Las principales aportaciones de los trabajos antes mencionados, son la creación de modelos celulares que se podrían utilizar en el estudio de los mecanismos de acción de drogas y/o agentes terapéuticos en protozoarios parásitos de humanos.

#### IV. INTRODUCCION .

La motilidad es una de las funciones mas importantes en las células eucariónticas y de la que dependen procesos elementales de la célula. Por citar algunos se pueden mencionar: la división celular, el flujo citoplásmico, la endo y exocitosis, el movimiento intracelular de organelos y partículas, el movimiento ameboideo y la fagocitosis . En los procesos antes mencionados, actualmente se sugiere que existe una participación directa del aparato contráctil denominado citoesqueleto.

La extraordinaria movilidad y plasticidad de los trofozoítos del protozooario parásito Entamoeba histolytica, lo convierten en un excelente modelo para el estudio de los eventos dependientes de motilidad . Fagocitosis, pinocitosis, formación de pseudópodos, movimiento citoplásmico, etc. son todas actividades que parecen estar relacionadas con su virulencia y patogenicidad.

La participación de proteínas del citoesqueleto en las funciones antes citadas es una extrapolación de lo que sucede en otras células eucariónticas, ya que se conoce muy poco acerca de la funcionalidad y organización estructural de las proteínas de su citoesqueleto en Entamoeba histolytica y otras amibas-parásitas.

De estas proteínas, la actina de Entamoeba histolytica HM1

es uno de los primeros componentes que ha sido bioquímicamente caracterizado (Gadassi, 1982; Meza y col., 1983), sin embargo, actualmente se desconoce como se regula su polimerización, si existen proteínas asociadas a ella y que esto este relacionado con motilidad o con fenómenos de superficie que a su vez determinen la conducta invasiva de este parásito.

Existen evidencias que postulan que tratando los trofozoítos de E histolytica con citocalasinas B y D, se puede disminuir su movilidad y virulencia. Particularmente en lo que respecta a la citocalasina D, se piensa que esta droga presumiblemente inhibe la adhesión amibiana posiblemente porque altera la función de los microfilamentos de la amiba dando como resultado la dispersión de las moléculas de adhesina que se encuentran en la superficie, así como la alteración en la forma celular (Nicolson, 1976; Aust-Kettis y Sundquist, 1978). Evidencia concreta sobre la unión de citocalasina a la actina de amiba se ha obtenido recientemente en nuestro grupo (Rosas-Giselle, Tesis).

Como ya se mencionó en la sección anterior, la resistencia a drogas en protozoarios parásitos ya se ha investigado desde el inicio del presente siglo. Sin embargo, aunque se han reportado diversos trabajos concernientes a ello, particularmente en E. histolytica no se ha definido un modelo experimental que pueda ayudar a explicar la relación de una de las proteínas más importantes del citoesqueleto celular de la amiba (la actina), con fenómenos involucrados con la patogenia del parásito.

## V.- OBJETIVOS

Con la finalidad de contar con un sistema experimental que permita estudiar la relación de las proteínas del citoesqueleto (entre ellas principalmente actina) con la motilidad del protozoario parásito Entamoeba histolytica, en el presente trabajo nos propusimos como objetivo general: aislar de la cepa HM1-IMSS mutantes que estén alteradas en su fagocitosis así como la selección de clones por su resistencia a citocalasina D.

Partiendo del antecedente de que la disminución en la virulencia reportada en la cepa silvestre en presencia de citocalasina, probablemente es producto de una alteración en la actina, dió lugar a la realización de los siguientes objetivos particulares :

- Selección de una clona mutante de E.histolytica, que sea capaz de crecer en presencia de 5µg/ml de la droga citocalasina D.
- Hacer una caracterización parcial de la clona obtenida mediante criterios de virulencia tales como :
  - i) Eritrofagocitosis
  - ii) Efecto citopático
- Hacer un análisis bioquímico de los extractos proteínicos de la mutante obtenida mediante :
  - i) Electroforesis unidimensional
  - ii) Electroforesis bidimensional
- Medir in vivo la incorporación de metionina-<sup>35</sup>S de la clona mutante obtenida.

## VI.- MATERIALES Y METODOS

### 1.-Aislamiento de bacterias THY

La selección de mutantes auxotróficas para timina se hizo de acuerdo al método de Jeffrey H. Miller (1972), usando trimetoprim.

Bacterias de la cepa Salmonella typhimurium LT-2 se sembraron por estría en cajas de petri, en medio mínimo con glucosa (Gmin) . Después de 24h de crecimiento, las células se cosecharon con el auxilio de una espátula y se resuspendieron en SS a una D.O. de 0.4 (660nm), que corresponde a una densidad bacteriana aproximadamente de  $4 \times 10^8$  células por mililitro; 0.1 ml de la suspensión bacteriana se agregó por duplicado en tubos de vidrio de 18 X 150mm con tapón metálico los cuales contenían 5ml de NZx, los tubos se incubaron a 37°C durante 6h en agitación leve. Después de transcurrido el tiempo de incubación, las células en fase logarítmica de crecimiento se cosecharon por centrifugación (6000 r.p.m.15 min) en una centrífuga de mesa y se colocó la pastilla bacteriana en tubos de 18 X 150 mm estériles que contenían 10 ml de NZx suplementados con NTG a una concentración final de 100µg/ml (previamente se disolvió en DAVIS N). Las células con NTG se incubaron durante 15min en baño maria a 37°C, se centrifugaron y se lavaron dos veces con SS esteril . La suspensión bacteriana mutagenizada se transfirió a otros tubos conteniendo 5ml de NZx nuevo y se incubaron durante 24h en

agitación suave.

a) Selección con trimetoprim en medio líquido.

De la suspensión bacteriana anterior se tomó 0.1ml y se agregó a un tubo con 6ml de Gmin que además contenía trimetoprim (200µg/ml) y thy (200µg/ml). El tubo con las bacterias se incubó en baño maría a 37°C durante 24h en agitación. Transcurrido el tiempo de incubación, se agregó 1ml de la suspensión celular a otro tubo que contenía 9ml de SS estéril; de este último tubo se hicieron diferentes diluciones, de donde finalmente se tomaron 0.1ml y se dispersaron por duplicado sobre la superficie de AN+Thy contenido en cajas de petri (aproximadamente se dispersaron 1000 células por caja). Las cajas se incubaron durante 48hrs a 37°C .

b) Selección por la técnica de réplica en placa.

Esta técnica, introducida inicialmente por Lederberg y Lederberg (1952), permite la transferencia en una sola operación de la réplica de una placa principal que contenga de 50 a 100 colonias, a varias placas diferentes.

Las colonias bacterianas contenidas en las cajas AN+Thy y con la ayuda de palillos estériles se sembraron en cajas con medio nuevo y se incubaron a 37°C durante 48h. Después del tiempo de incubación, las cajas anteriores se sembraron por parchado

tanto en medio Gmin como en AN+Thy ; por lo menos se sembraron 20 cajas de cada medio. Las cajas se incubaron a la misma temperatura y tiempo antes mencionado. Después del periodo de incubación, se obtuvo el porcentaje de colonias mutantes que crecieron en presencia y ausencia de thy en todas las cajas resembradas.

c) Pruebas de reversión de las bacterias Thy<sup>-</sup>.

Las cajas de petri conteniendo AN+Thy se dividieron en 8 fracciones por la parte exterior con un marcador indeleble. Las colonias bacterianas que crecieron en AN+Thy en el procedimiento anterior, se resembraron por estría en los compartimientos citados anteriormente; se sembraron 50 cajas en total con 8 colonias en cada caja, mismas que se incubaron durante 24h a 37°C. Después del tiempo indicado, estas mismas colonias se resembraron por estría en cajas individuales pero ahora en ausencia de Thy (solo en Gmin), y se volvieron a incubar. Una vez que paso el tiempo de incubación, quedo eliminado un porcentaje de las colonias, mientras que el porcentaje restante se siguió incubando un tiempo similar.

Incubaciones sucesivas nos indicaron como las colonias bacterianas se fueron eliminando por carecer el medio de Thy. Una vez que se cumplió un tiempo considerable (144h), y cuando se habia eliminado casi la totalidad, las colonias que quedaron y que no mostraron crecimiento en Gmin (17 en total), se volvieron

a resembrar en Gmin+Thy y se incubaron durante 48h.

Con la ayuda de una espátula se cosecharon las colonias individuales, se resuspendieron en 0.1 de SS estéril y se dispersaron sobre la superficie de Gmin en cajas de petri. Al centro de cada caja se agregaron 2 mg de NTG y se incubaron durante 48h a 37°C . Después del tiempo de incubación, las mutantes que no revertieron se sembraron por estría sobre la superficie de Gmin+Thy a diferentes concentraciones (5, 25 y 50µg/ml) y posteriormente se seleccionaron las mutantes auxotróficas que crecieron a la concentración optima de Thy; de éstas se decidió trabajar con la más estable y se le denominó SM-7.

## **2.-Tratamiento del material de vidrio utilizado en el cultivo de E.histolytica**

El material usado por primera vez se lavó con SIGMACLIN, se enjuago muy bien varias veces con agua de la llave y después con agua destilada. Posteriormente se dejó durante 6h en NaOH 1.0 N , se enjuagó muy bien varias veces con agua de la llave y se colocó en HCl 1.0 N un tiempo igual al del NaOH para después volver a enjuagar con agua de la llave y bidestilada. Posteriormente se colocó en una estufa durante 3h a 200°C.

En el caso de los tubos de cultivo, estos se sumerjieron en una solución de ROCCAL (un vol. de esta solución que ya viene al

10% con 5 vol. de H<sub>2</sub>O destilada), se dejaron durante una hora y despues se tallaron por la parte interna con un escobellon suave; se enjuagaron con agua de la llave varias veces y se colocaron en CLORALEX al 5% (sin los tapones), durante toda la noche o un tiempo equivalente. Se enjuagaron muy bien por lo menos 7 veces con agua de la llave y un tiempo similar con agua bidestilada. Se hornearon a la misma temperatura y tiempo como se mencionó anteriormente y se esterilizaron en autoclave (20lbs.pulg-2/20 min.).

### **3.-Preparación del medio de cultivo BI-8-33.**

La composición del del medio de cultivo BI-S-33 corresponde a la descrita por Diamond, y col., (1978) a excepción del Biosate el cual se sustituyó por Biotriptasa producido en el país (BIOXON) y del suero de bovino (MICROLAB).

#### **a) Medio basal BI.**

Biotriptasa 30g; dextrosa(SIGMA) 10g; NaCl(BAKER) 2g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(BAKER) 0.6g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(BAKER) 1.0g; L-cisteína(SIGMA) 1.0g; acido L-ascorbico(MERCK) 0.2g; citrato férrico amónico (SIGMA) 0.0236g).

Se mezclaron y se disolvieron los componentes en agua tridestilada (conductividad<sup><1></sup>), en el orden en que estan citados, se ajustó la mezcla a pH 6.8 con NaOH 5N añadido gota a gota y se

aforó a 820ml.

El medio se filtró con papel Watman #40, se depositó en botellas de vidrio con tapa mismas que se cubrieron con papel aluminio; se esterilizó en autoclave (15 lbs/pulg<sup>2</sup> por 15 min.). Se cerraron bien los tapones de las botellas y el medio se conservó a 4°C o a -20°C. El medio de cultivo no se utilizó después de 15 días de preparación .

b) Descomplementación del suero .

El suero de bovino (lote 5/7), congelado en botellas de 400ml, se sumergió en baño de agua a 36°C hasta descongelarlo . Después las botellas se colocaron en otro baño de agua a 56°C por 30 min en agitación; se secaron las botellas por fuera y se distribuyó el suero en fracciones alícuotas de 100ml en botellas de borosilicato estériles (Wheaton) con tapón de rosca que se mantuvieron en refrigeración.

c) Medio BI-S-33 completo.

Al suero de bovino que se conservó en alícuotas de 100ml se le añadió asépticamente 20 ml de una mezcla de vitaminas comerciales (Special, Diamond Vitamin Mixture, North American Biologicals). Se agregaron 20 ml del suero vitaminado a 100 ml de medio basal BI, el medio completo quedó a una concentración final de suero al 13% (v/v) y de vitaminas al 3% (v/v), este medio lo

designamos como BI-S-33x.

#### 4.-Cultivo de Entamoeba histolytica .

Los trofozoítos de la cepa HM1-IMSS aislada por De la Torre y col., (1971), fueron cultivados axénicamente en el medio BI-S-33x. Los cultivos en fase logarítmica de crecimiento se colocaron en hielo durante 10min para despegar las células de las paredes del tubo, se agitaron suavemente, se centrifugaron durante 5min a 1500 r.p.m. y se ajustaron a la concentración deseada. Los trofozoítos se sembraron a bajas concentraciones (entre 200 y 400 células por ml). Para las resiembras se utilizaron tubos de vidrio de 16 X 125mm con tapón de rosca (CORNING de mex). Los cultivos amibianos siempre se utilizaron en fase media logarítmica de crecimiento, salvo indicación al respecto.

#### 5.-Mutagénesis de los trofozoítos de E histolytica y selección para fagocitosis negativa.

La técnica de mutagénesis y selección se desarrolló de manera similar (aunque con algunas modificaciones dadas las características de nuestro sistema), al esquema descrito por Clarke, M. (1978), para la obtención de mutantes de motilidad de Dictyostelium discoideum. El esquema esta basado en la sensibilidad que presentan los trofozoítos a la irradiación con luz cercana al espectro visible, después de incorporar en su DNA

la BrdUr que llevaban las bacterias que ingirieron (fig. 2 ).

#### i) Mutagénesis

Las amibas en fase logarítmica de crecimiento se crecieron en asociación con bacterias de la cepa Salmonella typhimurium SM-7 durante 8h a 37°C.

4 X 10<sup>6</sup> trofozoítos se cosecharon por centrifugación (1500 r.p.m. por 5min ), y se lavaron tres veces con PBS pH 7.0 para eliminar las bacterias. A continuación, la pastilla amibiana se resuspendió en un tubo Falcon esteril de 50ml con 10ml de medio mínimo descrito por Gillin y Diamond (1980) pero sin glucosa, que designamos como G.D. ; en este medio los trofozoítos se sometieron a un periodo de ayuno durante 1h en baño de agua a 37°C. En este lapso de tiempo se observó la movilidad, elongación y refringencia de los trofozoítos lo cual nos indicó seguir adelante con el procedimiento de mutagénesis.

Casi al término del periodo de ayuno, el mutágeno NTG se disolvió en medio G.D. (1mg/ml) y después se agregó a la suspensión amibiana a una concentración final de 100µg/ml. Posteriormente el tubo conteniendo a las amibas en presencia del mutágeno, se siguió incubando a la misma temperatura que en el periodo de ayuno solo que durante 30min. Después de este tiempo se suspendió la incubación agregando 30ml de medio G.D. frío y centrifugamos como se indicó anteriormente, se centrifugó y se

lavó tres veces con G.U., para posteriormente resuspender la pastilla en 4ml de medio BI-S-33<sub>x</sub>. De esta última suspensión, se tomó una alícuota depositando dos gotas en un portaobjetos y se probó exclusión de los trofozoítos con azul de tripano. Finalmente la suspensión amibiana se resembró de manera proporcional en 4 tubos con medio BI-S-33<sub>x</sub>, suplementado con 10µl de SA1 en cada tubo.

ii) Preparación de las bacterias.

Salmonella thyphimurium, cepa SM-7 fue crecida en cajas de petri conteniendo Davis N, agar (Bioxon de Mexico) 1.4%, glucosa 0.4%, peptona de caseína (Bioxon de Mexico) 0.4% y timidina (Sigma Chemical) 50µg/ml. Las cajas se incubaron 16h a 37°C. Los cultivos de bacterias en fase de crecimiento exponencial fueron colectados con la ayuda de una espátula y lavados cuatro veces (centrifugando a 6000 r.p.m. en cada ocasión) con Davis N para quitar los restos de agar y timidina soluble. Las bacterias fueron ajustadas a una D.D. de 1.0 (660 nm) en 10 ml de Davis N solo que en este caso la timidina se sustituyó por BrdUr (Sigma Chemical) a una concentración final de 50µg/ml. Después de 120 min de crecimiento (porque así se cumplieron por lo menos dos tiempos de generación), a 37°C en agitación, las bacterias fueron colectadas, lavadas tres veces con Davis N y resuspendidas a la mitad del volumen original en Davis N.

iii) Interacción de amibas y bacterias.

