

69
207



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

**"DEMOSTRACION DE ADN EN E. HISTOLYTICA,
MEDIANTE TECNICAS INMUNOQUIMICAS,
AISLAMIENTO Y PARCIAL CARACTERIZACION
DE ESTE MATERIAL GENETICO"**

T E S I S

Que para obtener el Título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a

Arturo Raúl Pérez González



MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1988



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I

INDICE

	<u>Pág.</u>
INTRODUCCION	1
CAPITULO I	
1.- GENERALIDADES	3
CAPITULO II	
2.- ABREVIATURAS	5
CAPITULO III	
3.- MATERIAL Y EQUIPO	6
CAPITULO IV	
4.- METODOS	
4.1 CULTIVO AXENICO DE <u>Entamoeba histolytica</u>	8
4.1.1 CALDO NUTRITIVO TV	
4.1.2 SOLUCION DE VITAMINAS Y TWEEN 80	
4.1.3 PREPARACION DE MEDIO DE CULTIVO TV1-S-33	
4.1.4 PRUEBAS DE ESTERILIDAD	
4.1.5 INOCULACION DE LOS TROFOZOITOS EN EL MEDIO DE CULTIVO TV1-S-33	
4.1.6 RECOLECCION, LAVADO Y DETERMINACION DE LA VIABILIDAD DE LOS TROFOZOITOS MEDIANTE LA TECNICA DE EXCLUSION - CON AZUL TRIPANO.	
4.2 CALCULO DEL NUMERO TOTAL DE TROFOZOITOS	12

- 4.3 EMPLEO DE MITOGENOS PARA FAVORECER LA DIVISION CELULAR 12
- 4.3.1 TRES MITOGENOS A DIFERENTES TIEMPOS Y DOSIS
- 4.3.1.1 SOLUCION DE FITOHEMAGLUTININA
- 4.3.1.2 SOLUCION REGULADORA DE FOSFATOS SALINA
- 4.3.1.3 SOLUCION AL 25% DE LIMULUS POLYPHEMUS
- 4.3.1.4 SOLUCION AL 25% DE PHASEOLUSVULGARIS
- 4.3.2 PREPARACION DE LOS CULTIVOS PARA FAVORECER LA MITOSIS
- 4.3.2.1 SOLUCION DE COLCEMID
- 4.3.2.2 SOLUCION HIPOTONICA 0.075 M.
- 4.3.2.3 SOLUCION FIJADORA
- 4.4 OBSERVACION DE LAS PARTICULAS DE ADN EN E. HISTOLYTICA UTILIZAN
DO TECNICAS CITOQUINICAS. 15
- 4.4.1 TINCION DE WRIGHT GIEMSA STAIN ESPECIFICA PARA ADN
- 4.4.1.1 LA SOLUCION
- 4.4.1.2 SOLUCION DE FOSFATOS DE SODIO ANHIDRO AL 9.47%
- 4.4.1.3 SOLUCION DE FOSFATOS DE POTASIO ANHIDRO AL 9.08%
- 4.4.2 TINCION DE FEULGEN ESPECIFICA PARA ADN
- 4.4.2.1 ACIDO CLORHIDRICO 1 N
- 4.4.2.2 REACTIVO DE SCHIFF
- 4.4.2.3 SOLUCION DE METABISULFITO AL 10%
- 4.4.2.4 SOLUCION VERDE LUZ AL 2%
- 4.4.3 TINCION CON VERDE METIL PIRONINA, ESPECIFICA PARA ADN
- 4.4.3.1 PIRONINA "y" O "G"
- 4.4.3.2 ALCOHOL ETILICO AL 70%
- 4.4.3.3 SOLUCION VERDE DE METILO
- 4.4.3.4 SOLUCION DE TRABAJO.

4.5 OBSERVACION DE LAS PARTICULAS DE ADN EN E. HISTOLYTICA UTILIZANDO METODOS INMUNOLOGICOS.

18

4.5.1 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

4.5.1.1 SOLUCION SALINA REGULADORA DE FOSFATOS
pH 7.4, 0.15 M.

4.5.1.1.1 SOLUCION 0.15 M. DE CLORURO DE
SODIO.

4.5.1.1.2 SOLUCION 0.15 M. DE FOSFATO DE
SODIO DIBASICO

4.5.1.1.3 SOLUCION DE FOSFATO DE SODIO -
MONOBASICO 0.15 M.

4.5.1.2 ANTIGAMGLOBULINA HUMANA CONJUGADA CON
FLUORESCINA.

4.5.1.3 SUERO ANTI-ADN

4.6 AISLAMIENTO DEL ADN DE E. HISTOLYTICA EN GRADIENTE DE CLÓ-
CLORURO DE CESIO.

20

4.6.1 SOLUCION REGULADORA DE FOSFATO 0.15 M pH 7.1

4.6.2 SOLUCION REGULADORA DE LISIS pH 7.8

4.6.3 SOLUCION DE ENZIMA RIBONUCLEASA 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

4.6.4 SOLUCION DE ENZIMA PROTEINAZA K 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

4.6.5 COLORANTE HOECHST N° 33258

4.6.6 SOLUCION SATURADA DE CLORURO DE CESIO pH 8.5 EN TRIS
0.02 M.

4.6.6.1 SOLUCION TRIS 0.02 M.

4.6.7 ISOPROPANOL Q. P.

4.7 PURIFICACION DEL ADN

23

4.7.1 DIALISIS DEL ADN

4.7.2 AJUSTE DE LA SOLUCION DEL ADN

4.7.2.1 SOLUCION DE ACETATO DE SODIO 20 M pH 5.2

4.7.3 PRECIPITACION DEL ADN CON ETANOL ABSOLUTO A 4°C

4.7.4 SEPARACION DEL ADN POR CENTRIFUGACION A 12,000 x g

4.7.5 EXTRACCION FENOLICA DE CADA UNA DE LAS BANDAS

4.7.5.1 SOLUCION FENOL; CLOROFORMO-ALCOHOL-ISOAMILICO EN UNA PROPORCION 24:1

4.8 CARACTERIZACION PARCIAL DEL ADN POR ELECTROFORESIS EN AGA ROSA AL 0.7%

26

4.8.1 ENZIMAS DE RESTRICCION BLOBLABS NEW ENGLAND

4.8.1.1 SNA CON UNA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE 4 U/ μ g4.8.1.2 HIND-III CON UNA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE -
3.8 U/ μ g4.8.1.3 HPA-11 CON UNA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE 3.5
U/ μ g4.8.1.4 HSP-1 CON UNA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE 20
U/ μ g4.8.1.5 ALU-1 CON UNA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE 10
U/ μ g4.8.1.6 PST-1 CON UNA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE -
1000 U/ μ g4.8.1.7 SAU 3-A CON UNA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE 1 U/ μ g

4.8.1.8 SOLUCION REGULADORA DE EDTA

4.8.2 PREPARACIÓN DEL GEL AGAROSA AL 0.7% EN SOLUCIÓN
REGULADORA DE BORATOS pH 8

4.8.2.1 SOLUCIÓN REGULADORA DE TRIS 0.089 M.

C A P I T U L O V

5.- RESULTADOS

29

C A P I T U L O VI

6.- DISCUSION

36

B I B L I O G R A F Í A

39

INTRODUCCION

Los diferentes niveles de virulencia en E. Histolytica pueden ser determinados *in vivo* e *in vitro*. Los primeros cuando una persona presenta el cuadro nosológico de la amibiasis (12 y 15), y su invasividad a órganos como hígado, cerebro, etc.; facilitándose el desarrollo del absceso hepático amibiano (25) o de la amibiasis cutánea (5 y 20), etc.; así como experimentalmente en animales de laboratorio, la inoculación intrahepática de amibas puede inducir al absceso hepático amibiano (2, 7, 11 y 14). Sin embargo, la presencia de E. Histolytica en el intestino no siempre es indicativa de enfermedad, ya que este protozoario tiene comportamiento diferente frente al huésped, haciéndonos suponer que existen diferentes grados de virulencia, o bien que existe una relación huésped-parásito predominantemente (10, 11 y 12).

