



207  
188

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias

Análisis de los Cromosomas de ENTAMOEBAS  
HISTOLYTICA con la Técnica de Electroforesis  
en Gel con Alternancia de Campos Electricos

Tesis de Licenciatura

Que para Obtener el Título de

B I O L O G O

P r e s e n t a :

*Magda Elizabeth Reyes López*

México, D. F.

**PALLA DE ORIGEN**

1989.



## **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

	pag.
LISTA DE ABREVIATURAS	3
I. INTRODUCCION	5
1. ANTECEDENTES GENERALES	
1.1 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	
1.2 ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA DE ADN	
2. ELECTROFORESIS DE CAMPOS ELECTRICOS ALTERNADOS (ECEA)	
2.1 APLICACIONES	
2.2 MODIFICACIONES AL DISEÑO ELECTROFORETICO DE ECEA	
3. MODELO DE ESTUDIO: <u>Entamoeba histolytica</u>	
3.1 GENERALIDADES	
3.2 CLASIFICACION	
3.3 CICLO DE VIDA Y ORGANIZACION SUBCELULAR	
3.4 PATOGENIA Y VIAS DE INVASION	
3.5 <u>Entamoeba histolytica</u> TIPO LAREDO	
II. OBJETIVO	29
III. MATERIALES Y METODOS	30
1.1 SISTEMAS ELECTROFORETICOS	
1.2 CONDICIONES ELECTROFORETICAS	
1.3 PREPARACION DEL ADN	
1.4 MARCADORES DE PESO MOLECULAR	
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	37
1. Características resolutivas de los sistemas electroforeticos	
2. Moléculas de ADN de tamaño cromosómico de <u>Entamoeba histolytica</u>	

V. CONCLUSIONES

52

VI. APENDICE

57

VII. BIBLIOGRAFIA

59

LISTA DE ABREVIATURAS

%	:	Por ciento
µgr/ml	:	microgramos por microlitro
µl	:	microlitros
°	:	grados
°C	:	grados centígrados
ADN	:	Acido desoxirribonucleico
CHEF	:	Electroforesis de campos eléctricos homogéneos Countour-clamped homogeneous Electric Fields.
cm	:	centímetros
ECEA	:	Electroforesis de campos eléctricos alternados
EDTA	:	Etilendinitrilotetracetato disódico
gr	:	gramos
hrs	:	horas
Kg	:	Kilogramo
Kpb	:	Kilopares de bases (1,000 pares de bases)
LET	:	0.5 M EDTA, 0.01 M Tris, pH 7.5
M	:	Molar
mA	:	miliamperes
mgr/ml	:	miligramos por mililitro
min	:	minutos
ml	:	mililitros
ml/min	:	mililitros por minuto
mm	:	milímetros
mM	:	milimolar
Mpb	:	Megapares de bases (Un millón de pares de bases)
NDS	:	0.01 M Tris, ) .5 M EDTA, 1 % Lauroyl sarcosine, pH 9.5 y 2 mgr/ml de Proteinasa K.
ngr	:	nanogramos
OFAGE	:	Electroforesis en gel con alternancia de campos eléctricos alternados y ortogonales. Orthogonal- field-alternation gel electrophoresis
pb	:	pares de bases

- P/V : Peso volumen
- seg : segundos
- TBE : 90 mM Tris, 90 mM ácido bórico y 2.5 mM EDTA disódico
- V : Volts
- V/cm : Volts por centímetro
- YAC : Cromosoma artificial de levadura. Yeast artificial chromosome

## I. INTRODUCCION

### 1. ANTECEDENTES GENERALES

Las técnicas electroforéticas desempeñan un papel muy importante para la caracterización y purificación de macromoléculas de importancia biológica. Fueron utilizadas por primera vez, en 1937, por el químico sueco, Arne Wilhelm Kaurin Tiselius para separar las proteínas séricas (Cooper, 1977; Alagón y Possani, 1983).

En biología molecular se ha usado a la electroforesis como una herramienta cotidiana, ya que la mayoría de las moléculas involucradas en los procesos biológicos presentan carga eléctrica, por lo que son capaces de migrar en un campo eléctrico. Generalmente la separación de moléculas diferentes de ADN, depende del tamaño, de la forma, de la carga, del potencial eléctrico y de la resistencia friccional, propiedades que caracterizan a cada molécula (Rickwood y Hames, 1985).

Actualmente se utiliza la electroforesis convencional en gel que proporciona un efecto de tamizado que puede ser manipulado para aumentar la eficiencia de la separación de macromoléculas complejas como es el ADN (Alagón y Possani, 1983; Cooper, 1977). Un gran problema de éste tipo de electroforesis son los efectos secundarios los cuales pueden ser:

a) Calor, producido por el alto voltaje del corriente electroforético, el cual puede producir desnaturalización de moléculas termosensibles así como alteraciones físicas del sistema (como puede ser, la distorsión de las bandas) [Alagón y Possani, 1983] y b) Efectos electroendosmóticos, que consisten en el movimiento neto de líquido hacia el cátodo principalmente, lo cual trae como consecuencia alteraciones en la movilidad de la partícula cargada (Alagón y Possani, 1983).

### 1.1 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Un gel es una red tridimensional de un polímero disperso en un solvente. Se han utilizado diferentes materiales para los geles, incluidos agar, agarosa y poliacrilamida (Rickwood y Hames, 1985), los cuales se usan de acuerdo al tipo y tamaño de las moléculas que se desean separar.

El polímero para la producción de geles más utilizado en biología molecular, es la agarosa (Tinoco et al, 1980; Alagón y Possani, 1983). El poder de resolución de estos geles depende de la concentración de agarosa, que generalmente es de 0.5 a 2 % (P/V) (Rickwood y Hames, 1985); de manera que para moléculas muy grandes se utilizan geles diluidos y para moléculas de bajo peso molecular, geles más concentrados.

Las moléculas por separar en geles de agarosa, se aplican en un punto del gel (generalmente en el cátodo [Rickwood y Hames, 1985]), las cuales migran a diferentes velocidades de acuerdo a su tamaño y carga y se separan en zonas discretas con un perfil de distribución Gaussiana, cuya distancia de migración es directamente proporcional al voltaje aplicado y al tiempo. Al final de la corrida electroforética, la localización de las moléculas que se han separado en los medios electroforéticos pueden visualizarse por medio de la utilización de diferentes métodos de tinción, como:

a) Tinción con Bromuro de etidio; en donde se aprovecha la fluorescencia inducida por la luz ultravioleta en las moléculas de bromuro de etidio intercaladas entre las bases que configuran el ADN. Otra ventaja de este método es la cuantificación del ADN contenido en un gel, ya que la cantidad puede ser estimada al comparar la fluorescencia de la muestra con una serie de marcadores del ADN de concentración conocida. Con este método pueden detectarse hasta 10 ngr de ADN (Schleif y Wensink, 1981).

b) Tinción de plata: este es un método que recientemente se diseñó para geles de agarosa, con el cual es posible detectar hasta 5 veces menos la cantidad del ADN observada con bromuro de etidio (Gottlieb y Chavko, 1987).

## 1.2 ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA DE ADN

La electroforesis se utiliza ampliamente para el análisis del ADN. Su uso se extiende desde la determinación de la secuencia de nucleótidos hasta la separación de moléculas del ADN de tamaño cromosómico. Generalmente la separación del ADN se lleva a cabo a pH neutros, en estas condiciones el ADN se encuentra cargado negativamente. Estas macromoléculas en forma de espiral, tienen una densidad de carga generalmente uniforme a lo largo de la molécula, ésto hace mantener una relación proporcional entre la cantidad de carga eléctrica transportada y el peso molecular (Tinoco et al, 1980; Alagón y Possani, 1983).

En geles de agarosa convencionales pueden separarse moléculas del ADN de 1 a 50,000 pares de bases (pb) de acuerdo, como ya se mencionó, a la concentración de agarosa que conforma el gel pudiendo obtener resoluciones de moléculas que difieren en tan sólo 1 a 0.5 % de su peso (Rickwood y Hames, 1985; Fangman, 1978). En este sentido la electroforesis provee un método versátil y seguro de conocer no sólo el peso molecular sino también de distinguir las diferentes formas topológicas del ADN: lineal, circular y superenrollado, ya que éstas presentan distintas movilidades electroforéticas aunque tengan el mismo peso molecular (Tinoco et al, 1980; Alagón y Possani, 1983).