Trofozoítos de E. histolytica mutagenizados con NTG y crecidos axénicamente durante tres repiembres hasta la fase media logarítmica en el medio BI-S-33<sub>x</sub>, se desprendieron de los tubos por enfriamiento en hielo durante 10 min, se centrifugaron en una centrífuga general de laboratorio (GLC-2) durante 5 min a 1000 r.p.m. , se lavaron dos veces con solución de NaCl 0.15 M pH 7.4 y se resuspendieron en medio G.D. a  $1 \times 10^6$  trofozoítos por mililitro . Un mililitro de la suspensión de trofozoítos se pasó a tubos estériles y se le agregó 1ml de la suspensión de bacterias S. typhimurium SM-7 crecidas con BrdUr (ajustadas por densidad óptica a  $1 \times 10^7$  bacterias /ml). Las suspensiones celulares se incubaron en un baño de agua a 37°C en agitación durante 3 horas para permitir que las amibas ingirieran las bacterias .

Después del tiempo de incubación, a cada uno de los tubos (6 en total), se les añadió 10 ml de medio G.D. frío, se centrifugaron y se lavaron 2 veces con este medio con la finalidad de eliminar las bacterias que no fueron ingeridas. Las pastillas amibianas se resuspendieron en otro tubo esteril al que se le agregaron 5 ml de BI-S-33<sub>x</sub>. Se contó el número de células,  $5 \times 10^5$  trofozoítos que estuvieron en contacto con las bacterias fueron sembrados en tubos con medio BI-S-33<sub>x</sub> suplementados con 20µl de SA1 cada uno. Los tubos con los trofozoítos se incubaron durante 24h a 37°C para permitir la replicación de las amibas y la incorporación de la BrdUr en su DNA.

iv) Irradiación de E. histolytica que incorporó en su DNA BrdUr.

Los trofozoítos que estuvieron en incubación durante 24h se enfriaron, se centrifugaron y se lavaron 3 veces con medio G.D. se resuspendieron en este mismo medio a  $5 \times 10^8$  trofozoítos por mililitro. Alícuotas de 2 ml de esta suspensión se pasaron a cajas de petri de 35 X 10mm. Las tapas de las cajas se invirtieron y se llenaron con una solución de timidina (1 mg/ml), que actúa como filtro de luz de longitud de onda mas corta de 310nm, para evitar el daño a los trofozoítos por irradiación con luz ultravioleta de onda muy corta. Las cajas de petri se pusieron sobre hielo y bajo la lampara de luz de 310 nm a 4 cm de distancia con el filtro de timidina interpuesto y en agitación leve. El tiempo de irradiación fue de 3h.

Despues del tiempo de irradiación, los trofozoítos se sacaron de cada caja de petri por succion con pipetas Pasteur estériles y se vaciaron en un tubo Falcon de 50ml; se lavaron una vez con medio G.D. , se sembraron en medio BI-S-33<sub>x</sub> suplementado con SA1 y se incubaron a 37°C durante 24h. Despues del tiempo de incubación, los trofozoítos sobrevivientes a la irradiación se contaron, se sembraron  $1 \times 10^8$  células en 11 ml de medio BI-S-33<sub>x</sub> suplementado con SA1 y se incubaron hasta fase logarítmica de crecimiento. El protocolo de interacción e irradiación se repitió completo por tres veces y la población resultante de la

tercera irradiación se pasó 10 veces en medio BI-S-33x.

#### **6.-Aislamiento de poblaciones amebianas resistentes a CD.**

Esta técnica de selección se llevó a cabo tomando como modelo el procedimiento empleado por Toyama Toyama (1984) para la selección de células KB resistentes a citocalasina B.

Trofozoítos de un cultivo en fase logarítmica de crecimiento provenientes del tratamiento de selección para movilidad, se enfriaron y se centrifugaron para coleccionar las células; se contó el número de las mismas y se inocularon  $1 \times 10^5$  trofozoítos en 8 tubos con 12ml de medio BI-S-33x suplementado con CD (Sigma Chemical), 5µg/ml. Los tubos se incubaron durante 72h a 37°C. Después del tiempo de incubación, las células se coleccionaron por centrifugación en tubos Falcon de 50ml, se lavaron tres veces con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0 ; la pastilla se pasó a un tubo que contenía medio de cultivo nuevo suplementado con 10µl de SA1 pero sin la droga . Los trofozoítos se dejaron crecer hasta que alcanzaron la fase media logarítmica de crecimiento durante tres ciclos y en el último de estos, se repitió el protocolo anterior en forma sucesiva hasta obtener un buen número de amebas resistentes a la droga. Se cultivaron sucesivamente en forma alternada con y sin la droga, durante 19 pasajes.

#### **7.-Clonación de E.histolytica en agar semisólido.**

Se prepararon botellas Costar de 30ml con 25ml de medio BI-S-33<sub>x</sub>. Las botellas se incubaron durante 30min a 41°C en un baño de agua. Posteriormente se agregaron 2.6ml de agar (Difco) de preparación reciente al 5% (peso/volumen) en medio basal BI para obtener una concentración final de agar en el medio de 0.48%. Las botellas se agitaron vigorosamente hasta obtener una mezcla homogénea y se volvieron a incubar a la misma temperatura por 30min. Durante este tiempo los tubos con los trofozoítos en fase logarítmica de crecimiento se colocaron en hielo; la suspensión celular se contó y se inocularon  $4 \times 10^3$  amibas en tubos que contenían 10 ml de medio BI-S-33 + SA1 frío. Las suspensiones celulares se homogeneizaron agitando suavemente los tubos y se colocaron en agua-hielo hasta el momento de inocularlos en el agar semisólido.

Las cajas Costar con medio semisólido, se quitaron del baño a 41°C y se colocaron en la campana de flujo laminar vertical (VECD). Previa homogeneización invirtiendo los tubos, se tomaron 1ml de cada tubo y se inocularon en su caja respectiva. Los inóculos correspondientes fueron de 400 trofozoítos tanto para la cepa silvestre como para las resistentes a CD. Las botellas inoculadas se agitaron vigorosamente para distribuir los trofozoítos homogéneamente; se colocaron en hielo durante 10min hasta que el agar solidificó y después las botellas se incubaron a 37°C por 4 a 8 días hasta que las colonias fueron aparentes a simple vista para contarlas y determinar la eficiencia de formación de colonias (E F C), según Gillin y Diamond, (1978),

calculada como:

$$E F C = \frac{\text{Número de colonias obtenidas}}{\text{Número de trofozoítos inoculados}}$$

**B.- Cinéticas de crecimiento en presencia de citocalasina D o emetina.**

10<sup>4</sup> trofozoítos por tubo de las clonas silvestre y mutante se cultivaron en medio axénico BI-S-33<sub>x</sub> en ausencia y presencia de CD (5µg/ml) durante 96h; el número de trofozoítos se contó cada 12h en un hematímetro: una gota de la suspensión celular se colocó en el hematímetro y el número total de amibas que se contó se multiplicó por un factor de dilución de 1 X 10<sup>4</sup>, determinándose así la cantidad total de amibas por mililitro. Este mismo procedimiento se siguió para los experimentos con o sin emetina (10µg/ml conc. final) pero en este caso se contó el número de células cada 20h. Para CD los experimentos se hicieron por triplicado; para emetina por duplicado.

**9.-Eritrofagocitosis de E. histolytica.**

Colección de sangre.

Se aplicó un torniquete en el brazo de un donador de tipo Rh<sup>+</sup> y grupo sanguíneo (ABO) conocido. Con una jeringa (aguja 21 X 32 mm ) se obtuvieron 10ml de sangre por punción venosa. Se

quité la aguja para evitar la hemólisis y se vació inmediatamente en un tubo Falcon de 50ml el cual contenía 10 ml de solución anticoagulante de Alsever (Garvey y col., 1977); se tapó el tubo y se agitó suavemente la mezcla.

#### Lavado, obtención y almacenamiento del paquete globular.

La mezcla de sangre se centrifugó con solución de Alsever a 3000 r.p.m. durante 15 min en una centrífuga clínica (EQUIPAR). Los glóbulos rojos se lavaron por centrifugación bajo las mismas condiciones con 40ml de solución de NaCl 0.15M pH 7.4; después de cada centrifugación se quitó el sobrenadante líquido por aspiración así como el sedimento blanco (leucocitos) depositado sobre la pastilla de glóbulos rojos. Después de la última centrifugación, el paquete globular se resuspendió en solución de Alsever a una concentración de 80-90 % (v/v).

#### Experimento.

Los ensayos de eritrofagocitosis se realizaron de acuerdo a la técnica descrita por Trissl y col., (1978) con algunas modificaciones.

Los trofozoítos de las clonas X1 y G3 obtenidas en el presente trabajo, se desprendieron de los tubos por enfriamiento en hielo y se ajustaron en 10ml de medio BI-S-33<sub>x</sub> a una concentración de  $1 \times 10^6$  trofozoítos. El número de trofozoítos y

de glóbulos rojos (GR) se contó en un hematímetro.  $1 \times 10^9$  GR se suspendieron en 5ml de medio axénico BI-S-33<sup>x</sup>. A la suspensión tanto de trofozoítos como de GR la designamos como suspensión I.

8 ml de la suspensión I de las clonas silvestre y mutante se repartieron por partes iguales en tubos Falcon de 50ml (4 tubos en total) y se colocaron en un baño de agua a 37°C en agitación suave (suspensión II). A uno de cada pareja de tubos de las dos clonas se les agregó CD a una concentración final de 5µg/ml, manteniéndolos en el baño de agua hasta el momento de la interacción con los glóbulos rojos.

Al inicio del experimento se tomaron 1ml de la suspensión I y se agregaron a cada uno de los tubos con trofozoítos de la suspensión II. De cada uno de los tubos de la interacción trofozoítos-GR, se tomó 1 ml y se depositó en un tubo Falcon que contenía 30ml de H<sub>2</sub>O bidestilada con la finalidad de lisar los glóbulos rojos no adheridos; esto se hizo para los tiempos 0,5,10,15, y 30 min. respectivamente. Al término de los tiempos preestablecidos se tomó la alicuota de 1ml y se centrifugó inmediatamente (1000 r.p.m. 5min), para evitar la lisis de las amibas mutantes. Se quitó el sobrenadante de cada pastilla y se agregaron 0.5ml de glutaraldehído al 2.5% en una solución amortiguadora de fosfatos con pH 7.4 y se incubaron durante 30 min a 37°C. Después de este tiempo a cada tubo Falcon se le agregaron 40ml de NaCl 0.15M y se centrifugó; posteriormente las pastillas amibianas se contrastaron con diaminobenzidina

(Novikoff, y col., 1972) y se incubaron por 30min a 37°C . Los eritrocitos ingeridos por amiba se contaron en 100 amibas al azar , con la ayuda de un microscopio invertido OLYMPUS CK S041 a un aumento de 160X y se obtuvieron promedios para cada tiempo y clona.

#### 10.-Efecto citopático de E.histolytica sobre células MDCK en cultivo.

El efecto citopático de los trofozoítos de las clonas silvestre y mutante de E.histolytica sobre células en cultivo fue medido en función de la destrucción de monocapas confluentes de células de la línea MDCK . El procedimiento empleado fue similar al descrito por Mirelman, y col., 1984.

4 X 10<sup>5</sup> trofozoítos de cada una de las clonas se suspendieron previamente en medio modificado de Eagle (DMEM), se añadieron a cajas de cultivo de 24 pozos (3.5ml de capacidad por pozo). La caja contenía monocapas confluentes de células MDCK (4 X 10<sup>5</sup> células por pozo). La interacción se llevó a cabo durante 60 min a 37°C y posteriormente la caja se colocó en hielo por 15 min con la finalidad de que se despegaran los trofozoítos adheridos a las monocapas. Estas se lavaron tres veces con solución salina 0.15M pH 7.4; a cada pozo se le agregó 0.5ml de glutaraldehído al 2.5% en PBS pH 7.0 y la caja se colocó a 37°C durante 15 min . Se quitó el glutaraldehído y se añadió azul de metileno al 0.1% (en regulador de boratos 0.1M pH 8.7). El exceso

de colorante se quitó con 4 lavados con regulador de boratos (0.01M pH 8.7), se agregó 1ml de HCl 0.1M y se colocó la caja a 37°C durante 30 min; la cantidad de colorante extraído fue proporcional al número de células intactas que se mantuvieron adheridas a la multicámara de cultivo. La intensidad de color se midió a 660 nm haciendo diluciones apropiadas en HCl 0.1M. Las monocapas celulares que fueron expuestas a los trofozoítos de la cepa Laredo (*E. histolytica-like*) sirvieron como control (0% de destrucción). El experimento se llevó a cabo por triplicado en ausencia y presencia de CD (5µg/ml), en este último caso los trofozoítos se preincubaron durante 15 min a 37°C en presencia de la droga, antes de ponerlos en interacción con la monocapa celular.

## 11.-Métodos de separación electroforética.

### A) Electroforesis unidimensional .

#### i) Preparación de los extractos amibianos .

Trofozoítos de las clonas en estudio en fase logarítmica de crecimiento se cosecharon por centrifugación (1500 r.p.m./5 min) y se lavaron tres veces con una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4. Las pastillas amibianas se resuspendieron en 5ml de la misma solución y se contó el número de células; se volvieron a centrifugar obteniéndose pastillas amibianas con una densidad celular de  $1 \times 10^6$  células en diferentes tubos

ependorff, a cada tubo se le agregó 50µl de una solución de parahidroximercuribenzoato (p-HMB). Los paquetes celulares contenidos en cada tubo se agitaron vigorosamente en un vortex para lisar las células, se tomaron alicuotas de 5µl y se determinó la cantidad de proteína por el método de Bradford (1976). A las pastillas de cada uno de los tubos se les agregó un volumen igual de buffer de muestra 2X, se hirvieron durante 5 min y se guardaron a -20°C hasta el momento de hacer los geles en placa, para lo cual solo se les agregó 2-mercapto-etanol a una concentración final de 5% , se hirvieron durante 1 min y se colocaron en el gel correspondiente.

ii) Preparación de los geles.

Las proteínas totales de los trofozoítos de las clonas mutante y silvestre se separaron en geles de poliacrilamida al 10 y 12% según el método descrito por Laemli (1970). Se prepararon geles planos en placa de 15mm de espesor. Las concentraciones finales de los componentes de los geles fueron: para el gel concentrador, acrilamida (Bio-Rad) al 5% ; bis-acrilamida (Serva) 0.8% ; Tris (Sigma Chemical) 0.125M pH 6.8 ; SDS (Sigma Chemical) 0.1% . Para el gel separador la mezcla consistió de acrilamida al 10 o 12% bisacrilamida 0.8% , Tris 0.375M pH 8.8, SDS 0.1%. Se adicionaron además 100µl de persulfato de amonio (Bio-Rad) al 12.5% y 50µl de TEMED (Bio-Rad) al 10% por cada 10ml de mezcla, para catalizar la polimerización del gel. Se colocaron las muestras en los geles y se corrieron a

temperatura ambiente en una solución amortiguadora electrolítica de Tris 0.025M pH 8.3, glicina (Sigma Chemical) 0.192M, SDS 0.1% , a 100 volts 30min y despues a 125 volts hasta el término de tres horas y media.