In vitro puede determinarse la capacidad invasora de E. Histolytica midiendo parámetros como son fagocitosis, adherencia, zimodemos (13), así como llevando a cabo estudios de incorporación de timidina, investigando la capacidad para estimular la síntesis de ADN, en células CHO relacionando este hecho con virulencia, en donde los resultados al utilizar diferentes cepas de E. Histolytica indicaron que había una relación entre los varios niveles de virulencia y cepas.

Tratando de dar una explicación al diferente comportamiento que presenta este protozoario frente al huésped, suponemos que la constitución genética de este tiene un papel relevante en el cual las amibas han sufrido cambios que se manifiestan en forma importante, ya que unas tienen capacidad de producir enfermedad y constituir un problema de salud importante en nuestro medio y otros se -

localizan en pacientes portadores asintomáticos en donde el protozooario ha perdido su capacidad invasora.

En este trabajo nos propusimos demostrar en E. Histolytica cepa HMI-IMSS, la presencia de partículas que pudiesen corresponder a cromosomas determinada por el ADN en ellas, demostrables por la tinción de Feulgen (10). Así como llevar a cabo un aislamiento, purificación y parcial caracterización de este material genético en las amibas, hechos que servirán como fundamento en el estudio genético de ellas y probablemente explicarán su comportamiento frente al huésped.

CAPITULO I

1.- GENERALIDADES:

La primera prueba real del papel genético de los ácidos nucleicos, fue puesta de manifiesto en 1944 (4) con los trabajos de O. T. Avery, C. M. Macleod y McCarty, quienes mostraron que algunas propiedades de las bacterias pueden transformarse mediante la adición de ADN diferente al que ellas tenían originalmente. Por otro lado, el conocimiento de la estructura molecular de los genes se inició en 1953 con los trabajos de Watson y Crick (33), señalando la presencia del ADN en ellos y atribuyéndole a este último la capacidad de contener la información genética para que una célula progenitora de origen a células hijas. Por lo que en la definición de gen se implica que el ADN es una unidad cuya parte está presente en el cromosoma y bioquímicamente éste está constituido por una secuencia de nucleótidos, los cuales son los responsables de la síntesis de una proteína.

Los estudios de los cromosomas en los protozoarios tienen interés desde el punto de vista evolutivo, Sopina (31) ha demostrado que estos son característicos en la escala biológica, así como la organización del material genético; ella ha realizado estudios muy completos en ciliados y flagelados. En el género ameba lo ha hecho en forma muy parcial, en donde mostró que los núcleos de las amibas contenían numerosos y diminutos cromosomas localizados en la región central del núcleo, lo cual coincide al utilizar las técnicas de tinción como la de Feulgen (10). Asimismo Albach (2) demostró la presencia de ADN en la cromatina periférica, aunque la mayor parte del ADN se localizó en el endosoma central del núcleo, que es el sitio princi-

pal de concentración del ADN.

Inferimos que la constitución genética en las diferentes especies de la escala biológica, ha sufrido cambios de selección natural. Esto hace de interés llevar a cabo estudios con ambas en las cuales unas tienen capacidad de producir enfermedad y constituir un problema de salud importante para nuestro medio y - otras se localizan en portadores asintomáticos en donde el protozooario aparentemente ha perdido su capacidad invasora, aunque morfológicamente sean indistinguibles.

CAPITULO II

2. - ABREVIATURAS:

ADN	= ácido desoxirribonucleico
°C.	= grados centígrados
EDTA	= ácido etilendiaminotetraacético
G	= gravedad
g	= gramos
M	= molar
ml.	= mililitros
mm ³	= milímetros cúbicos
mM	= milimolar
mg	= miligramos
µg	= microgramos
µl	= microlitros
N	= normal
pH	= logaritmo del recíproco de la concentración de iones hidrón de una solución.
Q. P.	= químicamente puro
SRF	= solución reguladora de fosfatos
Tris	= tris (hidroximetil) aminometano
U	= unidades

CAPITULO III

3.- MATERIAL Y EQUIPO:

- Autoclave marca Presto
- Agitador magnético
- Asa bacteriológica
- Baño de hielo
- Cámara húmeda
- Cámara de electroforesis BIO-RAD
- Campana de flujo laminar marca Veco
- Centrífuga Sorvall con refrigeración
- Fuente de poder LKB 2103
- Flujo laminar marca Veco
- Gradilla
- Incubadora Medi-Lab. modelo EH-201
- Lámpara de luz ultravioleta
- Mechero
- Membrana para diálisis
- Membrana millipore de 0.22 μm .
- Microscopio de luz
- Micropipetas de 10, 20, 50 y 100 μl .
- Papel filtro Whatman N° 1
- Potenciómetro Corning Medical
- Refrigerador.

MATERIAL DE VIDRIO:

- Cámara de Neubauer
- Embudo *talle largo*
- Filtro millipore
- Matraces Erlenmeyer de 125 y 250 ml. con tapón de rosca
- Matraces aforados de 100 y 1000 ml. con tapón esmerilado
- Pipeta para glóbulos blancos
- Pipetas cortas de 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 ml.
- Pipetas Pasteur
- Probeta de 100 y 500 ml.
- Termómetro
- Tubos para centrifuga de 50 ml. de plástico con tapón de rosca.
- Tubos de vidrio de 15 x 125 mm. con tapón de rosca.
- Vasos de precipitado de 250 ml.

CAPITULO IV

4.- METODOS

4.1 CULTIVO AXENICO DE Entamoeba histolytica.

4.1.1. CALDO NUTRITIVO TV

<u>Componentes</u>	<u>Cantidades en g</u>
Peptona biotriptasa	3.0
Dextrosa	1.0
Cloruro de sodio	0.2
Fosfato de potasio dibásico	0.1
Fosfato de potasio monobásico	0.05
Acido ascórbico	0.02
Clorhidrato de L-cisteina	0.01
Citrato de amonio férrico	0.00228
Agua bidestilada	c. b. p. 87.0

PROCEDIMIENTO

Se disolvieron los reactivos en el orden presentado, en aproximadamente 50 ml. de agua bidestilada, se ajustó el pH a 6.8 con hidróxido de sodio 0.1 N y después se llevó a un volumen de 87 ml. con agua bidestilada. El medio TV se clarificó mediante filtración a través de papel Whatman N° 1 y se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121°C y 15 lb. de presión.

4.1.2 SOLUCION DE VITAMINAS Y TWEEN 80

- a) Solución de vitamina NCTC-107 (microlab).
- b) Vitaminas B₁₂. Se pesaron 40 mg. de vitamina B₁₂ y se disolvió en 100 ml. de agua destilada. Esta solución se almacenó en frasco ámbar a 4°C.
- c) Acido Teóico a 1 mg/ml. Se pesaron 100 mg. de ácido teóico y se disolvieron en 100 ml. de alcohol absoluto.
- d) Tween 80 al 50%. Se pesaron 5.0 g. de tween 80 y se disolvieron en 10 ml. de alcohol absoluto.

PROCEDIMIENTO

A 100 ml. de la solución (a), se le adicionaron 12 ml. de la solución (b), 40 ml. de la solución (c), 4 ml. de la solución (d) y 180 ml. de agua destilada. Esta solución se esterilizó mediante un filtro Millipore, con una membrana de 0.22 μ m, y se colocó en pequeños frascos ámbar, almacenados a 4°C.

4.1.3 PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO TV1-S-33

PROCEDIMIENTO

Para cada 87.0 ml. de caldo TV, se adicionaron en condiciones estériles, 3.0 ml. de la solución de vitaminas y Tween 80 y 10 ml. de suero bovino.

