



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

CARACTERIZACION DE LA DIVISION NUCLEAR  
Y LOS CROMOSOMAS DE Entamoeba histolytica

T E S I S

PARA OPTAR AL DOCTORADO EN

CIENCIAS BIOMEDICAS (MORFOLOGIA)

P R E S E N T A

FRANCISCO JAVIER SOLIS MARTINEZ

MEXICO, D. F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1991

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## INDICE

1. Resumen	1
2. Summary	3
3. Introducción	6
3.1 Generalidades	6
3.2. Patogenicidad de <i>Entamoeba histolytica</i>	9
3.3. Mecanismos de patogenicidad	10
3.4. Mitosis	13
3.5. Mitosis en protozoarios	18
5. Planteamiento del problema	23
6. Objetivos	24
7. Materiales y Métodos	26
8. Resultados	30
8.1. El Centro organizador de microtúbulos	30
8.2. La división nuclear	31
8.3. Los cromosomas	34
8.4. El cinetócoro	37
9. Discusión	39
9.1. El centro organizador de los microtúbulos	39
9.2. La división nuclear	40
9.3. Los cromosomas	42
9.4. Las vesículas intranucleares	45
9.5. Modelo para la división nuclear de <i>Entamoeba histolytica</i>	46
10. Conclusiones	48
11. Referencias	51
12. Figuras	63

## 1. RESUMEN

### EL CENTRO ORGANIZADOR DE LOS MICROTUBULOS

El centro organizador de los microtúbulos (MTOC) de *S. histolytica* es un cilindro electrodenso, localizado en el centro del núcleo, y mide 0.6  $\mu\text{m}$  de diámetro por 1.5  $\mu\text{m}$  de longitud. Al inicio de la división nuclear, el centro organizador de los microtúbulos se encuentra formado por pequeños cuerpos electrodensos, no organizados, dispersos en el centro del núcleo. Los microtúbulos (Mts) se dispusieron en forma radial alrededor del centro organizador de los microtúbulos. También se observó material cromatínico alrededor del centro organizador de los microtúbulos. Un "surco" nuclear, con algunos microtúbulos unidos, que atravesaba el núcleo de lado a lado, fue observado al inicio de la división nuclear.

### LA DIVISION NUCLEAR

Se estudió el movimiento de los microtúbulos durante la división nuclear. Tomando como base este movimiento, se identificaron cinco estadios de la mitosis: Profase, Metafase, Anafase A, Anafase B, y Telofase. En la Profase, se observó condensación del material cromatínico, así como la detección de microtúbulos en el centro del núcleo. Después, los microtúbulos parecieron crecer del centro organizador de los microtúbulos, y el material cromatínico se dispuso alrededor del organizador microtubular, entrando el núcleo a la Metafase. Posteriormente, en la Anafase, el centro organizador de los

microtúbulos organizó a los microtúbulos, primero de un modo lateral, y más tarde para formar el huso mitótico, que estaba hecho de un solo racimo de microtúbulos unidos por sus extremos. La unión de los microtúbulos a sí mismos pudo ser observado en cortes transversales del huso mitótico. En la Telofase se observó la separación de los núcleos hijos. En esta fase se observó el rompimiento de los microtúbulos del huso mitótico, probablemente debida a la formación de la membrana nuclear.

#### LOS CROMOSOMAS

Mediante diversos tratamientos específicos para identificar DNA, se localizaron corpúsculos positivos a estos tratamientos en núcleos amibianos en división. Estos corpúsculos podrian ser los cromosomas de *Amoeba histolytica*. El tamaño de estos cuerpos nucleares fue de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, en promedio, y mostraron ser esféricos o piriformes. Los cuerpos nucleares se observaron frecuentemente cerca de la membrana nuclear interna, embebidos en el material periférico. Se observó unión de los cuerpos nucleares a los microtúbulos. Esta unión fue lateral, a diferencia de la unión cinetócoro-microtúbulo típico, que es terminal.

#### LAS VESICULAS INTRANUCLEARES

Se observaron dos tipos diferentes de vesículas intranucleares en *Amoeba histolytica*. Cada tipo de vesícula parecía contener diferente material. Uno de ellos con material granular altamente electrodensso, así como material fibrilar. El otro tipo de vesícula

contenia, aparentemente, material nucleoplásmico. Las vesículas aparecieron al inicio de la mitosis, y su número se incrementó durante el desarrollo de ésta. Las vesículas se localizaron principalmente entre el material periférico nuclear. Estas vesículas intranucleares podrían estar jugando algún papel en la división nuclear.

## 2 SUMMARY

### MICROTUBULE ORGANIZING CENTER

The microtubule organizing center (MTOC) of *Entamoeba histolytica* is an electron-dense cylinder, which is located at the center of the nucleus, and is 0.6  $\mu\text{m}$  diameter and 1.5  $\mu\text{m}$  long. At the beginning of nuclear division the MTOC is not organized, and it is formed by small electron-dense bodies with gaps among them, and the microtubules (Mts) form around the MTOC a spiked ball-like structure. Some chromatinic-like material was disposed around the MTOC. A nuclear furrow was observed at the beginning of nuclear division, with some Mts attached to it.

### NUCLEAR DIVISION

The movement of microtubules (Mts) during nuclear division was ultrastructurally studied. Five stages of mitosis could be defined: Prophase, Metaphase, Anaphase A, Anaphase B, and Telophase. In Prophase stage, some chromatinic-like material appeared condensed, and

the Mts in the center of the nucleus were detected. In Metaphase, the Mts seemed to grow from the microtubule organizing center (MTOC), and the chromatinic-like material disposed around the microtubular organizer. In Anaphase, the MTOC apparently organized the Mts, first in a lateral way, and later to form the mitotic spindle, which was made of a bundle of Mts joined by their ends. This joint of Mts to themselves could also be observed in cross-sections. In Telophase, the nuclear separation was observed, with sectioning of mitotic spindle Mts.

#### CHROMOSOMES

To determine the size and shape of chromosomes of the protozoan *Entamoeba histolytica*, several treatments were performed to identify DNA. There were bodies in amebic nuclei which were positive to these treatments. Furthermore, the bodies were found in dividing nuclei. These bodies might be the amebic chromosomes. The size of the nuclear bodies of *Entamoeba histolytica*, which were positive to the treatments was 1  $\mu\text{m}$  in diameter and showed a spherical or pear-like shape. The nuclear bodies were frequently observed close to the inner nuclear envelope, and embedded in the peripheric material. Attachment of microtubules to nuclear bodies was observed. The attachment of the nuclear bodies was observed to be lateral on the microtubule, and not on the microtubule end.

#### INTRANUCLEAR VESICLES

The intranuclear vesicles of *Entamoeba histolytica* were studied. Two different types of vesicles were found, each one containing different material. One type of vesicles contained highly electrodense granular material as well as fibrillar material. The other type contained nucleoplasmic material. The vesicles appeared at the beginning of the nuclear division and their number increased during the mitotic process. They were mainly located at the nuclear periphery and close to the mitotic spindle. They might play a role in amebic nuclear division.

### 3. INTRODUCCION

#### 3.1 GENERALIDADES

La amibiasis, ya sea luminal (asintomática) o invasiva, es ocasionada por el protozoario *Entamoeba histolytica*, el cual es parásito del hombre. Esta enfermedad, típica de países en desarrollo, representa una de las parasitosis más comunes en el mundo. Las estimaciones de Walsh (1986) hablan de 40 000 a 100 000 muertes ocasionadas por este parásito, que es capaz de invadir prácticamente cualquier epitelio. Así, se ha reportado amibiasis cutánea, cerebral, en órganos genitales, etc. (Brandt y Pérez Tamayo, 1970).

*Entamoeba histolytica* pertenece al reino Protocista, subreino Protozoa, phylum Sarcostigophora, subphylum Sarcodina, superclase Rhizopoda, clase Lobosea, orden Amoebida, suborden Tubulina y al género *Entamoeba* (Levine y cols. 1980).

El ciclo vital de este parásito presenta varias fases consecutivas, que son: 1) fase trofozoítica; 2) fase prequistica; 3) fase quística, y 4) fase metaquistica. La fase infectiva es la quística, y la invasiva es la trofozoítica.

##### 3.1.1 EL TROFOZOITO.

El trofozoito mide de 7 a 40  $\mu\text{m}$ , es móvil y en general es de forma alargada, presentando lobópodos, uroide y una superficie rugosa (González-Robles y Martínez-Palomo, 1981). Puede vivir como comensal en el lumen del intestino, donde se multiplica. Si vive como comensal,

la amiba no induce la presencia de signos o síntomas clínicos y a esta infección se le conoce como amibiasis luminal. Cuando el trofozoíto produce lesiones la enfermedad se conoce como amibiasis invasiva.

El trofozoíto es extremadamente sensible a los cambios del medio ambiente, tales como el cambio en acidez, temperatura u osmolaridad. Su citoplasma contiene abundantes vacuolas, muchas de ellas con enzimas lisosomales. En este protozoario es notable la ausencia de organelos eucarióticos típicos, como pueden ser el aparato de Golgi, mitocondrias y retículo endoplásmico. Se ha descrito la presencia de complejos membranales que tienen apariencia de un retículo endoplásmico muy primitivo (Feria-Velasco y Treviño, 1972). En el citoplasma del trofozoíto se han observado polirribosomas, los cuales, en algunas ocasiones, están ordenados en agregados conocidos como cuerpos cromatidiales. No se han detectado microtúbulos en el citoplasma.

De los organelos presentes en el trofozoíto, el núcleo es apreciable fácilmente en células teñidas con Giemsa. El tamaño del núcleo trofozoítico es de 4 a 7  $\mu\text{m}$  de diámetro. La membrana nuclear es realmente una doble membrana, que presenta una gran cantidad de poros dispuestos en forma desordenada, y se encuentra rodeada de una delgada capa de gránulos que le dan al núcleo una apariencia de anillo (Martínez-Palomo, 1982). Este anillo ha sido considerado por Albach (1980) como el equivalente amibiano del nucleolo. El núcleo tiene un cariosoma central que mide 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro. La división del núcleo, la cual es anterior a la división citoplásmica, es una división cerrada (la membrana nuclear permanece íntegra durante la división) y

dura aproximadamente 120 min (Solis y cols., 1986; Orozco y cols., 1988). También se ha sugerido que la división es intranuclear (donde el centro organizador de microtúbulos se encuentra dentro del núcleo), y pleuromitótica (división en la cual el huso mitótico se dispone bilateralmente en alguna etapa de la división) (Solis y cols., 1986; Orozco y cols., 1988). Los cromosomas del protozoario han sido investigados (Valdés y cols., 1990) mediante electroforesis en pulsos de gradiente de campo (Schwartz y Cantor, 1983), encontrándose 9 bandas en trofozoitos de la cepa HM1:IMSS y 6 en clones de esta misma cepa. Reportes antiguos hablan de 5 ó 6 cromosomas para *S. histolytica* (Kofoid y Swezy, 1925; Uribe, 1926; Epstein, 1941). Sin embargo, a la fecha no se conoce aún el tamaño, forma y número de éstos.

### 3.1.2 EL QUISTE

El trofozoito puede, mediante mecanismos aún desconocidos, transformarse en quiste en el intestino. Los quistes miden como promedio 12  $\mu\text{m}$  y la pared de éstos se tiñe con calcoflúor, demostrando la presencia de quitina (Arroyo-Begovich y cols., 1980). Se ha dicho que el quiste maduro de *S. histolytica* presenta cuatro núcleos y que tal característica sirve para distinguir a este parásito de otras amibas comensales, las cuales tienen diferente número de núcleos. Sin embargo, el número de núcleos en el quiste maduro es variable (Salazar y De Haro, 1987), llegándose a encontrar hasta 8 núcleos en algunos quistes. El quiste, además de ser la fase infectiva del parásito es también la forma de resistencia, ya que, a diferencia del trofozoito, puede resistir cambios de temperatura u osmolaridad.

### 3.2 PATOGENICIDAD DE *Entamoeba histolytica*

Entre los aspectos más intrigantes de la biología de *E. histolytica*, está el de conocer las características que confieren la capacidad invasiva del parásito y la razón por la que esta característica está restringida a ciertas regiones geográficas. La necesidad de responder a esta pregunta ha llevado al planteamiento de diferentes teorías, entre las cuales están:

#### I) TEORIA UNICISTA (Dobell, 1919)

Esta teoría afirma que *E. histolytica* siempre produce ulceraciones que pueden dar lugar o no a manifestaciones clínicas, dependiendo de la virulencia de la cepa y de las características del hospedero (deficiencias en el sistema inmunitario, desnutrición, entre otras).

Las diferencias entre la virulencia de las cepas amibianas se ha determinado por el número de trofozoítos requeridos para producir abscesos, así como por el número y tamaño de los abscesos producidos en hámsteres de uno o dos meses de edad (Tanimoto y cols., 1971). Los resultados obtenidos parecen apoyar la teoría unicista. Sin embargo, Orozco y cols. (1983) aislaron clonas amibianas incapaces de producir abscesos, que contradice a la hipótesis unicista.

#### II) TEORIA DUALISTA (Brumpt, 1925)

La teoría dice que *E. histolytica* comprende dos especies diferentes de amibas, las cuales son morfológicamente similares, siendo una de ellas patógena, la llamada *Entamoeba dysenteriae*, y la

otra no, llamada *Entamoeba dispar*. Sargeant (1982), mediante el análisis de zimodemos, ha proporcionado evidencias para apoyar esta teoría. Sin embargo, los resultados del grupo de Mirelman (1986) han sugerido que la virulencia de un cultivo amibiano es dependiente de diversos factores, entre ellos, la presencia o ausencia de bacterias en el medio de cultivo. Este reporte, en cierta forma, apoyaría la hipótesis unicista. Recientemente, Tannich y cols. (1989), han efectuado análisis del DNA y han reportado sondas de DNA que permiten diferenciar amibas patógenas de las que no lo son. Martínez-Palomo (1987) se ha inclinado por los resultados obtenidos por el análisis de zimodemos, esgrimiendo argumentos epidemiológicos y al hecho de que todas las lesiones por amibas, exceptuando a las intestinales, se efectúan en ausencia de bacterias.

### III) TEORIA PLURALISTA

Esta teoría afirma que *S. histolytica* está compuesta de cepas de diferente virulencia. Algunas de ellas pueden actuar como comensales en el lumen del intestino, causando la amibiasis luminal, y existen otras cepas que pueden causar invasión de tejidos como en la complicación hepática, pulmonar o cerebral. La existencia de cepas de *S. histolytica* con diferencias en su virulencia es ampliamente conocida, pero no hay suficientes evidencias para clasificarlas como especies diferentes de *Entamoeba*.

### 3.3 MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

Uno de los aspectos fundamentales de la relación huésped-parásito en la amibiasis es la elucidación de los mecanismos que pone en acción

la amiba para agredir al huésped.

Desde hace tiempo se conoce que existen varios pasos secuenciales en el mecanismo de ataque a la célula blanco por *A. histolytica*. Estos pasos son: 1) Adhesión a la célula blanco; 2) Acción de toxinas amibianas, y 3) Fagocitosis de la célula blanco.

1) Adhesión a la célula blanco. Se han estudiado muchas proteínas que intervienen en la adhesión de la amiba a la célula blanco. Estos péptidos tienen distinto peso molecular y algunos de ellos tienen actividad de lectina. Entre los más estudiados están la lectina de adhesión amibiana de 260 kD (obtenida bajo condiciones no reductoras) (Petri y cols., 1987). Bajo condiciones reductoras se obtienen dos bandas en geles de poliacrilamida: 170 y 35 kD. La lectina purificada es capaz de inhibir adhesión a la célula blanco, así como los anticuerpos producidos contra esta lectina (Ravdin y cols., 1986). Otra de las proteínas involucradas en la adhesión es la adhesina de 112 kD (Arroyo y Orozco, 1987). Esta adhesina fue analizada mediante el empleo de mutantes deficientes en adhesión (Rodríguez y Orozco, 1986). Algunos anticuerpos monoclonales dirigidos contra esta proteína fueron capaces de inhibir adhesión. Otra lectina aislada de amibas, con peso molecular de 220 kD, es inhibida por N-acetil-D-glucosamina (Rosales-Encina y cols., 1987) y fue caracterizada por medio de anticuerpos (Meza y cols., 1987). Recientemente, un trabajo de Rodríguez y cols. (1989), utilizando distintos anticuerpos, encontraron proteínas amibianas de distinto peso molecular que estaban involucradas en la adhesión a eritrocitos: proteínas de 210, 160, 112, 90, 70, 50 y 24 kD. Estos resultados sugieren que puede haber una gran

cantidad de adhesinas amibianas involucradas en la fase primaria de agresión amibiana a la célula blanco. Sin embargo, alguna de ellas pudiera ser la más importante y jugaría un papel primordial en la producción de una vacuna anti-amibiana.

2) Actividad citotóxica amibiana. Los estudios *in vitro* han llevado a la identificación de diversas proteínas que pudieran estar involucradas en la actividad citolítica de *A. histolytica*. Entre estas proteínas están la reportada por Lushbaugh (1978) y Mattern (1980), la cual tiene un peso molecular de 40 kD y es neutralizable por la adición de fetuina; Lynch y cols. (1982) y Young y cols. (1982) reportaron una proteína, denominada amebaporo, y cuya función es de canal iónico que se adhiere a la membrana de la célula blanco, causando así un desequilibrio iónico que destruye a la célula blanco. La existencia de canales iónicos como medio de ataque es un fenómeno que se presenta en otros organismos (Young y Cohn, 1987); Muñoz y cols. (1986) describieron una colagenasa presente en mayor concentración en las amibas patógenas con respecto a las no patógenas. Esta colagenasa no es una proteína de secreción, sino que se encuentra adosada a la membrana del trofozoito; Keene y cols. (1986) describieron una proteasa multifuncional en las amibas patógenas. Otros factores han sido también estudiados, tales como diferencias entre amibas patógenas y no patógenas en cuanto a su sensibilidad a la lisis del trofozoito por las proteínas del sistema del complemento (Reed y cols., 1980), proteasas (Perez-Montfort y cols., 1989) y receptores a fibronectina (Talamás y Meza, 1988). Un trabajo reciente hecho por Keller y cols. (1988) demostró que algunos de estos factores

posiblemente implicados en la virulencia amibiana, ya mencionados, no intervienen en el mecanismo de patogenicidad de *Ƨ. histolytica*.

### 3) Fagocitosis

El mecanismo de fagocitosis ha sido muy estudiado utilizando modelos distintos a los amibianos (Krieger y cols., 1985). Sin embargo, el mecanismo en *Ƨ. histolytica* ha sido poco estudiado. Lo que se conoce es que existe una cierta relación entre la virulencia amibiana y la fagocitosis (Trissl y cols., 1978; Orozco y cols., 1983; Rodríguez y Orozco., 1986). Además de que los fenómenos de adhesión y fagocitosis están separados, ya que algunos anticuerpos monoclonales, obtenidos a partir de trofozoitos amibianos, no inhiben ésta sino que inhiben fagocitosis (Arroyo y Orozco, 1986). Este hallazgo podría implicar la existencia de un mecanismo fagocítico diferente al reportado en células de mamífero, que involucra la formación de "pozos recubiertos" (Krieger y cols., 1985).

### 3.4 MITOSIS

La mitosis es el proceso por el cual las células eucarióticas aseguran la repartición igualitaria de sus cromosomas en la división celular (McIntosh y Koonce, 1989). La mitosis se ha dividido en varias fases consecutivas, las cuales son: 1) Profase, que consiste en la condensación de los cromosomas; 2) Prometafase, con la formación del huso mitótico y alineamiento de los cromosomas en el centro del huso (placa ecuatorial); 3) Anafase, que es la separación de los cromosomas en dos partes iguales, mediante el movimiento de éstos hacia los extremos del huso, y; 4) Telofase, en la cual el núcleo se

regenera y los cromosomas se descondensan para entrar a la interfase.

El movimiento de los microtúbulos durante la mitosis ha sido descrito, entre muchos otros, por Dustin (1982). En la profase se observa el desensamble de los microtúbulos citoplásmicos. Los dímeros de tubulina se reensamblan progresivamente en el centrosoma polar (también llamado Centro organizador de los microtúbulos, de acuerdo a un término acuñado por Pickett-Heaps (1969)) y los cromosomas empiezan su condensación. Los movimientos de los cromosomas profásicos hacia la placa ecuatorial (en la metafase) se efectúan mientras el huso mitótico crece rápidamente. Los cinetócoros (sitio centromérico de anclaje a los microtúbulos) se orientan hacia los polos.

La posición ecuatorial de los cromosomas divide al huso mitótico en dos mitades. En algunos husos, donde los cromosomas tienen escasa condensación o son laterales, se puede observar que los microtúbulos que se extienden entre los dos polos se traslapan en la zona media o ecuatorial. Este hecho se puede observar en *Dictyostellium* (Roos y Camenzind, 1981) y en levaduras (King y cols., 1982). La zona ecuatorial de traslapamiento de los microtúbulos se encuentra posteriormente en la telofase formando el "cuerpo medio" (mid-body). Dustin (1982) señala que es improbable la existencia de microtúbulos que van de polo a polo del huso mitótico.

