

03062  
2ej.3

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE DNA REPETITIVO DE**  
**Entamoeba histolytica**

**TESIS**

**que para obtener el título de maestro en**  
**Investigación Biomedica Básica**

**presenta**

**Licenciado en I.B.B. Jorge Armando Cruz Reyes**

**ASESOR**

**Dr. Paul M. Lizardi Lopez**

**Noviembre 1988**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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

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

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

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

**INDICE**

**A) Introducción.**

**B) Materiales y Métodos.**

**C) Resultados.**

**D) Discusión.**

**E) Apéndice.**

**F) Bibliografía.**

## A.- INTRODUCCION

La amibiasis es la infección del hombre por el parásito protozoario Entamoeba histolytica (Schaudinn 1903). Este organismo fue descrito por primera vez por Lesh en 1875, se distribuye universalmente (Kagan 1976), y afecta aproximadamente al 10% de la población mundial (W.H.O. 1969). En México es una de las enfermedades mas importantes por su frecuencia y mortalidad (Gutierrez et.al.1976). Esta especie se ha encontrado usualmente viviendo como comensal en el lumen del intestino grueso (amibiasis luminal), pero puede invadir la mucosa intestinal produciendo la disenteria o ameboma; a travez de su dispersion via sanguinea, puede dar lugar a lesiones extraintestinales, particularmente en el higado (amibiasis invasiva).

Entamoeba histolytica ha sido objeto de una amplio estudio en México y otros países, especialmente en lo que se refiere a la caracterización de la virulencia, dependiente principalmente de la invasividad del parásito. En particular se ha profundizado en el conocimiento de propiedades biológicas como fagocitosis, adhesión a celulas blanco, efecto citopático y posible actividad citotóxica (XV Congreso Nal. de Bioq.).

El conocimiento de deferentes aspectos que hagan posible el uso de este organismo como un modelo de estudio de la organización y estructura genómica, de análisis genético, o de regulación de la expresion genética, no ha sido extensivamente desarrollado. El presente trabajo de tesis de maestría, pretende aportar nueva información relacionada a la estructura del genoma de este parásito, con la caracterización de algunos de sus elementos repetitivos. Adicionalmente, como una consecuencia de la naturaleza de sus secuencias, se establece su capacidad para distinguir específicamente E. histolytica de la amiba Laredo "E. histolytica-like".

En general el componente repetitivo constituye una proporción importante de los genomas eucariontes (Britten et.al.1968). Una sola unidad repetitiva puede estar presente decenas o centenas de miles de veces. Por ejemplo en Tripanosoma cruzi la unidad repetitiva mas abundante se encuentra 120,000 veces y constituye

aproximadamente el 10% del genoma (Gonzalez et.al.1984). Normalmente varias familias de elementos repetitivos estan presentes en un solo organismo. Estas secuencias, aparentemente han sido conservadas evolutivamente, mas como un componente estructural del genoma que como una secuencia de nucleotidos con una función específica, excepto en el caso de familias de genes estructurales conocidos, como los ribosomales o los de tubulina. Una observación general es que los elementos repetitivos puede presentar diversas variaciones, por ejemplo: en la secuencia de nucleotidos dentro una misma familia de elementos, en el número de copias y la ubicación en el genoma dentro de una especie de organismos, y en su presencia o ausencia por completo entre especies

Dos aspectos de la naturaleza de estos elementos ha sido de gran interés para la parasitología molecular, el campo de la biología que interesa a este trabajo. Por un lado su inestabilidad, productora de polimorfismos en la estructura del genoma, debido a su capacidad de de mutación asociada a cambios puntuales y mecanismos de duplicación, delección, y translocación en algunos casos. Este fenomeno ha sido observado principalmente en protozoarios, ya que el rango de tamaño de los cromosomas ha permitido su análisis en sistemas electroforéticos de campos pulsados (Schwartz et.al.1984, Corcoran et.a.1986, Kemp et.al.1985). Particularmente en E. histolytica se han reportado variaciones en la composición de bases en diferentes cepas axenicas y monoaxenicas, por medio de analisis de desnaturalización térmica (Gelderman et.al.1971) y determinación de densidad flotante (Reeves et.al.1971). Tambien se han observado fluctuaciones en el contenido de DNA de trofozoitos axenicos (Lopez-Revilla et.al.1978). Hasta el momento no se han reportado elementos repetitivos que sean blanco de mecanismos generadores de rearrreglos moleculares.

El otro aspecto de gran interes actual se relaciona a la utilidad de algunos ejemplares de DNA repetitivo, como herramientas en la taxonomía molecular (Ramirez et.al.1987), y la identificación específica de generos y especies de organismos (Ellis 1988, Ramirez et.al.1987). La evolución del componente repetitivo suele darse con una velocidad relativamente rapida, tal que secuencias nuevas pueden surgir dentro de cada una de las especies de organismos que

hayan divergido de un ancestro común.

La identificación con alta sensibilidad y especificidad, de generos y especies patogenicas para el ser humano y animales de interes comercial, es de gran importancia para fines de control epidemiológico. Con este fin, la Biología Molecular esta participando con el aislamiento y caracterización de elementos repetitivos con potencial en el diseño de ensayos diagnósticos basados en la hibridación específica de ácidos nucleicos (Lizardi et.al.1988, Zolg et.el.1987). Para la identificación específica de E. histolytica, se han propuesto enfoques basados en el tamaño del trofozoito y del nucleo (Lopez-Revilla et.al en prensa), o el perfil electroforético de proteínas totales (Said-Fernandez et.al.1978). Aparentemente las dificultades técnicas asociadas a estos análisis los han hecho poco atractivos. Otro tipo de ensayos propuestos se basan en la aplicación de zimodemos para la identificación intra-específica de cepas patogénicas de cepas no-patogénicas (Sargeant et.al.1978). El posible papel diagnóstico de este interesante enfoque permanece en duda, ya que aparentemente el número de patrones zimodemos típicos de E. histolytica, está aumentando conforme se estudian mas especimenes (Martínez-Palomo 1982). Recientemente ha sido reportado el aislamiento de una secuencia repetitiva ribosomal, subclonada de un fragmento transcribible, que distingue este parásito de otras especies de Entamoeba (Bhattacharya et.al.1988).

A continuación se presentara la caracterización preliminar de elementos repetitivos de Entamoeba histolytica, presumiblemente espaciadores ribosomales, que no se transcriben pero que está ubicados en un locus ribosomal. Se estimó un número de copias para estos elementos, de 200 copias por genoma haploide. Se encuentran contenidos en el genoma de E. histolytica, pero no en el de una cepa E. histolytica-like (Laredo). El intenso polimorfismo, al menos, en sus secuencias, permite distinguir intra-específicamente diferentes cepas de E. histolytica. Se observaron diferencias entre la cepa HM1-CINVESTAV y la cepa HM1-CIIGB. Se discute la necesidad de una re-clasificación de especies y sub-especies del genero Entamoeba a partir de criterios de análisis molecular fino (Ramírez et.al.1987).

## B.- Materiales y Metodos.

### 1) Aislamiento de DNA de Amibas

Se obtuvo DNA de las siguientes cepas de amiba:

Entamoeba histolytica HM1-CINVESTAV/IPN

Entamoeba histolytica HM1-CIIGB/UNAM

Entamoeba histolytica HM38

Entamoeba histolytica HK9

Entamoeba histolytica-like Laredo

El siguiente protocolo fue provisto por la Dra. Isaura Meza del CINVESTAV/IPN.

1.1 Lavar las amibas ( $100 \times 10^6$ ) en medio de cultivo o PBS 2 o 3 veces.

Centrifugar por 15 min. a 5000 RPM, para empastillar.

1.2 Resuspender la pastilla de amibas suavemente en 10 ml (TKM-Inh. prot):

Tris-HCl pH8            10 mM

KCl                      24 mM

MgCl                     10 mM

Spermidina            0.6 mM

N-etil maleimida      5 mM (recien preparada, 1ml de 50mM en Tris pH8 se prepara para 10 ml del bufer).

DIFP                     2 mM Diisopropilfluorofosfato.

p-hidroximercuri-

ribenzoato              50 ul de un stock 10 mM en tris pH9 para 10 ml de Buffer. El stock se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

1.3 Revisar la integridad de las amibas (es importante que no haya lisis celular en esta etapa). Agregar Nonidet P-40 (stock 10%) a una concentración final de 0.5%-1%.

1.4 Lisar los trofozoitos usando un homogenizador Dounce. 60 pases suaves pueden ser suficientes, en hielo.

1.5 Observar al microscopio, la aparición de nucleos. La suspensión de nucleos se divide en 2 corex que contienen: 10 ml c/u de sacarosa 1M (esteril) disuelta en buffer TKM:

Tris pH8	10 mM
KCl	24 mM
MgCl	10 mM

1.6 Centrifugar a 6000 RPM, 12 min.

1.7 Disolver la pastilla de nucleos en 1 ml de EDTA 0.5 M, Sarcosil 1%.

1.8 Extraer 2 veces con un volumen de fenol saturado, mezclando suavemente durante 5 min. Centrifugar a 3000 RPM 10 min y eliminar la fase fenólica.