4.1.4 PRUEBAS DE ESTERILIDAD.

Las pruebas que se llevaron a cabo para determinar la existencia de una posible contaminación por bacterias, fueron los siguientes:

La primera fue incubar el medio TVI-S-33 durante 24 horas a 37°C., habiendo transcurrido las 24 horas, se procedió a sembrar el medio TVI-S-33 en medios de cultivo para anaerobios y aerobios, como son tioglicolato y gelosa sangre con la ayuda de una asa bacteriológica. Estos medios se incubaron 24 y 48 horas a 37°C.

En ambas pruebas no se presentó el desarrollo de microorganismos.

4.1.5 INOCULACION DE LOS TROFOZOITOS AL MEDIO DE CULTIVO TVI-S-33

La cepa de E. Histolytica que se cultivó en el laboratorio fue la cepa HM-1 (proporcionada por la Q. F. B. Margarita de la Torre, Centro Médico I.M.S.S.).

Se usaron tubos de ensaye de 15 x 125 mm. con tapón de rosca; por lo general cada tubo contenía aproximadamente 1×10^6 trofozoitos/10 ml.

El tubo que se utilizó para inocular cada matraz, se colocó en baño de hielo por cinco minutos para desprender las células de las paredes del tubo, que contenían 10 ml. del medio de cultivo con 3×10^5 trofozoitos/3.0 ml. Esta cantidad fue usada para inocular las matraces de 125 ml. que contenían 87 ml. de caldo TVI-S-33. Después se incubaron a 37°C . durante 72 horas.

4.1.6 RECOLECCION, LAVADO Y DETERMINACION DE LA VIABILIDAD DE LOS TROFOZOITOS, MEDIANTE LA TECNICA DE EXCLUSION CON AZUL TRIPANO.

Después de haber obtenido un buen desarrollo de las células a las 72 horas, los matraces se colocaron en baño de hielo para promover el desprendimiento de las células y se colocaron en tubos estériles para centrifuga de 50 ml. con tapón de rosca, se centrifugaron a 500 Xg y se lavaron con solución salina a un pH de 7.

El procedimiento se repitió siete veces con un volumen total de 80 ml.

Al terminar con el lavado de las células, se comprobó la viabilidad de los trofozoitos con azul tripano al 0.2%, se observó 97% de viabilidad.

4.2 CALCULO DEL NUMERO TOTAL DE TROFOZOITOS

Los trofozoitos se ajustaron a una concentración de 2×10^8 células/ml. El número total de células se contó mediante una cámara de Neubauer y una pipeta para glóbulos blancos con los siguientes cálculos:

$$\frac{a.b.c.}{d} = e$$

- a) Suma de los cuatro cuadros grandes de la cámara de Neubauer
- b) Dilución de la pipeta 1:20
- c) Factor para determinar el valor por mm^3 . (10).
- d) Número de cuadros (4)
- e) Factor para determinar el valor por ml. (1000).

EJEMPLO:

$$e = \frac{a.20.10}{4}$$

4.3 EMPLEO DE MITOGENOS PARA FAVORECER LA DIVISION CELULAR

4.3.1 En forma separada, con tres mitógenos a diferentes tiempos y - en diferentes dosis.

4.3.1.1 Solución de fitohemaglutinina. Esta lectina fue obtenida en los laboratorios GIBCO con número 670-0576.

4.3.1.2 Solución salina amortiguada con fosfatos. Para su preparación, se pesaron los siguientes reactivos:

- Cloruro de sodio	8.5 g
- Fosfato de sodio dibásico dihidratado	8.62 g
- Fosfato de potasio monobásico	2.48 g

Se disolvieron en un litro de agua destilada y se llevó a un pH de 7.2.

4.3.1.3 Solución al 25% de *Limulus polyphemus*. Obtenida de los laboratorios SIGMA CHEMICAL COMPANY con N° L9509. Se pesaron 250 mg. y se disolvieron en un mililitro de solución salina amortiguada con fosfatos.

4.3.1.4 Solución al 25% de *Phaseolus vulgaris*, obtenida de los laboratorios SIGMA CHEMICAL COMPANY con n° L8629. Se pesaron 250 mg. y se disolvieron en un mililitro de solución salina amortiguada con fosfatos.

PROCEDIMIENTO:

Se adicionaron de 0.05 ml. a 0.5 ml. de las tres diferentes lectinas a la concentración indicada, en series de tubos por duplicado con 7000 amibas axénicas en cada uno, y se incubaron durante 24, 48 y 72 horas a 37°C.

4.3.2 Preparación de los cultivos para favorecer la mitosis.

4.3.2.1 Solución de colchicina, obtenida de los laboratorios - GIBCO con N° 120-5210.

4.3.2.2 Solución hipotónica 0.075 M. Se pesaron 5.58 g. de cloruro de potasio y se disolvieron en un litro de agua - destilada.

4.3.2.3 Solución fijadora ácido acético-alcohol metílico 1:3. Se mezclaron 20 ml. de ácido acético glacial y 60 ml. de alcohol metílico.

PROCEDIMIENTO:

A los tubos que se incubaron en el inciso 4.3.1., se les trató con 0.2 ml. de colchicina durante 30 minutos a 37°C., se colocaron durante 5 minutos en baño de hielo, se centrifugaron a - 1500 r.p.m. durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y - al botón de células se le adicionó solución fijadora ácido acético-alcohol metílico 1:3 (5 mililitros), se dejaron reposar - durante 20 minutos y se centrifugaron a 1500 r.p.m. durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante hasta dejar una suspensión de células de 0.5 ml., se tomó un volumen de esta suspensión - mediante pipeta Pasteur y se dejaron caer gotas de esta suspensión desde una altura de un metro sobre un portaobjetos.

4.4 OBSERVACION DE LAS PARTICULAS UTILIZANDO METODOS CITOQUIMICOS.

4.4.1 Tinción con Wright Giemsa específica para ADN

4.4.1.1 La solución Wright Giemsa fue obtenida de Voul-Sol Medical Industries Inc.

4.4.1.2 Solución de fosfato de sodio anhidro al 9.47%. Se pesaron 9.47 g de fosfato de sodio y se llevaron a 100 ml. con agua destilada.

4.4.1.3 Solución de fosfato de potasio anhidro al 9.08%. Se pesaron 9.08 g de fosfato de potasio y se llevaron a 100 ml. con agua destilada.

PROCEDIMIENTO.

Se mezclaron 24.5 ml. de solución de fosfato de sodio con 24.5 ml. de la solución de fosfato de potasio y un mililitro de la solución Wright Giemsa, esta solución fue colocada en las laminillas que se prepararon en el inciso 4.3.2 durante 3 minutos, se lavaron con agua de la llave, y se observaron al microscopio.

4.4.2 Tinción de Feulgen específica para ADN

4.4.2.1 Acido clorhídrico 1 N. Se tomaron 8.5 ml. de ácido clorhídrico concentrado y se mezclaron con 91.5 ml. de agua destilada.

4.4.2.2 Reactivo de Schiff. Se pesaron los siguientes reactivos:

- Fucsina básica	1.0 g
- Metabisulfito de sodio	1.0 g
- Carbón activado	0.5 g

Se mezclaron en 10 ml. de ácido clorhídrico 1 N. y 200 mililitros de agua destilada.

4.4.2.3 Solución de metabisulfito de potasio al 10%. Se mezclaron 5.0 ml. de metabisulfito de potasio con 5.0 ml. de ácido clorhídrico 1 N y 90 ml. de agua destilada.

4.4.2.4 Solución de verde luz al 2%. Se pesaron 2.0 g de verde luz y se llevaron a 100 ml. con agua destilada.

PROCEDIMIENTO:

A los portaobjetos preparados en el procedimiento del inciso 4.3.2., se les trató con ácido clorhídrico 1 N. durante un minuto, después se les cambió a una solución del mismo ácido pero precalentado a 60°C. durante 15 minutos. Posteriormente se lavaron con agua destilada, se trataron con el reactivo de Schiff durante 45 minutos y luego se lavaron durante dos minutos en solución de metabisulfito de potasio al 10% tres veces; y se lavaron con agua destilada. Adicionalmente se trataron -

con solución de verde luz al 2% durante dos minutos, se lavaron con agua destilada, se dejaron secar y se observaron al microscopio.