## B) Electroforesis bidimensional.

### i) Primera dimensión.

Las proteínas de los extractos totales de las clonas silvestre y mutante se separaron por electroforesis bidimensional de acuerdo al método descrito por O' Farrell, 1975 y R. Bravo, 1984; agregando además triton X-100. Las proteínas se corrieron en la primera dimensión en geles cilindricos de 3mm de diámetro por 12cm de largo, la concentración final de los geles fue: urea (LKB) 9.5M, acrilamida 4%, NP-40 (LKB) 2% , triton X-100 (LKB) 2% y anfolinas (Bio-Rad) al 2% de intervalo de 5-7 y 3-10 ; para permitir la polimerización se adicionaron 10µl de persulfato de amonio al 10% y 7µl de TEMED por cada 10 ml de la mezcla. Encima de la solución del gel se colocó una solución de urea 8M para impedir que el gel se polimerizara con una interfase concava. Como solución electrolítica de corrida se empleó en la camara del cátodo NaOH (Baker) 0.02M y en la camara del ánodo  $H_3PO_4$  (baker) 0.01M. La solución de corrida del cátodo se desgasificó durante seis horas conectandola directamente al vacío para evitar la formación de bicarbonatos . Los geles se precorrieron 15min a 200 V, 30min a 300 V y 30 a 400 V, despues

de lo cual se aplicó la muestra de proteína previamente disuelta en una solución amortiguadora de lisis que contenía urea 9.5M, NP-40 2%, triton X-100 2%, 2-mercaptoetanol 5% y anfolinas 5-7 2% y 3-10, 1.6% (buffer A<sup>1</sup>). La concentración de proteína fue de 1 a 2µg/µl aplicándose un máximo de 100µg por gel. Sobre la muestra se colocaron 10µl de una solución de urea 9M y anfolinas al 1% y encima la solución de corrida evitando que se mezclaran las soluciones. Los geles se corrieron 16h a 400V. Al finalizar la corrida, los cilindros se sacaron de la varilla de vidrio inyectando aire y se colocaron para equilibrarlos en una solución que contenía tris 0.0625M, glicerol (Sigma Chemical) 10% , 2-mercaptoetanol 5% , SDS 2.3% durante 20 min. Finalmente se procedió a correr las proteínas en la segunda dimension o se almacenaron los cilindros a -20°C hasta su uso.

ii) Segunda dimensión .

Para separar las proteínas en la segunda dimensión, se prepararon geles de poliacrilamida al 12% según se describió previamente y en la superficie del gel se colocó el gel cilíndrico en donde previamente se habían corrido las proteínas en la primera dimensión. Para unir los geles, se cubrió el cilindro y la superficie del gel plano con una solución de agarosa (Seakem) al 1% , tris 0.0625M pH 6.8, glicerol 10% , 2-mercaptoetanol 5% , SDS 2.3% y azul de bromofenol (LKB) 0.001% . La agarosa se dejó secar y se corrió el gel en la solución amortiguadora descrita para geles de acrilamida . Los geles se

corrieron 1.5 horas a 100 V hasta que el azul de bromofenol alcanzó el gel separador y despues se incrementó el voltaje a 125V por 3 horas mas. Una vez finalizada la corrida, los geles se tiñeron con azul de Coomasie al 0.25% , se destiñeron (con una solución de metanol y ácido acético en una relación 5:4 , seguida con ácido acético al 10%) y/o se procesaron para fluorografía según se describirá posteriormente.

## 12.- Cinética de incorporación de metionina <sup>35</sup>S in vivo.

Para estudiar la síntesis de proteínas de las clonas X1 y G3 ,  $5 \times 10^4$  trofozoítos/tubo de cada clona se preincubaron en medio axénico sin cisteína durante 16h , despues de lo cual se lavaron y se resembraron en el mismo medio suplementado con  $2.4 \mu\text{Ci/ml}$  de <sup>35</sup>S-metionina ( $1220 \text{ Ci/mmol}$  , Amersham), tomándose muestras alícuotas cada 12h , hasta 36h . Dichas muestras se fraccionaron en dos partes: una (fraccion A) para medir la radioactividad y la otra (fraccion B), para ser procesada en geles verticales de poliacrilamida-SDS al 10% ; a esta ultima fracción se le adicionó disopropilfluorofosfato(DIFP)  $5\text{mM}$  , leupeptina  $10\mu\text{M}$  y N-etil-maleimida (NEM)  $5\text{mM}$ . Las bandas de proteína se revelaron primero por tinción con azul de Coomassie y se procesaron posteriormente para autorradiografía.

La radiactividad incorporada en las células se midió como material TCA precipitable llevándose a cabo como se describira más adelante.

La determinación de las concentraciones de proteína, se hizo según el método de Bradford (Bradford,1976), usando como patrón albúmina sérica bovina (Sigma Chemical).

i) Medida de la radioactividad incorporada en macromoléculas precipitadas con TCA.

Para cuantificar la radioactividad incorporada en macromoléculas, la fracción A se lavo 2 veces con medio G.D.; la pastilla se suspendió en TCA al 10% y se guardó a  $-70^{\circ}\text{C}$  en cada uno de los tiempos. Posteriormente, alícuotas por triplicado de cada tiempo y clona, se depositaron en cuadritos de papel Whatman : los cuadritos se secaron con una pistola de aire común, para sumergirlos despues en TCA al 10% durante 30min y enjuagarlos con TCA al 5%, todo a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se depositaron en un recipiente con agua y se hirvieron durante 15min en TCA al 5% . Despues de hervirlos se enjuagaron 2 veces con TCA al 5% frío; se lavaron tres veces con etanol absoluto, una con etanol-eter (1:1) y finalmente con eter. Los cuadritos de papel con las muestras de proteína precipitadas, se secaron con la pistola de aire y se introdujeron cada uno en viales de vidrio conteniendo 5ml de liquido de centelleo (aquasol).

La radioactividad incorporada se midió en un contador de centelleo líquido modelo TRI-CARB 460C.

ii) Procesamiento de los geles de acrilamida para

fluorografía.

Para observar el patrón de proteínas de los extractos totales de las clonas marcadas con  $^{35}\text{S}$ -metionina, los geles se procesaron para fluorografía de acuerdo al método de Bonner y Laskey (1974).

Después de teñir y desteñir los geles, se colocaron por dos veces durante media hora cada vez en DMSO, después en una solución de PPO al 22.5% en DMSO durante tres horas, posteriormente en agua y finalmente se secaron en un secador de geles (Lab-Line) durante una hora. Una vez seco el gel, se puso en contacto con una placa de rayos X (Kodak XR-5 OMAT), por tiempo variable. Generalmente las bandas conteniendo  $1 \times 10^5$  c.p.m. fueron visibles en 24h. Para almacenar las placas, se utilizaron portaplacas protegidos de la luz que se colocaron a  $-70^\circ\text{C}$ . El revelado de las placas se realizó en la oscuridad, colocándolas en revelador para rayos X (Kodak) 3.5 min, luego el fijador (Kodak) otros 3.5 min, y por último se enjuagaron en agua corriente.

## RESULTADOS

### 1.- Selección de bacterias Thy<sup>-</sup> .

La obtención de las mutantes auxotróficas para timina se muestra en el esquema metodológico de la figura 1 . De las 17 mutantes auxotróficas de la bacteria Salmonella typhimurium LT-2 que se obtuvieron en este trabajo (como se mencionó en la sección anterior ), estas presentaron diferencias en su crecimiento en relación a la cantidad de timina (tabla 1). Como se puede observar, las cepas 1,2,7,21 y 171, tuvieron un crecimiento óptimo en medio mínimo suplementado con timidina a una concentración de 50µg/ml. Aunque las demás cepas tienen un crecimiento óptimo similar a una concentración mayor de timidina (200µg/ml), para los fines de este trabajo, nos interesaba una mutante bacteriana auxotrófica con fenotipo Thy<sup>-</sup> y genotipo thy A .

El siguiente paso fue elegir la cepa bacteriana que mejor creciera en BrdUr . Cada una de las cepas se sembraron en medio Gmin ; Gmin+Thy(50µg/ml) y Gmin+BrdUr(50µg/ml); solo 2 cepas mostraron buen crecimiento con BrdUr en lugar de timidina aunque no fue similar al crecimiento mostrado en Gmin+Thy y en medio rico (AN+Thy). Con estos resultados (tabla II), se eligió la cepa 7(SM-7) la cual utilizamos posteriormente como vehículo en la selección de los trofozoítos deficientes en fagocitosis.

- I) CRECIMIENTO EN MEDIO Gmin
  
- II) MUTAGENESIS CON NTG
  
- III) SELECCION CON TRIMETROPRIM  
EN MEDIO LIQUIDO
  
- IV) SELECCION POR LA TECNICA DE  
REPLICA EN PLACA
  
- V) PRUEBAS DE REVERSION CON NTG

Salmonella typhimurium Thy<sup>-</sup>  
seleccion de SM-7

FIGURA 1  
AISLAMIENTO DE BACTERIAS Thy<sup>-</sup>.

TABLA I

OPTIMIZACION DEL CRECIMIENTO DE *Salmonella typhimurium* LT-2  
Thy<sup>-</sup> A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TIMIDINA.

CEPA	Gmin	Gmin + Thy (µg/ml)			
		5	25	50	200
1	X*	X	++	++++	++++
2	X	X	++	++++	++++
7	X	X	++	++++	++++
10	X	X	+	++	++++
20	X	X	+	++	++++
21	X	x	++	++++	++++
52	X	X	+	++	++++
80	X	X	+	++	++++
93	X	X	+	++	++++
102	X	X	+	++	++++
104	X	X	+	++	++++
112	X	X	+	++	++++
117	X	X	+	++	++++
152	X	X	+	++	++++
155	X	X	+	++	++++
171	X	X	++	++++	++++
177	X	X	+	++	++++

\*No hubo crecimiento bacteriano.

TABLA II

CRECIMIENTO DE *S typhimurium* LT-2 Thy<sup>-</sup> en presencia de BrdUr

MEDIO	CEPA				
	1	2	7	21	171
Gmin	X*	X	X	X	X
Gmin + Thy	++++	++++	++++	++++	++++
Gmin+BrdUr	+	+	+++	+	++
AN + Thy	++++	++++	++++	++++	++++

\* No hubo crecimiento bacteriano.

## 2.- Obtención de trofozoítos deficientes en fagocitosis.

El método de selección empleado en el aislamiento de subpoblaciones de trofozoítos deficientes en fagocitosis está basado en el esquema descrito por M. Clarke (1978) para la obtención de mutantes de motilidad de Dictyostelium discoideum. Después del tratamiento mutagénico y de la selección de trofozoítos negativos en fagocitosis (fig 2), se obtuvo una población heterogénea enriquecida en células con una capacidad eritrofagocítica disminuida, en un tiempo de interacción de 30min. La eritrofagocitosis mostrada por esta población de trofozoítos, de manera indirecta nos indicó su deficiencia en movilidad. La fig. 3 nos muestra la diferencia marcada de la capacidad eritrofagocítica de la población mutagenizada en relación a la cepa silvestre.

## 3.- Aislamiento de poblaciones amibianas resistentes a CD.

Se ha encontrado que al tratar los trofozoítos de E histolytica con citocalasina B (CB), droga que altera las células porque inhibe la polimerización de los microfilamentos de actina (Weihsing, 1978), se puede reducir la movilidad, así como los movimientos intracelulares (Michel y Hohmann, 1979) y disminuir la virulencia de ciertas cepas de Entamoeba (Ravdin, y col., 1982).

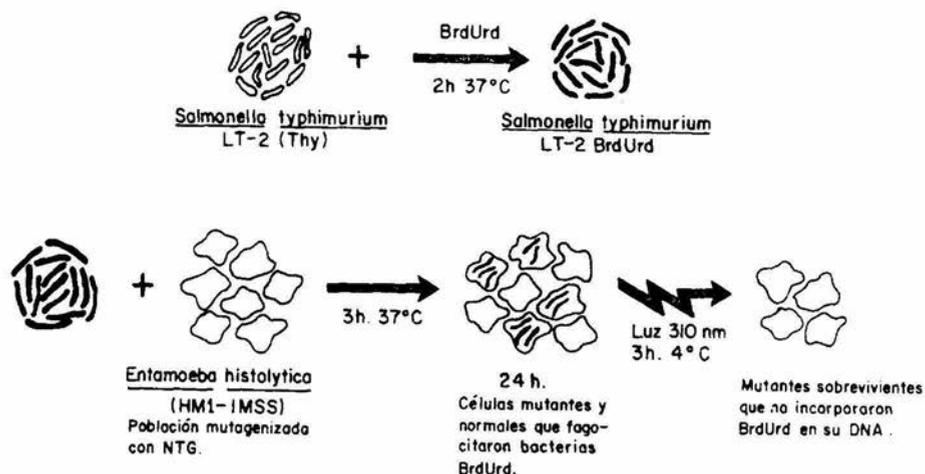


FIGURA 2

ESQUEMA DE LA OBTENCION DE TROFOZOITOS DEFICIENTES EN FAGOCITOSIS (Clarke, 1978).

*Salmonella typhimurium* SM-7, se incubó durante 2h a 37°C en presencia de BrdUrd, despues se puso en interacción (3h a 37°C) con trofozoitos que previamente habían sido mutagenizados con NTG. La suspensión de amibas-bacteras se incubó en medio axénico durante 24h a 37°C para permitir la replicación de los trofozoitos y la incorporación de BrdUrd en su DNA; posteriormente la población fue irradiada con luz de 310nm. Los trofozoitos que no ingirieron bacterias "envenenadas", por lo que no incorporaron BrdUrd en su DNA, y que sobrevivió por lo tanto a la irradiación constituyó a la población deficiente en fagocitosis.

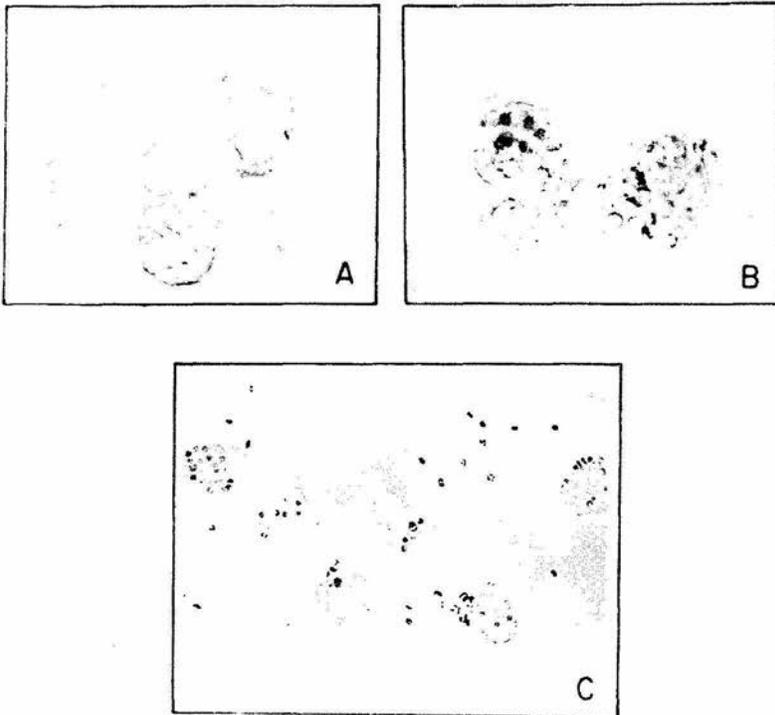


FIGURA 3

DEFICIENCIA ERITROFAGOCITICA DE TROFOZOITOS.

Trofozoítos de *E. histolytica*, de la población mutagenizada y de la cepa silvestre, se pusieron en interacción con GR (1:100) durante 30 min. a 37°C en tubos cónicos. Después del tiempo de interacción, se agregó agua bidestilada para lisar los GR adheridos a la superficie de los trofozoítos. Las suspensiones celulares se lavaron tres veces con PBS pH 7.4 y finalmente se suspendieron en glutaraldehído al 2.5% en PBS, se tomaron alícuotas depositándolas en portaobjetos y se observaron al microscopio. Panel A (60X):Cepa HM1-IMSS sin GR. Panel B (60X):Cepa HM1-IMSS con GR. Panel C (40X): población mutagenizada deficiente en fagocitosis proveniente de la cepa HM1-IMSS.