Algunas células tienen microtúbulos curvados hacia los polos, aún en la ausencia de Centro organizador de los microtúbulos. Este hecho implica la existencia de otras proteínas en el mantenimiento de la forma del huso. La confirmación de la existencia de tales proteínas

es la presencia de conexiones entre los microtúbulos del huso. Esto ha sido observado en algunos sistemas, tal como en las células HeLa (Hepler y cols., 1970). La unión de los microtúbulos a los cinetócoros se presenta también en la metafase.

En la anafase, los dos grupos de cromosomas se mueven regularmente hacia los polos. En esta fase, los microtúbulos unidos a los cinetócoros se acortan, mientras que los microtúbulos polares crecen en longitud. La anafase se ha dividido en dos partes: la anafase I (o A), donde se presenta el movimiento de los cromosomas hacia los polos, y la anafase II (o B), en la cual se presenta el crecimiento del huso mitótico, ocasionado por el alargamiento de los microtúbulos polares.

Por último, en la telofase, mientras los núcleos hijos reasumen el carácter interfásico de su cromatina (descondensación), los microtúbulos unidos a los cinetócoros y los centros organizadores de los microtúbulos se desvanecen, los microtúbulos polares forman una estructura muy alargada que presenta, en su parte media, microtúbulos traslapados que forman el "cuerpo medio" (mid-body). Una de las células hijas absorbe este "cuerpo medio" al momento de la separación celular o citocinesis.

#### 3.4.1 LOS CENTROS ORGANIZADORES DE MICROTUBULOS

Los centros organizadores de microtúbulos mas estudiados son los de células de mamífero, los cuales son como zonas discretas, amorfas y electrodensas en las cuales convergen una gran cantidad de

microtúbulos. Los centros organizadores de los microtúbulos pueden aparecer como cuerpos electrodensos dispersos en el citoplasma o localizados alrededor de centriolos como material pericentriolar. Aparentemente, algunas células pueden convertir los centros organizadores de los microtúbulos, centralizados, en formas dispersas, reuniéndolos después en la mitosis (Brinkley, 1985). Los centros organizadores de los microtúbulos pueden tener forma de placas planas y compactas, como pueden ser los cinetócoros de muchos cromosomas eucarióticos o los cuerpos polares del huso mitótico de algunos hongos (Brinkley, 1985), agrupamientos de partículas finamente dispersas (Peterson y Berns, 1980) o anillos fibrosos (Russell y Burns, 1984). El centro organizador de los microtúbulos puede ser identificado por la convergencia de microtúbulos o agregaciones de vesículas. En algunas células, el centro organizador de los microtúbulos forma parte del aparato de Golgi (Brinkley, 1985). Está establecido que los centros organizadores de los microtúbulos reúnen a los microtúbulos y otras proteínas y que el ensamblaje de los microtúbulos se realiza en estos sitios con preferencia a cualquier otro sitio en la célula (Brinkley, 1985).

#### 3.4.2 LOS CINETOCOROS

El centrómero o constricción primaria representa una región única de los cromosomas metafásicos de los mamíferos. El cinetócoro, dispuesto a lo largo de la superficie del centrómero, es una estructura discreta que funciona como el punto de anclaje del huso mitótico al cromosoma. El cinetócoro de la mayoría de los cromosomas de mamífero se aprecia morfológicamente idéntico cuando se observa al

microscopio electrónico (Kingwell y Rattner, 1987). Esta estructura consiste de tres placas sobrepuestas colocadas en forma paralela a la superficie del cromosoma (Roos, 1973). Las evidencias estructurales han confirmado la naturaleza fibrosa de la placa exterior del cinetócoro (Brinkley y Stubblefield, 1970), sugiriéndose que esta organización fibrosa refleja el doblamiento de la cromatina del cromosoma dentro del cinetócoro. Se ha encontrado que, en general, la estructura del cinetócoro está muy conservada entre los mamíferos (Kingwell y Rattner, 1987).

#### 3.4.3 LOS CROMOSOMAS

Los cromosomas humanos, y en general los cromosomas de mamíferos, han sido ampliamente estudiados. Las principales características de los cromosomas son: 1) Están formados por DNA, cuya fibra está cubierta, a intervalos regulares, de un octámero de proteínas histónicas, formando la cromatina, 2) Son cuerpos largos y filiformes que, durante la división celular, se contraen haciéndose mas gruesos y cortos, en los que se puede distinguir una constricción, llamada centrómero, y uno o dos brazos cromosómicos (cromátidas). Dependiendo de la posición del centrómero, los cromosomas se clasifican así:

1. Metacéntricos, cuando los dos brazos tienen casi la misma longitud, esto es, el centrómero está en la mitad del cromosoma.
2. Acrocéntricos, cuando los dos brazos tienen longitud diferente. El centrómero está más cerca de un extremo del cromosoma que del otro

extremo.

3. Telocéntricos, cuando hay sólo un brazo claramente distinguible. El centrómero se encuentra en el extremo cromosómico.

Los cromosomas no homólogos pueden distinguirse frecuentemente por su tamaño y la posición del centrómero.

Algunos segmentos cromosómicos o incluso cromosomas completos se llaman heterocromáticos (que se tiñen diferentemente) porque poseen una estructura densa y compacta durante los estadios de interfase y profase temprana de la mitosis. Los otros segmentos cromosómicos o cromosomas enteros se llaman eucromáticos (que se tiñen normalmente). Las regiones heterocromáticas facilitan la identificación de los cromosomas (Ayala y Kriger, 1984).

Aunque el mecanismo de la mitosis es muy parecido entre los metazoarios, así como el centro organizador de los microtúbulos, cinetócoros o cromosomas, en los protozoarios existen muchas variaciones en cuanto al mecanismo mitótico, forma del centro organizador de los microtúbulos o cinetócoros, así como de los cromosomas.

### 3.5 MITOSIS EN PROTOZOARIOS

Muchos autores, debido a la gran variedad de mitosis en protozoarios, han tratado de clasificar las mitosis de estos organismos con base en distintas características. Chatton, en 1910,

propuso las siguientes clasificaciones:

- 1) Promitosis (durante la mitosis la envoltura nuclear se conserva íntegra y se divide el nucleolo en dos)
- 2) Mesomitosis (envoltura nuclear íntegra, los centros organizadores de los microtúbulos son intranucleares, el nucleolo se disuelve), y
- 3) Metamitosis (La envoltura nuclear y el nucleolo desaparecen, el centro organizador de los microtúbulos es extranuclear).

Pussard (1973) clasificó las mitosis solamente con base en el comportamiento de la envoltura nuclear y el nucleolo. Grassé (1952) introdujo los términos ortomitosis y pleuromitosis. En la primera existe una placa ecuatorial y los cromosomas están unidos a las fibras cromosomales del huso mitótico. En la pleuromitosis no existe placa ecuatorial, los cinetócoros están unidos a la envoltura nuclear, la cual se conserva íntegra, y el huso mitótico es extranuclear. Hollande (1972) propuso una clasificación basada solamente en datos ultraestructurales. Así, el número de mitosis es de 5. Lo más importante de sus clasificaciones es que toma en cuenta la forma del huso mitótico. Sin embargo, se le han encontrado algunas limitaciones, por lo que sus clasificaciones han sido dejadas de lado. La clasificación de las mitosis de protozoarios actualmente usada es la propuesta por Raikov (1982). Esta clasificación es como sigue:

A) Ortomitosis abierta (eumitosis), con desaparición de la envoltura nuclear y del nucleolo, el huso es bipolar, axial y consiste de fibras

cromosomales y continuas.

B) Ortomitosis semiabierta, la diferencia con la anterior es que la envoltura nuclear tiene discontinuidades.

C) Pleuromitosis semiabierta, en la cual la envoltura nuclear tiene discontinuidades y el huso mitótico es bilateral.

D) Pleuromitosis intranuclear, la envoltura nuclear se conserva íntegra, el huso mitótico es bilateral y el centro organizador de los microtúbulos está dentro del núcleo.

E) Ortomitosis intranuclear, que difiere de la anterior en que la posición del huso mitótico es siempre axial.

F) Pleuromitosis extranuclear, que difiere de la pleuromitosis intranuclear en que los centros organizadores de los microtúbulos son extranucleares.

Existen una gran cantidad de ejemplos dentro de estas clasificaciones. Sin embargo, solo nos referiremos a los ejemplos contenidos dentro de la clase Lobosea, que es a la que pertenece

8. *histolytica*.

Ortomitosis abiertas. El género *Starmanella* (Page, 1967), *Acanthamoeba* (Bowers y Korn, 1968) y *Rosculus* (Hawes, 1963) son ejemplos de este tipo de mitosis.

Ortomitosis semiabiertas. El ejemplo de este tipo de mitosis dentro de los protozoarios de la clase Lobosea es el de *Amoeba proteus* (Gromov, 1987).

Pleuromitosis semiabiertas. No existen ejemplos de la clase Lobosea cuyas mitosis caigan dentro de esta clasificación.

Pleuromitosis cerradas. Aunque éste es el tipo de mitosis más común entre protozoarios, algas y hongos, no existe un ejemplo de la clase Lobosea en esta clasificación mitótica. Se dice que los organismos mas primitivos tienen este tipo de mitosis (Raikov, 1982).

Ortomitosis cerradas. Este tipo de mitosis tiene dos variantes: 1) El huso mitótico se forma entre dos centros organizadores de los microtúbulos situados en el interior de los polos nucleares; 2) El huso mitótico está formado por pequeños acúmulos de microtúbulos. Más raramente, el huso crece de centros organizadores de los microtúbulos no conectados a la envoltura nuclear. Dentro de esta segunda variante, la mitosis de *Naegleria* ha sido reportada por varios investigadores (Fulton y Dingle, 1971; Schuster, 1975). También se encuentra dentro de esta clasificación la mitosis de la cepa Laredo (antiguamente clasificada, sin serlo, como *S. histolytica*), reportada por Gicquaud (1979).

Pleuromitosis extranuclear cerrada. No existen ejemplos de este tipo de mitosis en la clase Lobosea.

### 3.5.1 CENTROS ORGANIZADORES DE MICROTUBULOS Y CINETOCOROS DE

## PROTOZOARIOS

En lo que respecta a los centros organizadores de los microtúbulos y cinetócoros de protozoarios, se han encontrado diferentes manifestaciones de ambos entre las distintas especies. Nuevamente, solo nos referiremos a la clase Lobosea.

El centro organizador de los microtúbulos de *Acanthamoeba castellani* es un cuerpo cilíndrico o en forma de disco, electrodenso, mide más de 1  $\mu\text{m}$  y se localiza en el citoplasma, cerca del núcleo, rodeado de dictiosomas. Los microtúbulos se alinean, a partir de este Centro organizador de los microtúbulos, en forma radial (Bowers y Korn, 1968). En *Amoeba proteus* no se han encontrado centros organizadores de los microtúbulos, y se propone que los cinetócoros jueguen el papel de aquéllos (Daniels y Roth, 1964). En el género *Naegleria* tampoco se han encontrado centros organizadores de los microtúbulos (Schuster, 1975). Gicquaud (1979) reporta que el centro organizador de los microtúbulos de la cepa Laredo es un cuerpo electrodenso de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro y se encuentra situado en el centro del núcleo.

Entre los protozoarios existen cinetócoros típicos, trilaminares, que están permanentemente unidos a la envoltura nuclear (Raikov, 1982). Otro tipo de cinetócoros, en forma de disco laminado se han encontrado en *T. cruzi* (De Souza y Meyer, 1974) y otros protozoarios (Vickerman y Preston, 1970). Incluso hay cinetócoros en forma de cuerpos electrodensos globulares en *Labyrinthula* sp. (Porter, 1972). Sin embargo, se reporta a el orden Amebidea dentro de los que carecen

de cinetócoro (Raikov, 1982). Se menciona que los microtúbulos del huso terminan directamente en la masa fibrilar del cromosoma que está solo parcial y localmente condensado (Raikov, 1982).

Los cromosomas de protozoarios son difíciles de observar debido a su falta de condensación y son de tamaño pequeño (Raikov, 1982). Sin embargo, existe una larga lista de protozoarios cuyos cromosomas han sido contados u observados. En general, los protozoarios tienen un ciclo típico de enrollamiento del cromosoma, en forma de espiral (Le Calvez, 1938). Se ha demostrado en *Patellina corrugata* (Grell, 1959), en *Euglena viridis* (Saito, 1961), *Holomastigotoides* (Cleveland, 1949) y *H. psammotermitidis* (Grassé y Hollande, 1963). Probablemente, la diversidad existente entre las mitosis de protozoarios sea también extensible a sus cromosomas.

## 5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque se han realizado estudios para conocer el mecanismo de división de *S. histolytica* (Solis y cols., 1986; Orozco y cols., 1988, entre otros), siguen sin dilucidar muchas de las incógnitas que ya se habían planteado, entre ellas están: ¿intervienen muchos organelos?, ¿existe un huso mitótico típico, formado por 2 mitades iguales?, ¿cuál es el comportamiento de los microtúbulos durante el proceso mitótico?, ¿existe un centro organizador de los microtúbulos?; si hay un centro organizador de los microtúbulos, ¿cómo es éste?, ¿cuál es su comportamiento durante la mitosis?, ¿se parece a otros centros

organizadores de los microtúbulos de protozoarios?, ¿ existen los cinetócoros?, ¿ cómo son?; en cuanto a los cromosomas, ¿ son capaces de condensar?, ¿ cuál es su tamaño, forma y número?, entre algunas de las preguntas sin respuesta.

## 6. OBJETIVOS

Tomando en cuenta estas preguntas, se planteó un objetivo general, que fue el de la:

CARACTERIZACION DE LA DIVISION NUCLEAR Y LOS CROMOSOMAS DE *Entamoeba histolytica*.

A partir de este objetivo general se derivaron cuatro objetivos particulares, que consistieron en lo siguiente:

- A) Determinar el tipo de división mitótica, ya sea una pleuromitosis ó una ortomitosis.
- B) Encontrar el centro organizador de microtúbulos y caracterizarlo.
- C) Localizar a los cinetócoros y tratar de caracterizarlos.
- D) Averiguar si los cromosomas son capaces de condensarse. Si esto ocurre, determinar la forma, tamaño y número de los cromosomas.

El cumplimiento de los objetivos implicaba una estrategia, a nivel morfológico, que dejara abierto el camino para resolver algunas

de las otras incógnitas planteadas en relación a la división nuclear.

La estrategia que se diseñó consistió en los siguientes pasos:

1) Obtener las condiciones adecuadas para la obtención de una buena proporción de trofozoítos de *S. histolytica* en división.

2) Estudiar la división nuclear mediante microscopía fotónica y electrónica.

3) Una vez localizados algunos de los organelos, mediante diversos tratamientos, lograr su caracterización morfológica.

## 7. MATERIALES Y METODOS

### 7.1 CULTIVO DE CELULAS.

Los trofozoitos de *S. histolytica*, cepa HM1:IMSS, y la clona M1, obtenida a partir de la cepa mencionada, fueron cultivados axénicamente en el medio TYI-S-33 (Diamond y cols., 1978), el cual tiene la siguiente fórmula:

Biosate	30	gr
Dextrosa	10	gr
NaCl	2	gr
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.6	gr
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1	gr
Cisteína	1	gr
Citrato férrico	0.023	gr
Acido ascórbico	0.2	gr

Ajustando a un pH de 6.8 en 820 ml de agua destilada.

La clonación de los trofozoitos de *S. histolytica* se llevó a cabo como está descrito (Gillin y Diamond, 1978). Los trofozoitos se incubaron en agar bacteriológico al 0.5 %, disuelto en medio de cultivo TYI-S-33.

### 7.2 ESTUDIOS DE MICROSCOPIA ELECTRONICA.

El medio de cultivo, presente en los tubos con trofozoitos en división, fue cambiado por solución amortiguadora de solución salina con fosfatos ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.2 M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.2 M y NaCl 0.154 M, pH final de 7.1 (PBS), y, posteriormente, los trofozoitos se fijaron por 1 hr con

glutaraldehído al 2.5 % en solución amortiguadora de cacodilato 0.1 N, pH 7.4, a 37<sup>o</sup> C, después de lo cual los trofozoítos se despegaron de la pared del tubo utilizando una espátula de hule, tal como está descrito (Solis y cols., 1986; Orozco y cols., 1988). Posteriormente, las células se postfijaron con OsO<sub>4</sub> al 1% en solución amortiguadora de cacodilato de sodio 0.1 N por 1 h a temperatura ambiente, seguido de deshidratación por medio de concentraciones crecientes de etanol (70%, 80% y 2 con etanol absoluto por 10 min en cada una) y óxido de propileno. Posteriormente, se incubaron por 24 h a temperatura ambiente en una solución de óxido de propileno y Epón 812 (Polysciences, Inc, Cal, USA) 1:1 y después incluidas en Epón 812 e incubadas a 60<sup>o</sup> C por 48 h.. Se obtuvieron cortes semifinos, que se tñieron con azul de toluidina, para estudios de microscopía fotónica y cortes finos, que fueron contrastados de acuerdo al reporte de Reynolds (1963), con acetato de uranilo al 1% en solución metanólica al 50% por 15 min y con citrato de plomo al 3% por 30 min, y observados con un microscopio electrónico Zeiss EM 10C.

### 7.3 ESTUDIOS AUTORADIOGRAFICOS.

24 Hr antes de que los trofozoítos estuvieran en confluencia o fase estacionaria, se agregó al medio de cultivo timidina tritiada (<sup>3</sup>(H)Tdr) (Amersham, VA, USA) con actividad específica de 12 µCi/ml, para una concentración final de 4 µC/ml. Después, las células se lavaron dos veces con PBS, y posteriormente fueron fijadas con metanol-ácido acético (3:1), extendidas en portaobjetos y secadas a temperatura ambiente. Acto seguido, los portaobjetos con las células se cubrieron con la emulsión fotográfica Ilford L-4 (Polysciences

Inc., Warrington, CA), diluida 1:1 con agua destilada (Algunas veces es necesario calentar la emulsión en baño maría antes de usarse). Los portaobjetos con la emulsión se incubaron en completa oscuridad por 1 semana a 4°C. Posteriormente, la emulsión se reveló con Kodak D-11, sin diluir, y de acuerdo a las especificaciones del fabricante. También se utilizó fijador Kodak.

#### 7.4 TINCION ESPECIFICA DEL DNA.

La tinción específica del DNA se llevó a cabo por diversos métodos.

A) Tinción con colorantes fluorescentes específicos de DNA. La tinción con colorantes fluorescentes específicos del DNA se efectuó tanto con trofozoitos completos como con lisados de éstos: los trofozoitos se tñeron con naranja de acridina (Sigma de Mexico, Mexico, DF) a una concentración de 8 µg/ml en citrato de sodio 0.2 M y fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.0 por 2 min y observados en microscopio de fluorescencia Olympus con filtro excitador de 495 y filtro de barrera de 420-505 nm. Los trofozoitos también fueron teñidos por 10 min con Hoechst 33258 (Polysciences Inc., Warrington, CA) a una concentración de 10 µg/ml en citrato de sodio 0.2 M y fosfato de sodio 0.1M, pH 5.5. Los extractos amibianos se prepararon al poner a los trofozoitos en agua destilada por 10 min a temperatura ambiente. Los extractos se lavaron dos veces con PBS, y posteriormente fijados con metanol-ácido acético (3:1) por 3 min, centrifugados y resuspendidos en fijador fresco. Los extractos se extendieron en portaobjetos. Casi inmediatamente, se prendió fuego a los portaobjetos para permitir la adhesión de los extractos a aquéllos. Luego, los extractos se tñeron

con naranja de acridina y Hoechst 33258. Una vez teñidos, los extractos se observaron con un microscopio Olympus, cuyas características ya fueron señaladas.

B) Tinción específica de DNA para microscopía electrónica. Esta tinción se realizó de acuerdo al reporte de Esquivel y cols. (1987), de la siguiente forma: Los trofozoitos de *S. histolytica* se fijaron *in situ* como se describe anteriormente. Posteriormente, las células se lavaron tres veces con HCl 0.2 N, pH 2.3, permitiendo un reposo de 15 min entre cada lavado. Después, las células se tiñeron con ácido fosfotúngstico al 3% en HCl 1 N por 1 h a temperatura ambiente y se procesaron para microscopía electrónica, evitando la post-fijación con tetróxido de osmio.