4.4.3 Tinción con verde metil pironina específica para ADN

4.4.3.1 Pironina "Y" o "G". Se pesaron 2.0 g de pironina "Y" o "G" y se disolvieron en 100 ml. de agua destilada. Una vez bien disuelto se vertieron en un embudo de separación y se adicionaron 100 ml. de cloroformo, se agitó vigorosamente y se dejó reposar la mezcla hasta la separación de las dos fases, se extrajo el cloroformo y nuevamente se adicionaron 100 ml., así hasta completar 10 lavadas.

4.4.3.2 Alcohol etílico al 70%. Se midieron 70.0 ml. de alcohol etílico absoluto y se adicionaron 30.0 ml. de agua destilada.

4.4.3.3 Solución de verde de metilo. Se pesaron 2.0 g de verde de metilo y se disolvieron con 100 ml. de agua destilada, y se siguió el mismo procedimiento que en el inciso 4.4.3.1.

4.4.3.4 Solución de trabajo. Se mezclaron 9.0 ml. de la solución acuosa de verde de metilo al 2% con 5.0 ml. de la solución acuosa al 2% de pironina "Y" o "G" y 20.0 ml. de agua destilada.

PROCEDIMIENTO:

A los portaobjetos preparados en el procedimiento del inciso - 4.3.2, se les lavó con alcohol al 70% dos veces, se trataron con la solución de trabajo durante 15 horas; se escurrieron en papel filtro y se lavaron con agua destilada. Se observaron al microscopio.

4.5 OBSERVACION DE LAS PARTICULAS UTILIZANDO METODOS INMUNOLOGICOS.**4.5.1 Investigación del ADN por Inmunofluorescencia Indirecta.****4.5.1.1 Solución salina amortiguada con fosfatos pH 7.4. 0.15 M.**

4.5.1.1.1 Solución 0.15 M. de cloruro de sodio. Se pesaron 8.7 g de cloruro de sodio y se aforaron con agua destilada a un litro.

4.5.1.1.2 Solución 0.15 M de fosfato de sodio dibásico
Se pesaron 21.3 g de fosfato de sodio dibásico y se aforaron a un litro de agua destilada.

4.5.1.1.3 Solución de fosfato de sodio monobásico 0.15 M. Se pesaron 1.80 g de fosfato de sodio monobásico y se aforaron con 100 ml. de agua destilada.

PROCEDIMIENTO:

Se mezclaron 900 ml. de la solución 0.15 M. de cloruro de sodio, con:

100 ml. de la solución 0.15 M. de fosfato de sodio dibásico, y
10 ml. de solución 0.15 M. de fosfato de sodio monobásico.

El pH se reguló a 7.4.

4.5.1.2 Antigammaglobulina humana producida en cabra y conjugada con (isotiocianato de fluoresceína).

4.5.1.3 Suero anti-ADN obtenido de paciente enfermo de lupus eritematoso diseminado con títulos de más de 109 u/ml.

PROCEDIMIENTO:

Se obtuvieron 1×10^6 trofozoitos/ml. con los que se llevó a cabo una dilución 1:1000. Se tomó una gota y se colocó en portaobjeto previamente limpio y desengrasado, éste se colocó en una estufa a 37°C., hasta que se secó la gota. Sobre la gota seca se colocó el suero anti-ADN obtenido de paciente enfermo de lupus eritematoso diseminado. El portaobjeto se colocó en una cámara húmeda a 37°C., durante 30 minutos. Después se lavó con solución salina amortiguada con fosfatos tres veces durante 10 minutos, con agitación y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Una vez secos, se les colocó el suero antigammaglobulina fluoresceinado y se dejaron nuevamente en la cámara húmeda durante 15 minutos a 37°C. Se lavó nuevamente agitando suavemente a temperatura ambiente constantemente; posteriormente se colocó la laminilla en una solución Azul de Evans al 5% durante 20 minutos. Se lavó la laminilla con agua destilada y se dejó secar, sobre la laminilla se puso glicerina al 90% libre de fluoresceína. Por último, se colocó un cubreobjeto sobre la tinción de la laminilla y se selló el perímetro de ésta con barniz.

4.6 AISLAMIENTO DEL ACIDO DESOXIRIBONUCLEICO (ADN) DE E. HISTOLYTICA EN GRADIENTE DE CLORURO DE CESIO.

4.6.1 Solución reguladora de fosfatos 0.15 M. pH 7.1. Se pesaron - 4.5 g de cloruro de sodio, 2.5 g de fosfato de potasio monobásico y 8.09 g de fosfato de sodio dibásico. En el orden descrito se disolvieron las sales en 500 ml. de agua bidestilada, se ajustó a un pH de 7.1 y se llevó a 1000 ml.

4.6.2 Solución reguladora de lisis pH 7.8 Acido Etilendiaminotetracético 0.1 M (EDTA), Trishidroximetilaminometano 0.05 M. - - (TRIS) y Sarcosyl al 0.5%.

Se pesaron 37.23 g de EDTA, 6.0 g de TRIS y 2.0 g de Sarcosyl.

Se disolvieron los reactivos en 500 ml. de agua bidestilada es térica, se ajustó a un pH de 7.0 con ácido clorhídrico 0.1 N. y

se aforó a 1000 ml.

4.6.3 Solución de enzima ribonucleasa 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se preparó una solución que contenía 10 ml de TRIS y 15 ml de cloruro de sodio, - ajustados a un pH de 7.5. Para ello se pesó 1.85 g de TRIS, - 0.43 g de cloruro de sodio. Se disolvieron las sales en 250 ml. de agua bidestilada estéril, se ajustó a un pH de 7.5 y se lle vó a 500 ml. Con 1.0 ml. de esta solución, se reconstituyeron los 100 μg de la enzima liofilizada:

4.6.4 Solución de enzima Proteinasa K 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Con 1.0 ml. de - agua bidestilada estéril se reconstituyó 100 μg . de la enzima liofilizada.

4.6.5 Colorante Hoechst N° 33258 específico para el ADN.

El colorante se disolvió con agua bidestilada estéril; se preparó una solución a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

4.6.6 Solución saturada de Cloruro de cesio pH 8.5 en TRIS 0.02 M.

4.6.6.1 Solución TRIS 0.02 M.: se pesó 1.21 g de TRIS y se di solvió en 250 ml. de agua bidestilada estéril, se ajus tó a un pH de 8.5 y se aforó a 500 ml.

Se pesaron 130 g de cloruro de cesio y se disolvieron en 70 ml. de solución TRIS 0.02 M. y una vez disuelto se filtró por medio de una membrana millipore de 0.22 micras de diámetro.

4.6.7 Isopropanol marca Bayer Q. P. Se utilizó sin diluir.

PROCEDIMIENTO:

Se lavaron 1×10^9 amibas en tubos de plástico estériles de - 50.0 ml. con solución salina amortiguada con fosfato pH 7.1, - se centrifugaron a $1250 \times g$ $10'$ $4^\circ C$ (6 veces).

El sobrenadante se decantó. Finalmente al paquete celular se le adicionaron 9.0 ml. de solución reguladora de lisis, posteriormente se adicionaron $100 \mu g/ml.$ de la solución de enzima ribonucleasa A (4.6.3) y se incubó 3 horas a $37^\circ C$. Seguida de esta incubación se adicionaron $100 \mu g/ml.$ de la solución de enzima Proteinasa K (4.6.4) y se incubó a $65^\circ C$. durante 2 horas, al - cabo de este tiempo, se agregó 1.0 ml. de colorante Hoechst específico para ADN y se incubó a temperatura ambiente durante - 15 minutos.