En este mismo tipo de electroforesis convencional se observan movilidades anómalas en moléculas de más de 50,000 pb, con la consecuente pérdida de resolución (Fangman, 1978). Esta limitante se trató de superar al utilizar geles de muy baja concentración de agarosa, con los cuales se han podido separar

moléculas de 300 Kpb, pero los geles son difíciles de manipular, además de que se requieren tiempos de corrida muy largos (Fangman, 1978; Schwartz et al, 1983; Schwartz y Cantor, 1984; Serwer, 1981); ésto había impedido que las moléculas del ADN de gran tamaño o de tamaño cromosómico pudieran ser analizadas en electroforesis.

Para tratar de resolver el problema del estudio de las moléculas del ADN de tamaño cromosómico, en genética y biología molecular, se diseñó la técnica de fragmentación del ADN con endonucleasas de restricción. Los fragmentos resultantes se analizan en electroforesis y posteriormente se unen los fragmentos para obtener una vista cromosómica (Schwartz y Cantor, 1984). Esta técnica presenta un gran problema ya que el tratamiento destruye en gran parte la información detallada de las moléculas de tamaño cromosómico (Schwartz et al, 1983).

## 2. ELECTROFORESIS DE CAMPOS ELECTRICOS ALTERNADOS (ECEA)

Recientemente, Schwartz y Cantor (1983), desarrollaron una técnica electroforética capaz de separar moléculas de ADN cromosómico de hasta 9,000 Kpb, lo cual permite su purificación y análisis, con lo que han proporcionado una herramienta útil para el estudio de la estructura y organización genética. Esta técnica se ha llamado electroforesis en gel de agarosa con campos electricos alternados: ECEA.

La movilidad anómala de moléculas grandes del ADN en electroforesis en gel, puede deberse a un efecto de condensación de las moléculas al entrar al gel, causada por el volúmen de líquido que se excluye, cuando el ADN penetra en los poros del gel que son más pequeños que el tamaño de la molécula (Schwartz et al, 1983).

La técnica de ECEA, proporciona una nueva manera de usar la matriz del gel de agarosa y el campo eléctrico, con lo que se produce una electroforesis basada en diferencias intrínsecas de movilidad (Schwartz et al, 1983; Klotz y Zimm, 1972).

La primera cámara de ECEA (Shwartz et al, 1983), utiliza dos pares de electrodos, un par está colocado en dirección horizontal y el otro en dirección vertical, los cuales se activan alternadamente a intervalos de tiempo (pulsos). (Fig 1).

Al aplicar un campo eléctrico, se produce la distorsión y alargamiento de las moléculas de ADN, de manera que las moléculas se orientan en los poros del gel, con un movimiento independiente del peso molecular. Con la aplicación del otro campo eléctrico que actúa a un ángulo de 90° con respecto al primero, se promueve que las moléculas se reorienten hacia otro nuevo conjunto de poros del gel y migren de acuerdo al peso molecular (Schwartz et al, 1983; Klotz y Zimm, 1972).

En este sistema electroforético, las moléculas están dentro de un ciclo continuo de orientación, migración y reorientación. Donde parte del pulso lo emplean en la reorientación y el resto en migración.

El tiempo de reorientación se afecta por: la magnitud de la fuerza aplicada a la molécula, por el campo eléctrico, por la duración de esta fuerza, por la resistencia a la reorientación causada por la matriz de agarosa y por la energía térmica y el peso molecular del ADN (Chu et al, 1986).

Debido a que el tiempo de reorientación está en función del peso molecular, las moléculas pequeñas se reorientan más rápido que las moléculas más grandes. De manera que el pulso es crítico para determinar la movilidad de una molécula del ADN en particular. Con pulsos cortos, una molécula del ADN de gran tamaño no es sensible al cambio de dirección del campo, por

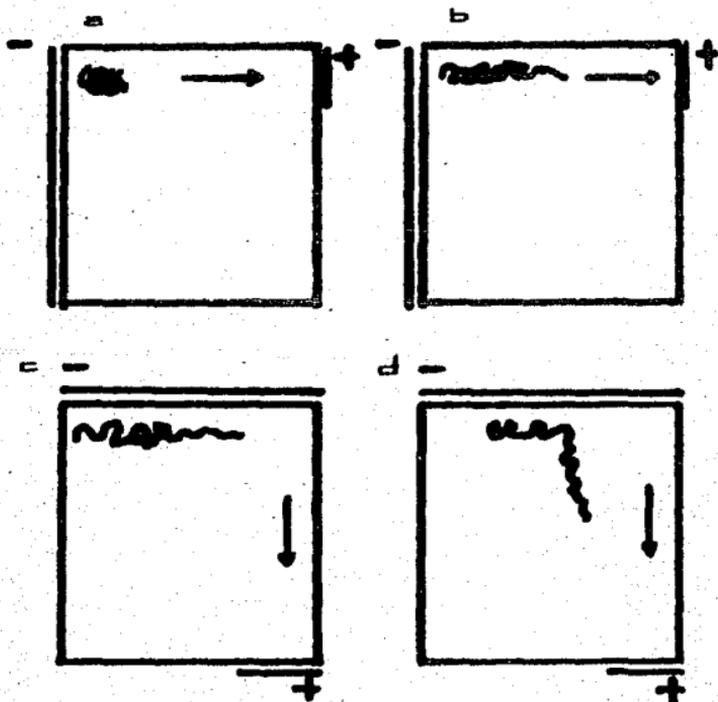


Fig 1. Ilustración esquemática de la electroforesis de campos eléctricos alternados.

- a, b Molécula del ADN antes y después de la aplicación del campo eléctrico horizontal.
- c Molécula del ADN antes de cambiar el campo eléctrico horizontal a vertical.
- d Después de un tiempo de haber aplicado el campo eléctrico vertical.

consiguiente su migración es semejante a la de una electroforesis normal, de acuerdo al vector resultante de los dos campos y con pulsos muy largos, el tiempo requerido para la reorientación es muy pequeño comparado con el que ocupa la molécula migrando a través del campo, el resultado es también una electroforesis normal, sólo que en este caso, primero en una dirección y luego en otra (Schwartz y Cantor, 1984; Smith et al, 1987a) (Fig 2). De acuerdo a lo mencionado anteriormente, el parámetro que se mide experimentalmente es la movilidad.

A diferencia de la electroforesis convencional, en ECEA, la relación entre el intervalo de migración y el tamaño de la molécula es lineal (Schleif y Wensink, 1981; Carle y Olson, 1984).

Dado que el pulso es lo que produce que las moléculas de cierto tamaño se muevan a una velocidad de migración característica, se ha encontrado que existe una relación entre éste y el tamaño de la molécula más grande que se desea resolver, lo cual es una medida del intervalo de separación óptima (Smith et al, 1987a).

Al igual que la electroforesis convencional, la aplicación de esta técnica con altas concentraciones de agarosa y voltajes altos, permite separar diferentes formas topológicas de las moléculas del ADN e identificar las formas ramificadas tales como tenedores de replicación y formas intermedias de recombinación, que migran más lento que las formas lineales (Bell y Byers, 1983).

En general se considera que todas las variantes de electroforesis en gel con campos eléctricos alternados, se basan en éstos principios, sin embargo actualmente no existe un marco teórico fisicoquímico bien fundamentado en cuanto a la teoría de ECEA.

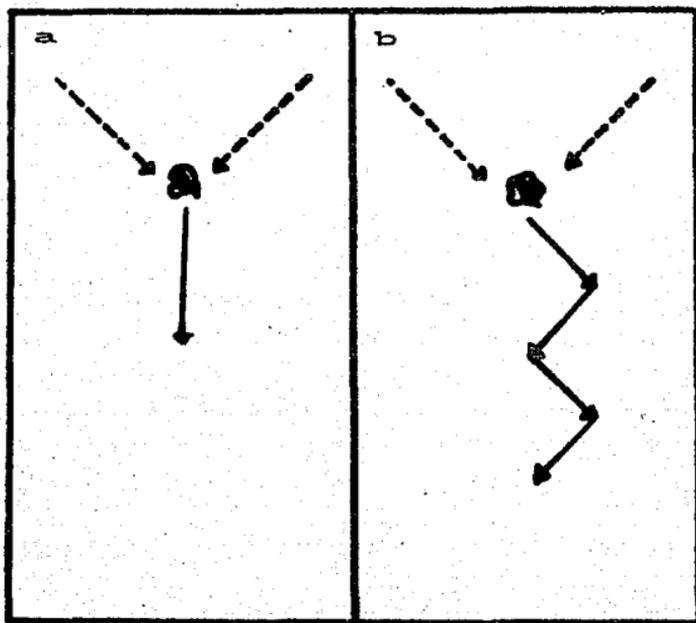


Fig 2. Se muestra el efecto del pulso, con respecto al tamaño de la molécula del ADN.