C) Tinción con anticuerpos anti-DNA. Los anticuerpos anti-DNA se obtuvieron de pacientes afectados por lupus eritematoso diseminado (LED) (Alarcon-Segovia *et al.*, 1982) y están dirigidos contra DNA. Los trofozoitos se fijaron suavemente con formaldehído al 3% en PBS por 15 min, y permeabilizados con Triton X-100 al 1% en PBS por 10 min. Las células se lavaron dos veces con PBS, y posteriormente fueron incubadas con el suero obtenido de pacientes con LED, diluido 1:20 con PBS, por 1 h a temperatura ambiente. Acto seguido, las células se lavaron dos veces con PBS, y, a continuación, la suspensión celular se incubó con proteína A-peroxidasa (pAP) por 1 h a temperatura ambiente. Luego, la peroxidasa se reveló con la adición de 3,3'-diaminobencidina, de acuerdo al reporte de Novikoff (1970). Una parte de esta suspensión se observó y fotografió con un microscopio óptico (Olympus), y el resto fue procesado para microscopía electrónica.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 EL CENTRO ORGANIZADOR DE LOS MICROTUBULOS

Para hacer las observaciones que se detallan a continuación, se observaron, aproximadamente, 1200 núcleos. Una cuarta parte de ellos, aproximadamente, se encontraban en alguna etapa de la división nuclear. Las etapas de la división en las cuales se encontraba el parásito fueron determinadas por la forma del núcleo, de acuerdo a lo reportado en la literatura (Solís y cols., 1986; Orozco y cols., 1988). En la profase y metafase, los microtubulos (abreviados Mts. a partir de aquí) siempre aparecieron en el centro del núcleo. Simultáneamente a la aparición de los Mts, se observó la condensación de material cromatinico en la periferia interna de los núcleos amibianos. Muchos núcleos en división mostraron un corpúsculo electrodensos en su parte central (Fig. 1). Este corpúsculo es amorfo y está compuesto de pequeños cuerpos electrodensos, rodeados por zonas electrotransparentes, de los cuales parecían sobresalir muchos Mts largos y otros cortados transversalmente. Los Mts estaban unidos a ellos mismos (Fig 1, flechas), ó a cuerpos amorfos transparentes a los electrones (Fig 1, puntas de flecha). Rodeando a estos cuerpos electrodensos, se encontraban otros cuerpos densos, de apariencia cromatinica. En otros núcleos, los cuerpos centrales electrodensos se encontraban agrupados formando un corpúsculo circular de 0.6  $\mu\text{m}$  de diámetro. Una gran cantidad de Mts parecían originarse de este corpúsculo (Fig 2). Alrededor de este corpúsculo se pudo observar material cromatinico.

En muchos núcleos se pudo observar el corpúsculo electrodensó con forma cilíndrica, con un diámetro de 1.5  $\mu\text{m}$ , y rodeado de material cromatínico (Fig. 3, recuadro, M). Una gran cantidad de Mts parecían estar anclados a este cilindro.

En algunas células, el cuerpo central electrodensó nuclear se encontraba alargado, y, a lo largo de éste, se observó un canal que atravesaba de lado a lado al núcleo (Fig 4, líneas discontinuas). Dos grandes acúmulos electrodensos estuvieron colocados a los lados del cuerpo electrodensó central. El núcleo mostrado en la figura 4 es alargado, indicando que se encontraba en división.

En otras ocasiones, junto al corpúsculo central, se observaron cuerpos filamentosos (Fig 5, flechas). Un canal irregular estaba, aparentemente, situado a lo largo del núcleo (Fig 5, líneas discontinuas). Generalmente, las dos mitades de estos núcleos fueron diferentes.

Se observaron núcleos conteniendo cuerpos centrales electrodensos de diferentes formas. La más común de éstas, fue la forma alargada con una porción media estrecha (Fig 6).

## 8.2 LA DIVISION NUCLEAR

Para caracterizar la división nuclear, se estudió el movimiento de los microtúbulos en los núcleos de trofozoítos en

división de *S. histolytica*.

Como se menciona anteriormente, los Mts empezaron a aparecer en forma desordenada en el centro del núcleo (Figs. 1, 2). Después, empezaron a ser organizados por un corpúsculo central, que podría ser el centro organizador de los Mts de *S. histolytica*. A partir de aquí, el organizador microtubular empieza a organizar a los Mts, primeramente en forma radial, y posteriormente para formar el huso mitótico. Un ejemplo de lo que se menciona se puede observar en la figura 7. En el centro del núcleo mostrado se encontraron una gran cantidad de Mts, dispuestos en forma radial, que parecían partir de un corpúsculo electrodensó, el centro organizador de los Mts (Fig. 7 M). Se pudieron observar algunos Mts cortados transversalmente (Fig 7, puntas de flecha). El material periférico nuclear estaba discretamente compactado, de forma regular, cerca de la envoltura nuclear. Algunos Mts llegaban hasta esta zona, sin llegar hasta la envoltura nuclear. Dos tipos diferentes de vesículas intranucleares se encontraban cerca de la envoltura nuclear, y algunas de ellas poseían una cubierta gruesa. Otro tipo de vesículas poseía una cubierta delgada (Fig 7, flecha).

Conforme la división nuclear avanzaba, se observaba también un nivel superior de organización microtubular. En la anafase A, los Mts empezaron a organizarse para formar un huso mitótico (Fig 8). Algunos Mts cortados transversalmente aparecieron en el lugar del cual, aparentemente, los Mts se originaban (Fig 8, flechas discontinuas). La mayoría de éstos se encontraban agrupados cerca del sitio de origen

microtubular, y parecían ser parte de un huso mitótico (Fig 8, asterisco). Algunos Mts casi llegaban a la envoltura nuclear, lejos del sitio de origen (Fig 8, flecha) y en forma paralela a la protuberancia nuclear. Otros Mts aparentemente divergían de su sitio de origen (Fig 8, puntas de flecha), disponiéndose en forma de abanico desplegado. También se observó la unión de los microtúbulos a sí mismos (Fig. 8, círculo). Poco del material periférico podía ser observado, y la mayoría de este material se encontraba en la parte superior del núcleo, al menos en el núcleo mostrado en la figura 8.

En un estadio más avanzado de la mitosis, pero todavía dentro de la anafase A, los núcleos presentaban Mts agrupados, formando un huso mitótico (Fig. 9, S) más organizado que el presentado en la figura anterior (Fig. 8). Aparentemente, este huso está formado por Mts cortos unidos por sus extremos. No se observaron Mts cortados transversalmente ó laterales, en donde se supone estaría el Centro organizador de los Mts (Fig. 9, M). Algunas vesículas intranucleares agrupadas (Fig. 9, V) pudieron ser observadas. Hubo vesículas de pared delgada (Fig. 9, flechas).

En la anafase B, el huso mitótico ya formado, creció con Mts agrupados estrechamente (Fig 10). Este huso mitótico largo parece estar formado de una sola pieza, a diferencia del huso mitótico típico, el cual se forma con dos medios husos (McIntosh and Koonce, 1989). Los Mts del huso mitótico amibiano están, aparentemente, unidos por sus extremos (Fig 10 A, recuadro). Este tipo de núcleos no presentaron Mts cortados transversalmente, indicando que,

posiblemente, todos los Mts están formando parte del huso mitótico. Dos corpúsculos electrodensos estaban embebidos en el huso mitótico. Se obtuvieron cortes transversales de husos mitóticos ya formados (Fig. 10 B). En este grupo de Mts se pueden observar "puentes" electrodensos entre aquéllos (Fig 10 B, recuadro, flechas), sin un orden regular. También se pudieron observar Mts aislados. Se observaron dos tipos diferentes de vesículas intranucleares, uno de ellos con envoltura delgada (Fig. 10 A, flecha) El material periférico nuclear se encontró distribuido regularmente en este tipo de núcleos.

En el último estadio de la división nuclear de *S. histolytica*, en la telofase, antes de que se observe la forma de "campana", observada en núcleos amibianos en división (Solis y cols., 1986; Orozco y cols., 1988), muchos de los Mts se encontraban presentes, y, aparentemente seccionados por la formación de la envoltura nuclear (Fig 11). La unión entre los núcleos hijos se pudo observar (Fig. 11, flecha). Uno de los núcleos hijos contiene material cromatínico (Fig 11, puntas de flecha). El material periférico nuclear estaba dispuesto en pequeños cuerpos discretos.

### 8.3 LOS CROMOSOMAS

Cuando los cortes semifinos de trofozoítos embebidos en resinas epóxicas se tiñeron con azul de toluidina, algunos núcleos de los trofozoítos presentaron corpúsculos esféricos. Estos corpúsculos se encontraron, generalmente, cerca de la envoltura nuclear interna (Fig

12 A, flechas). Tales corpúsculos podrían corresponder a los cromosomas amibianos. Los núcleos también contenían el material periférico nuclear, que ya ha sido descrito anteriormente, y algunos núcleos presentaban un cariosoma central difuso.

Con el fin de asegurar que los cuerpos esféricos estaban constituidos por ADN, utilizamos una estrategia que involucró el uso de anticuerpos dirigidos contra ADN, obtenidos de pacientes que padecen de lupus eritematoso diseminado, y posteriormente revelados con proteína A acoplado a peroxidasa y diaminobencidina. El patrón de tinción de los núcleos de los trofozoítos mostró, al igual que los núcleos de los cortes semifinos, cuatro o cinco cuerpos esféricos (Fig 12 B, flechas), o cuerpos ligeramente alargados (Fig 12 C), que se encontraron localizados en la periferia nuclear interna. Este hecho confirmó que los cuerpos esféricos estaban constituidos por ADN. La tinción de los núcleos Prometafásicos con colorantes específicos para el ADN, tal como el Hoechst 33258, mostró al ADN dividido en tres porciones (Fig 12 D), mostrando una imagen mitótica atípica. En la Anafase, el ADN se encontraba dividido en dos porciones iguales, mostrando aquí una imagen mitótica típica (Fig 12 E). Un cuerpo esférico puede ser visto en una de las dos divisiones del ADN (Fig 12 E, flecha). En la Telofase, se observó una distribución similar (Fig 12 F). Las autoradiografías de trofozoítos marcados con <sup>3</sup>(H)Tdr *in vivo*, confirmaron estos resultados al revelarse cuerpos discretos en la prometafase de la división nuclear (Fig 12 G).

Con el objeto de evitar interferencia citoplásmica en la

observación de los cuerpos esféricos discretos, los trofozoítos fueron lisados previamente a la tinción específica del ADN. La figura 13 A muestra un núcleo con cuatro cuerpos esféricos protuberantes. Un quinto cuerpo esférico puede ser observado al cambiar el campo de observación (Fig 13 B). La tinción de los lisados celulares con naranja de acridina (Fig 13 C) mostró los cuerpos esféricos. Con esta tinción, los cuerpos esféricos se tiñeron de amarillo ó verde-amarillento, mientras que el fondo se tiñó de rojo (los colores no se muestran). Estos resultados también son indicadores de que los cuerpos esféricos están constituidos por ADN.

Se efectuaron observaciones ultraestructurales de los cuerpos esféricos, utilizando trofozoítos completos. Estos fueron tratados con Triton X-100, para permeabilizarlos. Los precipitados producidos por el complejo formado por el anticuerpo anti-DNA, mas la proteína A acoplada a peroxidasa, y revelado con diaminobencidina, se localizaron exclusivamente dentro del núcleo, organizados en grupos, inmersos en material electrodensso (Fig 14 A). Algunos cuerpos electrodensos son señalados por las flechas (Fig. 14 A, flechas). En otros cortes finos se observaron trofozoítos con núcleos ligeramente alargados (Fig 14 B), con precipitados de la diaminobencidina en el material electrodensso (Fig 14 B). La reacción con la diaminobencidina se presentó positiva dentro de las vesículas intranucleares (Fig 14 B, flecha). La envoltura nuclear presentó aberturas grandes debido al tratamiento con el Tritón X-100.

Los trofozoítos contrastados con ácido fosfotúngstico (PTA) se

estudiaron con microscopía electrónica. El tratamiento con PTA contrasta a la cromatina compacta y extendida, mientras que el nucleolo y otras partículas ribonucleoproteicas no son contrastadas (Esquivel y cols., 1987). Este tratamiento permitió observar, en muchos núcleos amibianos, cuerpos cromatínicos, muy contrastados. Al utilizar la técnica de Reynolds (1963), estos cuerpos no fueron observados. En la figura 15 A, se observa un núcleo amibiano conteniendo este material discreto, que constaba de una porción electrodensa con discontinuidades en su superficie. Junto a esta porción se encontraron otros cuerpos menos electrodensos, unidos a aquéllos por medio de microfibrillas (Fig 15 A, flecha). El material periférico nuclear también fue teñido, aunque el grado de compactación fue diferente con respecto al del cuerpo discreto. Algunos Mts cortos, y algunos cortados transversalmente se encontraban presentes en el centro del núcleo (Fig 15 A, puntas de flecha). El material periférico nuclear también fue teñido (Fig. 15 A, PM). Algunos núcleos en división, contrastados con ácido fosfotúngstico, pudieron ser observados (Fig. 15 B). En tales núcleos, pudieron observarse cuerpos esféricos cercanos al centro nuclear (Fig 15 B, flechas). Por su forma, este material puede corresponder a los cromosomas amibianos. Algunos Mts se encontraron cercanos a estos cuerpos (Fig 15 B, entre asteriscos). La cercanía de los cuerpos esféricos y los Mts que, aparentemente, forman parte del huso mitótico, podrían estar indicando un proceso de la Anafase.

#### 8.4 EL CINETOCORO

A la fecha, no existían datos relacionados al cinetócoro de *X. histolytica*. En el transcurso de las observaciones de los núcleos amibianos, un hecho llamó la atención, el cual fue la unión de un cromosoma a un Mt. La figura 16 muestra un núcleo amibiano con el centro organizador de los Mts (Fig 16, asterisco). Desde este lugar los Mts se organizan en forma radial al inicio de la división nuclear. Algunos Mts se extienden desde el centro del núcleo hasta su periferia, sin tocar la envoltura nuclear. Cerca de ésta, un Mt tiene adosado material piriforme ligeramente electrodensó (Fig 16). Un mayor aumento mostró la unión de este cuerpo piriforme al microtúbulo en, al menos, tres partes: dos de ellas en los extremos del cuerpo piriforme y la restante, trilaminar, se encontró en la parte central del cuerpo piriforme (Fig 16, recuadro). Aunque pudiera estar incompleto, el cinetócoro amibiano podría ser esta unión del cromosoma al microtúbulo. En algunas ocasiones, el material cromatínico electrodensó se encontró inmerso entre las vesículas intranucleares (Fig. 17, V), cercano también a la envoltura nuclear (Fig 17, PM). Este lugar podría ser donde se efectúa la condensación cromosómica y las vesículas intranucleares estarían jugando algún papel importante en el mecanismo de condensación cromosómica.

## 9. DISCUSION

### 9.1 EL CENTRO ORGANIZADOR DE LOS MICROTUBULOS

Las observaciones de los núcleos amibianos en los primeros estadios de la división nuclear, inferidos éstos por la forma del núcleo, permite asumir que el corpúsculo electrodenso, del cual parecen originarse los Mts, es el centro organizador de los Mts (MTOC por sus siglas en inglés) de *Ƴ. histolytica*. Debido a que solamente se le observó dentro del núcleo, se concluye que la división amibiana es intranuclear.

Existen algunas diferencias del centro organizador de los microtúbulos amibiano con respecto al centro organizador microtubular de otros protozoarios. El centro organizador de los microtúbulos de *Ƴ. histolytica* parece ser un corpúsculo cilíndrico electrodenso, el cual mide 1.5  $\mu\text{m}$  de longitud y 0.6  $\mu\text{m}$  de diámetro. Está formado por cuerpos discretos, amorfos y electrodensos, que aparecen desorganizados al principio de la división nuclear. A diferencia de este centro organizador microtubular, el que presenta *A. castellani* es un cuerpo electrodenso delgado, localizado en el polo nuclear al inicio de la mitosis (Bowers y Korn, 1970). Otros tipos de centro organizador de los microtúbulos están formados por placas, por partículas finamente dispersas o por anillos fibrosos (Brinkley, 1985).

Los núcleos de los trofozoítos contrastados con ácido fosfotúngstico y observadas al microscopio electrónico mostraron pocos

Mts. Sin embargo, el corpúsculo central (ó centro organizador de los microtúbulos) fue fácilmente observado. Este cuerpo central algunas veces apareció alargado (Figs. 4 y 5), pareciendo estar dividiéndose o contrayéndose. En otras observaciones, el núcleo amibiano parecía estar dividido asimétricamente por algo que semejaba un surco (Figs. 4 y 5). Hasta el momento, no es posible conocer la secuencia exacta de eventos que tienen lugar durante la profase de la división nuclear, dado que no ha sido posible la sincronización de los cultivos. Sin embargo, la secuencia, basándose en las mitosis de mamíferos (McIntosh y McDonald, 1989), podría ser: 1) Formación del surco de división (Fig 4), que pudiera ser indicador del plano de la futura división nuclear (Mc Intosh y Koonce, 1989); 2) El Centro organizador de los Mts aparece (Fig 6 y 7); 3) La siguiente fase es la aparición de Mts y las subsecuentes fases de la división. El surco de división ha sido observado solamente en las primeras fases de la mitosis amibiana, en una gran cantidad de núcleos observados.

## 9.2 LA DIVISION NUCLEAR

En este trabajo se presenta una imagen más detallada de la división nuclear en *S. histolytica*, en especial el movimiento de los Mts durante la división nuclear. Los reportes acerca de la división señalaban que este protozoario presentaba una mitosis cerrada, (Orozco y cols., 1988). La forma del núcleo se utilizó como referencia para conocer los estadios de la división nuclear de este parásito, de acuerdo a lo reportado (Solis y cols., 1986; Orozco y cols., 1988). Se realizaron estudios ultraestructurales que permitieron definir el

movimiento de los Mts durante la división nuclear de *S. histolytica*, tal como se ha hecho en otros sistemas (Dustin, 1982), y permitió conocer los estadios de la división de acuerdo a este movimiento microtubular.

Los resultados obtenidos permitieron notar la similitud de la división nuclear amibiana con el mecanismo mitótico del micronúcleo de *Didinium* (Karadhazan and Raikov, 1977) en las primeras etapas de la división, debido al ordenamiento de los Mts en una forma radial (Fig 7). Si existe alguna relación cercana entre *Didinium* y *Entamoeba* es algo que tiene que ser demostrado.

Tomando siempre en cuenta la forma del núcleo para conocer la etapa de la división nuclear, de acuerdo a los reportes (Solís y cols., 1986; Orozco y cols., 1988), en una fase más avanzada de la mitosis, en la anafase A, los Mts empiezan a organizarse para formar el huso mitótico. En esta etapa algunos Mts laterales y cortados transversalmente pueden ser observados (Fig 8, puntas de flecha, flechas discontinuas). Aunque algunos Mts se encontraban muy cercanos a la membrana nuclear, nunca se observó la unión de los Mts a la membrana, en esta u otra etapa de la división. Posteriormente, en la anafase B, los Mts formaron un huso mitótico definido (Fig 10 A, S). En esta fase, el huso mitótico no mostró algún Mt lo suficientemente largo para alcanzar ambos polos nucleares simultáneamente, así como fue notoria la ausencia de Mts que se traslaparan en la parte central del huso mitótico. Por consiguiente, no se pudo observar una zona más electrodensa en el huso mitótico, resultante del traslapamiento de

los Mts. Estos resultados podrían indicar que el huso mitótico amibiano está formado de una sola pieza, en el cual los Mts están interconectados por sus extremos. Se conoce, en las mitosis típicas, que el huso mitótico está formado por dos medios husos, cuyos Mts se traslapan en su parte central, produciendo una zona más electrodensa (Dustin, 1982; Mc Intosh and Koonce, 1989). La presencia de puentes entre los Mts (Fig 10 B) podría indicar la unión entre éstos para permitir el deslizamiento de uno con otro, como lo han sugerido McIntosh y McDonald (1989) para el huso mitótico típico de mamíferos.

En lo que respecta al tipo de mitosis de *8. histolytica*, en la mayoría de los protozoarios taxonómicamente relacionados con la amiba, tales como *Acanthamoeba* (Sawyer and Griffin, 1971), *Hartmannella* (Page, 1967), and *Naegleria* (Schuster, 1975) desarrollan ortomitosis cerradas o abiertas. Sin embargo, en *8. histolytica* parece llevarse a cabo una pleuromitosis, ya que su huso mitótico empieza su formación de un modo bilateral, con la disposición radial de los Mts (Fig 7), y una reorganización, posterior, en una forma axial. Existen ejemplos de protozoarios en los que se presenta este cambio en la disposición de los Mts (Raikov, 1982).

### 9.3 LOS CROMOSOMAS

Es muy difícil observar los cromosomas de muchos de los protozoarios o de los hongos. Esta particularidad podría ser atribuida a la falta de condensación de los cromosomas de estos organismos, ocasionada por la ausencia de la histona H1 en las fibras de ADN, como

ha sido sugerido por Alberts y cols.(1986).