En un tubo Beckman N° 342414 de plástico que contenía 30.0 ml. de cloruro de cesio saturado pH 8.5 se incorporó el lisado, en seguida se selló el tubo por medio de calor, luego se metió a - una centrifuga marca Beckman L8-55 rotor VII-50 durante 18 horas, a $167,151 Xg$ a $4^\circ C$.

Al cabo de este tiempo se sacó el tubo de la ultracentrifuga y con la ayuda de una lámpara de luz ultravioleta se fotografearon las bandas de ADN presentes en el tubo.

Estas fueron separadas puncionando el tubo de plástico.

Cada una de las bandas (superior e inferior) se lavaron con isopropanol en una relación 1:1, se mezcló suavemente y se dejaron separar las dos fases; con una pipeta Pasteur estéril se retiró la fase superior que contenía el isopropanol. Este lavado se realizó dos veces más.

4.7 PURIFICACION DEL ADN

4.7.1 Dialisis del ADN

Una vez lavadas las bandas superior e inferior, se depositó el volumen de cada una de ellas en dos bolsas para dializarlas en agua bidestilada estéril con agitación durante 48 horas, cambiando el agua cada 6 horas.

4.7.2 Ajuste de solución donde se encontraba el ADN a una concentración de acetato de sodio 0.3 M, pH 5.2.

4.7.2.1 Solución de acetato de sodio 20 M, pH 5.2.

Se pesaron 272.18 g de acetato de sodio y se disolvieron en 100 ml. de agua bidestilada estéril y se ajustó a un pH de 5.2.

PROCEDIMIENTO:

A la solución donde se encontraban cada una de las bandas de

ADN se adicionó el volumen necesario de Acetato de Sodio 20 M. hasta tenerlas a una concentración final de 0.3 M.

4.7.3 Precipitación del ADN con etanol absoluto a 4°C.

PROCEDIMIENTO:

En dos tubos Corex Beckman siliconizados se midió el volumen de cada una de las bandas y se precipitó el ADN con etanol absoluto en una relación 1:2.5 volúmenes.

El ADN en etanol absoluto se congeló a -20°C. durante 24 horas.

4.7.4 Separación del ADN por centrifugación a 12,000 x g.

PROCEDIMIENTO:

Los tubos que contenían el ADN precipitado se colocaron en una centrifuga marca Sorvall RC-SB para centrifugarlos a 12,000 X g durante 30 minutos a 4°C.

4.7.5 Extracción fenólica de cada una de las bandas.

4.7.5.1 Solución fenol; cloroformo-alcohol isoamílico en una proporción 24:1. A esta mezcla se adicionó beta-mercaptoetanol e hidroxiquinoleína, ajustada a una concentración del 1%.

PROCEDIMIENTO:

En dos tubos Corex se midió el volumen de cada una de las bandas y se adicionó un volumen igual de la solución preparada en el inciso 4.7.5.1, y se centrifugaron los tubos a 1,200 Xg durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente con pipeta Pasteur estéril se recuperó el ADN de cada una de las bandas y se repitió la extracción fenólica una vez más. Al ADN de cada una de las bandas se le adicionó el volumen necesario de acetato de sodio 20 M. para llegar a tener una concentración final de acetato de sodio 0.3 M.

El ADN se reprecipitó con etanol absoluto a 4°C. en proporción 1:2.5. Se refrigeraron los tubos durante 3 horas a 4°C y se centrifugaron a 12,000 Xg durante 30 minutos a 4°C. El ADN se colocó en un rotavaporizador Savan speed vac. concentrator durante 20 minutos

Finalmente se diluyó cada una de las bandas en 500 µl. de agua bidestilada estéril.

4.8 CARACTERIZACION PARCIAL DEL ADN POR ELECTROFORESIS EN AGAROSA AL 0.7%

4.8.1 Enzimas de restricción utilizados para la digestión del ADN.
Biolabs New England.

Se utilizaron considerando que 2.0 U de enzima son necesarias para digerir 1 μg de ADN.

4.8.1.1 Sma con una actividad específica de 4 U/ μl

4.8.1.2 Hind-III con una actividad específica de 5.8 U/ μl

4.8.1.3 Hpa-II con una actividad específica de 3.5 U/ μl

4.8.1.4 MSP-I con una actividad específica de 20 U/ μl

4.8.1.5 ALU-I con una actividad específica de 10 U/ μl

4.8.1.6 PST-I con una actividad específica de 8 U/ μl

4.8.1.7 Sau-3-A con una actividad específica de 1 U/ μl

4.8.1.8 Solución reguladora de EDTA

PROCEDIMIENTO:

A 7 tubos eppendorf se les colocó 3 μl de ADN de la banda superior en cada uno, y de igual forma se depositaron en otros 7 - tubos eppendorf 3 μl de ADN de la banda inferior, posteriormente se adicionaron a cada uno de los 14 tubos 3 μl de solución reguladora 10X y se calculó el volumen de agua bidestilada estéril necesaria para que cada tubo tuviera un volumen final de 30 μl , considerando el volumen de enzima que se adicionaría a

cada tubo posteriormente, así como se muestra en la TABLA N° 1.

Posteriormente se incubaron los catorce tubos Eppendorf 5 hrs. a 37°C, después de este tiempo, se adicionaron 6 µl. de EDTA - 0.5 M PH = 8.0 adicionada de Ficoll 400 al 30% y de azul de bromofenol al 0.25%.

4.8.2 Preparación de gel de agarosa al 0.7% con bromuro de etidium.

4.8.2.1 Solución reguladora de tris boratos 0.089M PH 8.

Se pesaron 54.0 g de Tris base, 27.5 g de ácido bórico y se disolvieron en 2,500 ml. de agua bidestilada estéril y se adicionaron 20 ml. de EDTA 0.5 M y se ajustó a un pH de 8 y se aforó a 5 lts. con agua bidestilada estéril.

PROCEDIMIENTO:

Se pesaron 2.1 g de agarosa y se disolvieron en 300 ml de la solución reguladora de Tris-boratos 0.089 M PH 8.0 y sobre una placa de vidrio de 21 x 22 cm. se vertió la agarosa hasta obtener un espesor de aproximadamente 5 mm., se colocó sobre el gel un adaptador para practicar 20 pozos en los cuales se colocaron las muestras, luego se puso el gel en una cámara para electroforesis horizontal utilizando una solución reguladora para el corrimiento de las muestras de Tris-boratos 0.089 M PH = 8.

TUBO	ENZIMA	ADN B.S. 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	ADN B.I. 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	SOLUCION REG. 10X μL	AGUA BIDESTILADA ESTERIL μL	μL DE ENZIMA	SOLUCION EDTA. μL 0.5 M PH=8
1	Sma	3	-	3	22.5	1.5	6
2	Sma	-	3	3	22.5	1.5	6
3	Hind-III	3	-	3	22.97	1.03	6
4	Hind-III	-	3	3	22.97	1.03	6
5	Hpa-II	3	-	3	22.29	1.71	6
6	Hpa-II	-	3	3	22.29	1.71	6
7	MSP-I	3	-	3	23.7	0.3	6
8	MSP-I	-	3	3	23.7	0.3	6
9	ALU-I	3	-	3	23.4	0.6	6
10	ALU-I	-	3	3	23.4	0.6	6
11	PST-I	3	-	3	23.25	0.75	6
12	PST-I	-	3	3	23.25	0.75	6
13	SAU-3A	3	-	3	18	6	6
14	SAU-3A	-	3	3	18	6	6

TABLA N° 1

Se colocaron en los pozos 20 muestras en el siguiente orden:

POZO

1	Marcador HIND III	20 μ l
2	ADN BANDA INFERIOR	10 μ l
3	ADN BANDA SUPERIOR	10 μ l
4	Muestra del Tubo 1	30 μ l
5	Muestra del Tubo 2	30 μ l
6	Muestra del Tubo 3	30 μ l
7	Muestra del Tubo 4	30 μ l
8	Muestra del Tubo 5	30 μ l
9	Muestra del Tubo 6	30 μ l
10	Muestra del Tubo 7	30 μ l
11	Muestra del Tubo 8	30 μ l
12	Muestra del Tubo 9	30 μ l
13	Muestra del Tubo 10	30 μ l
14	Muestra del Tubo 11	30 μ l
15	Muestra del Tubo 12	30 μ l
16	Muestra del Tubo 13	30 μ l
17	Muestra del Tubo 14	30 μ l
18	ADN BANDA INFERIOR	10 μ l
19	ADN BANDA SUPERIOR	10 μ l
20	MARCADOR G Hind III	20 μ l

y se aplicaron 30 volts durante 18 hrs. Al cabo de este tiempo se llevó el gel al transiluminador de luz ultravioleta y se tomó fotografía.