1.9 Re-extraer la fase acuosa con un volumen de Cloroformo-Alcohol Isoamílico 1:1, 2 veces.

1.10 Dividir la fase acuosa en dos volúmenes de 0.5 ml, pasarlos a corex de 30 ml y diluir con agua destilada hasta un volumen de 9 ml. adicionar 2.2 vols. de Etanol y precipitar.

1.11 Centrifugar a 10 000 RPM, 30 min. a 4°C. El precipitado de cada corex se disuelve en 50-100 ul de buffer TNE (10 mM Tris pH8, 0.5 mM EDTA, 10 mM NaCl). Agregar 10-20 ul de RNasa T1 o IA, e incubar a 37°C durante 30 min.

1.12 Adicionar 25 ul de SDS 10%, y 63 ul de Proteinasa K (1mg/ml). Ajustar a un volumen de 250 ul con TNE e incubar a 37°C. 3-4 horas.

1.13 Extraer con fenol, cloroformo y eter (1:1, 1:1 y 2:1 respectivamente en relación con la fase acuosa).

1.14 Agregar a la fase acuosa 0.1 vol. de Acetato de Sodio 3M y precipitar con 2.2 vols. de Etanol absoluto.

1.15 Disolver la pastilla en Tris 10 mM, pH8 (vol. mínimo), y volver a precipitar con 2.2 vols. de Etanol absoluto.

1.16 Redisolver la pastilla final en un volumen de 30-50 ul de Tris 10mM, pH8.

1.17 Leer absorbancia a 260, 280 y 230 nm, y analizar en geles de agarosa.

## 2) Preparación del vector molecular de clonación.

El plásmido pUC13 (Vieira et.al.1985) fue linearizado con la enzima de restricción BamHI, extraído y desfosforilado de la siguiente manera:

2.1 A 0.7µg de plásmido se adiciono bufer CIP 1x (Tris-HCl 50mM pH8, EDTA 0.1mM pH8), y 23 unidades de CIP (calf intestine phosphatase).

2.2 Se incubó 45 min, a 37°C.

2.3 Se pasó el DNA por una minicolumna (Sephadex G-50, 5% en buffer TE). El volumen de resina a solución de DNA fue de 8:1. Cada centrifugación fue de 2 min. a 2000 RPM. Se hizo al menos un lavado con buffer TE, antes de pasar la solución de DNA.

2.4 Al DNA recuperado se añadió 1 unidad de CIP, y se incubo 60 min. a 37°C.

Se inactivó la enzima a 68 °C, 15 a 20 min. Se aplicó la muestra a un gel de agarosa 1% y se recuperó el plásmido lineal capturandolo del gel con una membrana DEAE-Celulosa NA-45 (Lizardi et.al 1984). El DNA fue eluido usando un buffer de alta sal (Tris-HCl 20mM pH9, EDTA 2mM, NaCl 1.2M), 60 min. a 68°C.

## 3) Clonación de DNA repetitivo.

El DNA total de Entamoeba histolytica HM-1 fue digerido totalmente con Sau3a y clonado en el sitio BamHI del plásmido pUC13. Colonias de E. coli HB101 transformadas con el DNA recombinante fueron analizadas en una hibridación en colonia. Se uso como sonda DNA total de E. histolytica HK9 marcada con <sup>32</sup>P. Filtros replicas (Hanahan y Meselson 1983), con el mismo patrón de colonias fueron hibridizadas contra RNA total de E. histolytica HK9 marcado (<sup>32</sup>P). Fueron seleccionadas las colonias de mediana y alta intensidad en la hibridación con DNA, pero que no mostraron señal visible con RNA marcado. Se hicieron minipreparaciones de plásmido usando el método alcalino (Maniatis et. al.1982), y el tamaño de los insertos fue determinado. La presencia de DNA repetitivo

clonado fue confirmada en experimentos de hibridación en punto (dot-blot) y tipo "Southern".

#### 4) Hibridaciones.

La hibridación en colonia se hizo según Meselson y Hanahan(1983), brevemente: colonias de hasta 1mm de diametro se obtuvieron. Estas fueron transferidas a filtros de nitrocelulosa y tratadas una vez con NaCl 0.5M, NaOH 0.5M durante 5 min, y después con NaCl 0.5M, Tris-HCl 0.5M pH8 durante 10 min, dos veces. Finalmente los filtros fueron cocinados (con vacío a 68°C durante 2 hrs.).

La preparación de la sonda radioactiva de DNA se hizo con los reactivos y protocolo de Amersham para "Random Primer". La actividad específica usada fue de  $3 \times 10^8$  a  $1 \times 10^9$  CPM/ug DNA. La sonda radioactiva de RNA se preparó de la siguiente manera: El RNA (0.6 nmoles de nucleótidos) es desfosfatado y fragmentado al ser calentada la solución a ebullición, 25 min en Buffer TE (Tris-HCl 25mM pH8, EDTA 0.5mM). El volumen final es de 5 ul. Se adiciona Buffer Quinasa 10X (Tris-HCl 50mM pH 8.5, MgCl 20mM, DTT 20mM), ATP P (48 pmoles,  $336 \mu\text{Ci}$ , de 7000 Ci/mmol), y 8U de Polinucleótido Quinasa, en 50 ul como volumen final. La reacción se deja a 37°C durante 30 min. Después se detiene en EDTA 20mM pH 7.2 y se pasa por una minicolumna de Sephadex G-50. La actividad específica usada fue de  $3 \times 10^7$  -  $3 \times 10^8$  CPM/ug RNA.

La hibridación tipo Southern en nylon (S&S) se hizo según Scheider & Schuell. El protocolo es como sigue:

4.1 El gel se trata con NaOH 0.5M, NaCl 1.5M, dos veces, con agitación durante 15 minutos cada una.

4.2 Posteriormente, se trata el gel con Tris-HCl 0.5M pH 7.4, NaCl 1.5 M, dos veces, con agitación durante 15 minutos cada una.

4.3 La membrana de nylon se humedece primero en agua y posteriormente se deja en buffer 6X SSC hasta la transferencia.

4.4 La transferencia capilar se hace en buffer 20X SSC.

4.5 Se siguió método de empaçado de Maniatis(1982) para transferencia ca-  
P. 112

4.6 Los lavados se hicieron de la siguiente manera(con agitación):

2X SSPE, 0.1% SDS, 5 min. Temperatura ambiente.

2X SSPE, 0.1% SDS, 30 min. T.A.

0.1 SSPE, 0.1% SDS, 30 min. T.A. (dos veces).

0.1 SSPE, 0.1% SDS, 60 min. 45°C (65°C).

El último lavado para otro tipo de hibridaciones fue:

0.1X SSPE, 0.1% SDS, 60 min a 68°C. Para hibridación en colonia y  
Dot-Blot.

vs. DNA como sonda radioactiva.

0.1X SSPE, 0.1% SDS, 60 min a 55°C. Para hibridación en colonia y  
Dot-Blot

vs. RNA marcado radioactivamente.

4.7 Re-uso de los filtros:

Los filtros de nitrocelulosa se sumergen en NaOH 0.1M durante  
15 min. Posteriormente se neutralizan con Tris-HCl 0.1M, siempre en  
agitación.

Los filtros de Nylon se sumergen en buffer SSPE 0.01X, SDS  
0.1% a temperatura de ebullición durante 20 min.

5) Determinación de transcripción.

Las clonas de interés fueron transferidas a nitrocelulosa,  
previa linearización para hacer una hibridación tipo Dot-Blot. Se  
aplicaron 10 y 50 ng de cada plásmido. Como controles positivos se  
aplicaron preparaciones de DNA de dos clonas distintas, 10 y 50  
ng, que contienen presumiblemente DNA ribosomal de Entamoeba  
histolytica HM1. También se aplico DNA de Actina de E. histolytica  
HM1 21.3, 10.6, y 5.32ng, clonado en  $\lambda$ gt11. La relación de masa  
inserto:vector es 1:50 La sonda radioactiva fue RNA total de  
Entamoeba histolytica HK9.

6) Estimación de número de copias.

Esta determinación se hizo por medio de una hibridación tipo

Dot-Blot. Se transfirieron a nitrocelulosa 10 y 50 ng de cada plásmido recombinante linearizado. Como control de número de copias se uso el gene de Actina de Entamoeba histolytica (Edman et. al. 1987, Huber et.al. 1987). El estimado de número de copias se hizo asumiendo que el inserto representa una unidad repetitiva. El tamaño del inserto se determinó en un gel de acrilamida 7.5%, al ser extraído este del vector molecular con una doble digestión EcoRI-HindIII. EL papel de nitrocelulosa fue expuesto a DNA total de Entamoeba histolytica HM1, marcado con P. Los puntos prendidos radioactivamente, fueron cortados del papel y contados en liquido de centelleo. Los resultados fueron intrapolados en la curva de masa (núm. de copias) vs. CPMs, hecha para el gen de Actina. Se hizo una corrección por el tamaño del inserto en cada caso. Un calculo mas preciso del número de copias, sera posible para cualquiera de estos insertos siempre que se determine su secuencia nucleotídica.