En este reporte se muestra la condensación de los cromosomas amibianos, aún cuando no existen reportes acerca de la existencia o ausencia de la histona H1 en este parásito. Los datos experimentales obtenidos, tales como la tinción específica del DNA, observado tanto e trofozoítos enteros como lisados, las autorradiografías de trofozoítos marcados radiactivamente con <sup>3</sup>(H)Tdr y el tratamiento de los trofozoítos con anticuerpos dirigidos contra DNA de doble cadena (Alarcón-Segovia y cols., 1986), son altamente sugerentes de que los cuerpos discretos condensados, positivos a los tratamientos descritos anteriormente, son los cromosomas de *Entamoeba histolytica*.

De acuerdo a los datos presentados, los cromosomas amibianos pueden ser esféricos o alargados. Por medio de la microscopía óptica, la mayoría de los cromosomas son esféricos (Fig 12, E), y en algunas ocasiones se mostraban alargados (Fig 13, B). En las micrografías electrónicas los cromosomas eran esféricos (Figs 14, A, y 15, B) o alargados (Figs 14, B, 15, A, y 16). En general, las formas cromosómica observadas en microscopía óptica y electrónica concordaban. Las condensaciones amorfas observadas en microscopía electrónica (Fig 17) podrían ser algunas de las fases anteriores a la total condensación de los cromosomas. El tamaño de algunos de los cromosomas es de alrededor de 1  $\mu$ m. Una conclusión es que los cromosomas amibianos son pequeños. En comparación, los cromosomas humanos miden, en promedio, 6  $\mu$ m de largo y 1.4  $\mu$ m de ancho (Alberts y cols., 1986).

La localización de los cromosomas fue, principalmente, cerca de la envoltura nuclear interna. Sin embargo, los cromosomas que estaban presentes en núcleos en división, fueron localizados cerca del centro del núcleo.

En lo que respecta al número de cromosomas, la cantidad de grupos de éstos que se pudieron observar, no fueron suficientes para efectuar un análisis estadístico que confirmara el número cromosómico amibiano. Sin embargo, los experimentos de tinción específica del DNA permitió la observación de varios grupos de cinco, o múltiplos de este número. De esta forma, cinco podría ser el número haploide de cromosomas en *ℳ. histolytica*. Otros autores han reportado cinco o seis cromosomas para este protozoario (Kofoid and Swezy, 1925; Uribe, 1926; Epstein, 1941). Un reporte reciente (Valdés y cols., 1990), por medio de electroforesis en pulsos alternados para el DNA, sugiere la presencia de más de 30 cromosomas en *ℳ. histolytica*, contenidos en 6-9 bandas en geles de agarosa.

En lo que respecta al cinetócoro de *ℳ. histolytica*, aunque sólo se haya hecho una observación, fue posible su identificación. Existe la posibilidad de que se haya observado una parte de este organelo. Se hace notar que son necesarias un mayor número de observaciones para caracterizar este orgánulo. El hecho que si puede ser asentado es la existencia del cinetócoro amibiano. Al igual que en otros organismos (Mc Intosh y Mc Donald, 1989), la estructura del cinetócoro parece ser trilaminar, al menos en la parte central de unión al Mt. Existen algunas diferencias del cinetócoro amibiano con respecto a los

cinetócoros de otros organismos: 1) Se observaron tres puntos de unión del cinetócoro al Mt; 2) La unión microtúbulo-cinetócoro no tiene lugar en el extremo del Mt, sino que es lateral. En la mayoría de los organismos, la unión mencionada se efectúa con el extremo del Mt (Alberts y cols., 1986; McIntosh y McDonald, 1989). Sin embargo, no se conoce si existen sitios o Mts específicos para los cromosomas.

La condensación cromosómica tiene lugar en la periferia interna nuclear, y que las vesículas intranucleares juegan algún papel, no definido aún, en esta condensación, como ya se ha mencionado en este trabajo. Los cromosomas están inmersos en el material periférico nuclear, considerado el equivalente del nucleolo (Albach y cols., 1980). En esta sección nuclear es donde se lleva a cabo la producción de ARN ribosomal. Pudiera ser que el contacto estrecho de los cromosomas con el nucleolo ambiguo indicara una gran actividad transcripcional.

#### 9.4 LAS VESICULAS INTRANUCLEARES

Un tipo de vesículas intranucleares de *S. histolytica* ya ha sido descrita por varios autores (Feria-Velasco y Treviño, 1969; Zaman, 1970). Ellos describieron las vesículas que poseen una doble membrana, y en un un reporte de González-Angulo y cols. (1972), se menciona la presencia de DNA en el interior de tales vesículas. Los resultados reportados en este trabajo apoyan los de los autores ya mencionados, y se presentan evidencias de la existencia de otro tipo de vesícula intranuclear. Este otro tipo de vesícula posee una envoltura delgada y regular. En algunas ocasiones, se observó material fibroso

electrodensos en el interior de la vesícula, el cual es similar, morfológicamente, al material nucleoplásmico. Los dos tipos diferentes de vesículas se tiñen diferencialmente cuando los trofozoítos han sido tratados, antes de su inclusión en resinas, con RNasa (Solis y Barrios, 1989). Existe un hecho remarcable, que es el incremento de las vesículas intranucleares durante la división nuclear del parásito, lo cual sugiere un posible papel en el proceso mitótico, aunado al hecho de la presencia de tales vesículas embebidas entre las condensaciones presentes en la periferia nuclear amibiana (Fig 17).

#### 9.5 MODELO PARA LA DIVISION NUCLEAR EN *Entamoeba histolytica*

Los datos obtenidos en lo que respecta al cambio de disposición de los Mts durante las distintas fases de la división nuclear, la forma del centro organizador de Mts y la situación de los cromosomas en el núcleo, permite proponer un modelo acerca del mecanismo de la mitosis en *E. histolytica*: 1) Profase (Figs 7, 12 B, 18), con la condensación cromosómica en la periferia del núcleo, en la cual empieza a organizarse el huso mitótico, partiendo del centro organizador de Mts, localizado en el centro del núcleo del trofozoíto amibiano, formación de Mts lo suficientemente largos para casi llegar a la membrana nuclear, y, de esa forma, permitir el anclaje lateral de los cromosomas, por medio del cinetocóro amibiano; 2) Metafase (Figs 12 B, G, 18), que consiste en la reunión de los cromosomas en el centro del núcleo. Reorganización de los Mts para formar el huso mitótico de una sola pieza; 3) Anafase A (Figs 8, 9, 12 E, 18), cuando el huso mitótico empieza a crecer, con la consiguiente deformación del

núcleo; 4) Anafase B (Figs 10, 18), en la cual el huso mitótico separa a los cromosomas en dos partes iguales, y 5) Telofase (Figs 11, 12 F, 18), que consiste en el proceso de cariocinesis. Si este modelo fuera correcto, entonces en la prometafase amibiana el huso mitótico es bilateral. Por consiguiente, el tipo de mitosis que se lleva a cabo en *S. histolytica* es una pleuromitosis intranuclear cerrada, tal vez de un tipo no reportado antes, la cual, de cualquier manera, es una mitosis muy primitiva, como ha sido señalado por Raikov (1982).

Evolutivamente, *S. histolytica* es un organismo muy primitivo. A diferencia de organismos taxonómicamente relacionados, la amiba carece de organelos típicos, tales como mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplásmico. Sin embargo, existe un sistema membranal, semejante al retículo endoplásmico. Aun más, la apariencia *sui generis* del núcleo, su forma de división, y la forma de sus cromosomas, hacen pensar en la separación muy temprana, en términos evolutivos, de este organismo con respecto a otros protozoarios. Tal vez todas las especies de *Entamoeba* descienden de la especie *S. invadens*, la cual parasita a reptiles. Sería interesante estudiar las mitosis de otros organismos del género *Entamoeba* para encontrar similitudes o diferencias, las que existen bioquímicamente (Sargeant, 1980).

## 10 CONCLUSIONES

### CENTRO ORGANIZADOR DE LOS MICROTUBULOS (MTOC)

1. El Centro organizador de los microtúbulos de *Entamoeba histolytica* aparece en la profase.
2. El Centro organizador de los microtúbulos amibiano es un corpúsculo cilíndrico, formado en sus primeras fases por porciones electrodensas, a las cuales se unen los microtúbulos. Posteriormente estas porciones se agrupan formando un cilindro electrodenso, que mide 1.5  $\mu\text{m}$  de largo por 0.6  $\mu\text{m}$  de diámetro.
3. El centro organizador de los microtúbulos desaparece, aparentemente después de la metafase.

LA DIVISION NUCLEAR

1. Se definieron 5 fases de la división nuclear: Profase, Metafase, Anafase A, Anafase B y Telofase.
2. La Profase se presenta con la atracción , hacia el centro del núcleo, de los cromosomas periféricos por los microtúbulos.
3. El Centro organizador de los microtúbulos, junto con los cromosomas, forma la placa metafásica.
4. En la Anafase A y B, los cromosomas son repartidos a los núcleos hijos. El huso mitótico parece ser de una sola pieza, formado por microtúbulos unidos entre sí.
5. El huso mitótico parece ser seccionado, en la Telofase, por la formación de membrana nuclear entre los núcleos hijos.

#### LOS CROMOSOMAS

1. Los cromosomas de *S. histolytica* son capaces de condensar.
2. Los cromosomas amibianos son esféricos o alargados.
3. En promedio, los cromosomas amibianos miden 1  $\mu\text{m}$  de diámetro.
4. En la interfase, los cromosomas de la amiba se encuentran cercanos a la membrana nuclear interna.

5. Durante la división nuclear amibiana, los cromosomas son llevados al centro del núcleo en división y repartidos después por partes iguales entre los núcleos hijos.

#### LAS VESICULAS INTRANUCLEARES

1. Se observa un incremento en la cantidad de vesículas intranucleares (VI) de *S. histolytica*, al principio de la división nuclear.
2. Existen dos tipos diferentes de VI: uno de doble membrana, y otro de membrana sencilla.
3. Las VI de membrana sencilla contienen material morfológicamente similar al nucleoplasma.
4. Algunas VIs poseen en su interior DNA, y están relacionadas de alguna forma con los cromosomas amibianos.

## 11. REFERENCIAS

Alarcon-Segovia D, Llorente L, Fishbein B, Diaz-Jouanen E (1982) Abnormalities in the content of nucleic acids of peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* 23,3:304-317.

Albach R, Booden T, Boonlayangoor P, Downing S (1977) *Entamoeba histolytica*: autoradiographic analysis of nuclear sites of RNA synthesis. *Experimental Parasitology* 42:248-259.

Alberts et al (1986) *Molecular biology of the cell*. Prentice-Hall, New York.

Arroyo R, Orozco E (1987) Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Molecular and Biochemical Parasitology* 23:151-158.

Arroyo-Begovich A, Carabez-Trejo A, Ruiz-Herrera J (1980). *Journal of Parasitology* 66:735-741.

Ayala F, Kriger J (1984) *Genética Moderna*. Fondo Educativo Interamericano. México. pag 11.

Bowers B, Korn E (1968) The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* I. The trophozoite. *Journal of Cell Biology* 39:95-111.

Brandt H, Perez Tamayo R (1970) *Pathology of human amebiasis*.

Human Pathology 1:351-385.

Brinkley, B (1985) Microtubule organizing centers. Annual Review of Cell Biology 1: 145-172.

Brinkley B, Stubblefield E (1970) Ultrastructure and interaction of the kinetochore and the centriole in mitosis and meiosis. Advances in Cell Biology 1::119-185.

Brumpt E (1925) Etude sommaire de l'*Entamoeba* dispar N. sp. amibe à kistes quadri-nuclées, parasite de l'homme. Bulletin de L'Académie de Médecine (Paris) 94:943-952.

Cervantes-Mamoa A, Martinez-Palomo A (1980) Estudio del ciclo vital de *Entamoeba invadens* mediante cinematografía espaciada. Archivos de Investigación Médica 11:31-40.

Césana D (1978) La mitose gamogonique chez *Fridia lucida* (Foraminifera, Lagynidae). Ann Sci Nat Zool sér 12, 20:287-320.

Cleveland L (1949) The whole life cycle of chromosomes and their coiling systems. Transactions of The American Philosophy Society 39:1-100.

Chatton E (1910) Essai sur la structure du noyau et la mitose chez les Amœbiens. Faits et théories. Archives de Zoologie Expérimental Général 5:267-337.

Daniels E, Roth L (1964) Electron microscopy of mitosis in a radiosensitive giant ameba. *Journal of Cell Biology* 20:75-84.

De Souza W, Meyer H(1974) On the fine structure of the nucleus in *Trypanosoma cruzi* in tissue culture forms. Spindle fibers in the dividing nucleus. *Journal of Protozoology* 21:48-52.

Diamond L, Harlow DR, Cunnick C (1978) A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 74:431-432.

Dobell C (1919) *The Amoebae living in Man. A Zoological Monograph.* John Bale, Sons & Danielsson. London.

Dustin P(1982) *Microtubules.* 2nd Ed Springer-Verlag, New York.

Epstein G (1941) *Parasitic amoebae,* Medgiz Press, Moscow.

Esquivel C., Rovira P., Echeverria O., Vazquez-Nin G. (1987) A simple staining method for chromatin in electron microscopy compatible with serial sectioning. *Ultramicroscopy* 21:103-110.

Feria-Velasco A, Treviño N (1972) The ultrastructure of trophozoites of *Entamoeba histolytica* with particular reference to spherical arrangements of osmiophilic cylindrical bodies. *Journal of Protozoology* 19:200-211.

Fulton C, Dingle A (1971) Basal bodies, but not centrioles, in *Naegleria*. Journal of Cell Biology 51:826-836.

Gicquaud C (1979) Etude de l'ultrastructure du noyau et de la mitose de *Entamoeba histolytica*. Biologie Cellulaire 35:305-312.

Gillin F, Diamond L (1978) Clonal growth of *Entamoeba histolytica* and other species of *Entamoeba* in agar. Journal of Protozoology 25:539-541.

González-Angulo A, Ruiz de Chavez I, Treviño-García Manzo N (1973) Estudios con microscopio electrónico de los cuerpos redondos intranucleares de *Entamoeba histolytica* después de tratamiento con desoxirribonucleasa y ribonucleasa. Archivos de Investigación Médica (México) 4 (supl 1):25-32.

Gonzalez-Robles A, Martinez-Palomo A (1981) Scanning electron microscopy of attached trophozoites of pathogenic *Entamoeba histolytica*. Journal of Protozoology 30:692-700.

Grassé P, Hollande A (1963) Les flagellés des genres *Kolomastigotoides* et *Rostronymphe*. Structure et cycle de spiralisation des chromosomes chez *Kolomastigotoides psammotermittidis*. Annales de Science Naturelle et Zoologie, sér 12, 5:749-792.

Grell K (1959) Untersuchungen über die Fortpflanzung und Sexualität der Foraminiferen. IV. *Patellina corrugata*. Archives der

Protistenkaryologie 104:211-235.

Gromov D (1985) Ultrastructure of mitosis in *Amoeba proteus*.  
Protoplasma 126:130-139

Hawes, R. (1963) On *Rosculus ithacus* gen n. sp. n. (Protozoa, Amoebina), with special reference to its mitosis and phylogenetic relations. Journal of Morphology 113:139-147.

Hepler P, McIntosh R, Cleland S (1970) Intermicrotubule tubule bridges in mitotic spindle apparatus. Journal of Cell Biology 45:438-444.

Hollande A (1972) Le déroulement de la cryptomitose et de las modalités de la ségrégation des chromatides dans quelques groupes de Protozoaires. Année de Biologie 11:427-466.

Karadhazan B, Raikov I (1977) Ultrastructure of the micronucleus of *Didinium nasutum* (Ciliophora, Gymnostata) during meiosis. Tsitologiya (Leningrad) 19:1327-1332.

Keene W, Petitt M, Allen S, McKerrow J (1986) The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. Journal of Experimental Medicine 163:536-549.

Keller F, Walter C, Lohden U, Hanke W, Bakker-Grunwald T, Trissl D (1988) Pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba*: pore formation and hemolytic activity. Journal of Protozoology 35:359-365.

Kofoed Ch., Swezy O. (1925) On the number of chromosomes and the type of mitosis in *Entamoeba dysenteriae*. University of California Publications of Zoology 26:331-352.

King S, Hyams J, Luba A (1982) Absence of microtubule sliding and an analysis of spindle formation and elongation in isolated spindles from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Cell Biology 94:341-349.

Kingwell B, Rattner J (1987) Mammalian kinetochore/centromere composition: A 50 kDa antigen is present in the mammalian kinetochore/centromere. Chromosoma 95:403-407.

Krieger M, Kingsley D, Sege R, Hobbie L, Kozarsky K (1985) Genetic analysis of receptor-mediated endocytosis. Trends in Biochemical Sciences Nov :447-452.

Le Calvez J (1938) Recherches sur les Foraminifères. I. Développement et Reproduction. Archives de Zoologie Expérimental Général 80:163-333.

Levine y cols. (1980) A newly revised Classification of the Protozoa. Journal of Protozoology 27(1):37-58.

Lushbaugh W, Kairalla A, Cantey J, Hofbauer A, Pittman F (1979) Isolation of a cytotoxin-enterotoxin from *Entamoeba histolytica*. Journal of Infectious Diseases 139:9-17.

Lynch E, Rosenberg I, Gitler C. (1982) An ion-channel forming protein produced by *Entamoeba histolytica*. European Molecular Biology Organization Journal 1:801-804.

Martinez-Palomo A (1982) Biology of *Entamoeba histolytica*. Academic Press, Chichester, p 53.

Martinez-Palomo A. (1987) The Pathogenesis of Amoebiasis. Parasitology Today 3(4):111-118.

Mattern C, Keister D, Natovitz P (1980) *Entamoeba histolytica* "toxin": fetuin neutralizable and lectin-like. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 29:26-30.

McIntosh J, McDonald K (1989) The Mitotic spindle. Scientific American 26,4:26-34.

McIntosh J, Koonce M (1989) Mitosis. Nature 246:622-628.

Meza I, Cazares F, Rosales-Encina J, Talamas Rohana P, Rojkind M (1987) Use of antibodies to characterize a 220-kilodalton surface protein from *Entamoeba histolytica*. Journal of Infectious Disease 156:798-805.

Mirelman D, Bracha R, Chayen A, Aust Kettis A, Diamond L (1986) *Entamoeba histolytica*: Effect of growth conditions and bacterial associates on isoenzyme patterns and virulence. Experimental Parasitology 62:142-148.

Muñoz M, Rojkind M, Calderon J, Tanimoto M, Arias-Negrete S, Martinez-Palomo A (1986) *Entamoeba histolytica*: collagenolytic activity and virulence. Journal of Protozoology 31:468-470.

Novikoff A, Novikoff P, David C, Quintana N (1972) Studies on microperoxisomes II. A cytochemical method for light and electron microscopy. Journal of Histochemistry 20, 12:1006-1023.

Orozco E, Guarneros G, Martinez-Palomo A, Sanchez T (1983) *Entamoeba histolytica*: phagocytosis as a virulence factor. Journal of Experimental Medicine 158:1511-1521.

Orozco E, Solis F, Dominguez J, Chavez B, Hernandez F (1988) *Entamoeba histolytica*: cell cycle and nuclear division. Experimental Parasitology 67:85-95.

Page F (1967) Taxonomic criteria for limax amoeba, with descriptions of 3 new species of *Karmanella* and 3 of *Vahlkampfia*. Journal of Protozoology 14:499-521.

Pérez-Montfort R, Ostoa-Saloma P, Velázquez-Medina L, Montfort I y Becker I (1987) Catalytic classes of proteinases of *Entamoeba histolytica*. Molecular and Biochemical Parasitology 26:87-98.

Petri W, Smith R, Schlesinger P, Ravdin J (1987) Isolation of the Galactose-binding lectin which mediates the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica*. Journal of Clinical Investigation 80:1238-1244.

Peterson S, Berns M (1980) The centriolar complex. The International Review of Cytology 64:81-106.

Pickett-Heaps J (1969) The evolution of mitotic apparatus: an attempt at comparative ultrastructural cytology in dividing plant cells. Cytobios 1:257-280.

Porter D (1972) Cell division in the marine slime mold *Labyrinthula* sp., and the role of the bothrosome in extracellular membrane production. Protoplasma 74:427-448.

Russard M (1973) Modalités de la division nucléaire et taxonomie chez les amibes (Amoebea, Protozoa). Revision des notions de promitose, mésomitose et métamitose. Protistologica 9:163-173.

Raikov I (1982) The protozoan nucleus. Morphology and evolution. Springer, Wien (Cell Biology monographs Vol 9).

Ravdin J, Murphy C, Salata R, Guerrant R, Hewlett E (1985) The N-acetyl-D-Galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. I. Partial purification and relation to amebic virulence in vitro. Journal of Infectious Diseases 151:804-815.

Ravdin J, Petri W, Murphy C, Smith R (1986) Production of mouse monoclonal antibodies which inhibit in vitro adherence of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Infection and Immunity 53:1-5.