CAPITULO V

5.- RESULTADOS:

Los resultados obtenidos del empleo de lectinas como fitohemaglutininas *Limulus polyphemus* y *Phaseolus vulgaris* obtenida de GIBCO Laboratories que se utilizaron para favorecer la división celular en los cultivos de amibas, dieron poca información, pues las partículas de ADN fueron poco visibles, por lo que decidimos utilizar otras técnicas para demostrar la presencia del material genético en las amibas utilizando métodos citoquímicos. Las figuras 1 y 2 muestran la tinción de Giemsa específica para ADN.

FIGURA 1: Tinción con Wright Giemsa específica para ADN.

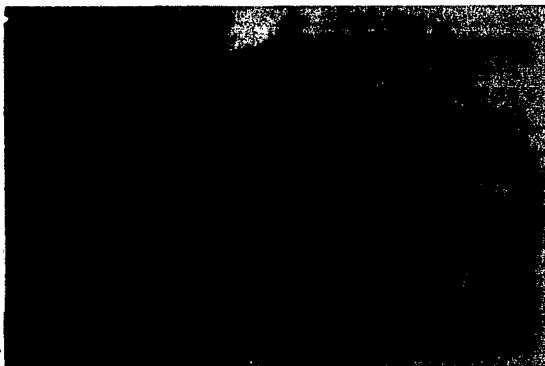


FIGURA 2: Tinción con "Giemsa" después de 72 horas de haber incubado las amibas a 37°C.

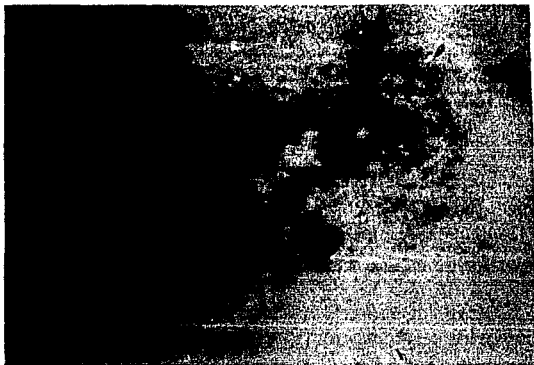


FIGURA 3: Tinción de Feulgen (10) específica para ADN. Las tinciones fueron contrastadas con solución de verde luz al 2% durante dos minutos y posteriormente fueron lavadas con agua bidestilada.

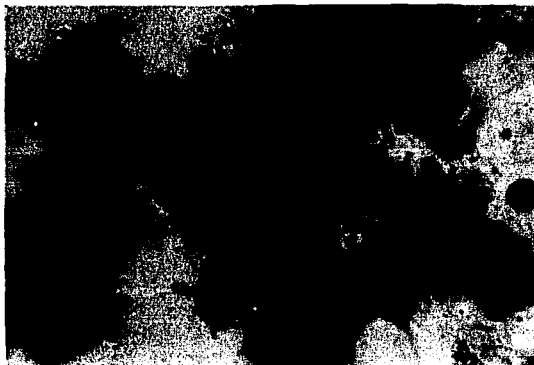


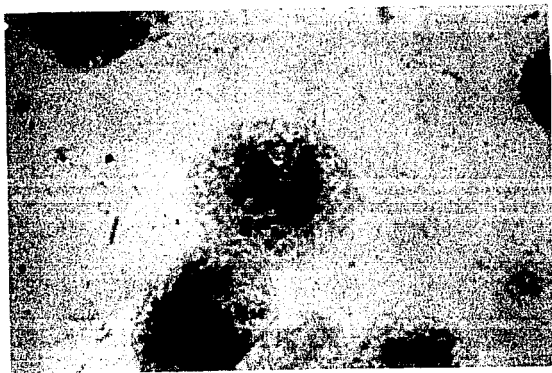
FIGURA 4: Tinción de Feulgen. Se observa el ADN de color magenta - distribuido en forma irregular en los núcleos de las amibas, así como la tinción de verde metil pironina, también específica para ADN como se muestra en las figuras 5 y 6.



FIGURA 5: *Tinción verde metil pironina específica para ADN*



FIGURA 6: *Tinción verde metil pironina específica para ADN*

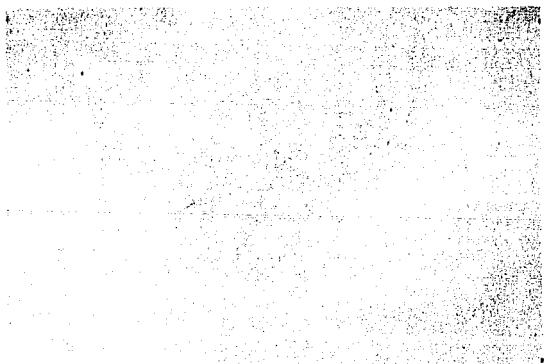


Otro de los procedimientos utilizados fue mediante técnicas inmunológicas por inmunofluorescencia indirecta, en donde se visualizó la presencia del ADN, como se muestra en las figuras 7 y 8

FIGURA 7

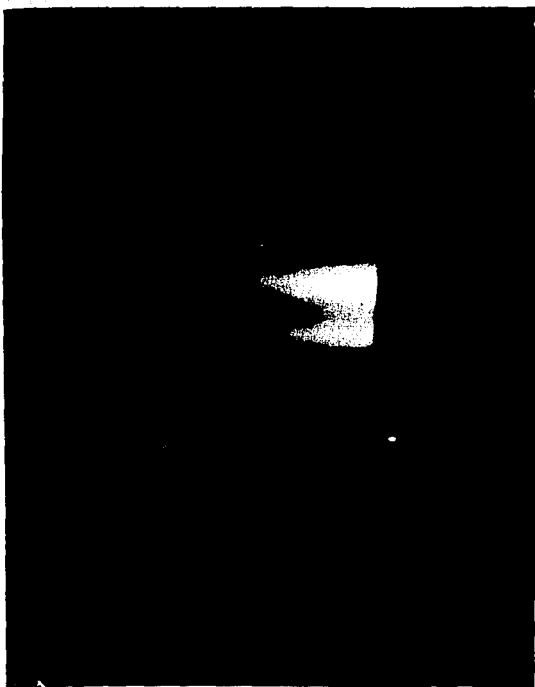


FIGURA 8



Los resultados obtenidos del aislamiento del ADN en gradiente de cloruro de cesio, se presentan en la figura 9 y finalmente en la figura 10 se presenta la caracterización parcial mediante electroforesis de las dos bandas obtenidas de ADN durante el aislamiento, utilizando para ello siete endonucleasas de restricción.