Teniendo como antecedente la función de la CB, aunado al interés particular por encontrar un marcador de estudio que nos permitiese delucidar la relación de la proteína actina con fenómenos de motilidad, se tomó como modelo experimental el procedimiento empleado por Toyama y Toyama (1984) en la selección de células KB resistentes a CB, pero usando CD la cual es más potente que la CB (Yahara y col., 1982).

Como se mencionó en la sección de materiales y métodos, a partir de la población heterogénea deficiente en movilidad obtenida del tratamiento mutagénico y de selección negativa, se obtuvo una subpoblación (denotada como subpoblación "B"), capaz de resistir 19 pasajes alternados en ausencia y presencia de CD a una concentración final de 5µg/ml. La fig.4 muestra la curva de crecimiento de la cepa HMI-IMSS y de la subpoblación "B" en ausencia y presencia de CD a una concentración final de 5µg/ml. La velocidad de crecimiento en ausencia de la droga, mostró un tiempo medio generacional de 17h y de 18h para la cepa silvestre y subpoblación "B" respectivamente. En presencia de la droga la primera empezó a morirse desde las primeras horas, mientras que la subpoblación "B" siguió creciendo, aunque más lenta (tiempo de generación de 25h). Con estos resultados procedimos a clonar en medio semisólido sin CD las dos cepas en estudio con la finalidad de trabajar con poblaciones homogéneas.

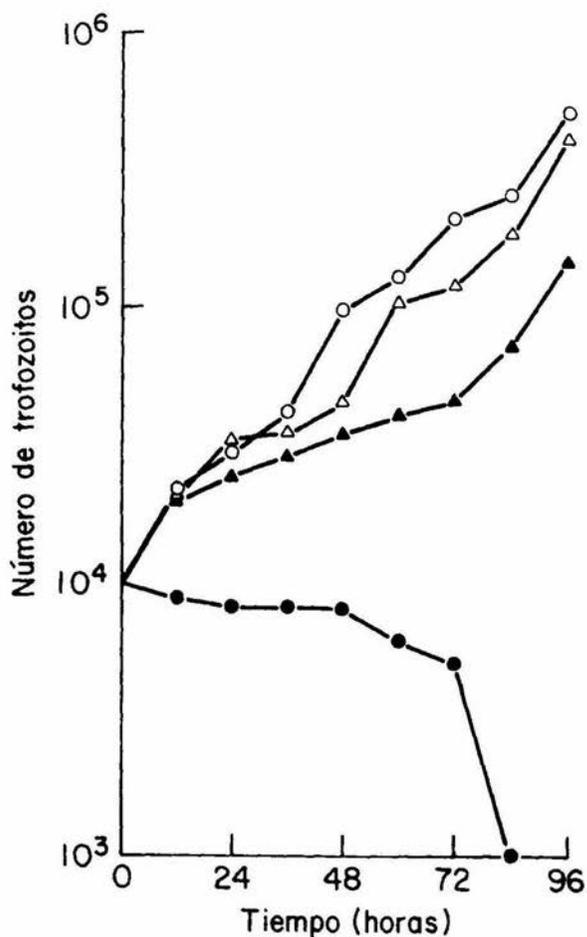


FIGURA 4

CURVA DE CRECIMIENTO DE *Entamoeba histolytica*.

10<sup>4</sup> trofozoítos de la cepa silvestre y subpoblación "B" se incubaron en medio axénico BI-S-33<sub>x</sub>. Cada 12h se contó el número de trofozoítos en un hematímetro. Cepa HM1-IMSS en ausencia (○) y presencia (●) de 5µg/ml de CD; subpoblación "B" (proveniente de la HM1-IMSS) en ausencia (△) y presencia (▲) de la droga.

Después de la clonación, se seleccionaron las clonas G3 (de la subpoblación "B") y X1 de la cepa HM1-IMSS para su posterior caracterización en el presente trabajo.

#### 4.- Crecimiento de Entamoeba histolytica en medio semisólido.

Como ya se mencionó anteriormente, con la finalidad de obtener poblaciones homogéneas, la cepa HM1-IMSS y la subpoblación "B", se clonaron en agar semisólido de acuerdo a la técnica descrita por Gillin y Diamond (1978), en presencia y ausencia de CD (5µg/ml) y de esta manera se aislaron varias colonias de las cuales se seleccionaron 2 (de la cepa silvestre y de la subpoblación "B"). El crecimiento en agar semisólido con CD siempre fue nulo para las 2 cepas; en ausencia de la droga, la cepa HM1-IMSS, mostró una EFC de 19.33% mientras que las clonas aisladas de la subpoblación "B" mostraron diferentes EFC (tabla III). En la tabla III se muestra la sensibilidad a CD de 5 clonas resistentes a esta droga con respecto a una clona de la cepa silvestre. Los experimentos subsiguientes se efectuaron solo para las clonas X1 (de la cepa silvestre) y G3 (obtenida de la subpoblación "B").

TABLA III

SENSIBILIDAD A CD EN MEDIO LIQUIDO DE LAS CLONAS OBTENIDAS EN AGAR SEMISOLIDO.			
CLONA	EFC (%)	BI-S-33 x + CD	BI-S-33x S/CD
X1 <sub>a</sub>	19.33	nulo	+++++
63 <sub>b</sub>	1.75	+++++	+++++
31 <sub>b</sub>	9.75	++++	+++++
33 <sub>b</sub>	9.75	++++	+++++
51 <sub>b</sub>	12.00	++++	+++++
53 <sub>b</sub>	12.00	+++	+++++
54 <sub>b</sub>	12.00	+++	+++++

- a. Clona de la cepa silvestre HM1-IMSS.  
 b. Clonas obtenidas de la subpoblacion "B",  
 resistentes a 5µg/ml de CD.

### 5.- Crecimiento poblacional de Entamoeba histolytica en ausencia y presencia de CD o emetina.

Una vez obtenidas las clonas X1 y G3 , fue necesario caracterizar el crecimiento en ausencia y presencia de CD (5µg/ml). En ausencia de CD, las clonas X1 y G3 tuvieron un tiempo generacional de 20h y 22h respectivamente. En presencia de la droga, la primera murió entre 12 y 24h, mientras que la mutante G3 creció, aunque mas lenta que en el medio sin la droga con un tiempo de generacion de 29h (fig 5).

Tambien se decidió probar la sensibilidad de ambas clonas a emetina (10µg/ml), experimento que se hizo en paralelo al anterior . La velocidad de crecimiento de las clonas X1 y G3 en presencia de emetina (10µg/ml), fue muy similar mostrando una evidente sensibilidad a esta droga (fig 6).

### 6.- Eritrofagocitosis.

La fagocitosis es una de las principales funciones que aunque de manera indirecta puede correlacionarse con la virulencia del protozoario parasito E.histolytica. Se ha logrado pues establecer una correlación entre la tasa fagocitica y la virulencia de diferentes cepas amibianas (Trissl, y col.,1978; Drozco, y col.,1980). En amibas patógenas de vida libre ya se ha reportado también (Visvesvara, y col.,1974), que la fagocitosis es uno de los procesos celulares importantes que utiliza el parásito durante la agresión hacia los tejidos.

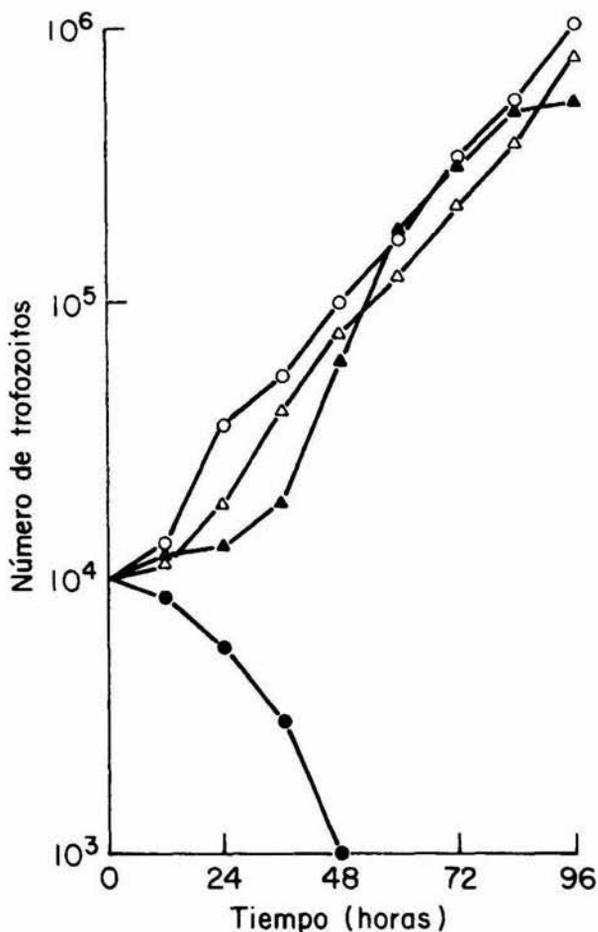


FIGURA 5

CRECIMIENTO POBLACIONAL DE LAS CLONAS X1 Y G3 (cepa HM1-IMSS) EN AUSENSIA Y PRESENSIA DE CD.

10<sup>4</sup> trofozoítos de cada una de las clonas se cultivaron en medio axénico BI-S-33<sub>x</sub> en ausencia y presencia de CD (5µg/ml) durante 96h. La curva se construyó con el promedio de 2 tubos para cada clona, contando los trofozoítos cada 12h en un hematímetro, los experimentos fueron por triplicado. Clona X1 en ausencia (O) y presencia (●) de 5µg/ml de CD ; clona G3 en ausencia (Δ) y presencia de la droga (▲).

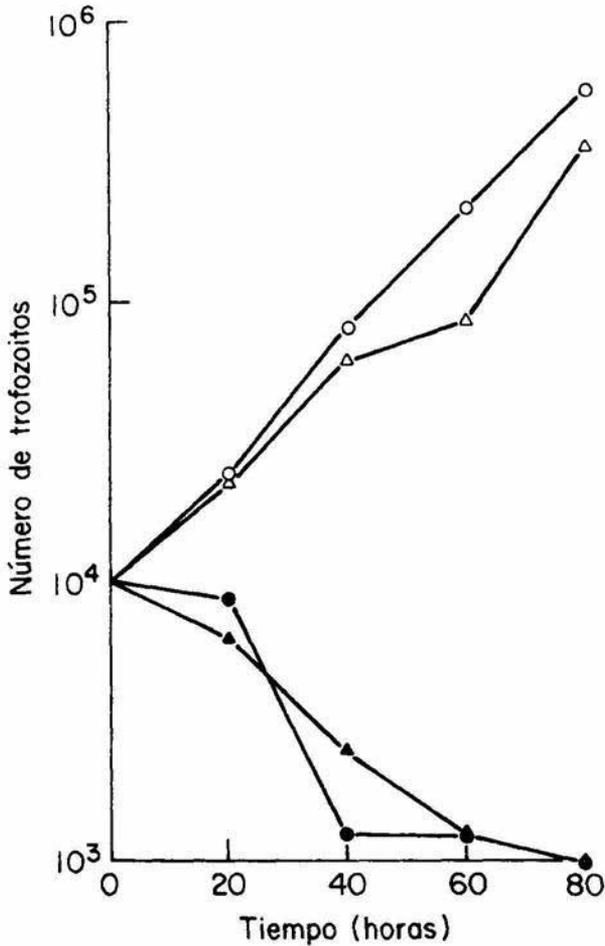


FIGURA 6

CRECIMIENTO POBLACIONAL DE LAS CLONAS X1 Y G3 (cepa HM1-IMSS) EN AUSENSIA Y PRESENCIA DE EMETINA.

10<sup>4</sup> trofozoítos de cada una de las clonas se cultivaron en el medio axénico BI-S-33<sub>x</sub> en ausencia y presencia de emetina (10µg/ml concentración final). Cada 20h se contó en un hematómetro el número de células. La curva se construyó con el promedio de 2 tubos para cada clona en ausencia y presencia de la droga; los experimentos fueron por duplicado. Clona X1 en ausencia (O) y presencia (●) de emetina; clona G3 en ausencia (Δ) y presencia (▲) de la droga.

El fenómeno de eritrofagocitosis ha sido considerado tradicionalmente por varios autores como el principal criterio de laboratorio para la identificación de amibas patógenas (W.H.O.,1969; Wilcoks,y col.,1972) y actualmente se sabe que existe cierta dependencia entre la competencia fagocítica y la virulencia de la amiba en vivo (Drozco, y col.,1983). Se ha encontrado que este fenómeno, precede al evento inicial que es la adhesión . Juntos o por separado los 2 procesos son inhibidos por las citocalasinas (Ravdin,1981; Lopez-Revilla,1982), indicándonos que se requiere una participación dinámica del citoesqueleto de la amiba. Si la actina es el blanco de la droga, podemos inferir que se requiere de la participación de la actina a diferentes niveles, para que se lleve a cabo la adhesión y la fagocitosis.

En el presente estudio el evento fagocítico de glóbulos rojos de humano, se midió en las clonas silvestre y mutante derivadas de E.histolytica HM1-IMSS, en ausencia (A) y presencia (P) de CD (5µg/ml concentración final). La figura 7 nos muestra la eritrofagocitosis de las clonas X1 y G3 a diferentes tiempos (0,5,10,15 y 30 min). La eritrofagocitosis de la clona X1 (barras claras) aumento con el tiempo en forma gradual en ausencia de la droga; en presencia de esta, el fenómeno se ve inhibido en un 85% a los 30 min . La clona mutante G3 (barras con diagonales), mostró una tasa eritrofagocitica disminuida en aproximadamente un 68% y 70% a los 30 min, en ausencia y presencia de la droga.

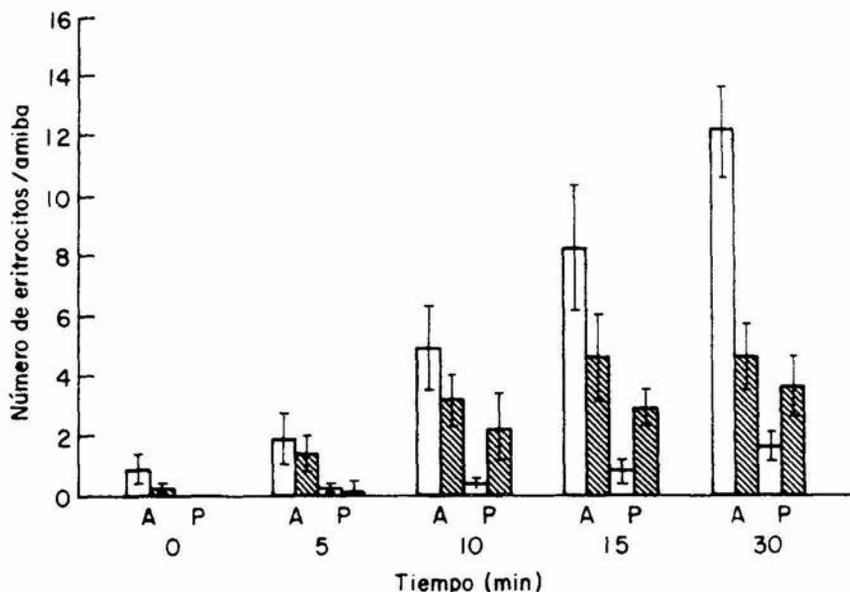


FIGURA 7

ERITROFAGOCITOSIS DE LAS CLONAS X1 G3 DE *E. histolytica* A DIFERENTES TIEMPOS .