Reed S, Sargeant P, Braude A (1983) Resistance to lysis by human serum of pathogenic *Entamoeba histolytica*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 77:248-250.

Reynolds E (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. Journal of Cell Biology 17:208-212.

Rodriguez M, Drozco E (1986) Isolation and characterization of phagocytosis- and virulence-deficient mutants of *Entamoeba histolytica*. Journal of Infectious Diseases 154:27-32.

Rodriguez M, Hernandez F, Santos L, Valdez A, Drozco E (1989) *Entamoeba histolytica*: molecules involved in the target cell-parasite relationship. Molecular and Biochemical Parasitology 37:87-100.

Roos U (1973) Light and electron microscopy of rat kangaroo cells in mitosis. I. Formation and breakdown of the mitotic apparatus. Chromosoma 41:195-220.

Roos U, Camenzind R (1981) Spindle dynamics during mitosis in *dyclostelium discoideum*. European Journal of Cell Biology 25:248-251.

Rosales-Encina J, Meza I, Lopez-De Leon A, Talamas-Rohana P, Rojkind M (1987) Isolation of a 220-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. Journal of Infectious Diseases 156:790-797.

Russell D, Burns R (1984) The polar ring of coccidian sporozoites: A unique microtubule-organizing centre. *Journal of Cell Science* 65:193-207.

Saito M (1961) Studies in the mitosis of *Euglena*. I. On the chromosome cycle of *Euglena viridis* EHRBG. *Journal of Protozoology* 8:300-307.

Salazar P., De Haro I (1987) Manual de Técnicas para el diagnóstico morfológico de las parasitosis. Editor Méndez-Cervantes, pag. 11.

Sargeant P, Williams J, Bhojnani J, Kumate J, Jimenez E (1982) A review of isoenzyme characterization of *Entamoeba histolytica* with particular reference to pathogenic and non-pathogenic stocks isolated in Mexico. *Archivos de Investigación Médica (México)* 13 (supl 1):89-94.

Sawyer T, Griffin J (1971) *Acanthamoeba comandoni* and *A. astronyxis*: taxonomic characteristics of mitotic nuclei, centrosome and cysts. *Journal of Protozoology* 18:382-388.

Schuster F (1975) Ultrastructure of mitosis in the amoeboflagellate *Naegleria gruberi*. *Cell and Tissue Research* 7:1-12.

Schwartz D, Cantor C (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37:67-75.

Solis F, Chavez B, Orozco E (1986) Fases de la división nuclear en *Entamoeba histolytica*. Archivos de Investigación Médica 17(1) : :95-100.

Solis F, Barrios R. (1989) Las vesículas intranucleares de *Entamoeba histolytica*. Revista de la Facultad de Medicina 32, 5:194-195.

Talamas-Rohana P, Meza I (1987) Interaction between pathogenic Amebas and Fibronectin: Substrate degradation and changes in cytoskeleton organization. The Journal of Cell Biology 106:1787-1794.

Tannich E, Horatman RD, Knobloch J y Arnold HH (1989) Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 86:5118-5120.

Tanimoto M, Sepúlveda B, Vázquez-Saavedra J, Landa L (1971) Lesiones producidas en el hígado del hámster por inoculación de *Entamoeba histolytica* cultivada en medio axénico. Archivos de Investigación Médica (México) 2 (supl 1):275-294.

Trissl D, Martinez-Palomo A, De la Torre M, de la Hoz R, Perez de Suarez E (1978) Surface properties of *Entamoeba histolytica*: increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. Journal of Experimental Medicine 148:1137-1145.

Uribe, C. (1926) Nuclear division in the trophozoites of *Entamoeba histolytica*. Proceedings of the National Academy of

Sciences 12:305-311.

Valdes J, Hernández F, Ocadiz R, Orozco E (1990) Molecular karyotype of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, in press.

Vickerman K, Preston T (1970) Spindle microtubules in the dividing nuclei of trypanosomes. Journal of Cell Science 6:365-383.

Walsh J (1986) Problems in the recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Reviews of Infectious Diseases 8:228-238.

Young J, Young T, Lu L, Unkeless, Cohn Z (1982) Characterization of a membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica*. Journal of Experimental Medicine 156:1677-1690.

Young J, Cohn Z (1986) Cell-mediated killing: a common mechanism. Cell 46:641-642.

al Zaman V (1973) The intranuclear bodies of *Entamoeba*. International Journal of Parasitology 3:243-251.



Figura 1. MTOC desorganizado. El MTOC estaba en el centro del núcleo. Muchos microtúbulos están anclados al MTOC. Algunos microtúbulos están unidos unos a otros (flechas) o con cuerpos amorfos (puntas de flecha). Barra= 1  $\mu$ m.

Figura 2. Corte transversal del MTOC. Muchos microtúbulos parecen estar anclados al MTOC, disponiéndose en una forma radial. El material alrededor del MTOC es cromatinico. Barra= 1  $\mu$ m.

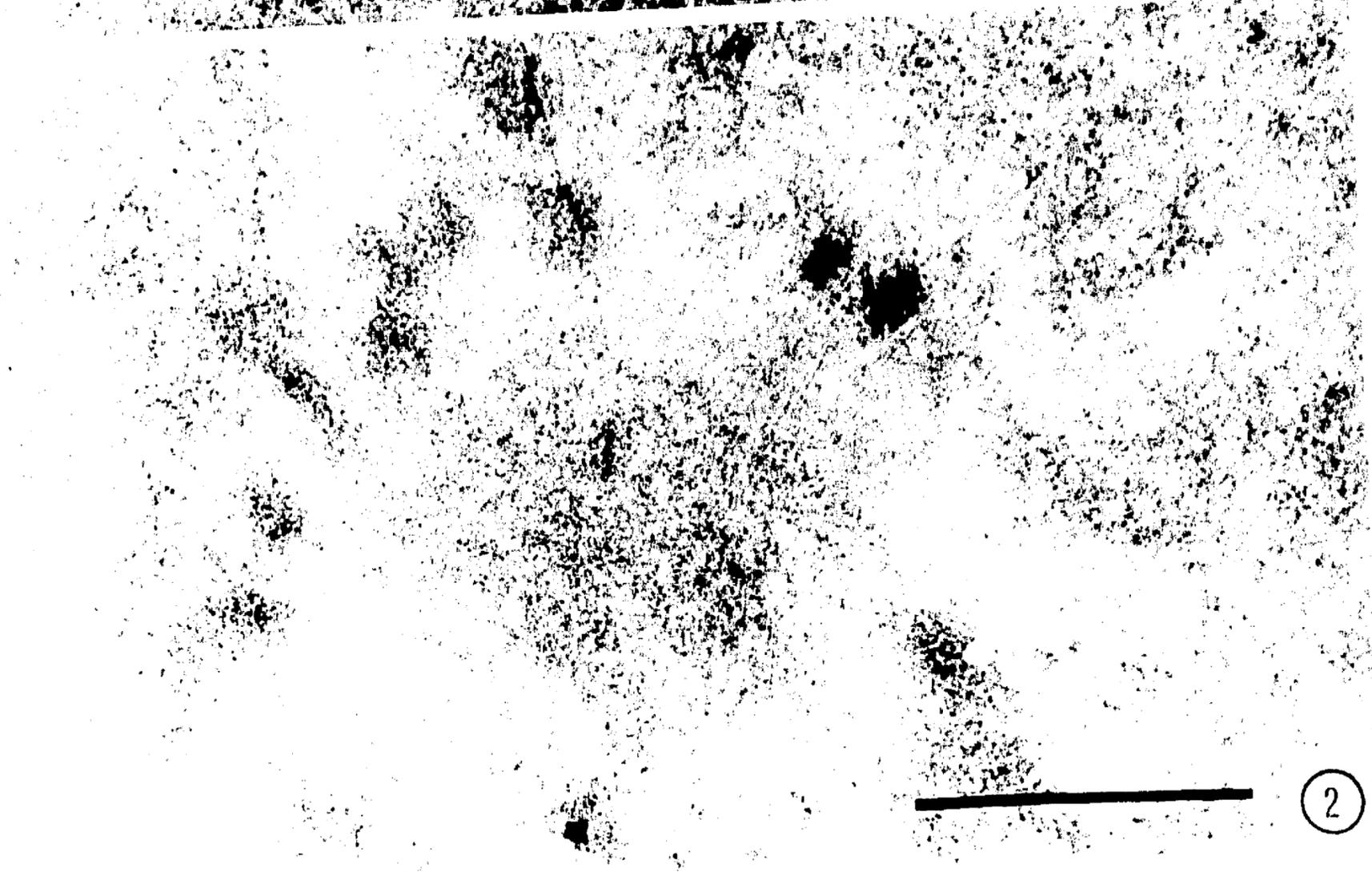
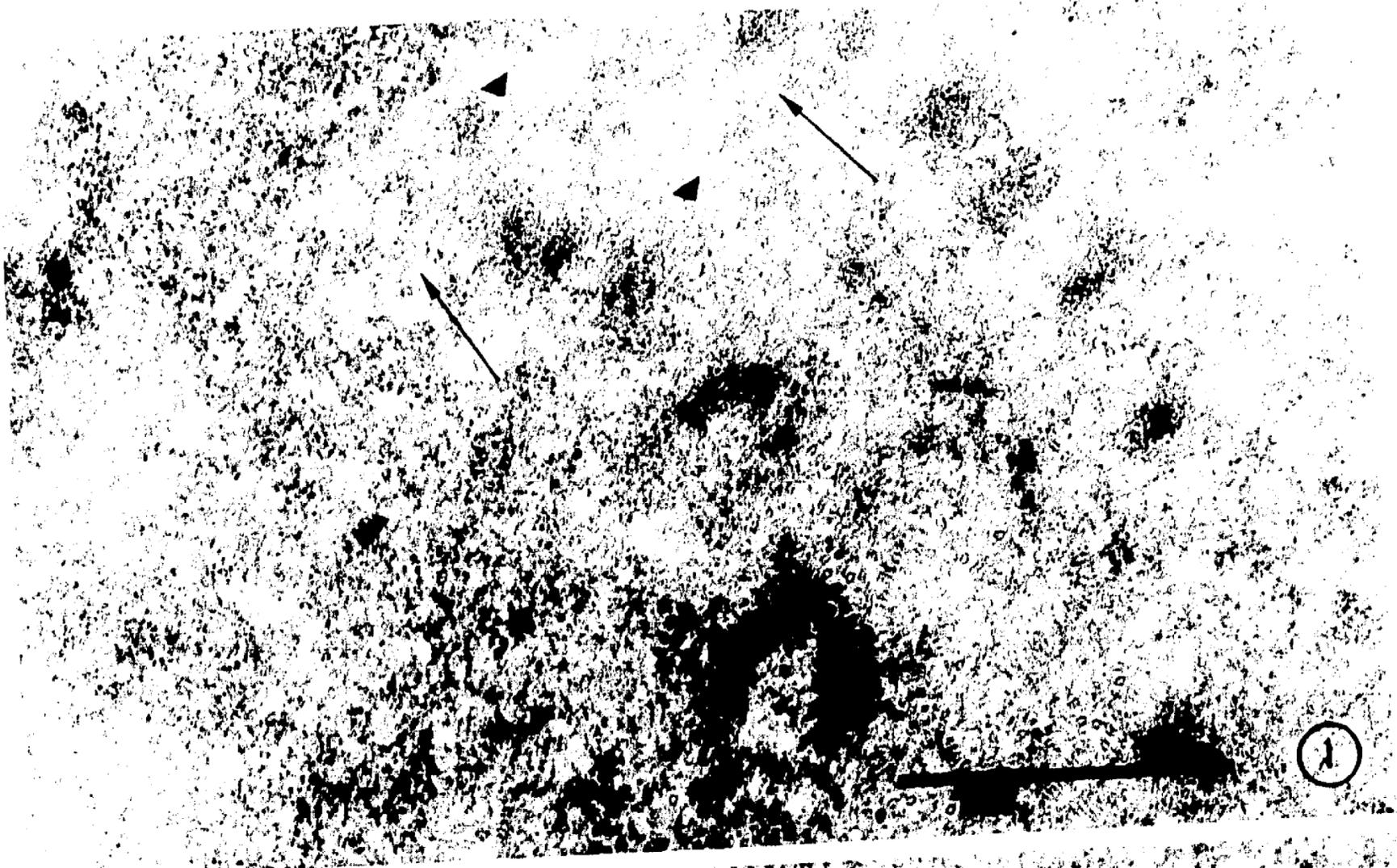
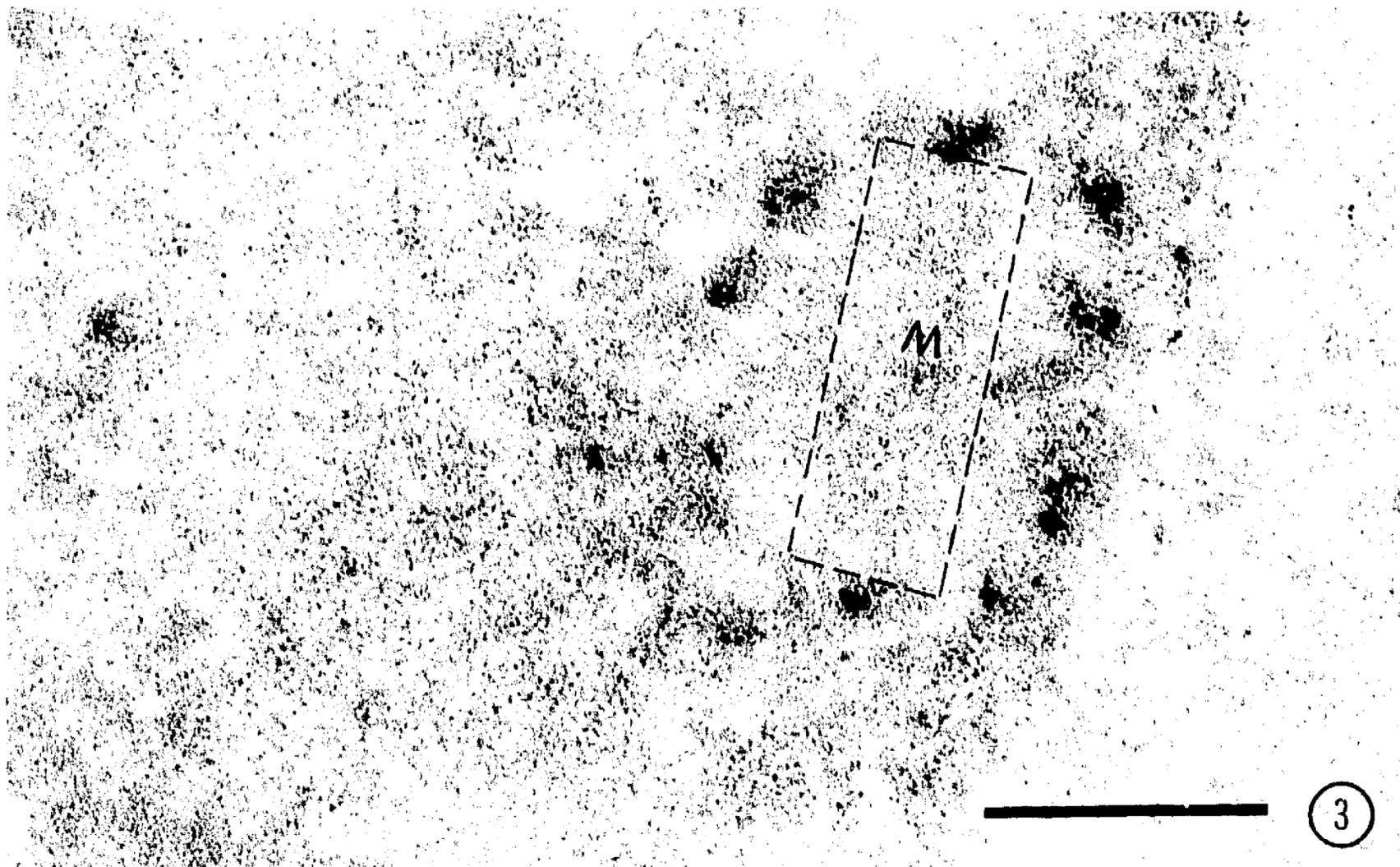
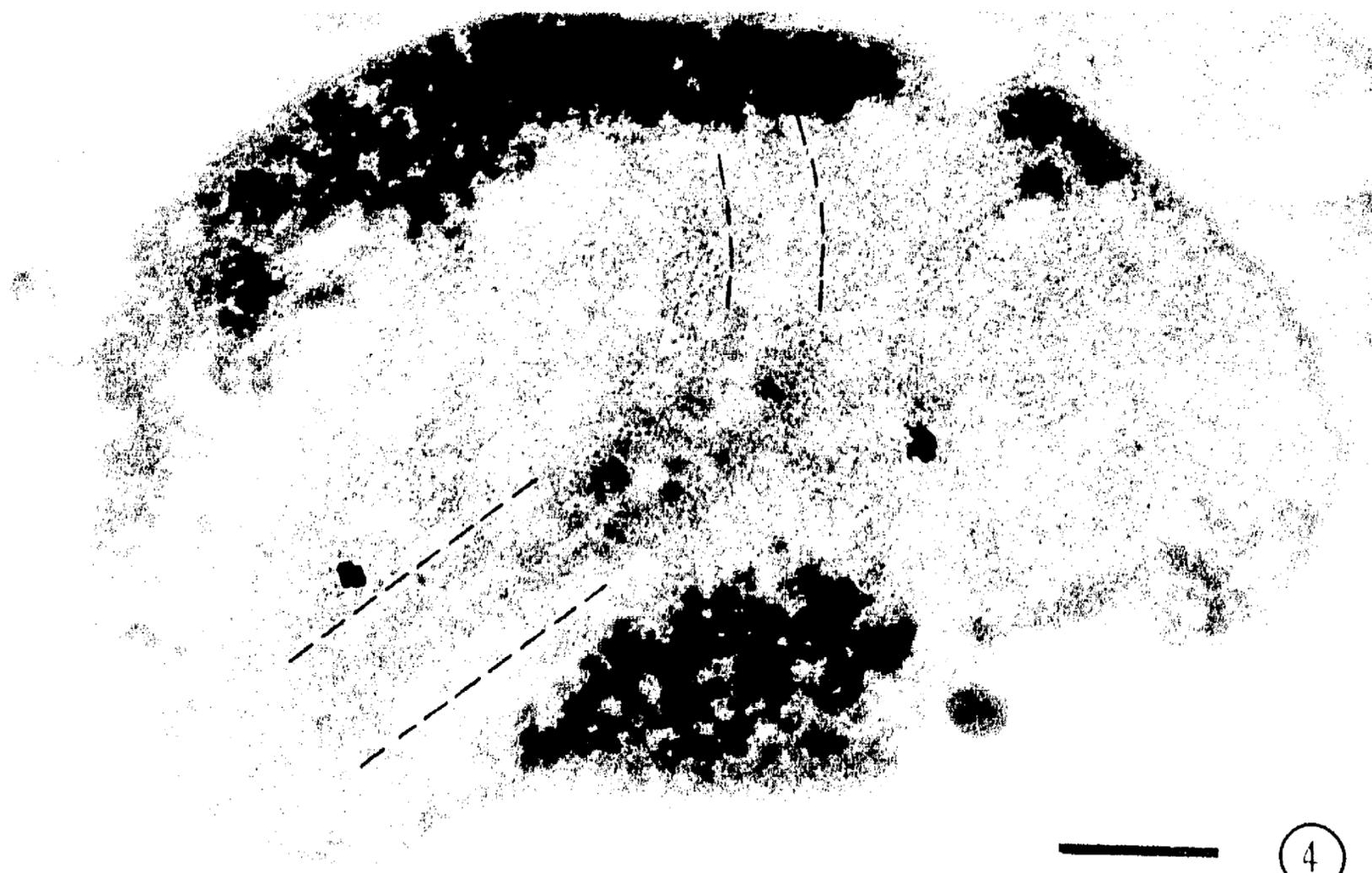


Figura 3. MTOC organizado. Los microtúbulos parecen originarse a partir del cuerpo cilíndrico (recuadro, M), que se encuentra rodeado de material cromatínico. Barra= 0.5  $\mu\text{m}$ .

Figura 4. Surco de división en células contrastadas con ácido fosfotúngstico. Un surco (líneas discontinuas) estaba presente en muchos trofozoítos. Barra= 1  $\mu\text{m}$ .