- a. En el extremo de pulsos cortos
- b. Utilización de pulsos largos
- Dirección del campo eléctrico
- Movimiento real de la molécula

De acuerdo a lo anterior, las separaciones en ECEA son sensibles a muchas variables experimentales, incluidos el pulso, la fuerza del campo eléctrico, la concentración de agarosa, la temperatura y la duración de la corrida (Smith et al, 1987a; Snell y Wilkens, 1986).

Por ejemplo, el pulso en relación inversa con la fuerza del campo eléctrico, son los determinantes críticos para la separación de las moléculas de acuerdo a su tamaño. Esto es, si la fuerza del campo aumenta, el pulso deberá ser menor.

Otra variable es la temperatura del gel durante la corrida, ya que los geles se corren a una potencia relativamente alta (60 Watts) y corriente alta (200 mA), lo que en consecuencia provoca el incremento de la temperatura, esto puede solucionarse con la recirculación y enfriamiento del amortiguador en el cual se lleva a cabo la electroforesis. Se obtienen mejores resoluciones cuando los geles se encuentran relativamente fríos (4 a 6 °C).

La duración de la corrida tiene efectos importantes en el patrón de bandas obtenido. Esto se debe a la geometría del campo de algunos de los sistemas diseñados, en los cuales las moléculas no migran a una velocidad constante a lo largo del experimento, pues el ángulo entre las direcciones del campo eléctrico, asociado a cada uno de los dos pares de electrodos, cambia de 90° en la parte superior del gel a un ángulo más grande en la parte inferior, de manera que el campo neto a lo largo del eje principal del gel disminuye. La movilidad neta de todas las moléculas también disminuye conforme éstas migran en el gel, con lo que se acumulan en la parte inferior del gel y por lo tanto, la separación entre las bandas llega a un máximo en función del tiempo (Carle y Olson, 1984; Chu et al, 1986). Entre los sistemas diseñados de ECEA ha sido modificado el ángulo de reorientación y se puede obtener mejor resolución a todo lo largo del gel, ya que en éstos, la duración de la corrida no afecta en alto grado el patrón electroforético obtenido (Chu et al, 1986).

El método de ECEA, promete revolucionar la práctica de la genética molecular, debido a que permite analizar regiones genómicas de gran tamaño, que no se habían podido estudiar por otros métodos, como se muestra en la figura 3.

## 2.1 APLICACIONES

Las aplicaciones de la electroforesis de campos eléctricos alternados (ECEA), se pueden dividir en tres categorías:

- a) Separación de cromosomas completos (obtención de cariotipos moleculares)
- b) Construcción de mapas de restricción de fragmentos grandes de regiones cromosómicas y,
- c) Purificación de fragmentos para su posterior clonación.

Se ha utilizado en el estudio de moléculas del ADN de tamaño cromosómico y subcromosómico de una gran variedad de organismos.

- a) Separación de cromosomas completos (obtención de cariotipos moleculares)

En 1984, Schwartz y Cantor describieron el uso de este sistema electroforético y presentaron la primera separación de cromosomas de levadura. Poco después del descubrimiento inicial, se separaron cromosomas de muchos otros eucariontes primitivos y fragmentos del ADN muy grandes.

La técnica de ECEA se ha utilizado para generar cariotipos electroforéticos de varias cepas de Saccharomyces cerevisiae (Schwartz y Cantor, 1984; Carle y Olson, 1984; Carle y Olson, 1985). En este sistema se han podido reconocer hasta 15 bandas

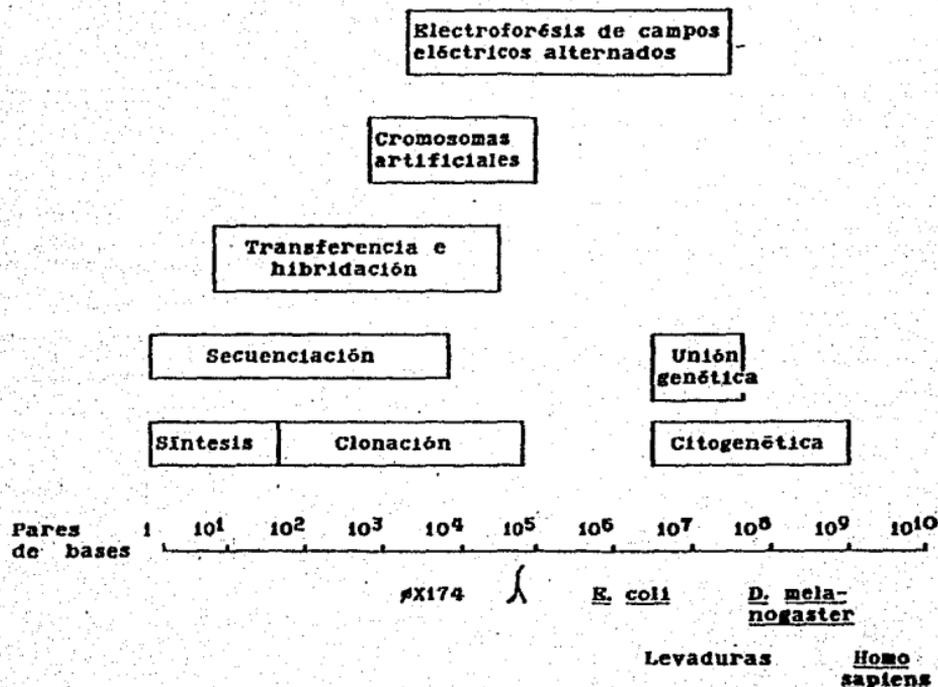


Fig 3. Se muestra la gran variedad de técnicas utilizadas para obtener información detallada del genoma de varios organismos. Cada una de las técnicas analíticas es efectiva en un intervalo de magnitud limitado. En particular, el intervalo entre 1 X 10<sup>6</sup> y 2 X 10<sup>8</sup> pb no se había podido estudiar, hasta el diseño de la técnica de electroforésis en gel con alternancia de campos eléctricos.

específicas de cromosomas (Chu et al, 1986).

Se ha obtenido el cariotipo molecular de Schizosaccharomyces pombe, una levadura que presenta en estado haploide tres cromosomas, con lo que se ha extendido el intervalo de resolución de ECEA hasta 9.000 Kpb (Smith et al, 1987a; Stewart et al, 1988; Vollrath y Davis, 1987; Turmel y Lalonde, 1988). De Candida albicans se ha obtenido un cariotipo molecular, y presenta moléculas de hasta 5.000 Kpb (Vollrath y Davis, 1987).

Esta técnica también se ha utilizado en el estudio de organismos unicelulares parásitos, entre ellos Plasmodium falciparum, donde se han observado polimorfismos del tamaño del ADN cromosómico debido a frecuentes deleciones en poblaciones naturales (Walliker et al, 1987; Langsley et al, 1987; Corcoran et al, 1986; Van der Ploeg et al, 1985). algunas especies de Trypanosoma (Engman et al, 1987; Gibson y Miles, 1986; Bernards et al, 1986; Van der Ploeg et al, 1984), Leishmania sp. (Holmes et al, 1986; Garvey y Santi, 1986) y Giardia lamblia (Adam et al, 1988); en estos organismos se han detectado polimorfismos y una gran plasticidad genómica inter- e intra-cepas, lo que les confiere algún tipo de variabilidad antigénica (Van der Ploeg et al, 1985).

Los cariotipos moleculares obtenidos de diferentes especies de Leishmania, han sido útiles en la clasificación y el diagnóstico clínico de Leishmaniasis (Garvey y Santi, 1986). También, se ha observado que la resistencia a drogas que presenta Leishmania mayor es provocada por la amplificación de un ADN estable presente en círculos extracromosómicos (Holmes et al, 1986).

Este nuevo sistema electroforético es útil en el análisis de muchas características cromosómicas, las cuales eran imposibles de estudiar, debido a que el ADN en algunas especies eucarióticas no se condensa, o a que las aproximaciones

genéticas clásicas no pueden utilizarse, ya que estas especies suelen carecer de intercambio genético.

Por otro lado, el análisis directo de los cromosomas completos de humanos, está todavía fuera del alcance de las técnicas de ECEA. El análisis de moléculas grandes requiere su rompimiento por endonucleasas de restricción. Las enzimas utilizadas en la actualidad suelen producir fragmentos de ADN muy grandes, que se han separado por medio de esta técnica.

b) Construcción de mapas de restricción de fragmentos grandes de regiones cromosómicas

La electroforesis de campos eléctricos alternados en combinación con enzimas de restricción de baja frecuencia de corte, proveen un puente entre las tecnologías extremas de: citogenética y mapeo de restricción de fragmentos pequeños.