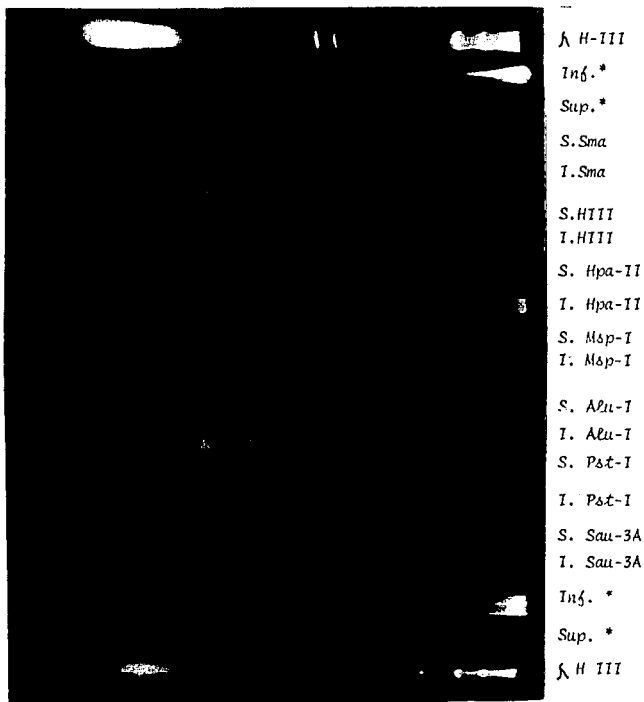
FIGURA 9: Aislamiento del ADN en gradiente de cloruro de cesio.



Banda
Sup.

Banda
Inf.

FIGURA 10: Caracterización parcial de las dos bandas obtenidas durante el aislamiento del ADN.



(*) SIN DEGRADAR

CAPITULO VI

6.- DISCUSIÓN:

Como ya se mencionó anteriormente, los estudios relacionados con el material genético en las amibas fueron iniciados por Sopina [31], quien hizo notar la presencia de diminutos cromosomas en el endosoma de su núcleo, variando éstos de acuerdo a la especie de la amiba; sin embargo, en este trabajo se señaló que no fueron muy visibles las diferentes etapas de la división nuclear.

Por otro lado, los estudios de Morales (19) con E. invadens mostraron claramente algunas etapas de división nuclear durante el enquistamiento. La observación de estos resultados nos motivó a utilizar lectinas y favorecer la mitosis con el objeto de determinar la morfología de los cromosomas. Esto a nuestro juicio tiene importancia porque sitúa la etapa filogenética de las amibas relacionada a la conformación del contenido genético de ellas.

Nuestros intentos tratando de visualizar los cromosomas utilizando lectinas dieron como resultado la observación de pequeñas partículas que, a nuestro juicio, podrían corresponder a cromosomas, probablemente si la observación se hubiera hecho al microscopio electrónico tendríamos una información más completa.

Sin embargo, con las tinciones específicas para el ADN utilizadas, pudimos observar la cromatina periférica del núcleo distribuida en forma muy irre-

gar, así como señalar que el endosoma nuclear no fue central.

Otra metodología que utilizamos para la demostración del contenido de ADN - en las amibas, fue utilizando técnicas de inmunofluorescencia indirecta, - donde claramente observamos que el contenido de ADN estuvo presente en el núcleo distribuido en forma irregular.

El primero en aislar el contenido de ADN de los núcleos de diferentes cepas de E. histolytica utilizando un gradiente de cloruro de cesio fue Reeves - (23), quien demostró que Este fue diferente de acuerdo a la especie de amiba utilizada. Asimismo López Revilla (17), mostró que había fluctuaciones - en el contenido de ADN aislado de diferentes cepas de amibas, tratando de - relacionar la diferente cantidad de ADN, con patogenicidad. El problema se - presenta cuando en dos cepas de E. histolytica morfológicamente iguales, - una es capaz de producir invasividad a órganos y la otra se comporta en forma comensal. Sin embargo, la metodología utilizada por los dos autores anteriormente mencionados, data de hace más de 10 años, por lo que pensamos que los resultados podrían modificarse considerablemente utilizando una metodología más actualizada.

Nuestro trabajo consistió en aislar el ADN de E. histolytica cepa HM-1 y - llevar a cabo con ella una purificación y caracterización parcial utilizando siete enzimas de restricción como se muestra en las figuras 9 y 10.

Una de las enzimas de restricción utilizada fue Sma, que al igual - que Hind-III tiene un comportamiento semejante en la banda inferior, - si consideramos que Sma rompe enlaces entre guanina y Citosina en donde se presenta la siguiente secuencia 5' ..CpCpCp.}GpGpGp..3' y que Hind-III rompe enlaces entre adenina y adenina en la secuencia 5'. .Ap}ApGpCpTpTp..3'

podemos señalar por el tamaño de los fragmentos, que estas secuencias no están presentes en el ADN de la banda inferior. Por lo contrario, en la banda superior sí están presentes, pues aunque la hidrólisis fue pequeña, ésta se observó obteniéndose fragmentos que pueden corresponder a un contenido de - 23,130 pares de bases con un peso molecular aproximado de 15×10^6 D. Con la enzima Hind-III (30), estos fragmentos formados contienen entre 9,414 y 23,130 pares de bases y su peso molecular está entre 6.12×10^6 y 15×10^6 D.

Con lo que respecta a las endonucleasas Hpa-II y Msp-I (26,29), las dos hidrolizan el enlace entre Citosina y Citosina en la secuencia a 5'.. m Cp CpGp...3' la diferencia es que Hpa-II no actúa sobre el enlace Citosina-Citosina cuando la base se encuentra metilada; la actividad de Hpa II que se presentó con la banda superior dio fragmentos con un número mayor de 4,371 - pares de bases y un peso molecular de 2.84×10^6 D. Sin embargo, con la banda inferior, la enzima Hpa-II no presentó ninguna actividad. Lo que propone es que la secuencia en donde se encuentra el enlace que rompe esta enzima estaba metilado.

Otra de las endonucleasas fue Msp-I (6, 28), si consideramos que esta enzima presenta actividad cuando está presente la siguiente secuencia 5'.. Cp CpGp...3 al llevar a cabo la hidrólisis con las dos bandas obtenidas de - ADN pudimos observar que con la banda superior se formaron fragmentos con un número de bases aproximado de 4,371 y un peso molecular de 2.84×10^6 , habiendo con la banda inferior una mayor actividad, pues los fragmentos formados presentaron un número de pares de bases de 2,028 y un peso molecu-

lar de 1.32×10^6 . Cabe señalar que el hallazgo de encontrar el ADN de la amiba con bases metiladas es interesante, pues de acuerdo a lo reportado por Cooper y Whittaker (2, 34), se incide que en la escala filogenética los ADN poco metilados corresponden al ADN de los insectos, el ADN medianamente metilado a los artrópodos y en los vertebrados se presenta el ADN metilado en forma más importante; por otro lado, podría pensarse que este puede ser un mecanismo de defensa en contra de las enzimas que son liberadas por otras bacterias, así como de sus propias enzimas.

En relación a la actividad presentada por la endonucleasa Alu-1 (24), esta rompe enlaces con la secuencia $5'..ApGp\{CpTp..3'$ el resultado obtenido dio la formación de fragmentos con un número de pares de bases entre 6,557 y 4,371 y un peso molecular entre 4.26 y 2.84×10^6 Daltones.

El comportamiento con la banda inferior, fue el obtener fragmentos más pequeños, siendo éstos de 4,371 pares de bases y un peso molecular de 2.84×10^6 .

Otra enzima de restricción que utilizamos fue Pst-1 (29), esta endonucleasa tiene la capacidad de romper el enlace $5'..CpTpGpAp\{Gp..3'$. El resultado de la acción enzimática sobre la banda superior de ADN después de la electroforesis dio como resultado que se formaron fragmentos largos y éstos al compararlos con los fragmentos del ADN del Fago Lamda utilizado como indicador de pesos moleculares conocidos, dio como resultado que aproximadamente los fragmentos obtenidos contenían entre 6,551 y 4,371 pares de bases, situándolo con un peso molecular entre 4.26 y 2.8×10^6 Daltones.

Con la banda inferior no hubo acción enzimática, por lo que inferimos que en el ADN de esta banda no había una secuencia de bases donde estuviera presente adenina y guanina vecinalmente, puesto que la imagen observada fue semejante a cuando con esta banda se llevó a cabo la electroforesis sin tratarla con ninguna enzima.