En tubos cónicos a 37°C, se agregaron 8ml de suspensión de trofozoítos ( $2 \times 10^7$ /ml) y 4ml de suspensión de eritrocitos en PBS pH 7.4 ( $8 \times 10^7$ /ml). A diferentes tiempos se tomaron alícuotas de 1ml y se depositaron en tubos cónicos que contenían 30ml de agua bidestilada para lisar los eritrocitos en suspensión y adheridos a la superficie de los trofozoítos. Las preparaciones se fijaron con glutaraldehído (2.5%), se contrastaron con diaminobencidina y se contaron los eritrocitos ingeridos por 100 amibas. Se obtuvieron los promedios de eritrocitos por amiba para cada tiempo y clona . Clona X1 ( barras claras ) ; clona G3 (barras con diagonales). (A) ausencia ; (P) presencia de 5µg/ml de CD.

## 7.- Efecto citopático.

Se ha reportado (Drozco,1981), que los cultivos de células epiteliales de la línea MDCK son un modelo adecuado para medir en forma cuantitativa los efectos destructivos de las cepas de E.histolytica. Esto a raíz de que los cultivos confluentes de las células MDCK forman una capa continua de células con características de epitelio cuboidal simple, unidas por contactos de tipo hermético; la capa epitelial así constituida muestra propiedades de permeabilidad y de transporte, semejantes a los llamados epitelios de transporte. En este trabajo, los ensayos se llevaron a cabo interaccionando trofozoitos de las clonas X1 y G3 con monocapas de la línea celular antes mencionada en ausencia (A) y presencia (P) de CD . En este último caso los trofozoitos de las dos clonas en estudio se preincubaron con la droga como se describió en la sección de Materiales y Metodos.

Como se puede observar en la figura 8, después de 60 min de interacción, la clona X1 (barra clara), destruyó en su totalidad la monocapa celular, mientras que la clona G3 (barra con diagonales), mostró una disminución de un 46% en el grado de destrucción. Cuando los trofozoitos de las dos clonas se preincubaron con la droga, el efecto de la clona X1 se vió abatido drásticamente (93% de inhibición), mientras que la clona G3 mostró un efecto similar que en ausencia de CD (38% de inhibición).

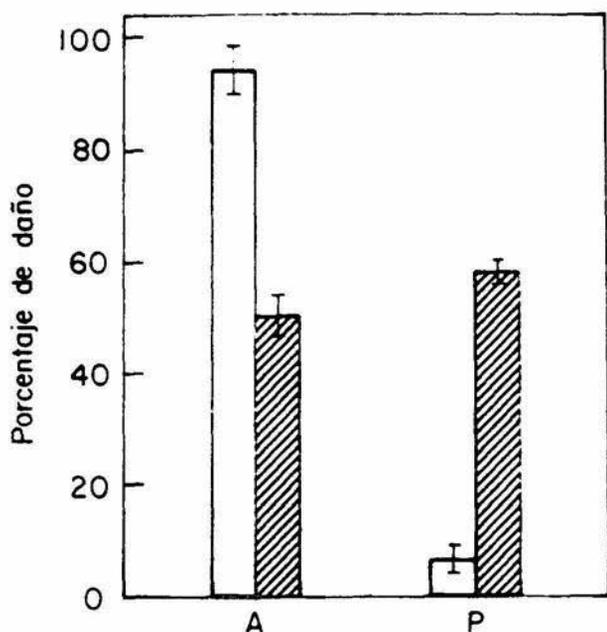


FIGURA 8

EFFECTO CITOPATICO DE LOS TROFOZOITOS DE LAS CLONAS X1 Y G3 DE *E.histolytica* SOBRE CULTIVOS DE CELULAS EPITELIALES DE LA LINEA MDCK.

Trofozoítos de las clonas X1 y G3 se pusieron en contacto con monocapas confluentes de células de la línea MDCK en relación 1:1. Las preparaciones se incubaron a 37°C durante 1 hora (para los ensayos en presencia se preincubaron los trofozoítos en medio axénico 15min con 5µg/ml de CD), se separaron los trofozoítos por enfriamiento en hielo y se fijaron con glutaraldehído (2.5%); la destrucción de la monocapa se midió espectrofotométricamente como se describió en Materiales y Metodos.

B.- Patrones electroforéticos de proteínas totales de las clonas X1 y G3 .

i) Electroforesis unidimensional.

La estrategia de conocer el patrón electroforético de los componentes proteicos de los trofozoítos, puede servir como base para analizar posteriormente su distribución en los organelos y otras estructuras subcelulares, así como definir su presencia en fracciones celulares ambianas con actividad biológica de interés (por ejemplo tóxica o antigénica), la que podría ser usada tal vez como un criterio taxonómico general.

El interés particular por conocer el patrón electroforético de las clonas en estudio, también coincide con lo anterior, pero además, se hizo con la finalidad de observar la disposición de las proteínas de la clona G3 separadas por su peso molecular y compararlas con la clona X1 de la cepa silvestre y de esta forma poder apreciar principalmente en lo posible alguna diferencia en la proteína actina . La figura 9 señala el patrón electroforético de las proteínas de los extractos celulares de las dos clonas.

No se encontró diferencia en la banda correspondiente a actina; sin embargo, se encontró significativamente disminuida una proteína con PM de 87,000 daltones así como el incremento de un péptido de PM de 21,000 daltones.

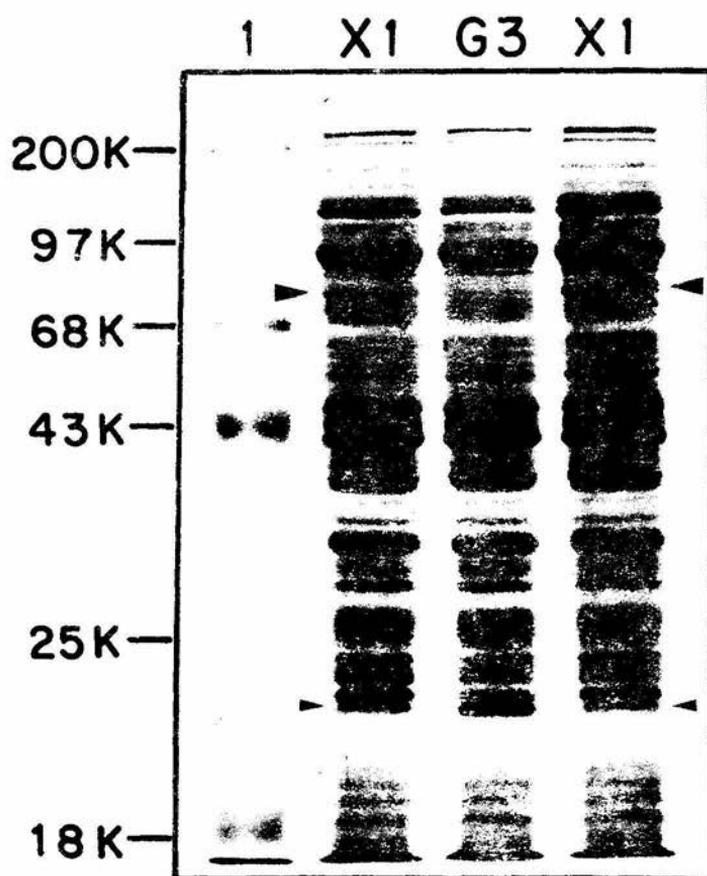


FIGURA 9

PATRON ELECTROFRETICO UNIDIMENSIONAL DE PROTEINAS TOTALES DE LAS CLONAS X1 Y G3 SEPARADAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS.

60µg de extractos totales de *E. histolytica* HM1-IMSS clonas X1 (carriles 2 y 4) y G3 (carril 3), se separaron de acuerdo a su peso molecular. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie. en el carril 1 los marcadores de peso molecular que corresponden a: miosina (cadena H) (200K), fosforilasa B (97K), seroalbúmina bovina (68K), ovoalbúmina (43K),  $\alpha$ -quimotripsinógeno (25K) y  $\beta$ -lactoglobulina.

ii) Electroforésis bidimensional .

El criterio que seguimos para completar el análisis electroforético de la clona mutante G3 con respecto a la clona de la cepa silvestre X1, fue el obtener extractos proteínicos totales de ambas clonas y separar las proteínas de estas por su punto isoeléctrico . El objetivo principal en esta parte del trabajo, fue buscar alguna variante isoeléctrica en la actina de la clona G3 con respecto a la de la clona X1 . La figura 10 nos muestra los geles bidimensionales con los resultados obtenidos , mismos que no revelan en la clona mutante G3 diferencia alguna en la proteína actina.

9.- Incorporación de metionina <sup>35</sup>S en las clonas X1 y G3 .

Como una forma de medir la síntesis de proteínas de las clonas X1 y G3 , se comparó la incorporación de metionina-<sup>35</sup>S en ambas . La medición de las c.p.m. se hizo en material TCA precipitable . Los resultados anteriores no mostraron diferencias en la incorporación de metionina-<sup>35</sup>S de la clona X1 de la cepa silvestre comparado con la incorporación en la clona mutante G3 (fig 11).

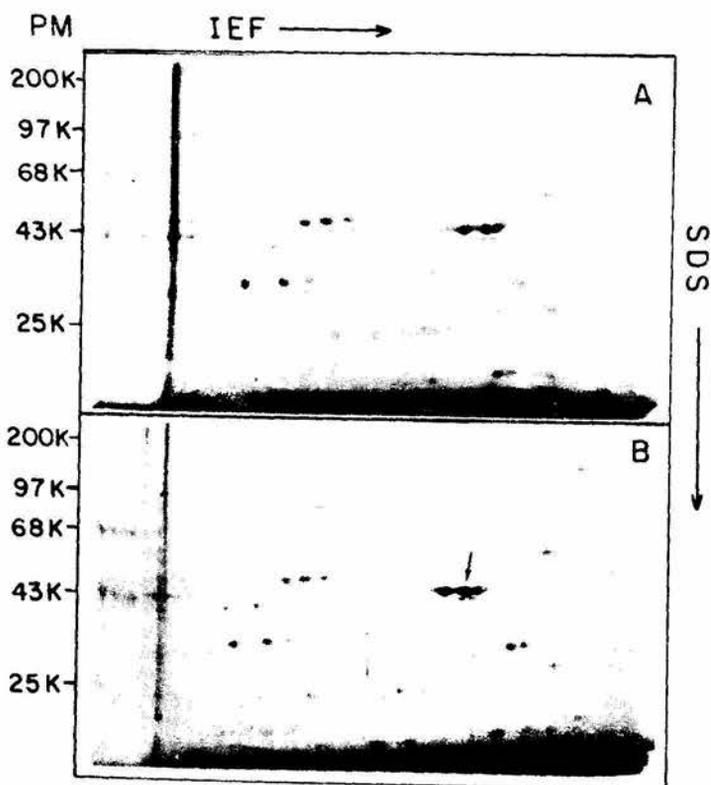


FIGURA 10

PATRON ELECTROFORETICO BIDIMENSIONAL DE PROTEINAS TOTALES DE LAS CLONAS X1 Y G3 SEPARADAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS.

100µg de extractos totales de *E. histolytica* HM1-IMSS clona X1 (panel A) y G3 (panel B), se separaron primero por su punto isoeléctrico (IEF) y posteriormente por su peso molecular (SDS) como se indica en el capítulo de Métodos. Los geles se tiñeron con azul Coomassie. La flecha indica la actina en la clona G3 (panel B). La figura indica también los pesos moleculares anotados en miles de daltones.

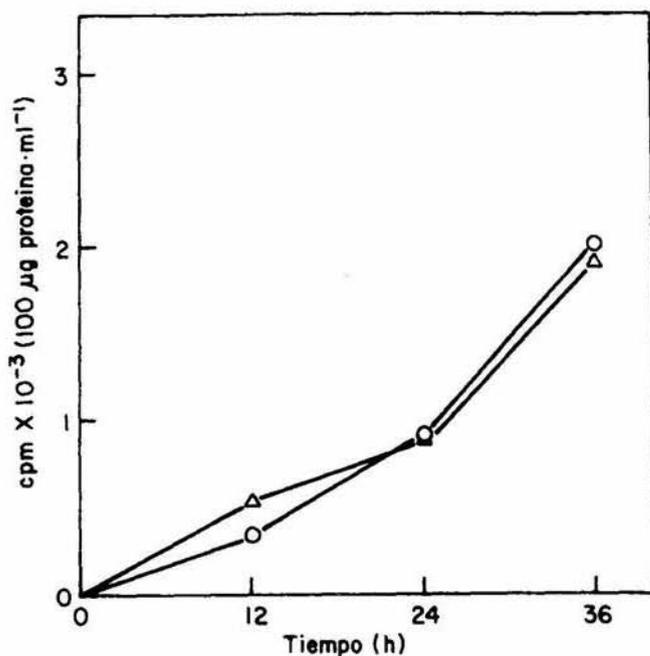


FIGURA 11

INCORPORACION DE METIONINA-<sup>35</sup>S DE LAS CLONAS X1 Y G3 .

La incorporación en macromoléculas de metionina-<sup>35</sup>S se midió *in vivo* en las clonas X1 y G3 (cepa HM1-IMSS), preincubadas en medio axénico sin cisteína durante 16h e incubadas posteriormente en presencia de 2.4µCi/ml de metionina-<sup>35</sup>S. Cada 12h se determinó la radioactividad incorporada en material TCA precipitable. Clona X1 (O) ; clona G3 (Δ).

**10.- Análisis electroforético unidimensional de los extractos proteínicos totales marcados con metionina-<sup>35</sup>S en las clonas X1 y G3 .**

Se analizó también el patrón de proteínas de las clonas X1 y G3 marcados metabólicamente con metionina-<sup>35</sup>S y de este modo poder comprobar si había diferencias en la síntesis de alguna de las proteínas y de manera particular en la actina.

La cinética de incorporación con metionina-<sup>35</sup>S se determinó a diferentes tiempos . La fracción B resultante (como se indica en Metodos), de cada una de las clonas se corrió en un gel vertical al 10% de acrilamida-bisacrilamida-SDS, el cual se sometió al tratamiento de DMSO-PPD para poderlo secar y exponerlo a una placa de rayos X, con el fin de obtener la respectiva autorradiografía.

La figura 12 muestra la autorradiografía. Los resultados no mostraron diferencias en la actina como se observa en el patrón electroforético de las proteínas marcadas con metionina-<sup>35</sup>S en las clonas X1 y G3 (cepa HM1-IMSS), sin embargo se confirma la disminución de un péptido de 87,000 daltones así como el incremento del péptido de 21 kd.

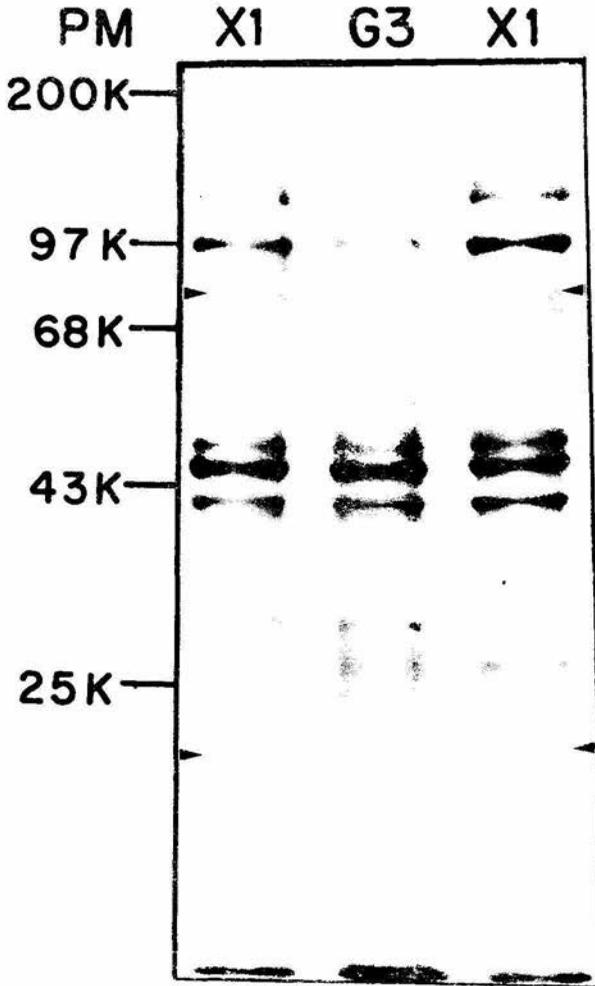


FIGURA 12

PATRON ELECTROFORÉTICO UNIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS DE LAS CLONAS X1 Y G3 MARCADAS CON METIONINA-<sup>35</sup>S .