En este contexto Smith y colaboradores (1987b), construyeron un mapa físico del genoma completo de Echerichia coli, con fragmentos de 20 a 1,000 Kpb, separados en ECEA. Este mapa ha facilitado los estudios de genética y biología molecular de éste organismo y su construcción sirve de modelo para posteriores estudios en genomas más grandes.

La posibilidad de construir mapas físicos del genoma por medio de ECEA, ha tenido un impacto significativo en los estudios genéticos de organismos y seguramente en el futuro podrá realizarse en el genoma del humano (Gemmill et al, 1987; Van Ommer et al, 1986; Kenrick et al, 1987; Hardy et al, 1986; Lawrance et al, 1987).

c) Purificación de fragmentos para su posterior clonación

En adición a los experimentos de mapeo, la electroforesis de campos eléctricos alternados ha sido una técnica útil para la construcción y análisis de bibliotecas genómicas (Collins et al, 1987; Povstka et al, 1987; Burke et al, 1987).

La técnica de ECEA facilita la selección de fragmentos grandes del ADN para ser clonados una vez que éstos se han cortado con enzimas de restricción.

El primer reporte de esta técnica es el de Burke et al (1987), en donde se demuestra la posibilidad de clonar fragmentos del ADN de un millón de pares de bases en cromosomas artificiales de levaduras (YAC).

## 2.2 MODIFICACIONES AL DISEÑO ELECTROFORETICO DE ECEA.

Se han descrito varias modificaciones al diseño original de la cámara electroforética utilizada para ECEA (Carle y Olson, 1984; Carle et al, 1986; McPeck et al, 1986; Chu et al, 1986; Annand, 1986), que disminuyen los problemas del primer diseño, entre ellos la distorsión en el patrón de migración, resolución no uniforme de línea a línea y ciertas complejidades en la construcción del aparato de ECEA.

Una de las modificaciones es la cámara de electroforesis en gel de agarosa con campos eléctricos alternados y ortogonales, OFAGE, descrita por Carle y Olson (1984). En este sistema la distorsión de las bandas se redujo al colocar los electrodos en las esquinas del gel, a casi 90° uno del otro, lo cual forma un gradiente en la fuerza del campo. En éste diseño, se optimizó el ángulo entre los campos con lo que la resolución aumentó. Anteriormente, se afirmaba que la mayor resolución se debía al

gradiente de la fuerza del campo obtenido; pero fue hasta después, que observaron que el ángulo formado entre los campos aplicados alternativamente, es crítico para la separación de macromoléculas. A pesar de estas mejoras, las separaciones en OFAGE dan un efecto característico de vidrio de reloj, que consiste en la deformación de las bandas.

Actualmente tres grupos han demostrado, que los campos eléctricos en gradiente no son necesarios para la separación y que al aplicar campos eléctricos uniformes cuya dirección forma un ángulo de reorientación obtuso, se obtienen los mejores resultados (Carle et al, 1986; Chu et al, 1986; Annand, 1986).

La variación más importante en éste sentido es la proporcionada por Chu y colaboradores (1986), quienes usaron campos eléctricos uniformes y alternados con un ángulo de reorientación de  $120^\circ$ . El diseño se llamó electroforesis de campos eléctricos homogéneos, CHEF. Se trata de un arreglo poligonal de los electrodos alrededor del gel que generan un campo eléctrico uniforme. Cada electrodo se fija en un potencial intermedio lo que produce campos periféricos que simulan la acción de un par de electrodos idealmente lineales y de longitud infinita, con lo que el campo eléctrico sería igualmente homogéneo. Este arreglo de electrodos es un factor importante para obtener la resolución de intervalos de tamaño de las moléculas, junto con la optimización de las variables experimentales mencionadas. En este sistema se han logrado separar moléculas mayores de 5.000 Kpb (Vollrath y Davis, 1987).

En poco tiempo esta técnica se ha desarrollado ampliamente (Annand, 1986; Larson et al, 1987; Stewart et al, 1988) y proporciona un método de estudio de los organismos. Principalmente de organismos unicelulares parásitos, cuyas secuencias de ADN que codifican información especie-específica, están empaquetadas en cromosomas en el núcleo. Estos cromosomas no pueden ser observados en el microscopio óptico debido a que no

se condensan durante el proceso de mitosis del celular. De modo que, sus genes no pueden ser mapeados en cromosomas específicos por técnicas citogenéticas, aún en el caso de que se tengan marcadores genéticos.

### 3. MODELO DE ESTUDIO: Entamoeba histolytica

#### 3.1 GENERALIDADES

Entamoeba histolytica es un protozoario parásito causante de la enfermedad llamada amebiasis, el cual afecta aproximadamente al 10 % de la población mundial y en México es un problema de salud pública por su frecuencia y como causa de mortalidad (Mathews et al, 1986).

#### 3.2 CLASIFICACION

REINO	:	Protoctista
SUBREINO	:	Protozoarios
PHYLUM	:	Sarcomastigophora
SUBPHYLUM	:	Sarcodina
SUPERCLASE	:	Rhizopoda
CLASE	:	Lobosea
SUBCLASE	:	Gymnamoebia
ORDEN	:	Amoebida
SUBORDEN	:	Tubulina
FAMILIA	:	Entamoebidae
GENERO	:	Entamoeba
ESPECIE	:	<u>Entamoeba histolytica</u> Schaudinn, 1903 (Whittaker, 1969; Levine et al, 1980)

La clasificación de las especies de Entamoeba, se basa en el número de núcleos en el quiste maduro. Entamoeba histolytica

presenta un quiste tetranucleado y es la única de importancia médica (Mathews et al. 1986; Faust et al. 1984).

### 3.3 CICLO DE VIDA Y ORGANIZACION SUBCELULAR

Entamoeba histolytica presenta las siguientes fases en su ciclo de vida: Trofozoito, prequiste, quiste, metaquiste y trofozoito metaquistico (Faust et al. 1974) (Fig 4).

**TROFOZOITO.** Fluctuan entre 10 y 60 micrometros de diámetro, según el grado de actividad y la cepa. Es un protozoario relativamente primitivo, anaerobico, que carece de mitocondrias, contiene un pequeño retículo endoplásmico o Aparato de Golgi y en el citoplasma presenta una gran cantidad de vesículas con actividad de fosfatasa ácida. Los movimientos y la fagocitosis resultan de la formación de prolongaciones pseudopódicas de la membrana celular digitiformes y largas o anchas y redondeadas. Algunos estudios han sugerido que la superficie de E. histolytica juega un papel importante en la lisis dependiente de contacto con las células de mamífero (Aley et al. 1980; McLaughlin y Aley. 1985; Faust et al. 1974). En el centro de la masa citoplásmica, está el núcleo, que es esférico con un diámetro de aproximadamente la quinta o sexta parte de la amiba completa. Este se caracteriza por la ausencia de nucleolo y la presencia de un área definida como cromatina periférica. Algunos autores, consideran a ésta como el equivalente funcional del nucleolo, por ser un área relacionada activamente en la síntesis o acumulación de ARN (McLaughlin y Aley, 1985).

El núcleo presenta como característica notable, vesículas o cuerpos intranucleares con actividad de fosfatasa ácida. La envoltura nuclear presenta gran cantidad de poros (McLaughlin y Aley. 1985; Martínez-Palomo, 1982), la cual no se disuelve durante la división nuclear. Se cree que la división ocurre como una mitosis característica y que probablemente el número

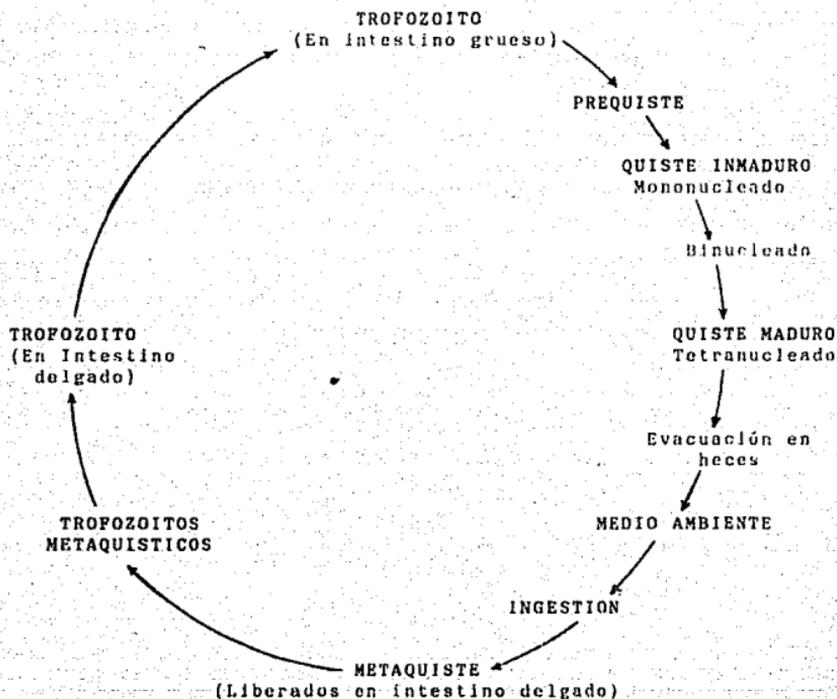


Fig 4. Ciclo de vida de Entamoeba histolytica

cromosómico es constante (Cervantes y Martínez-Palomo, 1960), aunque éste no se conoce.