En relación a la hidrólisis, producida por la endonucleasa Sau-3A (32), la actividad desarrollada sobre el ADN es en los sitios donde la secuencia es 5'.. \searrow GpApTpCp..3', siendo muy activa, pues los fragmentos del ADN en la banda superior correspondieron a 2,322 pares de bases, con un peso molecular de 1.5×10^6 Daltones, lo que nos indicó que esta secuencia está presente en el ADN de las dos bandas estudiadas.

De los resultados obtenidos podemos concluir que se pudo aislar y purificar el ADN de E. histolytica llevando a cabo una caracterización parcial con enzimas de restricción, dando la información de qué tipo y de qué secuencia de bases está constituido el ADN de E. histolytica, así como la presencia de bases metiladas, lo cual no se había reportado para esta amiba y tiene importancia porque la sitúa como un protozooario muy peculiar, de acuerdo a la escala biológica que le corresponde, creemos que estos estudios darán una pauta de comparación al estudiar el ADN de otras cepas de E. histolytica, cuyo comportamiento es diferente frente al huésped, así como un mejor conocimiento de la característica biológica de este protozooario.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Adams, E. B.: "Analysis of 5,087 cases of invasive amoebiasis". *Amibiasis México*, D. F. 1976, pág. 735.
- 2.- Albach, L.; Booden, T.; B oon, P.; Downing, S.: "Concepts of function of peripheral non-chromatin and endosome in E. histolytica". *Arch. invest. Med. (Méx.)*, 1980; 11 (1 Suppl): 63.
- 3.- Artigas, J.; Beaver, P. C.; "Salmon diet in relation to amebic colitis in the dog". *Amer. J. Med. Hyg.* 1961; 10.
- 4.- Avery, C. T.; Macleod, C. M.; and McCarty, M.; "Studies on the chemical nature of the substances inducing transformation of Pneumococcal types. Induction of transformation by DNA fraction isolated from Pneumococcus - type 111". *J. Expt. Med.* 1944; 79: 137
- 5.- Beaver, A.; López, V. C.; y D'Alesiandro E.; "Cutaneous amebiasis of the eyelid with extension into the orbit". *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 1978; 27 (6): 1133.
- 6.- Bird, A. P.: "DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA". - *Nucleic acids Research.* 1980; 8: 1499.
- 7.- Bos, H. J.: "An hypothesis about the role of intestinal bacteria in the virulence of E. histolytica". *Amibiasis IMSS México*, D. F. 1976; pág. 551.

- 8.- Carrera, G. M.; Sadum, E. H.; Faust, E. C.: "The effect of protein deficient diets on the susceptibility of guinea pigs to infection with E. histolytica". Amer. J. Trop. Med. Hyg. 1952; 1.
- 9.- Cooper, D. N.; Taggart, H. M.; and Bird, A.: "Unmethylated domains in vertebrate DNA". Nucleic acid Research, 1983; 11 N° 3: 647.
- 10.- Dezma, C. Shechan.; H. T. Barbara.; Hrapchik, B.: "Theory and practice of histotechnology". 2da. Ed. U.S.A. pág. 150.
- 11.- González, M. A.; López C. A.; y Tanimoto, Weki: "Absceso hepático amibiano experimental y candidiasis oportunista". Amibiasis IMSS México, D. F. 1976; pág. 558.
- 12.- Gutiérrez, G.; "Manual de infectología". 6a. ed. Ediciones médicas del Hospital Infantil de México, 1978, pág. 56.
- 13.- Jiménez, C. E.; Kumate, J.: "Correlación clínica de zimodemas de E. histolytica". Arch. Invest. Méd. (Méx.), 1982, 13 (Supl. 3): 77
- 14.- Kenney, M.; Eveland, L. K., and Vermakov, V.: "Cyst of E. histolytica in tissues". Amibiasis IMSS. México, D. F., 1976, pág. 546.
- 15.- Kumate, J.; Aranda, E.: "Enfermedades diarreicas en el niño". 5a. ed. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México, D. F., 1978, pág. 236.

- 16.- Larsh, J. E.; "The effect of a lactogogue producing diet on experimental amebiasis in dogs". Amer. J. Trop. Med. Hyg., 1952; 1.
- 17.- López Revilla, R.; y Gómez, R.; "E. histolytica, E. invadens, and E. moshkoviskii fluctuations of the DNA content of axenic trophozoites". - experimental parasitology, 1978; 44: 243.
- 18.- Mora Galindo, J.; Martínez Palomo, A.; Chávez, B.: "Interacción entre E. histolytica y el epitelio cecal de cobayo". Arch. Inv. Méd. (Méx.), 1978; 9: 261.
- 19.- Morales Vallarta, M.; Mata, B.; Ramírez, B. E.; y Segura J.: "División nuclear y presencia de microtúbulos en la diferenciación de E. invadens". Arch. Inv. Méd., 1982; 13 Sup. 3: 211.
- 20.- Nabyl, I.; Elsayh, F.: "Cutaneous amoebiasis". British Journal of plastic surgery 1978; 31: 48.
- 21.- Orozco, E.; Martínez Palomo, A.; López Revilla, R.; "Un modelo in vitro para el estudio cuantitativo de la virulencia de E. histolytica". Arch. Inv. Méd. (Méx.), 1978; 9: 257.
- 22.- Raudin, J. I.; Guerrant, R. S.; "The role of adherence in cytopathogenic mechanism of E. histolytica". Arch. Invest. Méd. 1982; 3 Supl. 2: 123.
- 23.- Reeves, R. E.; Terrie, S.; y Montalvo, E.: "Characterization of deoxyribonucleic acid of E. histolytica by cesium chloride density centrifuga-

- tion". *The Journal of Parasitology*. 1971: 57. N° 5: 937.
- 24.- Roberts, J.; Myers, A. P.; Morrison, A.; "A Specific endonucleasa from *Arthrobacter luteus*". *J. Mol. Biol.* 1976: 102: 157.
- 25.- Sepúlveda, B.; "La amibiasis invasora por *E. histolytica*". *Gaceta Médica de México*, 1970; 100: 101.
- 26.- Sharp, A.; Sugden, B.; y Sambrook, J.: "Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus para-influenzae* using analytical agarosa, ethidium bromide electrophoresis". *Biochemistry*, 1973; 12: - N° 16: 3055.
- 27.- Sharyn, A. E.; Roberts, J.R.: "Two restrictionlike enzyme from *Xanthomonas malvacearum*". *J. Mol. Biol.* 1977; 112: 521.
- 28.- Singer.: "methylation of mouse liver DNA studied by means of the restriction enzymes MSP-1 and HPA-11". *Science*, 1979; 203: 1019.
- 29.- Smith, L. D.; Blattner, R. F.; y Julian, D.: "The isolation and partial characterization of a new restriction endonucleasa from *Providencia stuartii*". *Nucleic acids Research*, 1975; 3 N° 2: 343.
- 30.- Smith, O. H.; y Wilcox, W. K.; "A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*". *J. Mol. Biol.* 1970; 51: 379.

- 31.- Sopina, V. A.; Ivanova, S. B.; y cols.: "A study on histones in amoeba nucleic by indirect immunofluorescence method". *Experimental Cell Research*, 1979; 12: 299.
- 32.- Sussenbach, J. S.; Monfoort, C. H.; Schiphof, R.; and Stobberingh, E. E.: "A restriction endonuclease from *Staphylococcus aureus*". *Nucleic acids Research*, 1976; 3. N° 11: 3193.
- 33.- Watson, J. D.; and Crick, F.: "A structure for DNA". *Nature*, 171: 736.
- Watson, J. D.; and Crick, F.: "Genetic implication of a structure of DNA". *Nature*, 1953; 171: 964.
- 34.- Whittaker, A. P.; McLachlan, A.; y Hardman, N.: "Sequence organisation in nuclear DNA from *Physarum polycephalum*: Methylation of repetitive sequences". *Nucleic acids Research*, 1981; 9 No. 4: 801.