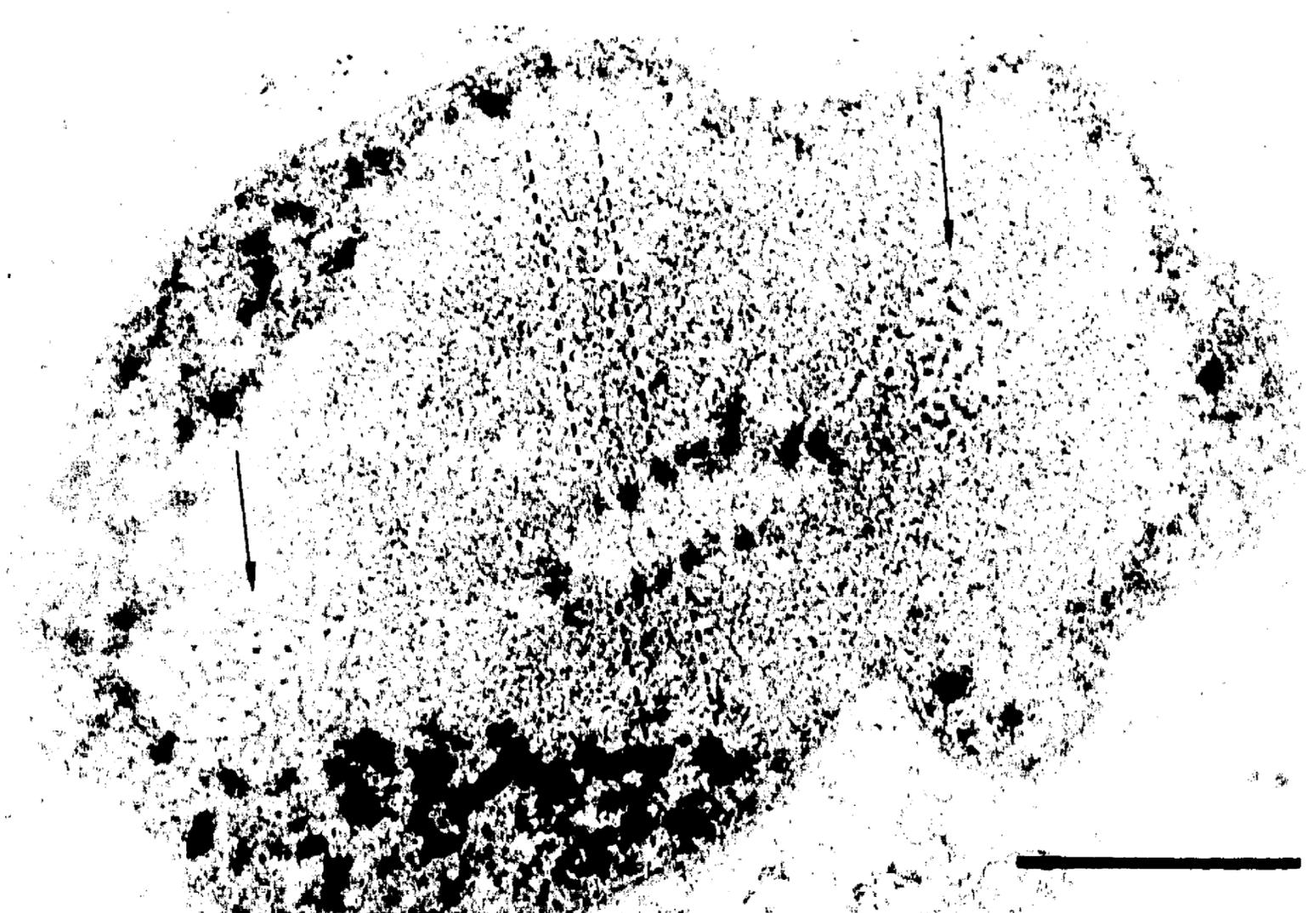
3



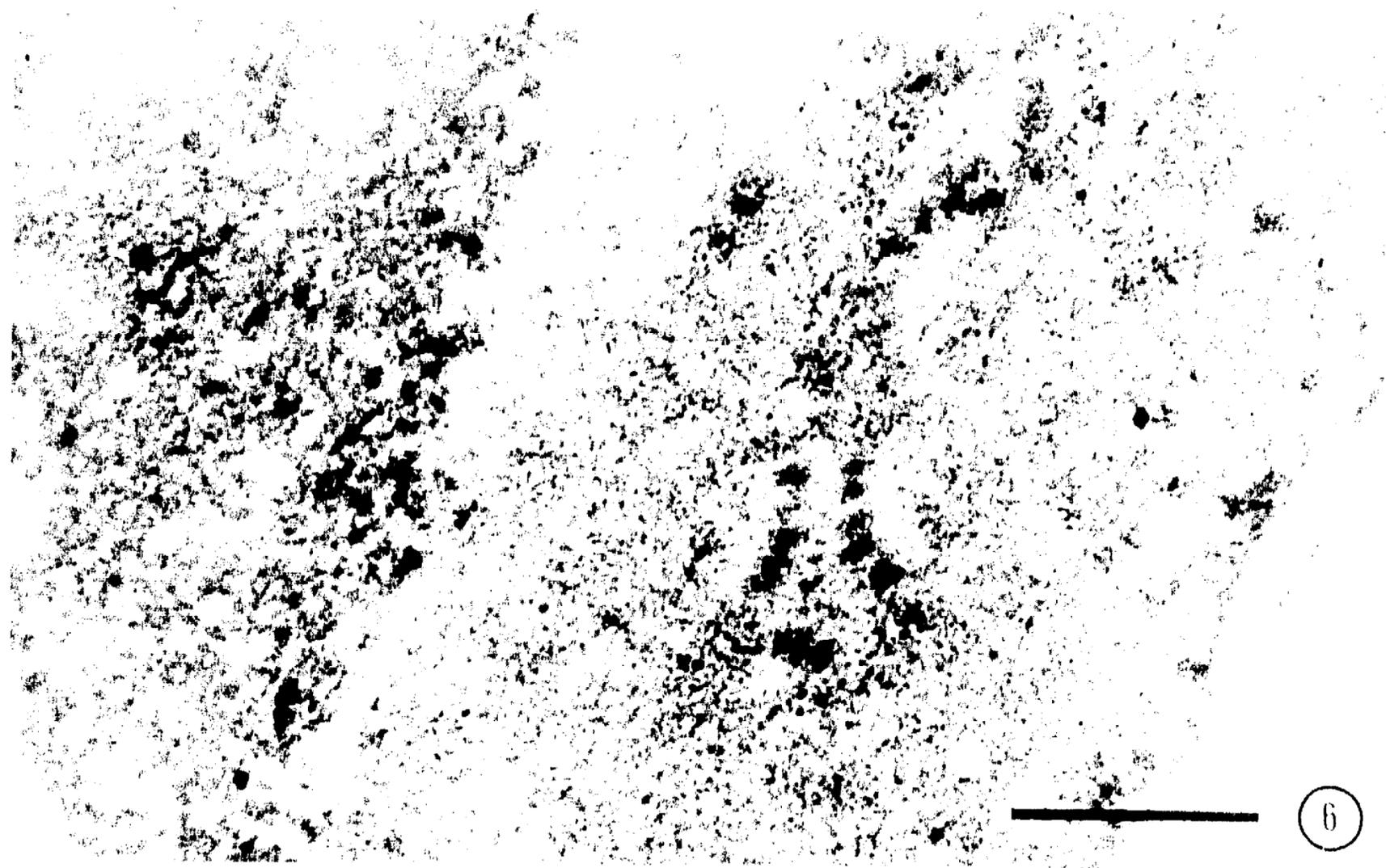
4

Figura 5. Cuerpos filamentosos en los núcleos amibianos. Algunas células contrastadas con ácido fosfotúngstico presentaban núcleos con cuerpos filamentosos (flechas). Un surco aparente (líneas discontinuas) divide al núcleo y al MTOC en dos partes desiguales. Barra=1  $\mu\text{m}$ .

Figura 6. MTOC alargado. El MTOC se observa alargado, con dos partes desiguales, las cuales, aparentemente, están unidas en su porción media. Barra= 1  $\mu\text{m}$ .

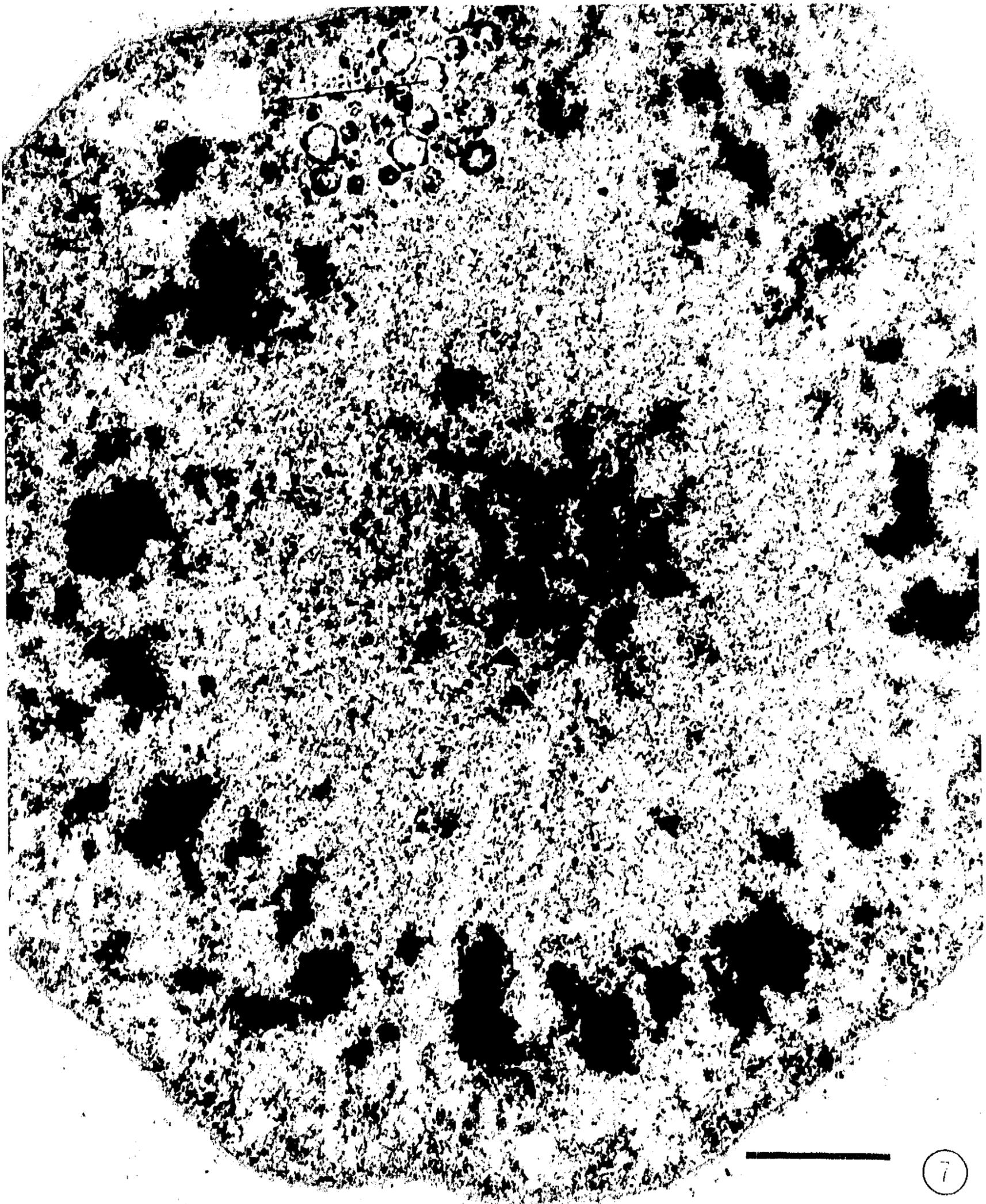


5



6

Figura 7. Placa prometafásica de *X. histolytica*. El MTOC (M) es electrodensso, rodeado por material cromatínico. Algunos microtúbulos están cortados transversalmente (puntas de flecha). Se pueden observar dos tipos diferentes de vesículas intranucleares, algunas de ellas con membrana sencilla (flecha). Barra= 1  $\mu\text{m}$ .



ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Figura 8. Reorganización microtubular en el núcleo amibiano. Un cúmulo de microtúbulos semeja un huso mitótico (asterisco). Los MTs (puntas de flecha) parecieron diverger partiendo de una zona común (flechas discontinuas). Un microtúbulo está cercano a la membrana nuclear (flecha). Los microtúbulos estaban unidos entre sí por sus extremos (Círculo). Barra= 1  $\mu$ m.

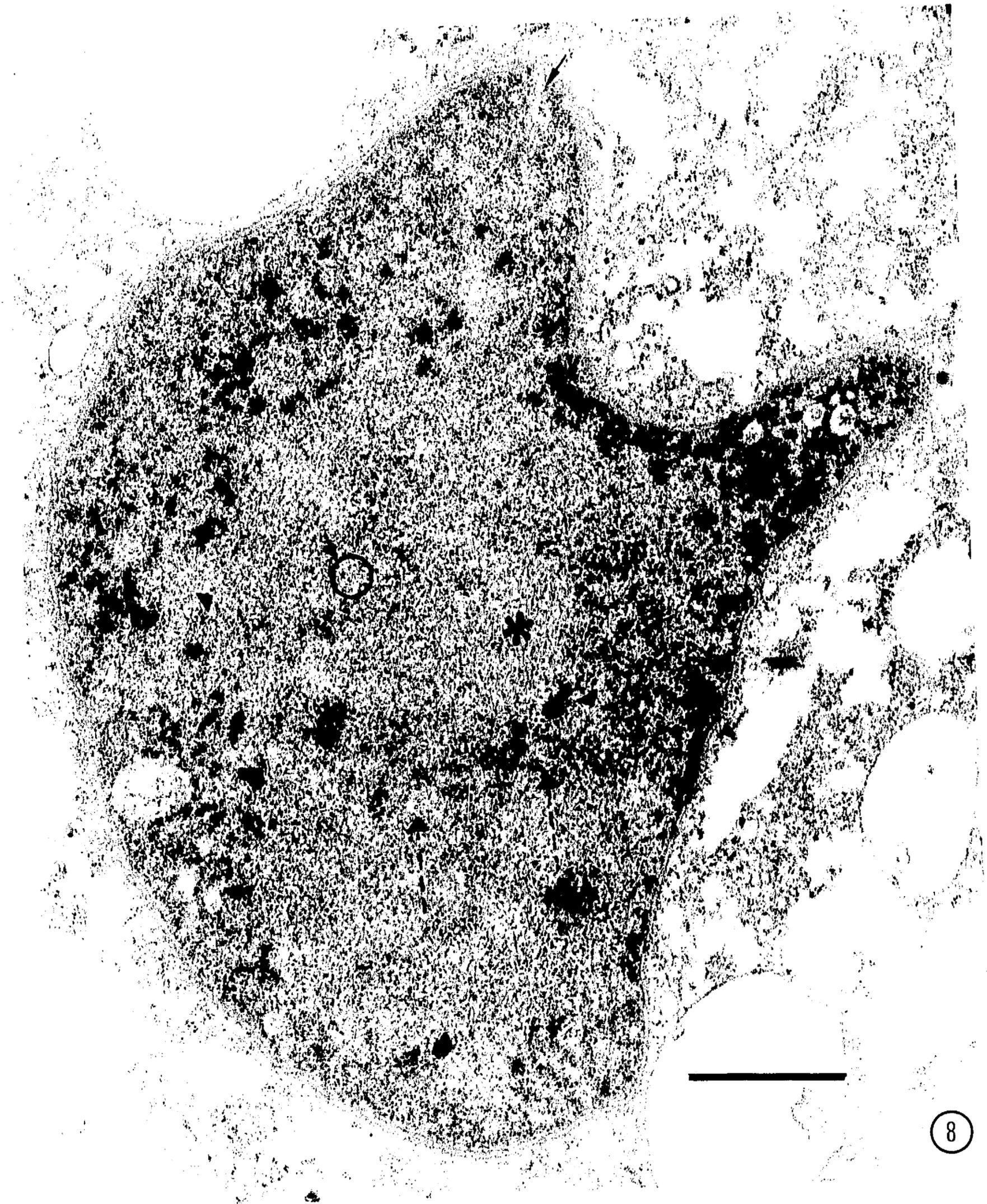


Figura 9. Núcleo amibiano en anafase A. El núcleo mostraba un huso mitótico (S) en formación. Hay algunas vesículas intranucleares agrupadas (V), dos de ellas con superficie regular (flecha). Los MTs parecen empezar del mismo sitio (M). Barra= 1  $\mu$ m.

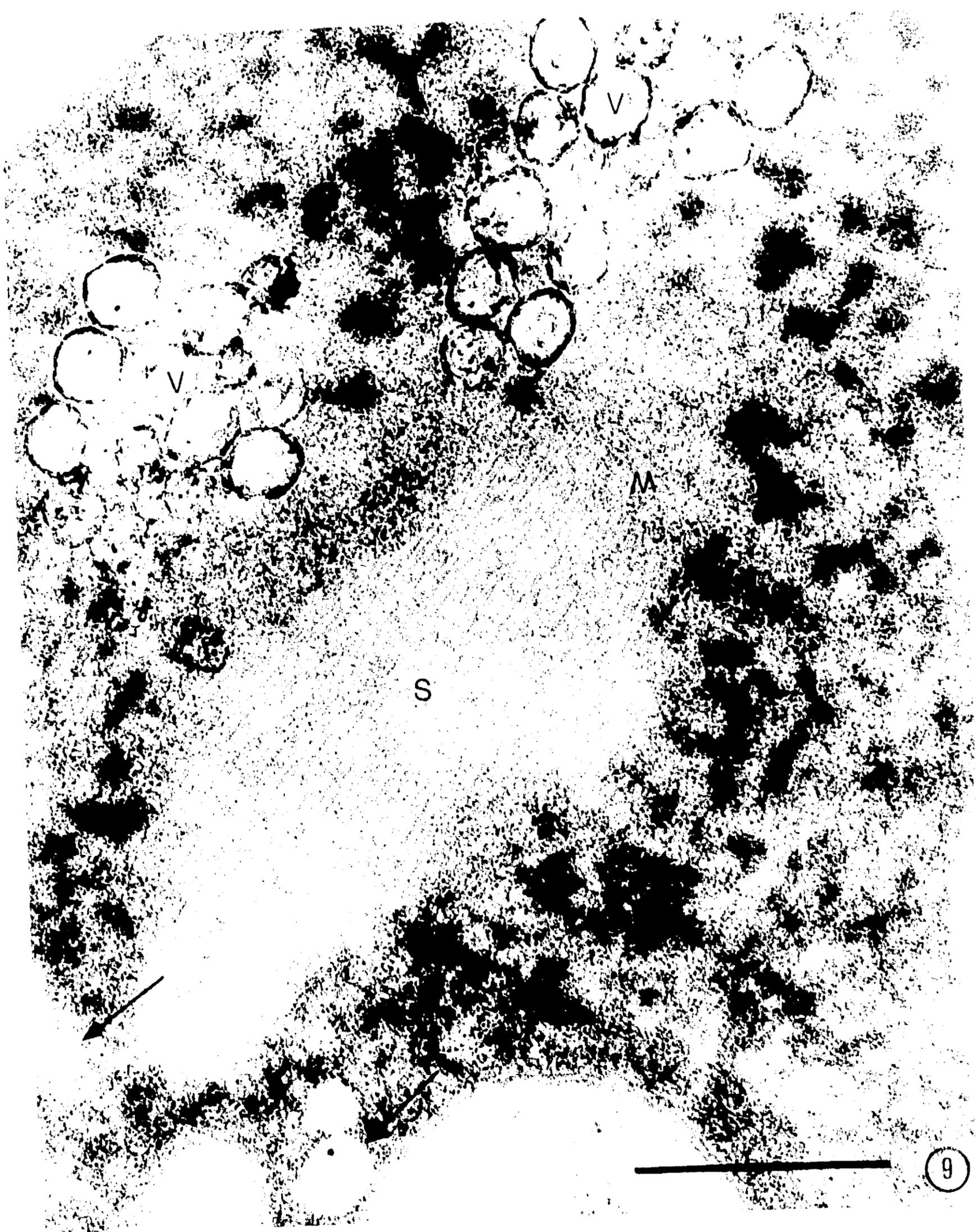


Figura 10 A) Núcleo de *S. histolytica* en anafase B. El núcleo alargado presenta Mts unidos (recuadro). El crecimiento nuclear podría estar localizado en la porción puntiaguda del núcleo. Dos grupos de vesículas intranucleares diferentes pueden ser observadas. Un grupo de ellas tiene una membrana sencilla (flecha). Barra= 2  $\mu\text{m}$ . B) Corte transversal del núcleo amibiano en división. El corte transversal del núcleo de *S. histolytica* en división muestra un huso mitótico angosto, con Mts unidos por puentes electrodensos (recuadro, flechas). Barra= 1  $\mu\text{m}$ .