Existe muy poca información sobre esto en E. histolytica obtenida por técnicas de microscopía electrónica y no se han podido identificar centriolos, huso acromático, ni cromosomas ya que éstos no se condensan en ningún estadio de la mitosis.

Durante algún tiempo, los trofozoítos viven y se multiplican en las criptas del intestino grueso y utilizan las secreciones mucosas y las bacterias endémicas como alimento.

ENQUISTAMIENTO. Sólo bajo ciertas condiciones se produce el enquistamiento. Esto sucede a medida que la materia fecal se deshidrata en la luz del colon.

Los trofozoítos se condensan primeramente en una masa esférica, y forman el prequiste. Entonces secreta una cubierta resistente y relativamente delgada que da lugar al quiste inmaduro.

El quiste maduro presenta cuatro núcleos, producidos por dos mitosis consecutivas del núcleo, cada uno de los cuales es una réplica del núcleo original (Paust et al, 1974).

DESENQUISTAMIENTO. Ha sido observado in vitro en condiciones semejantes a las del aparato digestivo. El quiste no experimenta cambios aparentes mientras se encuentra en lugares del aparato digestivo en donde la reacción del medio es ácida, pero en condiciones de pH neutro o alcalino se inicia su germinación.

Los jugos digestivos debilitan la pared del quiste y permiten que la amiba multinucleada o metaquiste, salga por una hendidura de la pared que la envuelve. Inmediatamente, el citoplasma se divide, de tal modo que cada núcleo pasa a ser el

centro de un pequeño trofozoito metaquistico (Faust et al. 1974).

**COLONIZACION.** Los trofozoitos metaquisticos de E. histolytica, no colonizan el intestino delgado, sino que son arrastrados hacia el ciego en el intestino grueso, en donde se establecen. Depende de su número, el que uno o más se ponga en contacto con la mucosa o se alojen en las criptas glandulares. Una vez que las amibas comienzan a alimentarse y crecer, llegan a convertirse en trofozoitos normales y se completa el ciclo de desarrollo (Faust et al. 1974).

### 3.4 PATOGENIA Y VIAS DE INVASION

Entamoeba histolytica presenta un gran poder invasivo de los tejidos humanos. Actualmente, no se ha podido demostrar que alguna cepa o variedad de E. histolytica no sea patogénica (Martínez-Palomo, 1982).

**LESION INTESITINAL.** La lesión típica es en la mucosa intestinal, donde los trofozoitos desarrollan úlceras en el ciego, apéndice o zonas contiguas del colon ascendente. Las células epiteliales en contacto con las amibas presentan necrosis superficial.

Desde éstos sitios primarios de invasión se pueden producir lesiones secundarias en otras partes del intestino, en órganos o tejidos extraintestinales (Faust et al. 1974).

**LESIONES EXTRAINTESTINALES.** Un elevado porcentaje de las infecciones extraintestinales se ubican en el hígado, las cuales producen hepatitis amebiana o en casos más graves el llamado absceso hepático amebiano. Comunmente la invasión continúa hacia el pulmón o la pleura derechos, pero en ocasiones puede dirigirse a colon, peritonéo u otros órganos abdominales, o hacia la pared del abdomen o del tórax (Faust et al. 1974).

En la figura 5, se presenta la relación entre los diversos tipos de amibiasis extraintestinal y la lesión primaria en el intestino grueso.

El diagnóstico de la amibiasis, excepto en el caso del absceso hepático amebiano, está basado en la observación de E. histolytica, ya sea como trofozoito o como quiste, en las materias fecales. En el caso de abscesos amebianos del encéfalo por lo general fulminante, no se diagnostica su naturaleza hasta la necropsia (Faust et al, 1974).

E. histolytica es objeto de amplio estudio en México y en otros países, principalmente en la caracterización de virulencia, de acuerdo a la capacidad de invasión del parásito. Se ha profundizado en sus propiedades biológicas como capacidad de fagocitosis, adhesión a células blanco, efecto citopático y su posible actividad citotóxica.

La mayoría de los estudios son de tipo bioquímico o microscópico (McLaughlin y Aley, 1985; Aley et al, 1980), otros grupos han estudiado la relación amiba-bacterias en la amibiasis, que es un factor importante en el crecimiento y patogenicidad del parásito (Mirelman, 1987).

Los estudios de su organización genética y biología molecular no han sido extensivos. Se han realizado estudios comparativos de caracterización y contenido del ADN de diferentes cepas de E. histolytica (López-Revilla y Gómez, 1978; Reeves et al, 1971; Gelderman et al, 1971a), así como el tamaño del genoma y la determinación de la composición de bases por estudios de desnaturalización térmica (Gelderman, 1971b) así como también la homología de secuencias en varinas especies de E. histolytica (López-Revilla y Gómez, 1986).

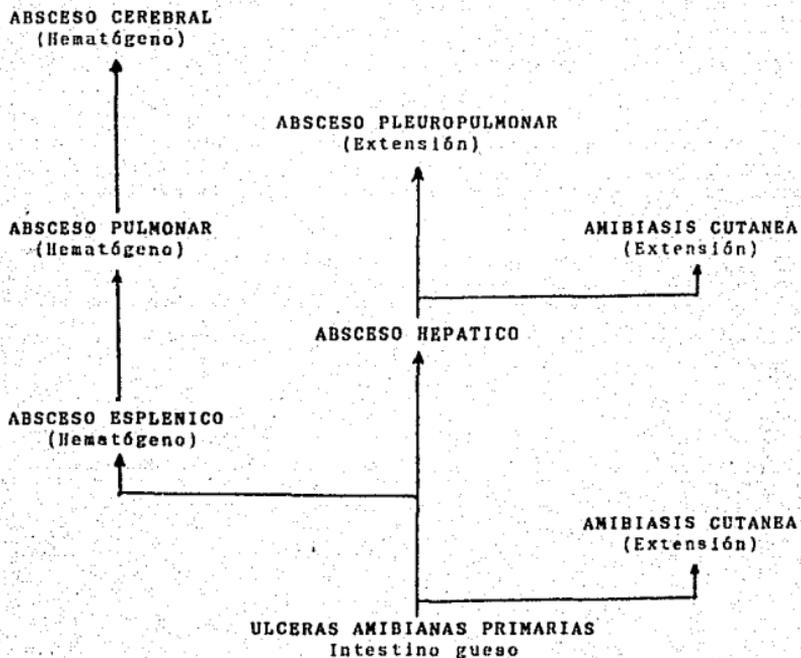


Fig 5. Vías de invasión y localización de la amibiasis extraintestinal.

Se muestra la relación entre los diversos tipos de amibiasis extraintestinal y la lesión primaria en el intestino grueso.

### 3.5 Entamoeba histolytica TIPO LAREDO

Otro tipo de Entamoeba cuyo quiste es tetranucleado es la E. histolytica tipo Laredo la cual no ha sido considerada como una especie separada, a pesar de que presenta varias diferencias fenotípicas y genotípicas con E. histolytica típica.

E. histolytica tipo Laredo, se aisló inicialmente de portadores asintomáticos. Es morfológicamente igual a las cepas patogénicas de E. histolytica, de las cuales difiere principalmente en su capacidad de multiplicarse a temperatura ambiente (Richards et al. 1966), en que no es patógena y muestra diferente sensibilidad a las drogas.