La figura muestra una fotografía de la autorradiografía obtenida de un gel de poliacrilamida-SDS al 10%. Las proteínas marcadas con metionina-<sup>35</sup>S de la fracción B (como se indica en Métodos), se separaron de acuerdo a su peso molecular y el gel obtenido se expuso a una placa de rayos X como también se indica en la sección de Métodos. Carriles 1 y 3, extractos marcados de la clona X1. Carril 2 extractos marcados de la clona G3. Los pesos moleculares están anotados en miles de daltones.

### VIII.-DISCUSION DE RESULTADOS

En este trabajo se aislaron mutantes de la cepa HM1-IMSS de E.histolytica resistentes a citocalasina D y se caracterizó parcialmente una de ellas (la clona 03).

Para el aislamiento de estas mutantes se empleó un procedimiento de mutagénesis con nitrosoguanidina y selección de mutantes defectuosas en fagocitosis similar al descrito para Dictyostelium discoideum, por M.Clarke en (1978). Esta técnica de selección negativa ha sido utilizada también en la obtención de mutantes espontáneas para movilidad en Entamoeba histolytica (Orozco y col.,1982) y mas recientemente para obtener clonas que presentan diferencias en adhesión, fagocitosis y virulencia (Orozco y col.,1985<sup>b</sup>).

En nuestro trabajo, como una manera de incrementar la probabilidad de mutación para procesos celulares que dependen de motilidad, empleamos el mutágeno NTG.

Este es uno de los mas potentes agentes alquilantes,mutágeno (y carcinógeno) usado ampliamente en cultivos bacterianos, donde se ha demostrado que actua en el punto de replicación del DNA, pudiendo originar mutaciones múltiples (Cerdeira-Olmedo y col.,1968).

En células eucarióticas, la nitrosoguanidina ha sido utilizada en la inducción de diversos tipos de mutantes de

levaduras, líneas celulares, protozoarios, etc., (Guichner y Veleminsky, 1982).

En la presente tesis, la población de trofozoítos obtenida después del tratamiento con nitrosoguanidina, resultó en una proporción mayor de mutantes, de tal manera que después de la selección para fagocitosis, encontramos una diferencia marcada en la capacidad eritrofagocítica en la población mutagenizada con respecto a la cepa silvestre (fig 3). La eritrofagocitosis disminuida que mostró esta población de trofozoítos, de manera indirecta nos indicó su deficiencia en procesos de movilidad, aunque no podemos descartar otras funciones particularmente a nivel de membrana.

Una vez que obtuvimos la población heterogénea de mutantes de fagocitosis, canalizamos el trabajo hacia la selección de una población resistente a una droga que estuviera implicada con la funcionalidad del citoesqueleto (esto es, cuyo blanco sea una estructura o una proteína que forme al citoesqueleto). Optamos por emplear CD, que tiene una acción bastante específica para actina.

Se ha demostrado (Yahara y col., 1982; Schliwa, 1982) que la CD es más potente que CB y que otras citocalasinas, ocasiona un profundo efecto sobre la maquinaria contráctil de las células como resultado tanto de una interacción directa de la droga con la actina así como por una respuesta celular secundaria.

Cuando inicialmente tratamos con CD los trofozoítos de E.histolytica provenientes de la selección para fagocitosis, la respuesta en la cepa silvestre fue evidente y se produjo un redondeamiento de las células y en 24 horas empezaron a lisarse. El efecto en los trofozoítos mutantes, tuvo una marcada diferencia con respecto al control, no se redondearon y aunque mas lento siguieron viviendo. De los 19 pasajes alternados en ausencia y presencia de CD (5µg/ml), los primeros 10 fueron alternados cada 48h y posteriormente cada 72h. Posteriormente a la población sobreviviente ("B") se le hizo cinética de crecimiento en ausencia y presencia de CD.

Debido a que es necesario trabajar con poblaciones homogéneas, la subpoblación "B" fue clonada en agar semisólido en ausencia de CD al igual que la cepa parental (HM1-IMSS). La EFC para la clona mutante G3 fue de 1.73% mientras que la de la clona X1 de la cepa silvestre fue de 19.33% ; esta marcada diferencia podria explicarse porque la mutante quizas tenga alteradas algunas propiedades de superficie.

En el presente trabajo, se hicieron tambien ensayos de clonación de las mutantes en presencia de CD y como ya se señaló en la sección de resultados, la respuesta fue nula. La baja EFC de las mutantes resistentes a CD y en particular la mostrada por la mutante G3, probablemente se debe a que ha sido dañada en algun mecanismo fagocítico y quizas pinocítico que no permite

realizar normalmente la difusión y/o fagocitosis de partículas o moléculas. La baja eficiencia en clonación y otros problemas de crecimiento que resultan al clonar en agar no se pueden explicar hasta la fecha.

Al medir el crecimiento de las clonas X1 y G3 en presencia de CD, la clona X1 de la cepa silvestre mostró una evidente sensibilidad a la droga, despréndiéndose del substrato a las primeras horas de cultivo y lisándose posteriormente, no así en ausencia de la droga donde mantuvo un crecimiento normal con un tiempo de generación de 20h. En ausencia de la droga la clona G3 tuvo un tiempo generacional de 22h y en presencia de CD fue de 29h.

Con los resultados anteriores, quedó caracterizado el crecimiento de la mutante G3 a una concentración de CD letal para E.histolytica HM1.

Como una forma de corroborar si la mutante resistente a CD mostraba alguna otra capacidad de resistencia, medimos su crecimiento en presencia de emetina (10µg/ml) y se encontró que la clona mutante mostró la misma sensibilidad que la clona silvestre. La decisión de probar en la mutante su sensibilidad a la emetina fue con la finalidad de iniciar el estudio de la resistencia a otras drogas. En el futuro se podrá continuar con la caracterización de la resistencia múltiple a otras drogas como por ejemplo, colchicina, vinblastina, adriamicina, actinomicina D

, etc., y de esta manera tener en la mutante un modelo que permita conocer la acción de drogas en el parásito Entamoeba histolytica.

Michel y Hohman (1979) y Lopez-Revilla (1982), han reportado que la citocalasina B reduce la adhesión en los trofozoítos de E. histolytica y que por tanto este fenómeno podría estar parcialmente mediado por los microfilamentos contráctiles. La adhesión de los trofozoítos a células CHO es inhibida por CB y CD a 37°C lo que sugiere que la adhesión de las amibas a las células involucra receptores que deben ser mantenidos activamente en una conformación eficiente (Ravdin Guerrant, 1981). Sin embargo, no hay evidencia concluyente sobre la presencia de filamentos de actina en el citoplasma que pudieran ser afectados por la CD (Meza, y col., 1983).

Con los resultados obtenidos en este trabajo respecto a la disminución en la tasa eritrofagocítica de la mutante G3, tanto en ausencia como en presencia de 5µg/ml de CD se puede pensar que esta cepa tiene una deficiencia en la adhesión específica a los glóbulos rojos como producto de la alteración o que carece de un receptor de superficie .

Se ha reportado (Trissl, y col., 1977), que la carga eléctrica de la superficie celular esta relacionada con la virulencia de la cepa amibiana y es importante para los eventos de adhesión. La resistencia a CD mostrada por la mutante G3, podría ser

consecuencia de una alteración en los microfilamentos o de un cambio en la impedancia de la membrana o ambos, lo que le ocasiona una reducción en la capacidad de destrucción a otras células. Si analizamos el comportamiento mostrado por la mutante en los fenómenos de eritrofagocitosis y efecto citopático, podemos arguir que la disminución en la tasa eritrofagocítica podría ser debida a un deterioro de las proteínas asociadas al citoesqueleto de la mutante o bien a las proteínas involucradas en la fusión de su membrana. En lo que se refiere al efecto citopático disminuído, este comportamiento probablemente es producto de un incremento en la impedancia de la membrana en la mutante G3, porque como se sabe este aumento favorece la disminución de la capacidad citopática de la amiba (Ravdin, y col.,1985).

Uno de los aspectos mas importantes que cabe mencionar es que la mutante G3 fue muy sensible a soluciones isotónicas como el PBS y medios salinos en general, probablemente porque la mutante G3 tenga modificada la carga eléctrica de la superficie membranal; tal vez esta sensibilidad al choque osmótico se podría asociar con la resistencia adquirida a CD. Con respecto a esto último, es probable también que la mutante esté alterada en los receptores para la CD, no permitiendo la entrada de la droga y por lo tanto mostrando una resistencia marcada a esta, lo que entonces fortalecería el argumento anterior.

Con la finalidad de comprobar si el comportamiento

manifestado por la mutante resistente a CD era debido a alguna alteración en la actina y/o proteínas asociadas al citoesqueleto, decidimos buscar dicha alteración mediante el análisis uni y bidimensional de extractos totales de la amiba. Sin embargo, según los resultados obtenidos, no se encontró cambio alguno en la actina mediante esta metodología. No obstante, con estudios mas extensos por ejemplo analizando la distribución de la actina en la célula, visualizando su polimerización en actividades que requieran movimiento y contacto a la célula blanco, como la fagocitosis (Bailey y col., 1985), podríamos esclarecer alguna diferencia. Experimentos realizados en nuestro grupo parecen indicar que hay una diferencia en la distribución de actina de la cepa mutante en comparación con la cepa silvestre.

Se sabe que la citocalasina B, interfiere con la síntesis macromolecular en ciertas células y en algunos casos de manera análoga en proteínas virales, además se ha reportado que induce la reducción de la síntesis de proteínas en varias líneas celulares, sugiriendo que esta inhibición parece estar mediada por la membrana actuando a nivel de la iniciación de la cadena polipeptídica (Koch y Koch, 1978). Con el objeto de comprobar si la mutante G3 había sido afectada en su síntesis de proteínas, se midió la incorporación en macromoléculas de metionina-<sup>35</sup>S *in vivo* por material TCA precipitable. Según los resultados obtenidos, no se encontraron diferencias en la clona mutante con respecto a la clona silvestre. Asimismo, al hacer el análisis electroforético unidimensional de los extractos proteínicos marcados con

metionina-<sup>35</sup>S in vivo de las dos clonas en estudio y mediante la autorradiografía correspondiente verificamos que tampoco hubo diferencias en la proteína actina, sin embargo mediante esta metodología, se pudo confirmar la disminución e incremento de dos péptidos (87kd y 21kd respectivamente).

Los resultados anteriores demuestran que la resistencia adquirida y manifestada por la clona mutante G3 resistente a CD, no alteraron su síntesis de proteínas y tampoco la de actina. No obstante al hacer un análisis electroforético unidimensional de los extractos totales de ambas clonas, se encontró que la mutante G3 tiene disminuido un péptido con PM de 87 kd, asimismo mostró el incremento de otro péptido con PM de 21 kd. Estos resultados sugieren que la disminución e incremento de ambos péptidos en la mutante, pueden jugar un papel importante en el desarrollo de la resistencia a otras drogas o bien pueden estar involucrados en la disminución en el transporte de la droga alterando las interacciones de la membrana y el citoesqueleto en la amiba.

La adhesión (Ravdin y Guerrant, 1981), fagocitosis (Orozco y col., 1982), efecto citopático (Orozco y col., 1978; Mirelman y col., 1983), efecto citotóxico (Bos, 1979) y la producción de abscesos hepáticos producidos en hamsters (Diamond y col., 1974), son criterios que se han relacionado directamente con la virulencia y patogenicidad de Entamoeba histolytica. La evidente reducción mostrada en los importantes procesos (eritrofagocitosis y efecto citopático) por la clona mutante G3, así como la

alteración en su patrón electroforético como producto de la ausencia e incremento en dos peptidos, nos proporciona un buen modelo para el estudio de los fenómenos que involucran la función del citoesqueleto, la capacidad de destrucción celular , su resistencia a multiples drogas y algunos otros mecanismos relacionados con la motilidad en este parásito.

## IX.- CONCLUSIONES

- 1.- En el presente trabajo se aislaron mutantes de Entamoeba histolytica HM1-IMSS, resistentes a una concentración de 5µg/ml (10µM) de citocalasina D.
- 2.- Se seleccionó una mutante (clona G3), que es de crecimiento lento pero crece perfectamente bien lo mismo en ausencia que en presencia de CD, esto en comparación con la clona X1 de la cepa silvestre.
- 3.- La clona G3 se caracterizó parcialmente mediante criterios de virulencia, dicha clona mostró disminuidas sus características de eritrofagocitosis y efecto citopático.
- 4.- La disminución en la virulencia de la clona mutante G3 en ausencia y presencia de CD, no esta relacionada con una alteración en la actina, sino probablemente a la alteración de alguna proteína asociada a ésta que se encuentre quizá en la superficie de la amiba.
- 5.-El crecimiento de la clona mutante G3 en agar semisólido fue casi nulo en comparación con el de la clona X1, lo que

sugiere que probablemente la clona G3 tiene alterado algún factor difusible en la membrana, el que puede ser elemental en los eventos pinocíticos y/o fagocíticos de la amiba.

6.- El análisis electroforético uni y bidimensional de los extractos de células de la mutante G3 no reveló cambios en el patrón de actina, aun marcando las proteínas con metionina-<sup>35</sup>S, sin embargo se encontró que esta clona tiene disminuido un péptido de 87kd e incrementado un péptido de 21 kd.

7.- La reducción en la capacidad de destrucción a otras células manifestada por la mutante G3 resistente a CD, se debe probablemente a una modificación en la carga eléctrica de la superficie membranal de la amiba.

X.-APENDICE

**SOLUCION DE ALBEVER ( Garvey y col., 1977 ).**

Dextrosa . . . . .	.20.5g
Citrato de sodio . . . . .	8.0g
Acido cítrico . . . . .	0.55g
Cloruro de sodio . . . . .	4.2g

Se ajusta a pH 6.1 y c.b.p. 1000ml de agua bidestilada.

**SOLUCION DE ANTIBIOTICOS 1 (SA1) (López-Ravilla, y col.,1981).**

1.- En un frasco ampula con  $1 \times 10^6$  unidades de penicilina G sódica cristalina (LAKESIDE), con una jeringa estéril de 5ml se inyectan 5ml de agua tridestilada estéril al frasco para disolver la penicilina.

2.- La penicilina disuelta se inyecta a un frasco ampula con un gramo de sulfato de estreptomicina (LAKESIDE) y se agita

hasta homogeneizar la muestra.

3.- Pasar asépticamente la muestra anterior a una probeta graduada estéril de 25ml y aforar a 20ml de agua tridestilada estéril.

4.- Guardar en alícuotas de 5ml en tubos estériles con tapón de rosca (10 X 100 mm) a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Almacenarlos cubiertos con papel aluminio (la estreptomicina es sensible a la luz).

#### **SOLUCION DE PARAHIDROXIMERCURIBENZOATO (p-HMB).**

1.- Pesar 0.18165 g de Tris-NaOH y disolver en  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada (en un volúmen menor a 10ml).

2.- Adicionar 0.3605 g de p-HMB, agitar hasta disolver y aforar a 10ml.

3.- La solución se reparte en alícuotas de 1ml en tubos eppendorf y se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

4.- La solución se descongela y usa en cada ocasión (nunca congelar y descongelar varias veces).

**SOLUCION SALINA 0.15M ( 88 ) .**

9 gramos de NaCl se disuelven en agua bidestilada, se ajusta el pH 7.4 con NaOH 0.1 N , añadiéndose gota a gota y se afora la solución a 1000 ml; se distribuye en botellas para dilución de borosilicato con tapón de rosca (CORNING), en muestras alícuotas de 100ml. Se esterilizan a 20lbs/pulg<sup>-2</sup> por 20 min , se aprietan los tapones y se almacena a temperatura ambiente.