#### 7) Determinación de la secuencia nucleotídica.

La secuencia de interés fue sub-clonada en M13. El plásmido recombinante fue digerido con HindIII y EcoRI y el inserto fue clonado en M13 mp18 o mp19 digerido con EcoRI y HindIII. Los fagos recombinantes fueron seleccionados usando IPTG y Xgal en la cepa de Escherichia coli JM10 (Messing 1980) y el DNA cadena sencilla fue obtenido. La reacción de secuencia se hizo con el Kit de secuenciación de United States Biochemical Corporation. La polimerización con secuenasa (Toneguzzo et.al.1988) fue en presencia de 5uCi de S. La electroforesis se hizo aplicando 50 watts, en un gel de Acrilamida al 8%. Despues de la corrida el DNA fue fijado en una solucion de Acido Acetico 10%, Metanol 10%. El gel fue secado a 80°C con vacío, y fue expuesto a temperatura ambiente sin pantalla durante 12 a 48 hrs.

#### 8) Enzimas utilizadas y reactivos para Biología Molecular.

Enzimas de restricción de Bio-Labs, Boehringer y BRL.

Fosfatasa ALcalina de SIGMA.

Polinucleotido Quinasa de Bio-Labs.

**Ligasa de Bio-Labs.**

**Kit de Secuenciación (secuencasa) de United States Biochemical Corporation.**

**Kit de marcaje radioactivo por Random Primer de Amersham.**

**Isotopos Radioactivos de Dupont y Amersham.**

**Formamida (para RNA) de BRL. Specialty Reagent. Redistilled Nucleic Acid Grade.**

**Urea de Merck.**

**Sephadex G-50 de Pharmacia.**

**Nitrocelulosa y Nylon de Schleicher and Schuell.**

### C.- RESULTADOS

#### 1) Aislamientos de elementos repetitivos de Entamoeba histolytica.

Se purificó DNA total de este organismo según el protocolo provisto por la Dra. Meza et.al. El material biológico obtenido fue digerido con la enzima de restricción Sau3A, que genera fragmentos de un tamaño promedio de 400 pares de bases,

en E. histolytica (datos no mostrados), y clonado en el vector molecular pUC13. Este plásmido fue previamente linearizado con la enzima BamHI y desfosforilado.

La mezcla de ligasa de las dos preparaciones anteriores se uso para transformar Escherichia coli HB101 (Hanahan 1983). Se seleccionaron en luria solido con Ampicilina, 100ug/ml, las colonias resistentes. Para su transferencia a papel nitrocelulosa se procuro que las colonias tuvieran un diametro maximo de 0.5mm, y que fueran aproximadamente 1000 por caja preti (130 mm de diametro). Fueron preparados filtros replicas (Meselshon y Hanahan 1983), para la conservación del DNA recombinante y para hacer hibridaciones del mismo filtro contra DNA total o RNA total marcados, ambos de E. histolytica.

De las hibridaciones anteriores fueron seleccionadas colonias que produjeron señales de mediana y alta intensidad en una autorradiografía. De estas fueron separadas 6 colonias que no dieron una señal aparente en la hibridación contra RNA marcado radioactivamente. El resto, aproximadamente 20, si produjeron esta señal.

Las 6 colonias anteriores, así como dos de las colonias que dieron la señal mas fuerte contra RNA marcado, fueron tomadas con palillos esteriles y crecidas en medio Luria mas Ampicilina. Se estrió una alicuota de cada cultivo, posteriormente se platearon colonias aisladas. Las nuevas colonias fueron transferidas a nitrocelulosa y re-hibridizadas contra DNA total de E. histolytica. La señal producida por las poblaciones de colonias plateadas fue homogenea.

El resultado anterior, fue indicativo de que se estaba trabajando con clonas purificadas. El DNA plasmidico fue aislado segun el método alcalino de Maniatis y posteriormente digerido con las enzimas de restricción EcoRI o HindIII. Se observó en geles de agarosa al 1%, el incremento en el peso molecular de los plásmidos recombinantes en relación a pUC13.

## 2) Determinación del número de copias de los insertos.

Esta determinación se hizo, asumiendo que cada inserto representaba una copia del elemento repetitivo. El tamaño de los insertos fue determinado al digerir los plásmidos recombinantes con HindIII y EcoRI. Se determino previamente que estas enzimas no reconocieran sitios internos en los insertos. El producto de la doble digestión fue aplicado a un gel de acrilamida 7.5%, y las bandas observadas fueron comparadas con controles de peso molecular.

Los plásmidos recombinantes linearizados con EcoRI o HindIII fueron transferidos a nitrocelulosa, se usaron 10ng y 50ng de cada plásmido. Los controles positivos empleados fueron, DNA total de Entamoeba histolytica HM1 2ng y 5ng, y la clona de  $\lambda$ gt11-gene de Actina de Entamoeba histolytica HM1 45ng, 90ng, 180ng (el inserto de DNA amibiano corresponde a 1/50 de la masa), cuyo número de copias ha sido reportado como 4/genoma haploide (Edman et.al 1987) o 5/genoma haploide (Huber et.al. 1987). La sonda radioactiva fue DNA total de E. histolytica HM1. Como se puede apreciar en la figura 1, la mayoría de las clonas probadas se prendieron fuertemente, y por otro lado no hubo señal visible en los puntos correspondientes a DNA total de humano, de levadura, de Escherichia coli, o de pUC13.

Los puntos marcados radioactivamente en los filtros, fueron recortados y las CPMs se determinaron por conteo en líquido de centelleo. Como puede verse en la figura 2, la relación observada entre la masa de DNA del gene de Actina fijada al filtro de nitrocelulosa y las CPM es confiable. Los valores de CPM determinados para las clonas fueron intrapolados en esta gráfica, y el número de copias fue calculado. Se hizo una corrección en cada

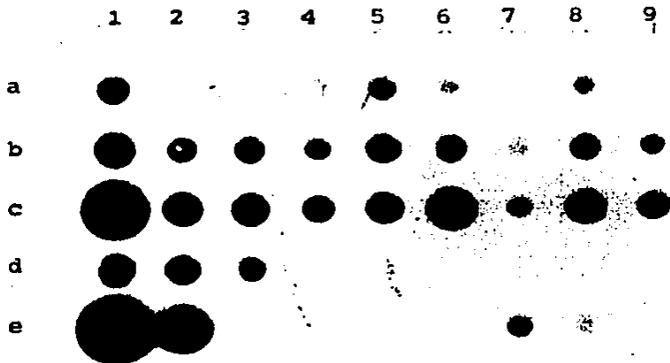


Fig. 1 Autorradiografía de la hibridación en Dot-Blot de diferentes clones de DNA de *E. histolytica* HM1-CIIGS, contra DNA total de HM38 organismo marcado radioactivamente. Las columnas 1-9 indican diferentes clones aislados. Las líneas a, b y c señalan la masa de DNA empleada, 2, 10, y 50ng respectivamente. La línea d muestra el gene de actina de *E. histolytica* clonado en  $\lambda$ gt11. La masa del inserto es 21.3, 10.6, 5.3, 2.6ng respectivamente. La línea e muestra diferentes controles: columnas 1 y 2 DNA total de HM38 (20 y 4ng respec.), columnas 3 y 4 DNA total humano, columnas 5 y 6 DNA de *Saccharomyces cerevisiae*, columnas 7 y 8 pUC13. Todos con 100 y 50ng respectivamente.

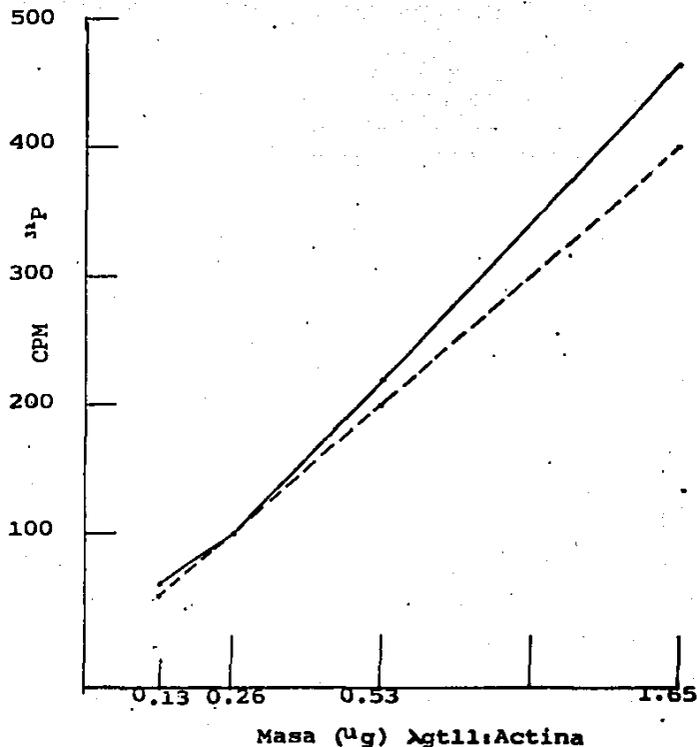


Fig. 2 Gráfica de linealidad entre CPMs y masa de DNA aplicada. Las posiciones correspondientes al gene de Actina *E. histolytica*, mostradas en la figura 1 fueron recordadas y contadas en líquido de centelleo. Las determinaciones de CPMs, se relacionaron a la masa de DNA de Actina. La línea punteada muestra la curva teórica, la línea continua muestra la curva observada.

caso de acuerdo al tamaño del inserto.