Para obtener información que pueda servir en la taxonomía del grupo Entamoeba, se han hecho principalmente dos tipos de estudios bioquímicos de diferencias y semejanzas (Martínez-Palomo, 1982).

Se han determinado diferencias genotípicas al analizar el ADN de cultivos de E. histolytica. Los parámetros estudiados son: la cantidad de ADN por célula, la proporción de bases y las secuencias nucleotídicas, debido a su característica de ser relativamente fijos de cada especie y que han dado buenos resultados al ser aplicados en la filogenética y taxonomía de bacterias. En éste sentido se ha encontrado que: E. histolytica presenta cinco veces más cantidad de ADN y de secuencias repetitivas que E. histolytica tipo Laredo, por lo que ésta se considera más primitiva, además de que el ADN muestra diferencias cuantitativas y cualitativas entre ambas (Martínez-Palomo, 1982).

Con estos métodos se han encontrado diferencias dentro de los miembros de un grupo de E. histolytica típica, debido a variaciones genotípicas y fenotípicas, por lo cual no pueden utilizarse para diagnóstico taxonómico.

Reeves y Bischoff (1968) al demostrar que los patrones de isoenzimas son diferentes, han propuesto que E. histolytica tipo Laredo, pertenece a una especie diferente de las clásicas cepas de E. histolytica. Adicionalmente, otras investigaciones a nivel molecular tal como la comparación de fragmentos de ADN repetitivo, han corroborado ésta evidencia fisiológica y bioquímica, lo que indica que E. histolytica tipo Laredo y E. histolytica no pertenecen a la misma especie.

La posibilidad de obtener un cariotipo molecular de E. histolytica y E. histolytica tipo Laredo, sería de gran interés, ya que podría ayudar a comprender la variabilidad encontrada inter-cepas debido a que es probable que se deba a rearrreglos cromosómicos como ha sido reportado en otros protozoarios parásitos. De ser así, se podrían reconocer patrones electroforéticos especie-específicos o cepa-específicos, además proporcionar una herramienta muy importante que puede ser utilizada para hacer mapeo génico (Carle y Olson, 1984; Walliker et al, 1987; Langsley et al, 1987; Corcoran et al, 1986; Engman et al, 1987; Gibson y Miles, 1986; Van der Ploeg et al, 1984; Holmes et al, 1986; Garvey y Santi, 1986; Adam et al, 1988).

## II. OBJETIVO

El objetivo de este estudio es obtener un cariotipo molecular a través de la técnica de electroforesis de campos eléctricos alternados, que sería de gran utilidad en el estudio del genoma y biología molecular de E. histolytica, ya que este microorganismo es un protozoario parásito de importancia en México y en otros países.

### III. MATERIALES Y METODOS

#### 1.1 ELECTROFORESIS

En este estudio se utilizaron dos tipos diferentes de cámaras de electroforesis de campos eléctricos alternados, los cuales se detallan como sigue:

##### A. Cámara de electroforesis de campos eléctricos alternados tipo OPAGE.

En la figura 6, se presenta un diagrama de la cámara, donde se muestra a escala, el lugar de colocación del gel y los electrodos.

La cámara es de las siguientes dimensiones 38 X 38 X 5 cm. Los cuatro electrodos se encuentran en el fondo de la cámara, siendo los electrodos negativos de 23.6 cm y los positivos de 5 cm de largo.

El gel mide 12.7 X 12.7 cm y se coloca directamente en un soporte de las mismas dimensiones de 3.2 mm de profundidad, en el fondo de la cámara. La posición del gel con respecto a los electrodos es crítica de manera que, como se muestra en la figura 6, el gel se centra con sus lados paralelos a las paredes de la cámara y los electrodos presentan un ángulo de 45° con respecto al gel. Con ángulos de reorientación diferentes en cada punto de éste, entre 120 y 150°.

La alternancia de los campos se proporciona por un circuito externo, que contiene un relevador y un contador de tiempo eléctricos, conectados a la fuente de poder.

Para evitar el sobrecalentamiento del amortiguador en el cual se lleva a cabo la electroforesis, este es recirculado por

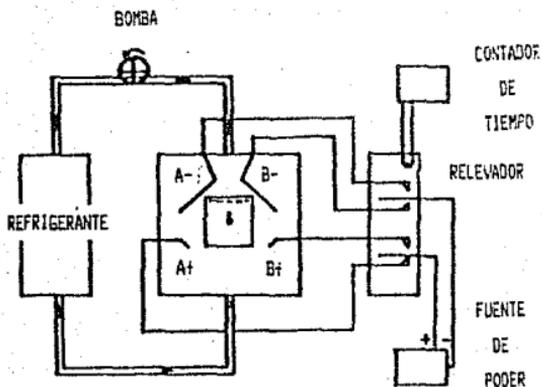


Fig 6. Diagrama del Sistema de electroforesis OFAGE.

Dibujados a escala se encuentran la cámara de electroforesis, los electrodos y el gel. (1 mm = 1.5 cm).

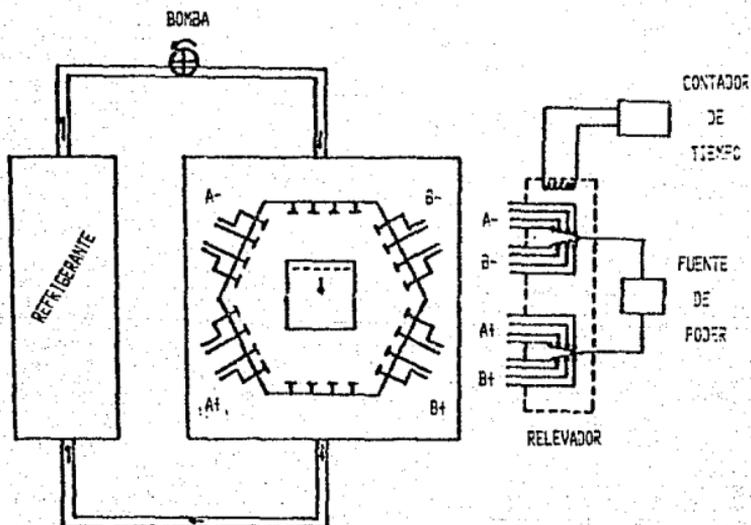


Fig 7. Diagrama del Sistema electroforético CHEF.

Sólo la cámara de electroforesis, la región que soporta a los electrodos y el gel, se encuentran dibujados a escala. (1 mm = 1 cm).

medio de unos conectores y una bomba peristáltica hacia un refrigerante.

De acuerdo a la potencia, el voltaje o la corriente utilizados, debe controlarse la temperatura para que la conductancia del aparato se mantenga constante.

B. Cámara de electroforesis de campos eléctricos alternados tipo CHEF.

En este sistema el campo eléctrico se genera por múltiples electrodos arreglados a lo largo del perímetro de un polígono con potenciales eléctricos predeterminados en cada uno de ellos con lo que, el campo eléctrico es totalmente homogéneo.

En la figura 7, se muestra este diseño, en el cual se señalan los dos lados opuestos del polígono que son utilizados para definir la orientación del campo eléctrico. Los ángulos de reorientación son de 120 ó 160°, dependiendo de la posición del gel con respecto al polígono y a la polaridad de los electrodos.

La alternancia en la orientación de los campos, al igual que en el sistema descrito arriba, es por medio de un relevador y un contador de tiempo eléctricos.

Este diseño tiene las mismas dimensiones que la cámara tipo OFAGE, de 38 X 38 X 5 cm, con 24 electrodos verticales, arreglados en el perímetro de un hexágono como se muestra en la figura 7, y el tamaño del gel es de 7.6 X 7.6 cm.

Para evitar el incremento de la temperatura, el amortiguador se recircula a través de un espiral de vidrio colocado dentro de un refrigerante. El amortiguador es bombeado continuamente a 250 ml/min usando una bomba peristáltica. Con este sistema la temperatura del gel se mantiene aproximadamente entre 4 y 6 °C.

### 1.2 CONDICIONES ELECTROFORÉTICAS

**Preparación del gel.** Los geles son de 0.8 % de agarosa NA (Pharmacia Biotechnology), en el mismo amortiguador utilizado en la corrida, TBE 50 % (TBE 100 % = 90 mM Tris, 90 mM ácido bórico, 2.5 mM EDTA disodio, pH 8.2). Con un grosor de 3 a 4 mm. Los peines son de 1.2 X 2 mm.