**MEDIO AN+Thy.**

Caldo nutritivo . . . . .4.0 g

Agar . . . . . 7.5 g

Aqua destilada . . . . . 500ml

Esterilizar a 15 lbs pulg<sup>-2</sup> por 15 min., agregar la concentración deseada de timina por filtración ( membrana de 0.45µm), previamente disuelta en agua y repartir en cajas de petri.

**MEDIO MINIMO CON GLUCOSA (8min).**

Davis N . . . . . 50ml

Agua destilada . . . . . 400ml

Agar (en su caso) . . . . . 7.5g

Esterilizar en autoclave (20 lbs/pulg<sup>-2</sup> por 15 min ),  
agregar 50ml de glucosa al 4%.

En el caso de Gmin+Thy, se agrega por filtración (membrana  
de 0.45µm), la concentración deseada de timina previamente  
disuelta en agua.

**MEDIO DE MANTENIMIENTO (G.D.).**

Medio basal.

Tris-HCl . . . . . 6.05g

NaCl . . . . . 1.46g

KCl . . . . . 0.89g

MgCl<sub>2</sub> . . . . . 0.76g

CaCl<sub>2</sub> . . . . . 0.2219g

El Tris HCl se disuelve en 400ml de agua tridestilada, se  
ajusta a pH 7.0 y se agregan los demas componentes, la solución  
se afora a 500ml ; se esteriliza en autoclave a 15 lbs pulg<sup>-2</sup> por  
15 min., y se almacena en refrigeración.

Medio G.D. completo.

Para 200ml :

Solución de vitaminas . . . . .	2ml
Albúmina sérica bovina . . . . .	0.075g
L-cisteína HCl . . . . .	0.17966g
Ac. L-ascórbico . . . . .	0.35226g

La cisteína y el ácido ascórbico se disuelven en 50ml de agua bidestilada, se ajusta a pH 7.0, se añade la albúmina disuelta en 10 ml de agua y las vitaminas. En condiciones estériles se agrega esta mezcla por filtración (membrana de 0.45µm), en 100ml de medio basal G.D. y se afora a 200ml con H<sub>2</sub>O bidestilada estéril; el pH final de la solución es 6.9.

**MEDIO RICO NZX (NZcase).**

DAVIS N 10X . . . . .	100ml
Extracto de levadura . . . . .	2g
Concentrado proteico (NZ) . . . . .	2g
Casaminoácidos . . . . .	2g
Agar (en su caso) . . . . .	15g
Glucosa . . . . .	4g

Se disuelven los componentes en agua bidestilada, la mezcla se afora a 1000ml y se esteriliza a 15 lbs pulg<sup>-2</sup> por 15min. No más de esta presión y tiempo, porque se carameliza la glucosa.

**BUFFER DE MUESTRA 2X**

Tris-OH . . . . . 1.51g

S D S . . . . . 2.0g

Glicerol . . . . . 25.0g

Pironina . . . . . 0.002g

Se mezclan y disuelven los componentes en 80ml de agua tridestilada, se ajusta a pH 6.8 con HCl concentrado y se afora la solución a 100ml. Se guarda a temperatura ambiente.

**DAVIS N**

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  . . . . . 3.0g

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  . . . . . 7.0g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  . . . . . 0.1g

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  . . . . . 1.0g

Se mezclan y disuelven los componentes con agua bidestilada, la solución se afora a 1000ml y se almacena a temperatura

ambiente . Se puede preparar tambien a una concentración 10X.

**P B S pH 7.0**

NaCl . . . . . 8.0g

KCl . . . . . 0.2g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> . . . . . 1.15g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> . . . . . 0.2g

Se mezclan y disuelven los componentes con agua bidestilada, se ajusta el pH de la solución y se afora a 1000ml. Se distribuye en botellas en alícuotas de 100ml; se tapan y se esterilizan en autoclave a 20 lbs pulg<sup>-2</sup> por 15 min., se aprietan los tapones y se almacenan a temperatura ambiente.

**P B S pH 7.4**

NaCl . . . . . 6.5g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> . . . . . 2.8g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> . . . . . 0.5g

Se mezclan y disuelven los componentes con agua bidestilada, se ajusta el pH a 7.4-7.5 con NaOH 10N (se añade gota a gota), se afora a 1000ml. Se distribuye en botellas en alícuotas de 100ml. Se tapan y se esterilizan en autoclave a 20 lbs pulg<sup>-2</sup>, se aprietan los tapones y se almacenan a temperatura ambiente.

XI.- BIBLIOGRAFIA

Atlas, S.J., y S. Lin Dihydrocytochalasin B. Biological effects and binding to 3T3 cells. J.Cell Biol., 1978; 76:360.

Arroyo-Begovich, A., Carabez-Trejo, A., Ruiz-Herrera, J.  
Identification of the Structural Component in the Cyst Wall of Entamoeba invadens. J. Parasitol., 1980; 66:735.

Aust Kettis, A., Lidman, K. y Fagradeus, A. Actin in Entamoeba histolytica trophozoites revealed by human actin anti bodies. J. Parasitol., 1977; 63:581.

Aust Kettis, A. y G. Sundquist. Dynamics of the interaction between Entamoeba histolytica and components of the immune response. Scand. J. Immunol., 1978; 7:35

Averbach, C. Mutation an introduction to research on mutagenesis .Oliver and Boyd, 1962 Edimburgo.

Bailey, G.B., Day, B.D. y J.W. Gasque . Rapid polymerization of Entamoeba histolytica actin induced by interaction with target cells. J. Exp. Med., 1985; 162:546

Bonner, W.A. y R.A. Laskey. A film detection method for tritium labeled proteins and nucleic acids in polyacrilamide gels. Eur. J. Biochem., 1974; 46:83

**Bos, H.J. Entamoeba histolytica: Cytopathogenicity of intact amoebae and cell free extracts : isolation and characterization of an intracellular toxin. Exp.Parasitol.,1979;47:369**

**Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Die Binding . Anal. Biochem., 1976;72":248**

**Bravo,R. Two-Dimensional Gel Electrophoresis: A Guide for the Beginner. En: Two dimensional gel electrophoresis of proteins methods and applications . Julio E. Celis y Rodrigo Bravo editores. Academic Press Inc., New York, 1984;3**

**Brenner, S.L. y E.D. Korn. Substoichiometric concentrations of Cytochalasin D inhibit actin polymerization. J. Biol. Chem., 1979;254:9982**

**Brenner, S.L. y E. D. Korn. The effects of cytochalasins on actin polymerization and ATPase provide insights in to the mechanism of polymerization. J. Biol. Chem., 1980; 255: 841**

**Brinkley, B.R., FisteL,S.H., Marcus,J.M. y R.L. Pardue. Microtubules in Cultured Cells; Indirect Immunofluorescent Staining with Tubulin Antibody. Int. Rev. Cytol., 1980; 63:59.**

**Brown, S.S. y J.A. Spudich. Cytochalasin inhibits the rate of**

elongation of actin filament fragments. J. Cell Biol., 1979; 83  
657

Browning, C.H. The chemotherapy of trypanosome interactions. Ann. N.Y.  
Acad. Sci., 1954; 59 198

Cabral, F.R., Sobel, M.E. y M.M. Gottesman. CHO Mutants resistant to  
colchicine, colcemide or griseofulvin have an altered  $\beta$ -tubulin.  
Cell, 1980; "20:29

Carpenter, W.B. On the Systematic arrangement of the Rhizopoda. Nat,  
Hist. Rev., 1861; 456

Cerda-Olmedo, E., Hanawalt, P.C. y N. Guerrero. Mutagenesis of the  
replication point by nitrosoguanidine : map and pattern of  
replication of the Escherichia coli Chromosome. J. Mol. Biol.,  
1968; 33:705

Cervantes, A.C. Estudios de los procesos de división celular y nuclear  
en Entamoeba. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología Celular):  
Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN. 1980

Chavez, B., Martinez-Palomo, A. y M. de la Torre. Estructura  
ultramicroscópica de la pared de quistes de Entamoeba invadens,  
E. histolytica y E. coli. Arch. Invest. Med (Mexico), 9, supl. 1, 113

Clarke, M. A Selection method for isolating motility mutants of

Dictyostelium discoideum. En: Cell Reproduction. E.R. Dirksen, D.M. Prescott and C.F. Fox editors. Academic Press Inc., New York, 1978; 624

Clarke, M. y J.A. Spudich. Nonmuscle contractile proteins: The role of actin and myosin in cell motility and shape determination. Ann. Rev. Biochem., 1977; 46:797

Cleveland, L.R., E.P. Sanders. Encystation, multiple fission without encystment, encystation, metacystic development, and variation in a pure line strains of Entamoeba histolytica. Archiv fr Protistenkunde, 1930; 70:223

Corsaro, C.M., M.L.Pearson. Enhancing the efficiency of DNA-mediated gene transfer in mammalian cells. Somat. Cell Gen., 1981; 5:603

De la Torre, M., De la Hoz, R., Landa, L. y B. Sepulveda. Cultivos axénicos de Entamoeba histolytica. Arch. Inv. Med. (Mex.), 1971; 2( Supl.1):165

Deschiens, R. L' Amibiase et l' Amibe Dysenterique . 1965, Masson, Paris

Diamond, L.S., Phillips, B.P. y I.L. Bartigis. A comparison of the virulence of nine strains of axenically cultivated E.histolytica in hamster liver. Arch. Inv. Med. (Mex), 1974; 5 (supl.2) : 423

Diamond, L.S., Harlow, D.R., y C.C. Curnick. A new Medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. Trans. R. Trop. Med. Hyg, 1978; 72: 431

Dobell, C. Researches on the intestinal protozoa of monkeys and man.  
I. General introduction. II. Description of the whole life-history of Entamoeba histolytica in cultures. Parasitology, 1928; 20 : 357

Drake, J.W. The molecular basis of mutations. Holden-Day, 1970, San francisco. 520 P

Ehrenberg, C.G. Organization, Systematik und geographisches Verhaltniss der Infusionsthierchen. K. Acad. Wiss., Berlin, 1830 ; 108 P

Ehrlich, P. En: Experimental researches on specific therapeutics. Herben lectures for 1907 of the Royal Inst. for Pub. Hlth., Lewis, London, 1908; p 81

Flanagan, M. D. y S. Lin Cytochalasins block actin filament elongation binding to high affinity sites associated with F-actin. J. Biol. Chem., 1980; 255 : 835

Flintoff, W. F. y M. Weber . Selection of wild-type revertants from methotrexate-resistant cells containing an altered dihydrofolate reductase. Somat. Cell Genet. 1980 ;6(4): 517

Franke, W.W., Schmid, E., Osborn, M. y K. Weber Diferent intermediate sized filaments distiguised by immunofluorescent microscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1978; 75: 503

Gadasi, H. Isolated Entamoeba histolytica actin does not inhibit DNase-I-activity . Biochem. Biophys. Res. Comm., 1982; 104 : 158

Barrels, J.I. y W. Gibson Identification and characterization of multiple forms of actin. Cell, 1976; 9: 793

Garvey, J. S., Cremer, N.E. y D.H.Sussdorf Reagents. Cap.VI. En: Methods in immunology. Editor. W.A. Benjamin, INC. Reading Massachusets 3a . edicion . 1977.

Gicquaud, R.C. Etude de l' ultrastructure du noyau et de la mitose de Entamoeba histolytica. Biol. Cellulare, 1979; 35 : 305

Gillin, F. D. y L.S. Diamond Clonal growth of Entamoeba histolytica and other species of Entamoeba in agar. J. Protozool., 1978; 25 : 539

Gillin, F.D. y L.S. Diamond Attachment and short-term maintenance of motility and viability of Entamoeba histolytica in a defined medium. J. Protozool., 1980; 27 : 220

Godman, G.C. y A.F. Miranda Cellular contractility and the visible

effects of cytochalasin, p. 277-429. En: Tanenbaum (ed),  
Cytochalasins biochemical and cell biological aspects, 1978.  
Elsevier/North Holland Publishing Co., New York.

Godman, G.C., Woda, B., Kolberg, R. y S. Berl Redistribution of  
contractile and cytoskeletal components induced by cytochalasin.  
I. In Hmf cells, a nontransformed fibroblastoid line. Eur. J,  
Cell Biol., 1980<sup>a</sup> ; 22 : 733

Godman, G. C., Woda, B. Kolberg, R. y S. Berl Redistribution of  
contractile and cytoskeletal components induced by cytochalasin.  
II. In HeLa and HEp-2 cells. Eur. J. Cell Biol., 1980<sup>b</sup> ; 22 : 745

Goldman, J.E., Schauberg, A. y W.T. Norton Isolation and  
characterization of glial filaments from human brain. J. Cell  
Biol., 1978; 78 : 426

Goldman, R.D., Lazarides, E., Pollack, R. y K. Weber The distribution  
of actin in nonmuscle cells : the use of actin antibody in the  
localization of actin within the microfilaments bundles of mouse  
3T3 cells. Exp. Cell Res., 1975; 90 : 333

Griffith, L.M. y T.D. Pollard Evidence for actin filament-microtubule  
interaction mediated by microtubule-associated proteins. J. Cell  
Biol., 1978; 78 : 958

Grollman, A. Structural basis for inhibition of protein. Synthesis by

emetine and cycloheximide based on analogy between ipecac alkaloids and glutarimide antibiotics. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1966; 56 : 1867

Guichner, T. y J. Velemisky Genetic effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and its homologs. Mut. Res., 1982; 99 : 129

Gupta, R.S. y L. Siminovitch The isolation and preliminary Characterization of Somatic cell mutants resistant to the protein synthesis inhibitor-emetine. Cell, 1976; 9 : 213

Haeckel, E. Die Radiolarien (Rhizopoda Radiolaria). Eine Monographie. I. G. Reimer, Berlin. 1862; 572 P

Hartwing, J.H. y T.P. Stossel Interactions of actin myosin and an actin binding protein of rabbit pulmonary macrophages. 3. Effects of Cytochalasin B. J. Cell Biol., 1976; 71 : 295

Hartwing, J.H. y T.P. Stossel Cytochalasin B and the structure of actin gels. J. Mol. Biol., 1979; 134 : 539

Honigberg, B. M. y W. Balazuth Subphylum SARCOMASTIGOPHORA to embrace the flagellate and amoeboid assemblages of protozoans. J. Protozool., 1963; 10(suppl.), 27

Injeyan, H., Huebner, E. y E. Meerovitch Studies on a Morphologically

Distinct Colchicine-Resistant Variant of Entamoeba sp. J. Protozool., 1979; 26 (2) : 253

Jeffrey H. Miller Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory . Cold Spring Harbor N.Y. 1972. p. 230

Jeffrey, J. S. y J. B. Thomas Mutants of Acanthamoeba castellanni Resistant to Erythromycin, Chloramphenicol, and oligomycin J. Protozool., 1978; 25 (4) : 486

Kobiler, D. y D. Mirelman Adhesion of trophozoites to monolayers of human cells. J. Infect. Dis. 1981; 144 : 539

Koch, G. y F. Koch . The use of cytochalasins in studies on the molecular biology of virus-host cell interactions . En : " Cytochalasins - Biochemical and Cell Biological Aspects" S. W. Tanenbaum, ed., 1978; pp. 475-498 . Elsevier / North-Holland, New York

Korn, E. Biochemistry of actomyosin-dependent cell motility. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1978; 75: 588

Kott, H. y Y. Kott On the resistance of Entamoeba histolytica to the environment. J. Protozool., 1970; 17, suppl., 30

Laemmly, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London), 1970 ; 227 : 680

Larsh, J.E. Jr. Medical parasitology . En: "Microbiology" ( W.K. Joklik and D.T. Smith, eds.),1972; Chapter 94, pp.1023-1043. Appleton, New York

Lazarides, E. y K. Weber Actin antibody: the specific visualization of actin filaments in non muscle cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1974; 71 : 2268

Lazarides, E. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. Nature, 1980: 283 : 249

Lazarides, E. y B.D. Hubbard Immunological characterization of the subunits of the 100 filaments from muscle cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1976; 73 : 4344

Lederberg, J. y E. M. Lederberg Replica plating and indirect selection of bacterial mutants . J. Bacteriol., 1952; 63 : 399

Leim, R.K. y H. Hutchinson Purification of individual components of the neurofilament assembly from the 70,000 dalton subunit . Biochemistry, 1982; 21 : 3221

Lester, S.C., Le Van, S.K., Steglich, C. y R. De Mars Expression of human genes for Adenine phosphoribosyl transferase and Hypoxantine-Guanine Phosphoribosyl transferase after genetic transformation of mouse cells with purified human DNA. Somat.