En la tabla 1 se muestran estos resultados.

### 3) Determinación de transcripción.

Se hizo esta determinación a nueve clonas, siete de ellas fueron aisladas en hibridación en colonia, como portadoras candidatas de elementos repetitivos no transcritos (clonas D1 a D7 de la tabla I), y las otras dos como elementos repetitivos presumiblemente transcritos (clonas R1 y R2, ver materiales y métodos). Para confirmar esta primera observación se aisló el DNA plasmídico y se fijaron en punto (Dot-Blot) 10 y 50 ng de cada clona sobre papel nitrocelulos. Este se expuso a RNA total marcado radioactivamente, de Entamoeba histolytica HK9. Puede apreciarse en la figura 3A que las primeras siete clonas no dan señal visible, mientras que las dos restantes sí la dan. Cada clona ocupa dos puntos, así por ejemplo la primera ocupa los sitios 1a y 1b, con 10ng y 50ng respectivamente (de todas las clonas se usó la misma masa de DNA, en la última columna 9a corresponde a 50ng y 9b a 10ng). Estos datos corresponden a lo esperado, de acuerdo a los criterios de selección practicados en las hibridaciones en colonia hechas previamente.

Adicionalmente al DNA de las clonas de interés, se fijó al filtro DNA correspondiente al gene de Actina de Entamoeba histolytica, posiciones 1.c(5.32ng), 2.c(10.6), y 3.c(21.3ng). Para verificar que los puntos que no fueron prendidos en esta hibridación contenían DNA, el filtro fue expuesto a una sonda de DNA total de HM1-CIIGB radioactivo (fig.3B). La sonda de RNA fue retirada previamente (ver mat. y met.).

### 4) Elementos repetitivos especie-específicos. Detección de polimorfismos genómicos intra-específicos.

Dos de las clonas no transcritas con mayor número de copias, D1 y D4 fueron usadas como sondas radioactivas en ensayos de hibridación tipo southern. En principio se compararon dos cepas diferentes de Entamoeba histolytica HM1 y HK9, con una cepa de amibas no patógenas para el hombre, Entamoeba histolytica-like

TABLA 1

A	B	C
D1	200	207
D2	1500	3
D3	1500	3
D4	230	101
D5	800	206
* D6	200	56
	240	
D7	200	64
R1	500	62
R2	240	204

Tabla 1 Caracterización de los insertos de DNA de *E. histolytica* clonados en pUC13. (A) Se denominó clonas "Dn" a aquellas que dieron señales de mediana y alta intensidad en ensayos de hibridación en colonia contra DNA total marcado, pero que no dieron señal radioactiva visible contra RNA total marcado. Las clonas "Rn" dieron señal en ambos ensayos de hibridación. Esta observación fue confirmada con los resultados de la fig. 3. (B) Los insertos fueron separados de pUC13 con la digestión EcoRI-HindIII y su tamaño fue determinado en un gel de acrilamida al 7.5%. \* La clona D6 generó dos insertos en la doble digestión. El tamaño de la clona D1 se precisó al determinar su secuencia nucleotídica. (C) El número de copias se calculó determinando las CPM en líquido de centelleo de cada punto mostrado en la fig. 1. Estos datos se relacionaron a la curva de CPM vs masa de DNA de Actina, cuyo número de copias es conocido (fig. 2).

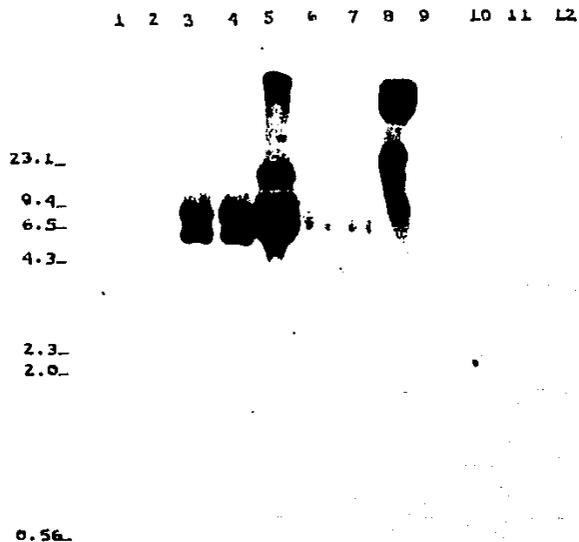


Fig. 5 Autoradiografía de la hibridación tipo Southern de DNA total de diferentes cepas de amibas digerido con EcoRI (mostrado en la fig. 4), contra la clona D1 marcada radioactivamente con el ensayo de random-primer. La hibridación se hizo a 60°C en 6X SSPE y 400 ng/ml de Heparina. El lavado de alta astringencia fue a 45°C por 60 min.

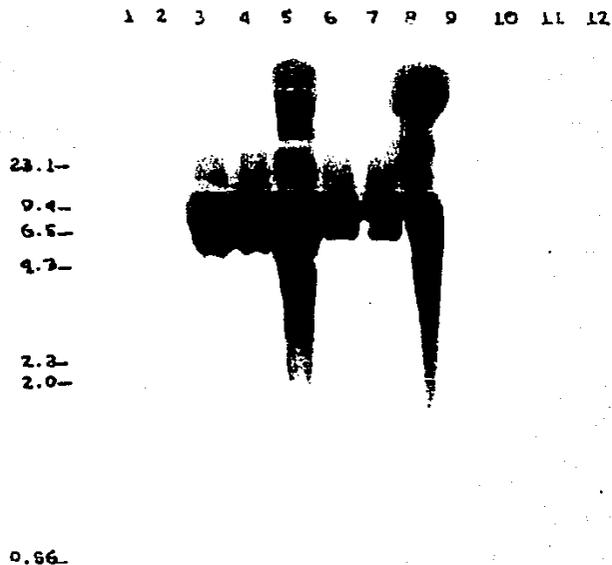


Fig. 6 Autoradiografía de la hibridación tipo Southern de DNA total de diferentes cepas de amibas digerido con EcoRI (mostrado en la fig. 4), contra la clona D4 marcada radioactivamente. Las condiciones de hibridación y lavado fueron las mismas que en la fig. 5. Marcadores de peso molecular  $\lambda$  HindIII, están señalados.

(Laredo). La cepa HM1, se obtuvo de dos laboratorios distintos (CIIGB/UNAM y CINVESTAV/IPN.). En la figura 4, digestiones completas con EcoRI del DNA total de estos organismos son mostradas en un gel de agarosa al 0.8% y teñidas con Bromuro de Etidio (EtBr). El carril 1 corresponde a un control de peso molecular, DNA  $\lambda$  digerido con HindIII, los carriles 2 y 12 presentan DNA total humano, en los carriles 3 y 4 se muestra DNA total de Entamoeba histolytica HM1-CINVESTAV, las digestiones fueron de 8 hrs. y 22 hrs. respectivamente, el carril 5 muestra DNA total de E. histolytica HM1-CIIGB digerido durante 22 hrs., los carriles 6 y 7 muestran DNA total de E. histolytica HK9 digerido 8 y 22 hrs. respectivamente, el carril 8 contiene una digestión parcial, el 9 y 10 muestran DNA total de amiba Laredo-CINVESTAV digerido 8 y 22 hrs. respectivamente. El carril 11 contiene DNA de amiba Laredo-CIIGB digerido 22 hrs. A todas las digestiones de 22 horas, se les adicionó mas enzima despues de las primeras 8 hrs.

Las digestiones muestran un barrido de DNA a lo largo de los carriles, esto es indicativo de que la digestión enzimática ha sido extensiva. Adicionalmente, pueden notarse en algunos carriles bandas conspicuas. Ha sido reportado que las bandas visibles con Bromuro de Etidio en digestiones de DNA total de Amibas con EcoRI, corresponden a DNA repetitivo ribosomal (Bhattacharya et.al.1987), y que son utiles para distinguir una cepa de otra. En diferentes cepas de E. histolytica, se puede ver un doblete de bandas en la zona de 1000 pares de bases (pb), y un doblete en la zona de 6500 pb (la referencia es  $\lambda$ HindIII, fig.4). En la cepa HM1-CIIGB, la banda de mayor peso molecular es producto de la digestión parcial del doblete anterior, como se mostrara posteriormente. El doblete de alto peso molecular manifiesta diferencias intra-especificas en la movilidad electroforética, incluso entre la cepas HM1 provenientes de dos laboratorios distintos.