**Electroforesis.** Las condiciones electroforéticas varían en los dos sistemas utilizados. Pero en ambos fueron utilizados tiempos de pulso de 80 seg a 20 min y un voltaje de 50 a 160 V. De acuerdo a esto, la duración de la corrida fue de 2 a 6 días. La profundidad del amortiguador es de 2 cm y la temperatura se mantuvo aproximadamente en 8 °C, temperatura en la cual se observaron los mejores resultados. La reproducibilidad de los resultados se obtiene cuando los geles se corren a temperatura constante.

**Tinción del gel.** Después de la electroforesis el gel se tinte por dos métodos distintos: Tinción con bromuro de etidio o Tinción con plata, la cual tiene mayor sensibilidad (Gottlieb y Chavko, 1987).

**Tinción con Bromuro de etidio:** Se prepara una solución de Bromuro de Etidio 0.5 µgr/ml en TBE 50 %, en la cual se sumerge el gel durante 1 hr. Posteriormente el gel se lava en el amortiguador TBE 50 %, una hora a 37 °C. Después, se observa en un transiluminador de luz ultra violeta de onda larga.

**Tinción de plata:** Se siguió el mismo método descrito por Gottlieb y Chavko (1987). Al terminar la corrida electroforética, el gel se fija 30 min en 100 ml de metanol:agua:ácido acético:glicerol (5:5:1:0.25) y Tritón X-100 añadido a una concentración final de 0.25 %.

El gel se coloca sobre una hoja de polietileno cubierta con papel Wathman 3MM humedecido con la solución anterior; sobre el gel se colocan varias capas de papel secante bajo 500 gr de peso durante 20 min.

El papel secante se sustituye por otro y se coloca un peso de 1 Kg, durante 30 min. Terminado el tiempo, se retira el peso y las hojas de papel secante, dejando secar el gel 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se lava 2 veces con 0.5 % de Tritón X-100 en agua destilada, de 15 minutos cada lavado y en agua destilada 1 min. El gel se tiñe en 100 ml de dos volúmenes iguales de las soluciones A y B:

Sol. A

0.5 % Carbonato de sodio

Sol. B

0.2 % Nitrato de plata

0.2 % Nitrato de amonio

1 % Ac. Tungstosilico

0.3 % Formaldehido

La solución se prepara momentos antes de teñir el gel y ambas soluciones son estables dos semanas en refrigeración. Una vez preparada la solución, se sumerge el gel de 20 a 30 minutos o hasta que las bandas sean visibles.

La reacción se detiene al transferir el gel a la solución fijadora 10 min y lavar en agua destilada. Se observa el gel con un transiluminador de luz blanca.

### 1.3 PREPARACION DEL ADN

Para estudiar los cromosomas en ECEA, se han desarrollado procedimientos para la lisis celular sin dañar el ADN, considerando la fragilidad esperada para moléculas de ADN intactas de casi 10,000 Kpb de longitud.

Trofozoítos de Entamoeba histolytica cepa HM-1 : IMSS y E. histolytica tipo Laredo: Se siguió el método desarrollado por Schwartz y Cantor (1984) para levaduras, con algunas modificaciones, basadas en el monitoreo de la integridad de la muestra en observaciones al microscopio y recuperación del ADN en electroforesis convencional.

Se utilizaron cultivos crecidos a fase logarítmica tardía en 750 - 800 ml de medio PEHPS, para crecimiento en suspensión.

El ADN se obtuvo con la lisis de los trofozoítos suspendidos en agarosa sólida y posteriormente se colocan estos bloques dentro de los pozos del gel antes de la electroforesis. Los trofozoítos se lavan dos veces en EDTA y se adicionan 500 µl de agarosa 1 % de bajo punto de fusión (BRL) en 0.125 M de EDTA (pH 7.5). Esta mezcla se mantiene a 38 °C, después se vacía en unos moldes y se deja enfriar.

Estos bloques se incubaron a 50 °C aproximadamente 18 hrs en 0.01 M de Tris, 0.5 M de EDTA, 1.5 % de Lauroyl sarcosine (pH 9.5) y 2 mgr/ml de Proteinasa K.

Las muestras se lavan y almacenan en 50 mM de EDTA a 4 °C. A diferencia de lo que ocurre en levadura, después de tres semanas de que se prepara la muestra se observa un alto grado de degradación, por lo que las muestras deben utilizarse entre ese lapso.

#### 1.4 MARCADORES DE PESO MOLECULAR

Saccharomyces cerevisiae cepa YNN295, Candida albicans y Schizosaccharomyces pombe cepa CF18, preparadas según el método de Schwartz y Cantor (1984): El método se inicia con la preparación de esferoplastos con Zymolasa, en agarosa 1 % de bajo punto de fusión en EDTA 0.125 M, pH 7.5. A los bloques fríos se

les adiciona Buffer LET (0.5 M EDTA, 0.01 M Tris, pH 7.5), además de 7.5 % de 2-mercaptoetanol. Se incuban toda la noche a 37 °C. De este modo se producen los esferoplastos y algo de lisis.

Los bloques posteriormente se incuban aproximadamente 18 hrs a 50 °C en NDS (0.01 M de Tris, 0.5 M EDTA, 1 % Lauroyl sarcosine (pH 9.5) y 2 mgr/ml de Proteinasa K. Los bloques pueden ser almacenados a 4 °C en EDTA 50 mM hasta dos meses.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSION

##### 1. Características resolutivas de los sistemas electroforéticos.

Para obtener la resolución de moléculas de ADN de tamaño cromosómico es necesario conocer las características de resolución del sistema para aplicarlas en el modelo de estudio y al mismo tiempo tener un intervalo de marcadores de peso molecular.

Inicialmente se intentó reproducir el patrón electroforético reportado de S. cerevisiae cepa YNN295 (Chu et al, 1986), la cual ofrece un intervalo de pesos moleculares de 260 a 1,300 Kpb (Tabla I). Los datos de esta tabla fueron obtenidos por comparación con multímeros lineares del bacteriofago lambda (Carle y Olson, 1984).

En la figura 8, se observa el patrón electroforético obtenido con esta cepa en las condiciones reportadas: 80 seg de pulso a 6 V/cm durante 48 hrs, en un gel al 1 % de agarosa. El patrón obtenido con el sistema OFAGE (Fig 8A) presenta resueltos los cuatro cromosomas más pequeños, cuyos pesos moleculares se encuentran señalados en la misma figura. La figura 8B muestra lo obtenido con el sistema CHEF, en donde se separaron dos cromosomas más, presenta el límite de resolución en 700 Kpb. Por la intensidad de tinción observada en la parte superior del gel, se considera que en esa región se encuentran acumuladas las moléculas más grandes que no pudieron resolverse en estas condiciones.

El patrón electroforético obtenido, no fue semejante al reportado en ninguno de los sistemas utilizados. Esto puede ser resultado del efecto de las variables que intervienen durante la corrida electroforética, como pueden ser el tipo y concentración

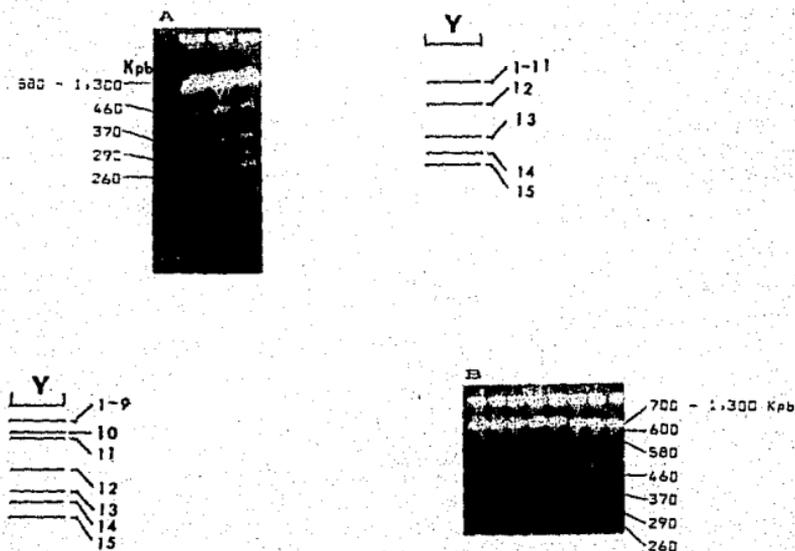


Fig 8. Patrón electroforético de Saccharomyces cerevisiae cepa YNN295.