Cell Gen., 1980; 6 (2) : 241

Levine, N.D., Corli, J.O., Cox, F.E.G., Dereux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A. R., Lom, J. III, Lynn, D., Merinfeld, E. G., Page, F. C., Poljansky, G., Sprague, V., Vaura, J. y F.G. Wallace A Newly Revised Classification of the Protozoa. J. Protozool., 1980; 27 (1) : 37

Lewin, B. GENES. 2nd. ed. John Wiley Sons, Inc. New York . 1985; 715p

Lin, D. C. y S. Lin Actin polymerization induced by a motility-related high-affinity cytochalasin binding complex from human erythrocyte membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1979; 76 : 23

Lin, D. C., Tobin, K. D., Grumet, M. y S. Lin Cytochalasins inhibit nuclei-induced actin polymerization by blocking filament elongation . J. Cell Biol., 1980; 84 : 455

López-Revilla, R. y Cano-Mancera, R. Adhesion of Entamoeba histolytica trophozoites to human erythrocytes . Infect. and Imm., 1982; 37 : 281

Mac Lean-Fletcher, S. y T.D. Pollard Mechanism of action of cytochalasin B on actin. Cell, 1980; 20 : 329

- López-Revilla, R. y J. Rodríguez-Báez Manual para el cultivo axénico de Entamoeba histolytica Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Mexico, 1981; pp. 36
- Martínez-Palomo, A. The Biology of Entamoeba histolytica. Research Studies Press. John Wiley, Sussex, U.K. 1982; 161 pp.
- Martínez-Palomo, A., Gonzalez-Robles, A., De la Torre, M. y R. De la Hoz Fijación e inclusión in situ de E. histolytica : Aplicación en estudios de morfología y citoquímica ultramicroscópica. Arch. Invest. Med. (Mex), 1974; 5, suppl. 2, 283
- Masuda, A., Akiyama, S. L. y M. Kuwano Chinese hamster cell mutant resistant to ML236B (compactin) is defective in endocytosis of low density lipoprotein. Mol. Cell Biol., 1982; 2 (11) : 1354
- Mattew, J. S. y F. R. Cabral Maytansine-resistant mutants of Chinese hamster ovary cells with an alteration in  $\alpha$ -tubulin. Can. J. Biochem. Cell Biol., 1985; 63 : 503
- Mendoza, F., Arcos, L., Ortiz-Ortiz, L. y I. Diaz de Leon Protein biosynthesis by Entamoeba histolytica in culture. Arch. Invest. Med. (Mex.), 1982; 13 (supl. 3) : 71
- Meza, I., Sabanero, M., Cazares, F. y J. Brain Isolation and characterization of actin from Entamoeba histolytica. J. Biol. Chem., 1983; 258 : 3936

Michel, R. y R. Hoheann Der Einfluss von Cytochalasin B , Colchicin und vinblastin auf die Adhsion von Entamoeba histolytica . Zeitschrift fr Parasitenkunde, 1979; 60\_ : 123

Michel, R. y E. Schupp Fibrillre and Tubulre Feinstrukturen im Cytoplasma von Entamoeba histolytica. Zeitschrift fr Parasitenkunde, 1975; 47 : 11

Minor, P. D. y D. H. Roscoe Colchicine resistance in mammalian cell lines. J. Cell Sci., 1975; 17 : 381

Mirelman, D., Feingold, C., Mexter, A. y R. Bracha Interactions between Entamoeba histolytica , bacteria and intestinal cells . En: Proceedings of Ciba Found. Symp. Cytopathology of parasitic diseases, 1983; Pitman Medical, London, 2

Mirelman, D., Bracha, R. y P. G. Sargeant Entamoeba histolytica : virulence enhancement of isoenzyme-stable parasites . Exp. Parasitol., 1984; 57 : 172

Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D.L., Geiger, B. y R. Krepler The catalog of human cytokeratins : Patterns of expression in normal epithelia tumors and cultured cells. Cell, 1982; 31 : 11

Morris, A. y J. Tannenbaum Cytochalasin D does not produce net depolymerization of actin filaments in HEP-2 cells . Nature

(London), 1980; 287 : 637

Neal, R. A. Antiamoebic activity of drugs given singly and in combination against axenically grown Entamoeba histolytica. Arch. Invest. Med. (Mex.), 1978; 9 (supl.1), 387

Nicolson, G. L. Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells . I. Cytoplasmic influence over cell surface components . Biochimica et Biophysica Acta, 1976; 457 : 57

Novikoff, A. B., Novikoff, P. M., Davis, C. y N. Quintana Studies on microperoxisomes . II A cytochemical method for light and electron microscopy . J. Histochem. Cytochem., 1972; 20 : 1006

O' Farrel, p. H. High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem., 1975; 250 : 4007

Drozco, E. Virulencia y propiedades de superficie de Entamoeba histolytica . Tesis de Doctorado en Ciencias (Biología Celular). Departamento de Biología Celular. CINVESTAV-IPN. 1981

Drozco, E., De la Cruz, F. y M. A. Rodríguez Isolation and characterization of Entamoeba histolytica mutants resistant to emetine. Mol. Biochem. Parasitol., 1985<sup>a</sup> ; 15 : 49

Drozco, E., Guarneros, G. y A. Martínez-Palomo Clonas de Entamoeba histolytica deficientes en fagocitosis presentan deficiencia en

virulencia . Arch. Inv. Med. (Mex.), 1982; 13 (supl. 3) : 137

Drozco, E., Guarneros, G., Martínez-Palomo, A. y T. Sánchez Entamoeba histolytica: Phagocytosis as a virulence factor . J. Exp. Med., 1983; 158 : 1511

Drozco, E., Martínez-Palomo, E. y G. Guarneros Virulencia y propiedades de superficie de varias cepas axénicas de Entamoeba histolytica. Arch. Inv. Med. (Mex.), 1980; 11 : 153

Drozco, E., Martínez-Palomo, A. y R. López-Revilla Un modelo in vitro para el estudio cuantitativo de la virulencia de E. histolytica . Arch. Inv. Med. (Mex.), 1978; 9 : 257

Drozco, E., Suarez, M. E. y T. Sanchez Differences in adhesion, phagocytosis and virulence of clones from Entamoeba histolytica, strain HM1-IMSS. Int. J. Parasitol., 1985<sup>o</sup> ; (15) 6 : 655

Page, F. C. An Illustrated key to Fresh water and Soil Amoebae. Freshwater Biological Association. (34), 1976

Peters, M. En: Trypanosomiasis and leishmaniasis with special reference to Chagas' disease. Ciba Found. Symp., North Holland , Amsterdam., 1974; 20 : 309

Pollard, J. D. Cytoplasmic contractile proteins. J. Cell Biol., 1981; 91 : 156

- Porter, K. The cytoplasmic Matrix and the Integration of Cellular Function . J. Cell Biol., 1984; 99 (1, pt.2) : 1s-248.
- Rampal, A. L., Pinkofsky, H. B. y C. Y. Jung Structure of cytochalasins and cytochalasin B binding sites in human erythrocyte membranes. Biochemistry., 1980; 19 679
- Ravdin, J. I. y R. L. Guerrant Separation of adherence cytolytic and phagocytic events in the cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica . Arch. Inv. Med. (Mex.), 1982; 13 . (supl.3) : 123
- Ravdin, I. J. y L. R. Guerrant Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica. Am. Soc. Clin. Invest., 1981; 68 ; 1305
- Ravdin, I. J., Guerrant, L. R. y N. Sperelakis Entamoeba histolytica : Impedance measurements and cytotoxicity in the presence of bepridil verapamil and cytochalasin D . Exp. Parasitol., 1985; 60 : 63
- Rollo, I. M. The pharmacological basis of therapeutics. A. G. Gilman and A. Gilman, eds. Mac Millan, New York, 1980, 1038
- Rosas, G. Efectos de citocalasina B sobre trofozoítos de Entamoeba histolytica. Tesis de Licenciatura; Facultad de Ciencias, UNAM 1987

Rosebaum, R. M. y M. Wittner Ultrastructure of bacterized and axenic trophozoites of Entamoeba histolytica with particular reference to helical bodies. J. Cell Biol., 1970; 45 : 367

Sabanero, M. e I. Meza Localizacion de actina en trofozoitos de Entamoeba histolytica HMI . Arch. Inv. Med. (Mex), 1982; 13 (supl. 3) : 37

Santi, D. V., Codere, J. A., Beverley, S. M. y R. T. Schimke Methrotrexate-resistant Leishmania tropica. A model for drug resistance in pathogenic protozoa. En : Molecular Parasitology, Academic Press; 1984

Schamarda, L. K. Zoologie . Braumuller, Viena. 1871 ; 372 p.

Segura, J. J. y R. Lopez-Revilla Inhibicion de la sintesis de proteinas por emetina en cepas axenicas de Entamoeba histolytica y Entamoeba invadens . En: Amibiasis (Sepulveda, B. y Diamond, L. S. eds.) Mexico, 1976; 105

Schliwa, M. Action of cytochalasin D on cytoskeletal networks. J. Cell Biol., 1982; 92 : 79

Schliwa, M., Blerkon, J. V. y K. R. Porter Stabilization of the cytoplasmic ground substance in detergent opened cells and a structural and biochemical analysis of its composition . Proc.

Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1981; 78 : 4329

Shaffer, J. G., Scantlan, T. M. y B. Iralu Observations on cell divisions of Entamoeba histolytica in culture. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1961; 10 : 167

Shaw, G., Debus, E. Y K. Weber The immunological relatedness of neurofilament proteins of higher vertebrates. Eur. J. Cell Biol., 1984; 34 : 130

Siebold, C. T. E. von Bericht ber die Leistungen in der Naturgeschite der Wrmer , Zoophyten und Protozoen Whrend des Jahres 1843 und 1844 . Arch. Naturgesch, 1845; 11 : 256

Siminovitch, L. On the nature of hereditary variation in cultured somatic cells. Cell, 1976; 7 1

Singh , B. N. Pathogenic and non-pathogenic amoeba . The Mac millan Press LTD., 1975 .

Snyder, J. A. and R. McIntosh Biochemistry and physiology of microtubules. Ann. Rev. Biochem., 1976; 45 : 699

Tanenbaum, S. W. Cytochalasins . Biochemical and cell biological aspects . In Frontiers of Biology. North-Holland Publishing Co., Amsterdam. 1978 ; 46

- Thompson, L. y R. Baker Isolation of mutants of cultured mammalian cells, en Prescott D. M. ed., Method in Cell Biology, Academic Press, New York, 1973 ; 6 : 210
- Trissl, D., Martínez-Palomo, A., Argello, C., De la Torre, M. y R. De la Hoz Surface properties related to concanavalin A- induced agglutination . A comparative study of several Entamoeba strains. J. Exp. Med., 1977; 145 : 652
- Trissl, D., Martínez-Palomo, A., De la Torre, M., De la Hoz R. y E. Perez de Suarez Surface properties of Entamoeba : Increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. J. Exp. Med., 1978; 148 : 1137
- Toyama, S. y S. Toyama A Variant Form of  $\beta$ -Actin in a Mutant of KB Cells Resistant to Cytochalasin B . Cell, 1984; 37 : 609
- Vanderkerckhove, J. y K. Weber At least six different actins are expressed in a higher mammalian : An analysis based on the aminoacid sequences of the amino-terminal tryptic peptide. J. Mol. Biol., 1978; 126 : 783
- Visvervara, G. S. y C. S. Callaway Light and electron microscopic observations on the pathogenesis of Naegleria fowleri in mouse brain and tissue culture. J. Protozool., 1974; 27 : 239
- Wasnuth, J. J., Hill, J. M. y L. S. Vock Biochemical and genetic

evidence for a new class of emetine-resistant Chinese hamster cells with alterations in the protein biosynthetic machinery. *Somat. Cell Genet.*, 1980; 6 (4) : 495

Weber, K. y M. Osborn en: *Microtubules* ( Roberts, K. and J. S. Hyams eds ), 1979; pp 279-313, Academic Press, New York

Weihing, R. R. Cytochalasin B inhibits actin-related gelation of HeLa Cell extracts . *J. Cell Biol.*, 1976; 71 : 303

Weihing, R. R. *Membrane association and polymerization of actin* , p. 671-684. En: Goldman T. Pollard, and J. Rosenbaum (ed.), *Cell motility. Cold Spring Harbor Conferences on cell Proliferation.* Cold Spring Harbor Laboratory, 1976, Cold Spring Harbor , N. Y.

W H O Expert Committee. *Amoebiasis. W H O Technical report series.* No. 421. (1969) Genova.

Wilcocks, C. y B. Manson, P. E. C. *Manson's Tropical Diseases.* 17a. Ed. Belliere-Tindal. Londres. 1972.

Wolosewick, J. J. y K. R. Porter *Microtrabecular lattice of the cytoplasmic ground substance artifact or reality.* *J. Cell Biol.*, 1979; 82 : 114

Yahara, I., Harada, F., Sekita, S., Yoshihira, K. y S. Natori *Correlation between effects of 24 different cytochalasins on*

cellular structures and cellular events those on actin in vitro.

J. Cell Biol., 1982; 92 : 69

XII. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

	Pagina
Fig. 1. Aislamiento de bacterias Thy <sup>-</sup> .....	51
Fig. 2. Esquema de la obtención de trofozoítos deficientes en fagocitosis (Clarke, 1978).....	55
Fig. 3. Deficiencia eritrofagocítica de trofozoítos.....	56
Fig. 4. Curva de crecimiento de <u>Entamoeba histolytica</u> .....	58
Fig. 5. Crecimiento poblacional de las clonas X1 y G3 (cepa HM1-IMSS) en ausencia y presencia de CD.....	62
Fig. 6. Crecimeinto poblacional de las clonas X1 y G3 (cepas HM1-IMSS) en ausencia y presencia de emetina .....	63
Fig. 7. Eritrofagocitosis de las clonas X1 y G3 (cepa HM1-IMSS) a diferentes tiempos.....	65
Fig. 8. Efecto citopático de los trofozoítos de <u>E.</u> <u>histolytica</u> sobre cultivos de células epiteliales de la línea MDCK.....	67
Fig. 9. Patron electroforético unidimensional de proteínas totales de las clonas X1 y G3 separadas en geles de poliacrilamida-SDS.....	69
Fig.10. Patron electroforético bidimensional de proteínas totales de las clonas X1 y G3 separadas en geles de poliacrilamida-SDS.....	71
Fig.11. Incorporación de metionina- <sup>35</sup> S en las clonas X1 y G3.....	72
Fig.12. Patron electroforético unidimensional de proteínas de las clonas X1 y G3 marcadas con metionina- <sup>35</sup> S....	74

Tabla I. Optimización del crecimiento del <u>Salmonella</u> <u>typhimurium</u> LT-2 Thy <sup>-</sup> a diferentes concentraciones de timidina .....	52
Tabla II. Crecimiento de <u>S. typhimurium</u> LT-2 Thy <sup>-</sup> en presencia de BrdUr.....	53
Tabla III. Sensibilidad a CD de la subpoblación "B" post-clonación en agar semisólido.....	60