La amiba Laredo muestra, al menos, una banda en la zona de 1800 pb, otra en la zona de 2500 pb, y un doblete en la zona de 6500 pb, distinguible de los dobletes anteriores.

Este DNA fue tranferido a Nylon e Hibridado con la clona D1 marcada radioactivamente. El resultado mostrado en la figura 5 indica claramente que esta estructura se conserva en el genoma de

sub-especies distintas de E. histolytica, que no está contenido en el genoma de la cepa Laredo, no-histolytica. Puede notarse también que D1 está hibridando con fragmentos que tienen diferente movilidad electroforética en las clonas de amiba probadas. Los fragmentos reconocidos, corresponden a bandas prominentes en EtBr, de mas alto peso molecular (zona de 6500 pb) y presumiblemente sede de genes ribosomales (Batahcharya et.al.1987)

De manera interesante, en la cepa HK9, solo es reconocido el fragmento de menor peso molecular en la zona de 6500 pb. El doblete conservado de bajo peso molecular, conservado en las cepas probadas no comparte homología con D1.

Este mismo filtro fue usado para otra hibridación con la clona D4 (ver en materiales y métodos el tratamiento de filtros para su re-uso). Como puede observarse en la figura 6, la estructura clonada también muestra especificidad para E. histolytica, así como capacidad para revelar polimorfismos genómicos intra-específicos, y también entre las cepas de HM1. Similarmente a D1, la clona D4 tiene homología solamente con las bandas de mas alto peso molecular visibles con EtBr. A diferencia de D1, esta clona es capaz de hibridar, en HK9, con la banda de mayor peso molecular en la zona de 6500 pb.

La banda común que puede notarse tanto en el carril de Laredo y en el de DNA humano, es aparentemente DNA contaminante con homología al vector molecular. En hibridaciones donde se usa exclusivamente el inserto como sonda radioactiva, esta banda no aparece.

Con el propósito de analizar con mas detalle la región polimorfica del genoma donde estan contenidas estas estructuras repetitivas, se digirió el DNA total con otras enzimas. En la figura 7, se muestra una autorradiografía de la hibridación en Southern del inserto clonado en D1 (ID1) marcado radioactivamente, con el DNA total de E. histolytica digerido con las enzimas EcoRI y BglII. Este ensayo de hibridación incluye la digestión de HM1-CINVESTAV y HM1-CIIGB con EcoRI (carriles 1 y 5 respectivamente), y puede notarse en comparación con la fig. 5 que la digestión del DNA total de HM1-CIIGB, esta vez es completa y desaparece una banda de alto peso molecular. En cuanto al DNA de HM1-CINVESTAV, ahora

aparece una banda nueva de alto peso molecular. Presumiblemente esta banda es el producto de la digestión parcial del doblete en la misma zona de 6500 pb. Esta observación sugiere que dichas bandas, representan regiones contiguas en el genoma y que están unidas por un sitio de EcoRI.

La digestión con BglII genera bandas con homología a D1 tanto en la región de 6500 pb, como en la región de 1800 pb de HM1-CINVESTAV y HK9 (carriles 2 y 7 respectivamente). Cuando se hizo la digestión simultáneamente con EcoRI y BglII para HM1-CINVESTAV (carriles 3 y 4, durante 8 y 22 hrs. respectivamente), y HK9 (carril 8), se observó un patrón similar al producido por EcoRI mas una banda ligeramente menor que la generada en la zona de 1800 pb por la digestión de BglII. En todos los casos, los fragmentos generados con homología a D1 son polimórficos entre las cepas HM1 y HK9. En el carril 6, la digestión es parcial. P. 11-

##### 5) Generación de "repetotipos".

Con la intención de generar patrones de restricción con homología al elemento repetitivo D1 (el cual será caracterizado con mas detalle en este trabajo), tipo huella digital "fingerprint" que faciliten una clara identificación de los organismos (Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. 1985) y el posible seguimiento de cambios sutiles en la organización de este elemento en el genoma, se hicieron digestiones con enzimas que reconocieran secuencias de 5 o 6 pb. ricas en A-T. Se sabe que el genoma de las amibas es particularmente rico en estas bases, ya se ha reportado que HK9 tiene 78.6% de pares de bases A-T (Geldermann et.al. 1971), y HM1 62% (Mutul et.al. en prensa). Se seleccionaron aquellas enzimas que produjeron un número abundante de bandas en EtBr y una distribución lo mas homogénea posible de fragmentos a lo largo de un gel de agarosa al 1% (fig. 8). Los mejores resultados se obtuvieron con DraI, HinfI y MboII.

Se eligió la digestión con MboII del DNA total de las cepas HM1-CINVESTAV, HM1-CIIGB, HM38, HK9. El DNA fragmentado se separó en un gel de Agarosa al 1.5%, y se transfirió a Nylon para ser hibridado al plásmido D1 marcado radioactivamente.

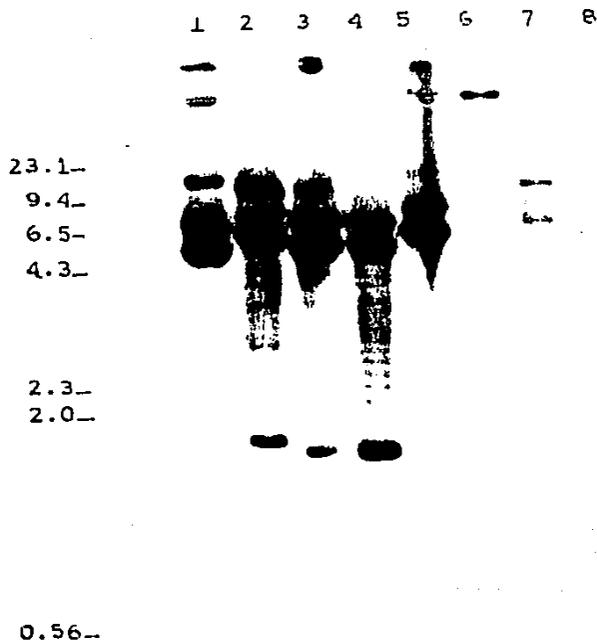


Fig. 7 Autoradiografía de la hibridación tipo Southern de DNA total de diferentes cepas de amibas digerido con EcoRI y BglII, contra el inserto de la clona D1. Los carriles 1-8 son DNA total de diferentes cepas de *E. histolytica*: HM1-CINVESTAV (1) EcoRI, (2) BglII, (3 y 4) EcoRI+BglII, (5) HM1-CIIGB EcoRI, (6) digestión parcial, HK9 (7) BglII, (8) EcoRI+BglII. La hibridación y lavado se hizo como en la fig. 5. Marcadores de peso molecular  $\lambda$  HindIII, están señalados.

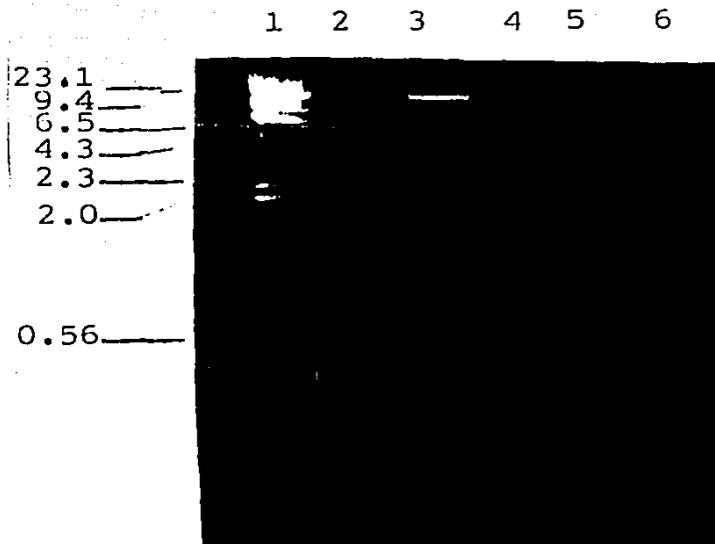


Fig. 8 Análisis de restricción de DNA total de *E. histolytica* con enzimas de restricción que generan patrones de bandeos de amplia distribución. Los fragmentos fueron separados por electroforesis en agarosa al 1% y teñidos con EtBr. El carril 1 muestra marcadores de peso molecular  $\lambda$  HindIII. Los carriles 2-6 son DNA *E. histolytica*: (2) HK9 sin digerir, (3) HM1-CIIGB sin digerir, (4) HM1-CIIGB DraI, (5) HM1-CIIGB HinfI, (6) HM1-CIIGB MboII.

En la figura 9 se presentan los "fingerprints" intraspecie-específicos, generados por MboII. No obstante el número de bandas teñidas con EtBr, el ensayo de hibridación muestra de nuevo un patrón sencillo en HM1-CINVESTAV y HK9.