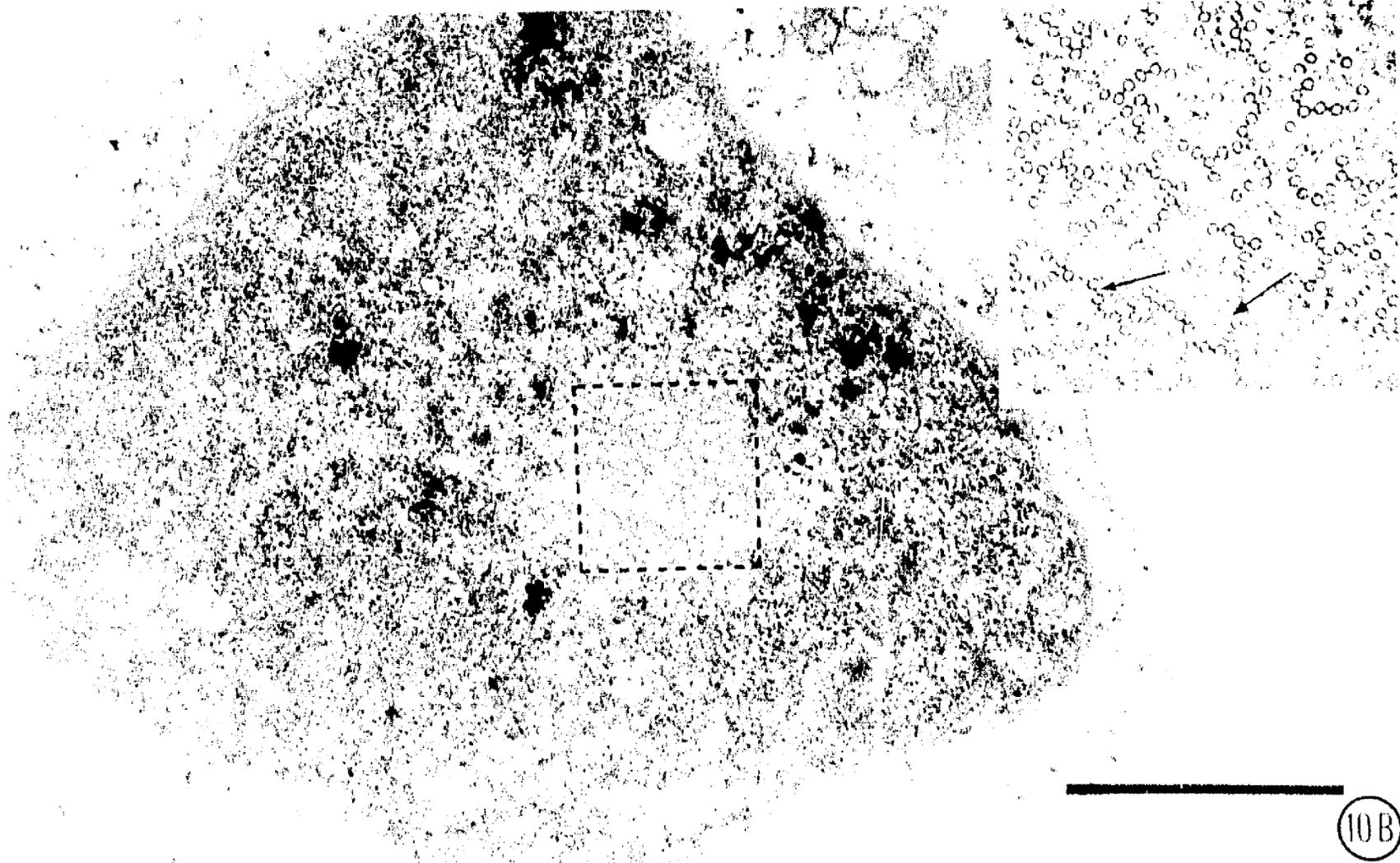
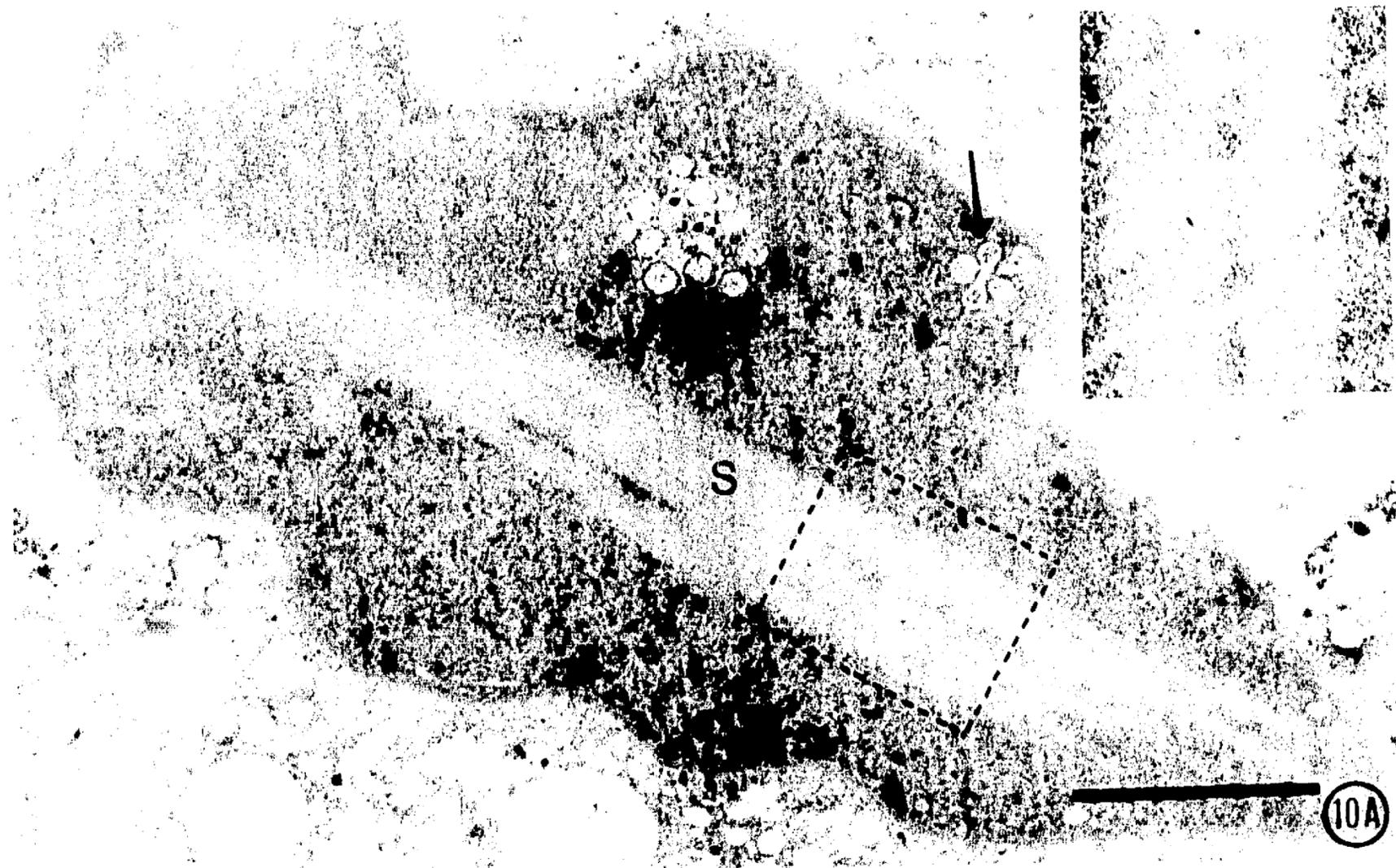


Figura 11. Núcleo amibiano telofásico. Los Mts del huso mitótico fueron seccionados por la formación del núcleo hijo. Aún existe unión entre los núcleos hijos (flecha). Las puntas de flecha señalan material cromatinico en uno de los núcleos. Barra= 1  $\mu$ m.



Figura 12. Trofozoítos teñidos específicamente para DNA. A) Cortes semifinos teñidos con azul de toluidina. Algunos cuerpos esféricos pueden ser observados en los núcleos (flechas). B) Núcleos amibianos tratados con anticuerpos dirigidos contra DNA de doble cadena y revelados con Proteína A-peroxidasa más diaminobencidina (PAP). Cuatro cuerpos esféricos o alargados están señalados por las flechas. C) Existen varios cuerpos en el interior de la membrana nuclear. D) Núcleo amibiano prometafásico teñido con Hoechst 33258. E) Núcleo amibiano anafásico. Se observa un cuerpo esférico en uno de los núcleos hijos (flecha). F) Núcleo amibiano telofásico teñido con Hoechst 33258. G) Autorradiograma del núcleo amibiano prometafásico. El DNA se reparte en, cuando menos, tres partes.

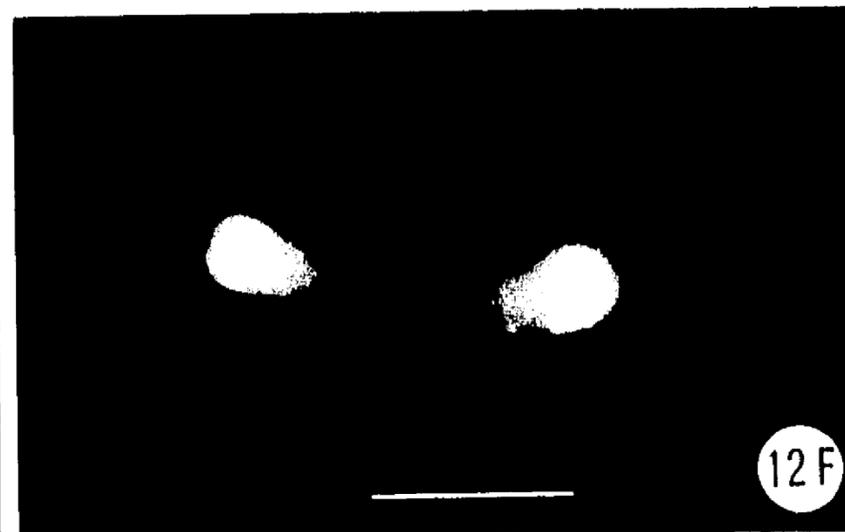
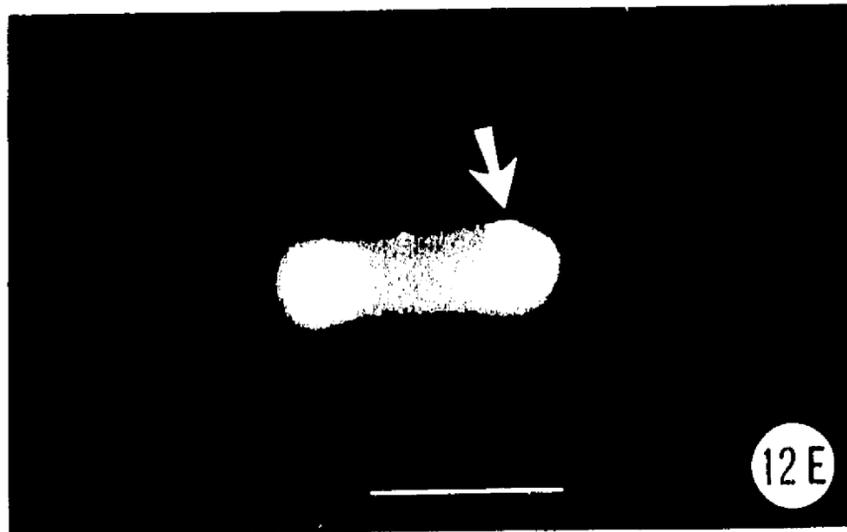
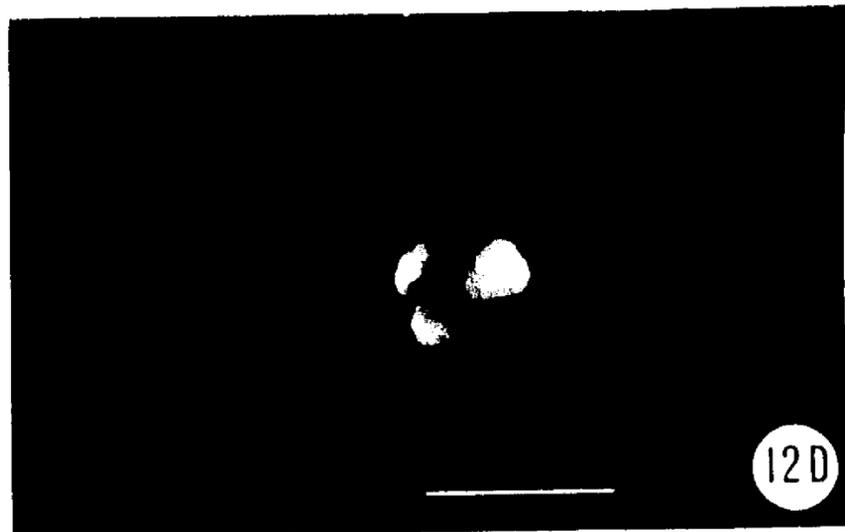
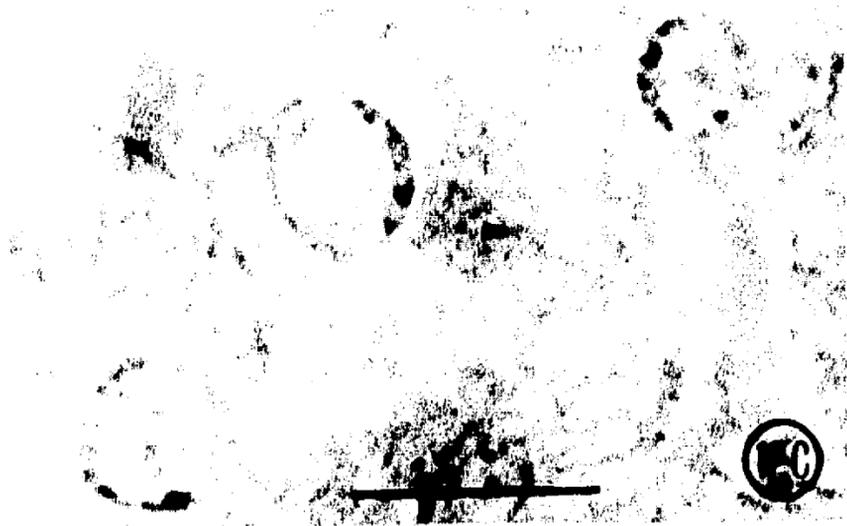
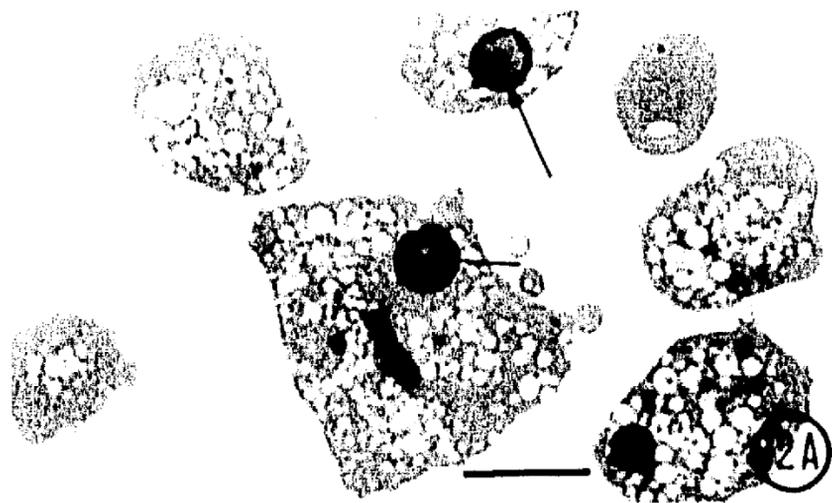


Figura 13. Trofozoítos teñidos específicamente para el DNA. A) Núcleos amibianos lisados y teñidos con Hoechst 33258. Se observan cuatro cuerpos esféricos cercanos a un núcleo. B) Observación de un plano diferente del núcleo mostrado en A. Se observa un cuerpo adicional (flecha). C) Trofozoítos amibianos teñidos con naranja de acridina. Los cuerpos eran amarillentos y el fondo era de color rojo (no marcado).