Ha resultado sorprendente el hecho de que cepa HM1-CINVESTAV (carriles 2 y 3) y la cepa HM1-CIIGB (carriles 4 y 5) muestren un patrón de homología a D1 tan distinto. La cepa HM1-CINVESTAV presenta un fragmento ligeramente menor a 2000 pb. La banda mas intensa es presumiblemente DNA sin digerir. La cepa HM1-CIIGB presenta 3 bandas mayoritarias, con un tamaño entre 2300 pb y 1000 pb (carriles 4 y 5). La cepa HM38 muestra dos bandas mayoritarias, ligeramente mas grandes que las dos bandas mas grandes de HM1-CIIGB (carriles: 6 y 7). Adicionalmente, estas dos últimas cepas muestran una población de secuencias repetitivas en tandem cuya unidad podría ser aproximadamente de 100 pb en HM1-CIIGB y ligeramente mayor en HM38. Finalmente la cepa HK9 presenta una sola banda de un tamaño muy similar a la banda inferior de HM38 (carriles: 8 parcial, y 9). La primera digestión de cada par fue de 22 hrs con una sola aplicación de enzima, la segunda digestión se hizo con el mismo tiempo pero recibió una segunda aplicación de enzima después de las primeras 8 hrs. El carril 3 tiene DNA de HK9 sin digerir.

#### 6) Determinación de la secuencia nucleotídica de la clona D1.

Se purificó DNA de esta clona por el método alcalino (Maniatis 1982) y se digirió con EcoRI y HindIII. EL fragmento mas pequeño se purificó usando el método de Gene-Clean (Bio 101), y se clonó en M13 mp18 digerido con EcoRI y HindIII. Se obtuvieron placas blancas en una infección de E. coli JM101. El DNA cadena sencilla obtenido (Messing 1980) se usó como templado para una reacción de secuenciación con Secuenasa. El producto de la reacción se aplicó a un gel de acrilamida al 8%. Se localizó el sitio de clonación en el pUC13 original y se leyó hasta encontrar nuevamente la secuencia del vector molecular. Se determinó un inserto de 149 pb, de los cuales 102 (68.45%) corresponden a pares A-T. Como se esperaba, de acuerdo al contenido de bases reportado para HM1 (Gelderman et.al.1971) la, proporción de pares A-T es alta. Fueron localizados

codones de terminación de traducción a lo largo de las tres fases de lectura posibles y solo uno para iniciación en toda la secuencia (fig. 10). Estas observaciones sugieren junto con los resultados de transcripción que esta familia de secuencias tiene una expresión genética nula.

#### D.- DISCUSION

El unico reporte publicado hasta la fecha en relación a la existencia de elementos repetitivos en Entamoeba histolytica (Bhattacharya et.al.1988), señala que las bandas prominentes generadas con enzimas de restricción, corresponden a DNA altamente repetido (aproximadamente 200 copias por genoma haploide) que codifica RNA ribosomal. En el presente trabajo de tesis de maestría se reporta la existencia de elementos repetitivos especificos de E. histolytica, no transcritos, con un alto número de copias, y que han sufrido polimorfismos al menos en su secuencia, tales que permiten la distinción intra-especifica.

Bhattacharya señala que que el componente repetitivo mas abundante de este organismo es el DNA ribosomal. Durante el aislamiento de las secuencias que aqui se presentan, se hizo una observación consistente con la propuesta anterior. Entre las colonias transformantes de E. coli con mediana y alta intensidad, identificadas en la hibridación con la sonda DNA total amibiano, se encontro que la proporción de colonias que dieron señal con la sonda de RNA total, versus aquellas que no dieron señal visible fue aproximadamente de 4:1. Por otro lado se ha reportado que entre el 85% y 95% del RNA que produce E. histolytica es ribosomal (Albach et.al.1984), así que la sonda de RNA empleada, debe estar constituida principalmente por este componente celular.

Se analizó el número de copias de algunas de los plásmidos recombinantes aislados, los tres mas abundantes fueron D1, D4 y R2, con aproximadamente 200 copias por genoma haploide. Las otras clonas que mostraron ser claramente repetitivas fueron D3, D5, D6 y R1 con una frecuencias de 50 a 60 copias por genoma haploide. Cabe mencionar que Bhattacharya reporta en su trabajo una clona de RNA ribosomal presente cerca de 200 veces por genoma haploide.

El análisis de las clonas aisladas se inició con la caracterización de D1 y D4. Experimentos de hibridación en Southern mostraron que estos elementos repetitivos no-transcritos son estructuras contenidas especificas en el genoma de E. histolytica (no estan presentes en la amiba Laredo). Estos experimentos tambien sugieren que los elementos repetitivos

clonados estan asociados a un locus genico ribosomal. Observaciones en nuestro laboratorio y resultados publicados por el mismo Bhattacharia et.al, muestran en hibridaciones Southern, que las clonas D1 y D4 comparten homología con algunas de las bandas de DNA total amibiano que son hibridizadas con RNA total y ribosomal (e.g. la clona ribosomal reportada por Bhattacharya) de E. histoytica. En este contexto, la frecuencia semejante de copias de las clonas D1, D4, R2 y de la unica clona de DNA repetitivo amibiano reportada a la fecha, tambien sugiere<sup>que</sup> estas clonas

estan relacionadas. Una posibilidad es que dichas secuencias, transcritas y no-transcritas, esten muy próximas dentro de un mismo locus génico. Esto permitiría que mecanismos moleculares, como la recombinación genética, que pueden ser determinantes en el número de reiteraciones de una región génica, afecten a varias estructuras simultaneamente.

Un modelo de organización genómica en eucariontes que se ha documentado ampliamente y que es compatible con estas observaciones es el que involucra a los genes ribosomales y sus espaciadores. Así podemos mencionar que los genes ribosomales de Leishmania tienen una arreglo en serie de multiples copias de una unidad repetitiva, constituida de una región transcribible y otra exterior, espaciadora no transcribible. En L. donovani (Leon et.al.1976), y L. braziliensis (Villalba et.al.1982), el número de copias de genes ribosomales de ha estimado del orden de 160, con una región transcribible promedio de 8000 pb y un espaciador externo de longitud variable. Las variaciones en la estructura de la región espaciadora ha sido aprovechadas en la identificación de diferentes especies de Leishmania (Ramirez et.al.1987), ya que la homogeneidad de los patrones de restricción es especie-especifica. En la mayoría de los organismos estudiados, a diferencia de los espaciadores que difieren profundamente en longitud y secuencia aun entre especies relacionadas cercanamente, los genes ribosomales con los que estan intimamente asociados se conservan fuertemente (Fedoroff 1979).

En la literatura se conocen varios ejemplos en los que presumiblemente, la variación conferida por los espaciadores a las unidades repetitivas ribosomales, permiten la identificación incluso de cepas de una misma especie en hibridaciones tipo

Southern de DNA total digerido, por ejemplo en Schistosoma mansoni (Rollinson et.al.1986). Se conocen otros ejemplos de elementos repetitivos con polimorfismos intra-especificos, principalmente telomericos como en el caso de Plasmodium falciparum (Kenneth et.al.1988) y Leishmania donovani (Ellis et.al.1988), o tambien en el DNA de quinetoplasto de L. donovani (Rogers et.al.1987), o de DNA repetitivo de origen no determinado en Theileria parva (Allsopp et.al.1988, Conrad et.al.1987).

De acuerdo al alto grado de polimorfismo intra-especifico de las clonas D1 y D4, no transcribibles y con enlace genético a genes ribosomales. Se propone que dichas clonas constituyen espaciadores ribosomales. La confirmación de esta propuesta requerira el mapeo preciso de los genes ribosomales flanqueando el supuesto espaciador(res).

Aparentemente la secuencia aislada en el plásmido D1, es blanco de mecanismos rearreglantes que operan con gran velocidad. Como se observa en la figura 5 y particularmente en la figura 9, se han generado polimorfismos en la cepa HM1 proveniente de dos laboratorios distintos. Las digestiones hechas con la enzima MboII (fig. 9) revelan la presencia de un arreglo de elementos repetitivos en serie con homologia a D1, que solamente se da en HM1-CIIGB y HM38, y que aparentemente no se da en HM1-CINVESTAV o HK9 (su patrón de homologia a D1 es sencillo)

Dado que estas son las primeras manifestaciones observadas, de un posible mecanismo hiper-arreglante en E. histolytica, los datos deben tomarse como base de experimentos adicionales con diferentes cepas provenientes de mas laboratorios dentro y fuera de Mexico.

En los minicirculos de DNA de quinetoplasto de Leishmania se ha reportado una region que presenta una divergencia creciente de un

extremo al otro. En esta región se encontraron localizados polarmente sub-fragmentos especificos de especie, de sub-especie y de aislado (Rogers et.al.1987). También se ha observado un polimorfismo sorprendente en el tamaño de los cromosomas de Plasmodium falciparum de aislados distintos, e incluso de clonas separadas durante el crecimiento seriado de un solo aislado, se ha propuesto que cambios dramaticos en la cantidad de DNA repetitivo

son determinantes (Corcoran et.al.1986).

Como pudo observarse en la figura 5, la digestión de DNA total con Eco RI, genero un patrón sencillo en HM1 (CINVESTAV y CIIGB, dos bandas) y HK9 (una banda), con homología a D1. En la figura 6 el patrón de hibridación usando la clona D4 como sonda, sigue siendo de dos bandas en las cepas de HM1, pero ahora tambien es de dos bandas en HK9.

Las digestiones parciales con esta enzima parece generar solo una banda de mayor peso molecular. Estos resultados sugieren por un lado que los fragmentos observados son contiguos y por otro, que las unidades repetitivas recortadas con EcoRI no hacen arreglos abundantes en serie. Una interpretación entonces, puede ser que dichas unidades de repetición se ubiquen en números muy reducidos (desde solo una) sobre estructuras genómicas presentes un número de veces considerable por trofozoito. Siguiendo esta línea de pensamiento, entonces se requerirían decenas o centenas de estas estructuras genómicas. Un ejemplo que puede evocarse para ilustrar esta propuesta lo encontramos en Tripanosoma brucei que contiene cerca de 100 mini-cromosomas de 50,000 a 100,000 pb. (Guyaux et.al.1985). Otra manera de imaginar dichas estructuras genómicas hipotéticas, es como elementos extracromosómicos. En ambas no se ha descrito a la fecha ninguna de las estructuras anteriores. En Leishmania se han reportado círculos extracromosómicos estables, portadores de genes de resistencia a drogas (Garvey et.al.1986).

La localización de las secuencias de interés en cariotipos, obtenidos en geles de campo pulsado sera de gran ayuda en el estudio de su organización genómica (Schwartz et.al.1984, Chu et.al.1986).

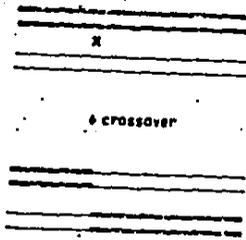
Un análisis preliminar de la secuencia nucleotídica de la clona D1 (fig. 10), muestra que las tres fases de lectura posibles muestran sitios de terminación de traducción. Hay un solo sitio de iniciación que esta flanqueado por sitios de terminación en la misma fase de lectura. Estas observaciones junto con los resultados previos que no detectan transcripción, sugieren que la familia de elementos repetitivos a la que pertenece esta secuencia es inactiva transcripcional y traduccionalmente, y que se ha conservado como un componente estructural del genoma de E. histolytica.

Desde la primera descripción de las secuencias repetitivas en eucariontes (Britten et.al.1968), las preguntas relacionadas a su origen y su posible papel en genoma continúan vigentes. La gran diversidad en el tamaño, organización, el número de copias, los mecanismos de amplificación, y conservación de secuencia, hacen que las pretensiones de responder a estas preguntas sean más bien discretas.

Como surgen las secuencias repetitivas especie-específicas. Una posible explicación supondría, por un lado la existencia de secuencias parentales que ya existían antes de la separación de especies. Y por otro, que estas secuencias son neutrales en un sentido evolutivo, es decir que pueden acumular mutaciones rápidamente sin que ello tenga un efecto deletéreo para el organismo portador. De tal manera que las secuencias han seguido acumulando mutaciones separadamente en las diferentes especies y han llegado a divergir ampliamente. La incidencia de mutaciones que cambian la secuencia de nucleótidos de genes y secuencias como los espaciadores podría ser muy similar, sin embargo cuando la expresión genética es afectada, la mutación es normalmente eliminada por selección natural. El resultado neto, en estas condiciones sería que secuencias como los espaciadores, cambian más rápido que los genes solo porque retienen una proporción mayor de mutaciones. En adición a los cambios introducidos por mutaciones puntuales, las duplicaciones y deleciones generadas durante un proceso de recombinación desigual, son un mecanismo que puede contribuir con cambios importantes en las unidades repetitivas. En la fig. 11 se esquematiza como un estre cruzamiento desigual puede generar cambios significativos durante un evento mitótico entre cromosomas hermanas, o durante uno meiótico entre cromosomas parentales y/o cromosomas hermanas. Todos los cambios producidos son heredados a unas u otras células hijas, en un proceso continuo que se traduce en polimorfismos en la secuencia, tamaño y número de copias, que son confinados de acuerdo al momento de su aparición y su velocidad particular (permitida?) de cambio, en géneros, especies, sub-especies y aislados.

Al plantear la hipótesis anterior, al mismo tiempo se dio

### A. EQUAL CROSSOVER



### B. UNEQUAL CROSSOVER

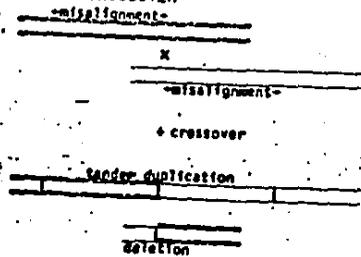


Fig. 14 Esquemática de un entrecruzamiento igual o recíproco (A) y uno desigual o no recíproco (B). Este último es generador de deleciones y duplicaciones en serie. Las moléculas homólogas son mal alineadas, el sitio de corte y reunión se representa con "x". Las líneas verticales representan los extremos de los segmentos duplicados en tandem de la secuencia recombinante que ha sido aumentada, y la posición de la deleción en la secuencia recombinante disminuida (fig. tomada de Smith 1978).

lugar rapidamente a otra cuestion. Si puede darse una variacion tan dramatica entre algunos elementos repetitivos, lo mas probables es que la secuencia de nucleotidos no sea importante, entonces porque existen?. Dado que no ~~no~~ hay ninguna evidencia que indique que estan en franca extincion, se han propuesto diferentes respuestas. Entre ellas podemos considerar dos que pueden ser planteadas en funcion de los espaciadores ribosomales (Fedoroff et.al.1979): los espaciadores son un producto secundario inevitable de los mecanismos moleculares que producen y mantienen las familias genicas, o que tienen una funcion relativamente independiente de secuencia. En relacion a la primera propuesta, si asumimos que el proceso de recombinacion (determinante de las duplicaciones) es insensible a la funcion del DNA recombinado, recombinaciones mas cortas que la unidad de transcripcion funcional, dificilmente se van a acumular bajo condiciones que favorecen la sobrevivencia de organismos con copias extras de un gene dado. De ahi que la recombinacion de segmentos mas largos que la unidad de transcripcion funcional se seleccione, permitiendo de esta manera el mantenimiento de la familia genica e incluso su amplificacion. La recombinacion y duplicacion de una region con la longitud minima optima, podria ser estadisticamente improvable.

Actualmente se considera a la cepa Laredo (Entamoeba histolytica-like) otra especie de Entamoeba. La cepa Laredo es la unica Entamoeba tetranucleada conocida, junto con E. histolytica que infecta al ser humano, su morfologia es similar y puede distinguirse de esta ultima por su capacidad para multiplicarse a temperatura ambiente, su resistencia a soluciones hipotonicas (Goldman 1969). Tambien por su muy baja patogenicidad al hombre (Rosas et.al. 1965), mayor resistencia a drogas (Entner et.al.1962), diferencias antigenicas menores y diferencias isoenzimaticas (Sargeant et.al.1980). La primera evidencia de tipo molecular reportada que apoya fuertemente la naturaleza diferente a nivel de especie entre estas Entamoebas fue presentada por Bhattacharya et.al.(1988). En dicho trabajo se muestra un elemento repetitivo transcribible de E. histolytica que no hibridiza con el genoma total de diferentes cepas de Entamoeba, (el genoma total de

diferentes) <sup>e.g.</sup> cepas de Entamoeba histolytica-like incluyendo Laredo, u otras cepas no-histolyticas. Las observaciones hechas en el presente trabajo confirman la observación anterior, al mostrar que hay componentes genomicos, en una cantidad significativa, contenidos en Entamoebas histolytica pero no en la cepa Laredo.

Las pruebas de tipo molecular, como la hibridación con sondas de DNA, así como la determinación de cariotipos, han mostrado ser de utilidad para generar criterios de índole taxonómico. Dos de los aspectos mas intrigantes de la biología de E. histolytica son la variabilidad (no entendida a la fecha) en su potencial patogenico y la restricción de amibiasis invasiva humana a ciertas regiones geográficas, incluyendo México y algunos lugares de Asia y Africa (Martínez-Palomo 1982), a pesar de su distribución mundial. Actualmente, enfrentan un interesante debate dos puntos de vista relacionados al problema anterior: Uno de ellos apoya la creencia de que las formas patogénica y no-patogénica de E. histolytica son en realidad dos especies distintas (Brumpt et.al.1925., Sargeant et.al.1980). Esta proposición se basa en sus diferencias isoenzimaticas "fijas". La otra proposición señala que entre las formas patogénicas y no-patogénicas los patrones isoenzimaticos (zimodemos) y el fenotipo patogénico claramente se interconvierten ("no-fijos"). Estos hallazgos (Mirelman 1987) soportan observaciones previas (Hoare 1952., Elsdon-Dew 1968) que sugieren que en lugar de dos especies, puede haber dos estados o fases del mismo organismo, un estado activo "agresivo" y uno inactivo, que bajo ciertas condiciones se interconvierten.