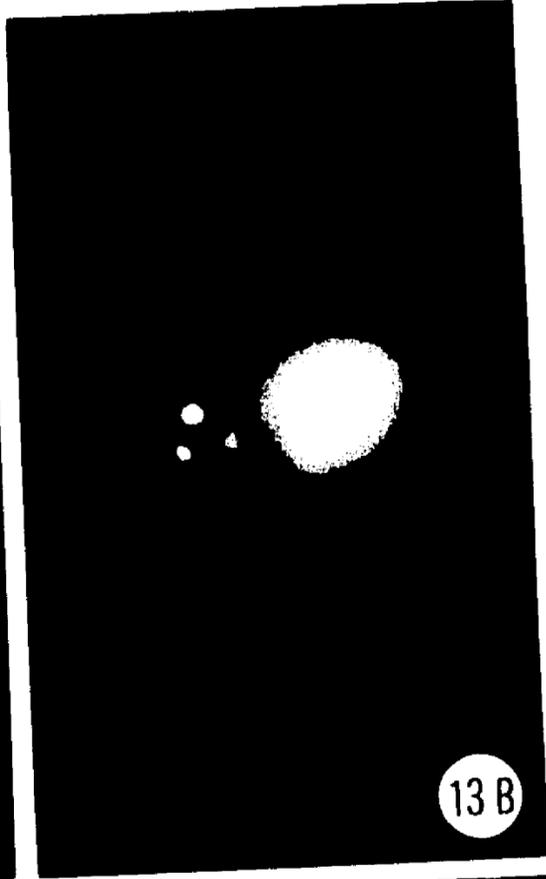
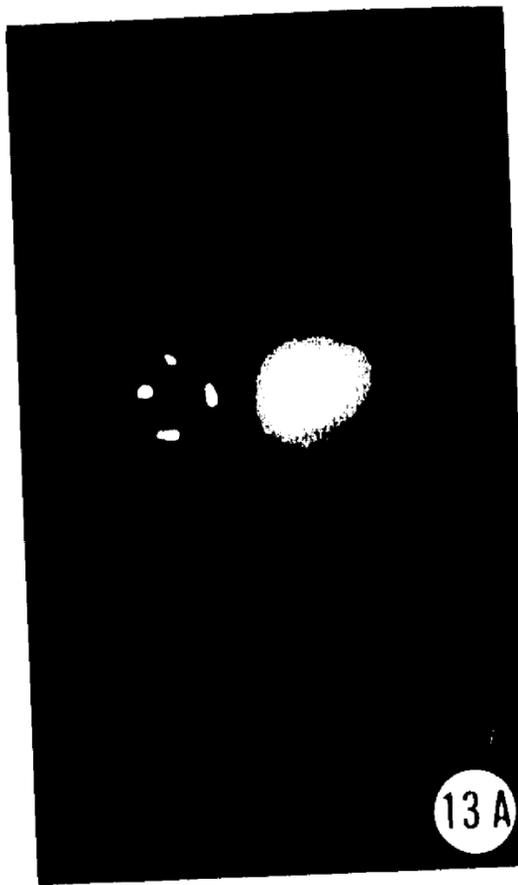
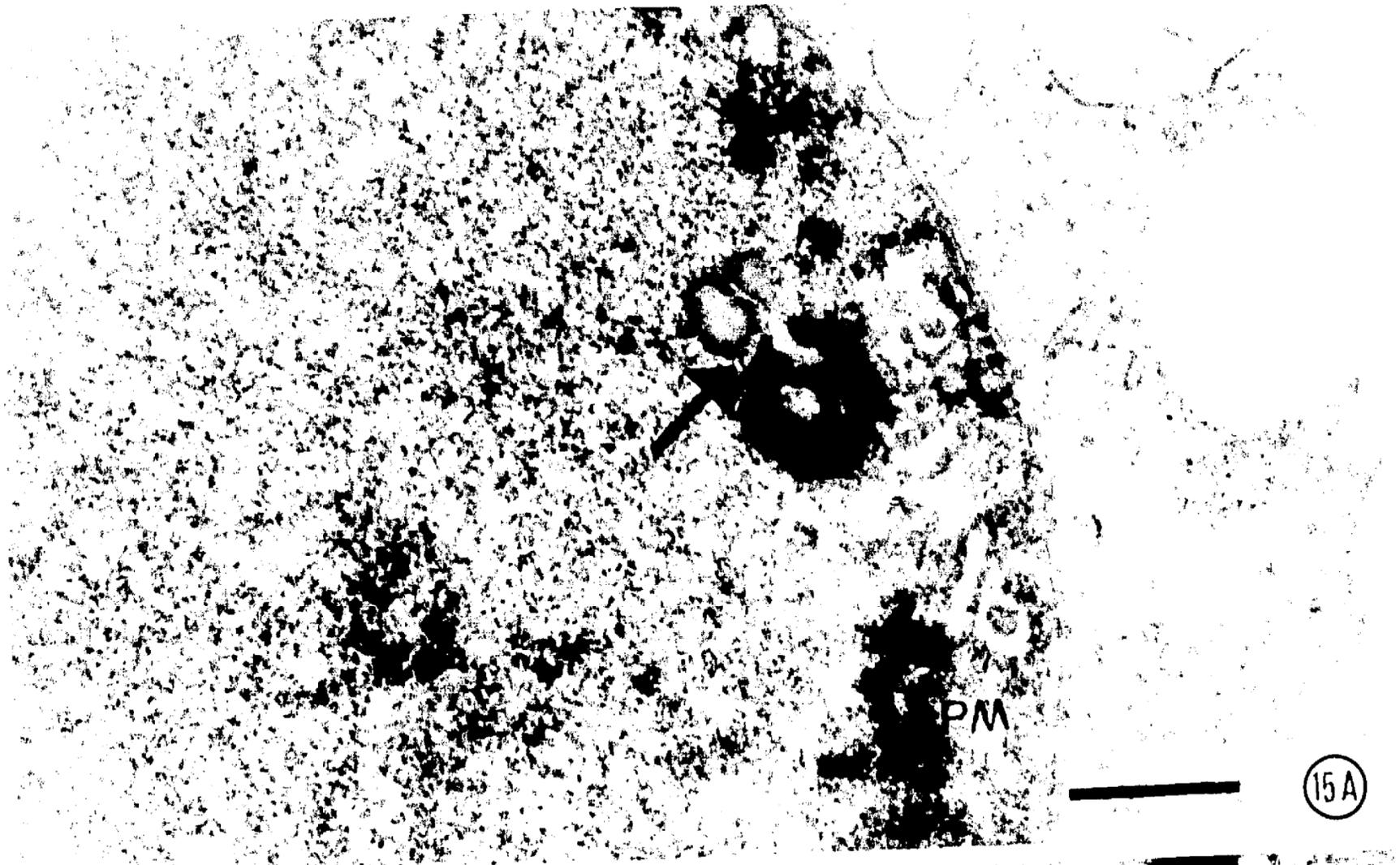
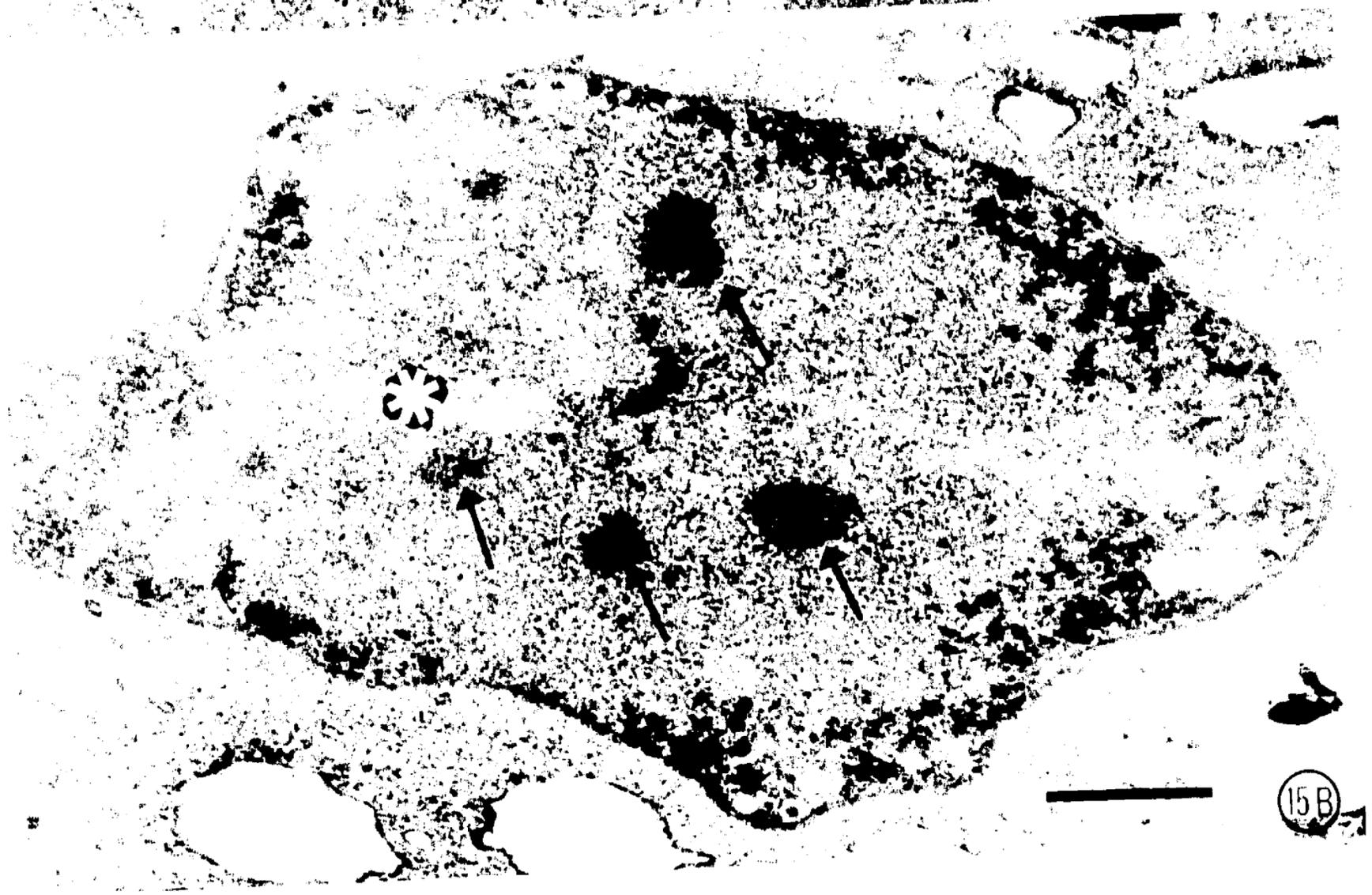


Figura 15. Núcleos amibianos contrastados con ácido fosfotúngstico (PTA). A) Dos porciones electrodensas de los cuerpos contrastados se encuentran cercanas una a la otra, y probablemente unidas a otras porciones menos electrodensas por medio de microfibrillas (flecha). Hay microtúbulos cortos y otros cortados transversalmente, en el centro del núcleo (puntas de flecha). PM, material periférico. Barra= 1  $\mu$ m. B) El núcleo amibiano está en división. Se observaron algunos cuerpos, aparentemente esféricos, contrastados por el PTA (flechas). Existen Mfs cercanos al centro del núcleo (entre los asteriscos). Barra= 1  $\mu$ m.



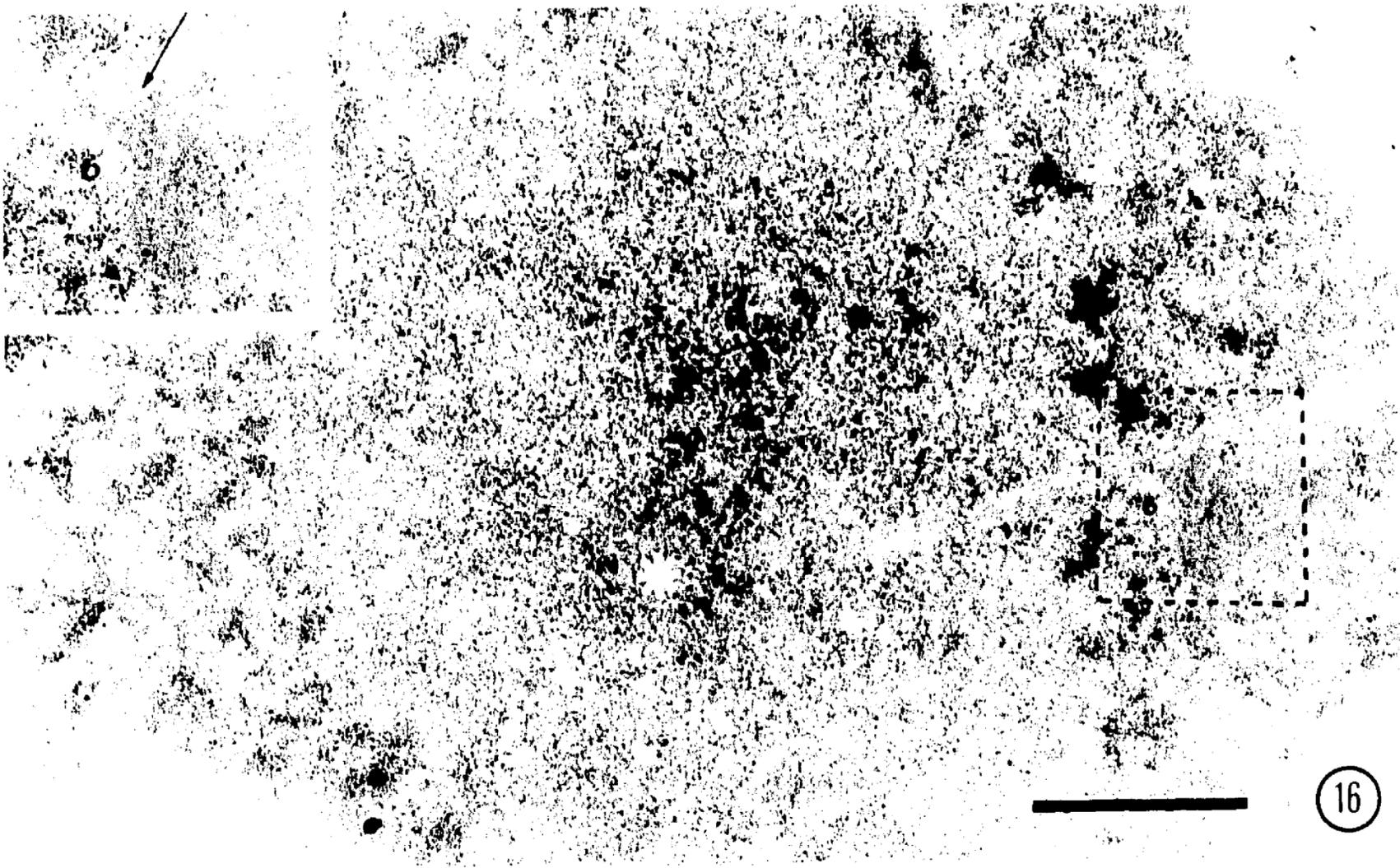
15A



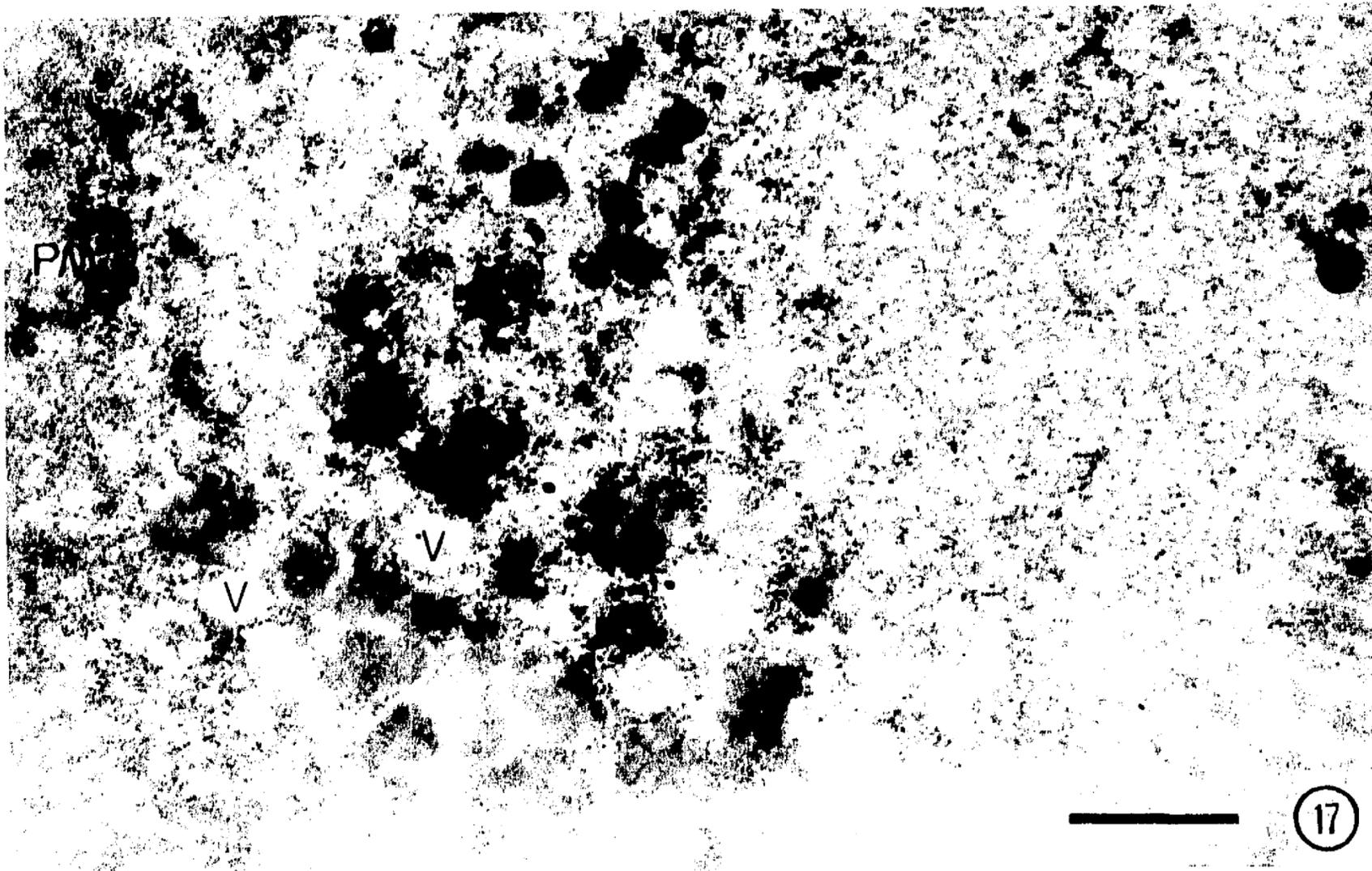
15B

Figura 16. El cinetócoro amibiano. Un cuerpo electrodensó está unido a un microtúbulo a través de 3 puntos. La porción central de unión es trilaminar (recuadro, flecha). El MTOC está en el centro del núcleo (asterisco). Barra= 1  $\mu$ m.

Figura 17. Posible sitio de condensación de cromosomas. La condensación de los cromosomas amibianos podría tener lugar en el interior de la membrana nuclear, cerca del material periférico (PM). Una gran cantidad de vesículas intranucleares (V) se encuentran dispersas entre las condensaciones ( $\sphericalangle$  cromosomas?). Barra= 1  $\mu$ m.

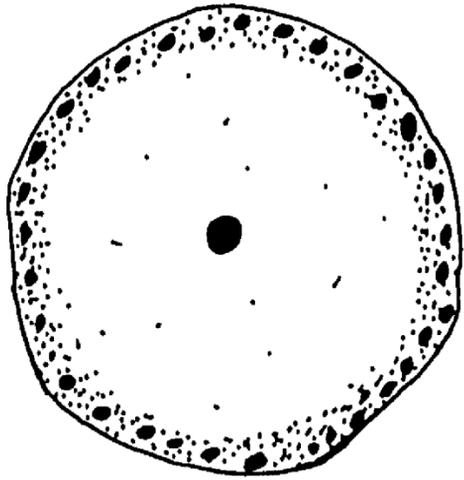


16

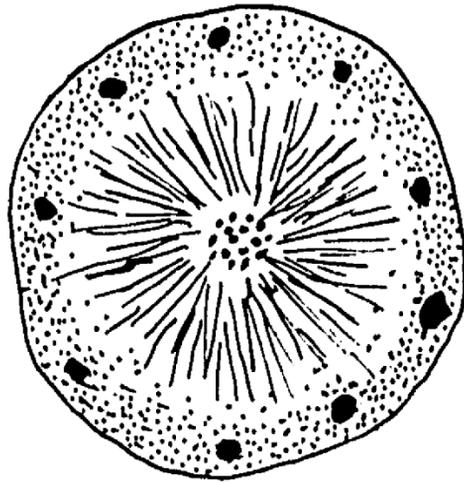
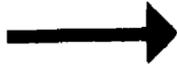


17

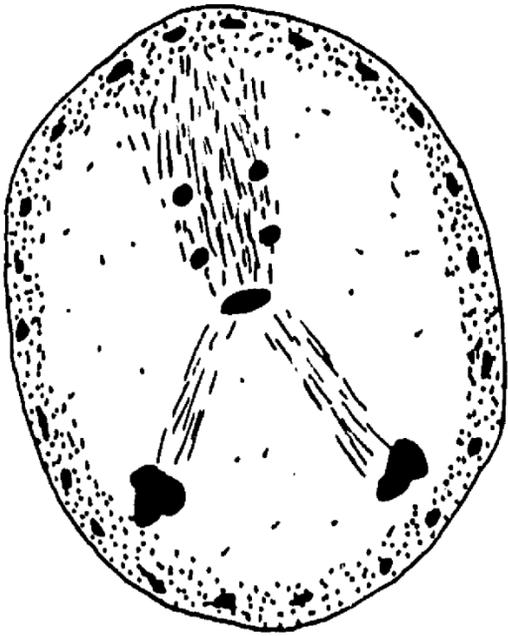
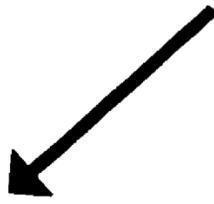
Figura 18. Modelo de la división nuclear de *Entamoeba histolytica*. En este modelo se muestran las 5 fases consecutivas en la división nuclear de *E. histolytica*, así como la disposición de los cromosomas. Este modelo está basado en las observaciones realizadas durante este trabajo.



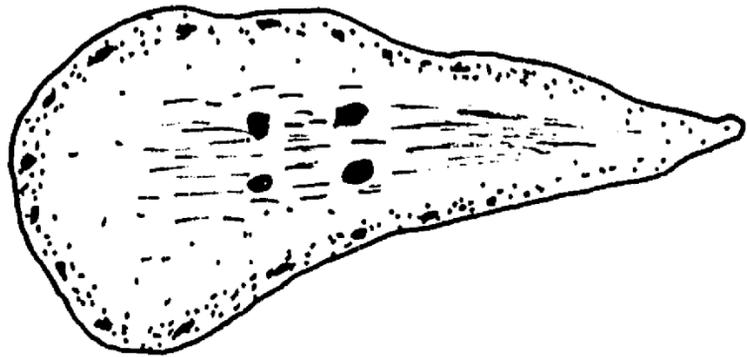
INTERFASE



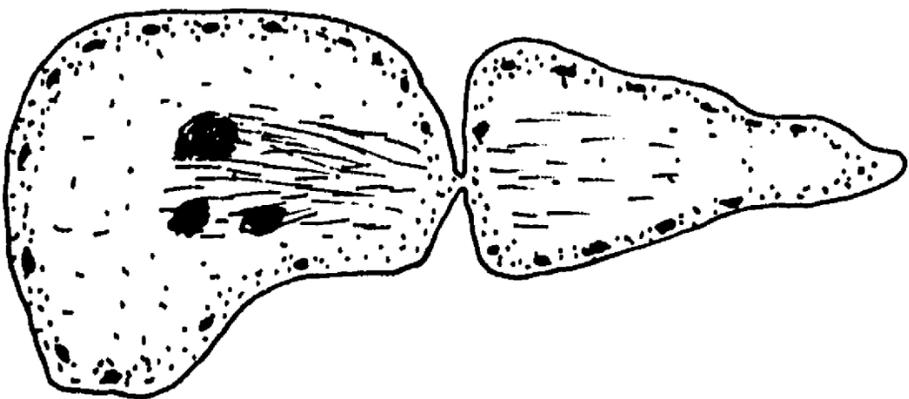
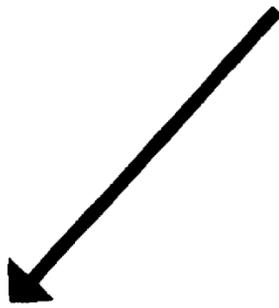
PROMETAFASE



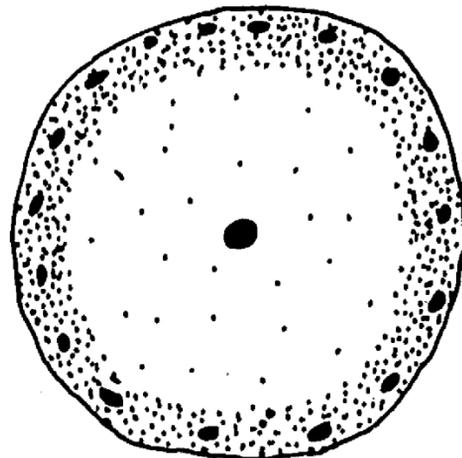
ANAFASE I



ANAFASE II



TELOFASE



INTERFASE

LA IMPRESION DE ESTA TESIS FUE APOYADA ECONOMICAMENTE

POR EL PROGRAMA DE APOYO A DIVISIONES DE

ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA U.N.A.M.