Sería de gran interes el empleo de técnicas de DNA recombinante y observación de cariotipos en la generación de criterios utiles para abordar la disyuntiva anterior. Entre otras cosas, tambien podrian ser empleados estos enfoque para definir si las diversidad geográfica en la incidencia de amibiasis es debida a diferencias genéticas observables, con utilidad taxonómica para establecer sub-especies de E. histolytica.

Sería de esperarse que resultados de ese tipo permitieran en el futuro un mejor control epidemiológico del parásito y la enfermedad que produce.

**E) Apendice**

<b>CINVESTAV</b>	<b>Centro de Investigaciones y estudios avanzados/IPN.</b>
<b>CPM</b>	<b>Cuentas por minuto</b>
<b>Denhardt's</b>	<b>Solución 1% Ficoll, 1% Albumina de suero de bobino 1% Polivinilpirrolidona</b>
<b>EtBr</b>	<b>Bromuro de Etidio</b>
<b>IIGB Genética</b>	<b>Instituto de Investigaciones sobre Ingeniería y Biotecnología/UNAM</b>
<b>RPM</b>	<b>Revoluciones por minuto</b>
<b>SSPE 20X</b>	<b>NaCl 3.6M, NaH PO 200mM (pH7.4), EDTA 20mM (pH7.4).</b>

F.- Bibliografia

-1-

- Albach R.A., Prachaayasittikul V., Heebneer G.M.(1984). Isolation and Characterization of RNA of Entamoeba histolytica. Mol.Biochem. Parasitol.12,261-272.
- Allsopp B.A., Allsop M.T.E.P.(1988). Theileria parva: genomic DNA studies reveal intra-specific sequence diversity. Mol.Biochem. Parasitol.28,77-84.
- Bhattacharya S., Bhattacharia A., Diamond L.S.(1988). Comparison of repeated DNA from strains of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. Mol.Biochem.Parasitol. 27,257-262.
- Britten R.J., Kohne D.E.(1968). Repeated Sequences in DNA. Science 161,529-540.
- Brumpt E.(1925). Etude sommaire de I' Entamoeba dispar n.sp. Amiba a kystes quadrinuclées, parasite del I'homme. Bulletin de I'Academie de Medecine (Paris) 94,943-952.
- Chu G., Vollrath D., Davis R.W.(1986). Separation of Large DNA molecules by Contour Clamped Homogeneous Electric Fields. Science 234, 1582-1585.
- Corcoran L.M., Forsyth K.P., Bianco A.E., Brown G.V., Kemp D.J.(1986). Chromosome Size Polymorphisms in Plasmodium falciparum Can Involve Deletions and Are Frequent in Natural Parasite populations. Cell 44,87-95.
- Conrad P.A., Iams K., Brown C.W., Sohanpal B., MoiYoi O.K.(1987). DNA probes detect genomic diversity in Theileria parva stocks. Mol.Biochem.Parasitol. 25,213-226.
- Cruz R.J.(1986). Un sistema experimental para el aislamiento del sustrato minimo de replicacion en plasmidos tipo ColE1 (tesis de licenciatura).
- Edman U., Meza I., Agabian N.(1987). Genomic and cDNA actin sequences from a virulent strain of Entamoeba histolytica. PNAS 84,3024-3028.
- Ellis J., Crampton J.(1988). Characterization of a simple, highly

repetitive DNA sequence from the parasite Leishmania donovani. Mol.Biochem.Parasitol. 29,9-18.

Elsdon-Dew.(1968). The epidemiology of amoebiasis. Advances in Parasitology 6,1-62.

Entner N., Evans L.A., Gonzalez C.(1962). Genetics of Entamoeba histolytica: Differences in drug sensitivity between Laredo and other strains of Entamoeba histolytica. Journal of Protozoology 9,466-468.

Fedoroff N.V.(1979). On Spacers. Cell. 16,697-710.

Fouts L.W., Manning J.(1976). Sequence arrangement of the 16S and 26S rRNA genes in the pathogenic haemoflagellated Leishmania donovani. Nucleic Acids Res. 5,491-504.

Garvey E.P., Santi D.V.(1986). Stable Amplified DNA in Drug-Resistant Leishmania Exists as Extrachromosomal Circles. Science 233,535-540.

Gelderman A.H., Keister D.B., Bartgis I.L., Diamond L.S.(1971). Characterization of the deoxiribonucleic acid of representative strains of Entamoeba histolytica-like amoebae. and E. moshkovskii.

Goldman M.(1969). Entamoeba histolytica-like amoebae occurring in man. Bulletin of the World Health Organization. 40,355-364.

Gonzalez A., Prediger E., Huecas M.E., Nogueira N., Lizardi P.M.(1984). Minichromosomal repetitive DNA in Trypanosoma cruzi: Its use in a high-sensitivity parasite detection assay. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 81,3356-3360.

Guyaux M., Cornelissen A.W.C.A., Pays E., Steinert M., Borst P.(1985). Tripanosoma brucei: a surface antigen mRNA is discontinuously transcribed from two distinct chromosomes. EMBO J. 4,995-998.

Hanahan D. (1983). Studies on Transformation of Escherichia coli with Plasmids. J.Mol.Biol. 166,557-580.

Hanahan D., Meselshon J. (1983). Plasmid Screening at High Colony

Density. methods in Enzimology 100,333-342.

Hoare C.A. (1952). The commensal phase of Entamoeba histolytica. Experimental Parasitology 1,411-427.

Huber M., Garfinkel L., Gitler C., Mirelman D., Revel M., Rozenblatt S. (1987). Entamoeba histolytica: cloning and characterization of Actin cDNA. Molecular and Biochemical Parasitology 24,227-235.

Jeffreys A., Wilson V., Thein S.L. (1985). Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. Nature 314, 67-73.

Kemp D.J., Corcoran L.M., Coppel R.L., Stahl H.D., Bianco A.E., Brown G.V., Anders R.F. (1985). Size variation in chromosomes from independent cultured isolates of Plasmodium falciparum. Nature 315,347-350.

Kenneth D.V., McCutchan T.F.(1988). Sequence and structure of a Plasmodium falciparum telomere. Mol.Biochem.Parasitol. 28,85-94.

Lesh (Losch), F.D. (1875). Massive development of amebas in large intestine. translated and reprinted en American Journal of Tropical Medicine and Hygiene (1975) 24,383-392.

Lizardi P.M., Binder R., Short S.A. (1984). Preparative Isolation of DNA and Biologically Active mRNA from Diethylaminoethyl Membrane. Gene Anal Techn 1,33-39.

Lopez-Revilla R., Gomez R. (1978). Entamoeba histolytica, E. invadens, E. moshkovskii: Fluctuation of the DNA content of Axenic Trophozoites. Experimental Parasitology 44,243-248.

Lopez-Revilla R., Gomez R. (1986). Trophozoite and nuclear size, DNA base composition, and nucleotide sequence homology in several Entamoeba species. En prensa.

Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J.(1982)Molecular Cloning Manual

Messing J.(1980). M13 cloning/dideoxy, sequencing manual.

Mirelman D.(1987). Amoba-Bacterium Relationship in Amebiasis.

Microbiological Reviews 51,272-284.

Mutul P.J., Cazares F., Meza I.(en prensa) Isolation and Characterization of DNA from Entamoeba histolytica HM1-IMSS.

Palomo Martinez A. (1982). The Biology of Entamoeba histolytica. Research Studies Press.

Rogers W.O., Wirth D.F.(1987). Kinetoplast DNA minicircles: Regions of extensive sequence divergence. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 84,565-569.

Said-Fernandez S., Lopez-Revilla R. (1978). Characteristic Protein Electrophoresis Patterns of Four Entamoeba Strains. Z. Parasitenkd 56,219-225.

Sargeant P.G., Williams J.E., Kumate J. Jemenez E. (1980). The epidemiology of Entamoeba histolytica in Mexico City. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 74,653-656.

Schaudinn F. (1903). Untersuchungen uber die Fortpflanzung eininger Rhizopoden. Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte, 19,547-576.

Toneguzzo F., Glynn S., Levi E., Mjolsness S., Hayday A.(1988). Use of a Chemically Modified T7 DNA Polymerase dor Manual and Automated Sequencing of Supercoiled DNA. BioTechniques 6(5),460-469.

Rollinson D., Walker T.K., Simpson A.J.G. The application of recombinant DNA technology to problems of helminth identification. Parasitology. 91,553-571.

Rosas G.A., Najarian H.H.(1965). Infectivity studies on the Laredo strain of Entamoeba histolytica. Texa reports on Biology and Medicine 23,507-511.

Schwartz D.C., Cantor Ch.R.(1984). Separation of Yeast Chromosome-Sized DNAs by Pulsed Field Gradient Electrophoresis. Cell 37,67-75.

Smith G.P. What is the origin and evolution of repetitive DNAs?. TIBS February 1978, 34-36.

Vieira J., Messing J. (1982). Gene 19,259

Zolg J.W., Andrade L.E., Scott E.D. (1987). Detection of Plasmodium falciparum DNA using repetitive DNA clones as species specific probes. Mol.Biochem.Parasitol. 22,145-151.