A. Sistema OFAGE

B. Sistema CHEF

Ambos con 80 seg de pulso, 6 V/cm, 48 hrs. Las células fueron tratadas como reportan Schwartz y Cantor (1984). Tinción con Bromuro de etidio, descrita en materiales y métodos. En la representación esquemática las bandas se numeraron de acuerdo a la tabla I.

de agarosa, o a efectos de la movilidad de las moléculas de acuerdo a la concentración del ADN total en la muestra. A través de los resultados obtenidos en el laboratorio se observó que una de las variables de mayor efecto en la movilidad del ADN es la temperatura. De acuerdo a esto el patrón electroforético puede variar, ya que con el aumento de la temperatura, se aumenta la velocidad de las moléculas y disminuye la resolución. De manera que aún dentro del mismo sistema pueden haber problemas de reproducibilidad de un experimento a otro. Esto puede explicar los resultados, pero también pueden ser considerados otros factores experimentales.

En estas mismas condiciones, pero durante un tiempo de corrida mayor (de 48 a 144 hrs), el patrón electroforético no varió en cuanto a número de bandas resueltas, pero si se observó mayor distancia de separación entre las mismas.

Además de tener S. cerevisiae cepa YNN295 como marcador, se utilizó Candida albicans y Schizosaccharomyces pombe cepa CF18, los cuales poseen un ADN cromosómico de mayor longitud que S. cerevisiae.

En C. albicans, la molécula de ADN cromosómico más pequeña tiene una longitud de 1.200 Kpb y la banda más grande de 5.000 Kpb (Snell y Wilkins, 1986; Fincham, 1979) y en S. pombe cepa CF18, levadura que generalmente presenta en estado haploide, tres cromosomas nucleares (Kohli et al, 1977; Umesono et al, 1983), algunas presentan un cuarto minicromosoma, que puede perderse fácilmente (Niwa et al, 1986; Finchman, 1979). Se han calculado los tamaños de éstos cromosomas por tinción relativa y por medio de la utilización de ECEA (Smith et al, 1987a) Tabla II.

La utilización de estos organismos como marcadores de peso molecular era necesaria para la obtención del cariotipo de el modelo de estudio, ya que no se tenía ningún dato en cuanto al tamaño y número de los cromosomas.

Tabla I. Peso molecular de los cromosomas de Saccharomyces cerevisiae calculados por comparación con multímeros lineales del bacteriofago lambda en ECEA (Lawrance et al, 1987; Chu et al, 1986).

Número	Longitud kpb	Posición del gel (hacia abajo)
IV	1,300	1
XV	1,250	2
VII	1,200	3
XVI	1,100	4
XIII	1,050	5
II	920	6
XIV	870	7
X	820	8
XI	700	9
VIII	600	10
V	580	11
IX	460	12
III	370	13
VI	290	14
I	260	15

Tabla II. Pesos moleculares de los cromosomas de Schistosaccharomyces pombe calculados por tinción relativa y ECEA.

Número	Longitud kpb
III	9,000
II	6,000
I	3,000
Mini-cromosoma	300-500

Para lograr la resolución de moléculas en un intervalo de 260 a 9.000 Kpb fue necesario variar las condiciones electroforéticas tales como la concentración de agarosa, el pulso, el voltaje aplicado y la duración de la corrida.

La concentración de agarosa se disminuyó de 1 % a 0.8 % para evitar que moléculas muy grandes queden atrapadas o se rompan al entrar a los poros de la agarosa, con lo que las bandas se observarían más definidas.

Existen varios modelos que intentan explicar el mecanismo de reorientación del ADN en ECEA, los cuales proponen métodos de selección de las condiciones electroforéticas de acuerdo al tamaño de molécula que se desea separar, pero no pueden ser generalizados a todos los sistemas electroforéticos diseñados.

Uno de éstos es el reportado por Smith et al. (1987a) en el que de acuerdo a la longitud de la molécula que se desea separar, se puede predecir el tiempo de reorientación de la misma y en consecuencia se puede conocer el pulso a utilizar de acuerdo a la fuerza de campo.

Con este método de selección de variables reportado por Smith et al. (1987a) aplicado en los sistemas electroforéticos utilizados en este estudio se obtuvo la resolución esperada, por lo que fue necesario variar las condiciones bajo las siguientes consideraciones:

- 1) Las moléculas a separar son de 260 a 9.000 Kpb, por lo que las más pequeñas requieren pulsos cortos y las más grandes, pulsos largos. En términos del tiempo de reorientación requerido por las moléculas de ADN y el tiempo de migración a través del gel dentro de un ciclo de alternancia de la dirección del campo eléctrico. Por lo que, si en una corrida electroforética, se emplea un intervalo de pulsos apropiados para resolver todos los tamaños de una población de moléculas, es posible obtener toda la

gama de pesos moleculares utilizados como marcadores. Este es importante para iniciar el estudio de E. histolytica, ya que no se conoce el tamaño de las moléculas cromosómicas que presenta.

2) Las observaciones anteriores indican que las corridas electroforéticas llevadas a cabo en condiciones de alta voltaje, producen artefactos que afectan la movilidad de las moléculas y se pierde la resolución de las mismas. Por lo que para poder separar el mismo tamaño de moléculas, que se resuelven a fuerzas de campo elevadas, con la utilización de bajo voltaje el pulso debe incrementarse. En estas condiciones el límite de resolución puede aumentar si se disminuye el voltaje de acuerdo al aumento del pulso.

3) Por último, en estas condiciones de bajo voltaje, el tiempo de corrida debe ser incrementado de varios días a semanas.

Así, se variaron las condiciones experimentales de manera que, si con 80 seg de pulso se obtuvo una resolución de 580 y 700 Kpb en el sistema OFAGE Y CHEF respectivamente, puede variarse el pulso de manera que la resolución de las moléculas pequeñas no se afecte y que además se puedan separar otras moléculas de mayor longitud.

La primera consideración, se pudo comprobar, como se observa en la figura 9, al utilizar pulsos de 5 y 20 min a voltaje constante (4 V/cm), durante 72 hrs. En esta figura se observa el resultado de la conjunción de dos pulsos, con lo cual se pudieron resolver los cromosomas más grandes de S. cerevisiae cepa YNN295, al igual que los más pequeños de C. albicans. No pudo obtenerse resolución en S. pombe cepa CF18, cuyo material genético presenta degradación.

El efecto de la utilización de estos pulsos, es importante pues permitió obtener resolución de moléculas de hasta 5,000 Kpb.

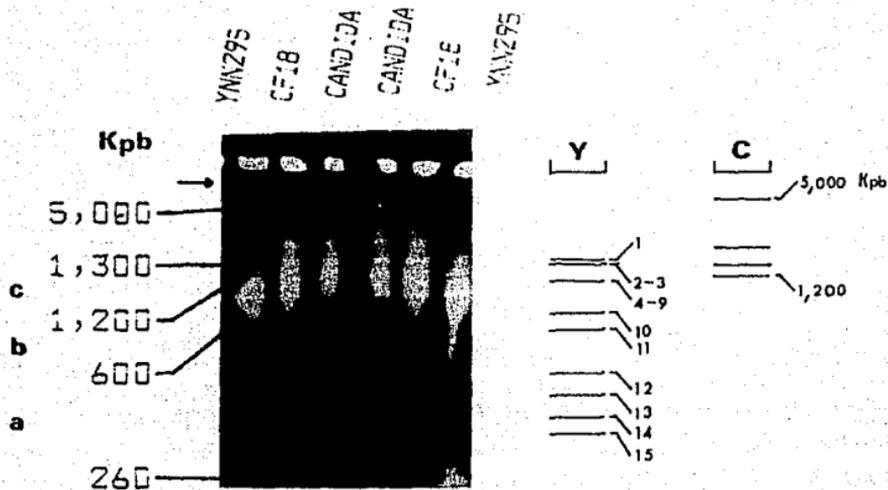


Fig 9. Patrón electroforético obtenido de los marcadores de peso molecular.

Se muestra el efecto de los pulsos utilizados sobre las moléculas de acuerdo a su longitud. Las condiciones empleadas fueron: 5 y 20 min de pulso a 4 V/cm, 72 hrs.

Se observan tres zonas de resolución diferencial:

a) Zona de resolución de las moléculas pequeñas de S. cerevisiae cepa YNN295, en un intervalo de 260 a 600 Kpb.

b) Zona de poca resolución, en esta área se encuentran concentradas las moléculas de 600 a 1,200 Kpb.

c) Zona de resolución, se pueden separar las moléculas más grandes de las levaduras de 1,250 y 1,300 Kpb.

La región señalada con una flecha indica el tipo de artefacto presente cuando el pulso es muy largo. Tinción con bromuro de etidio.

Al analizar el patrón electroforético de cada una de las muestras, se hicieron evidentes tres zonas de diferente resolución. De abajo hacia arriba, son: (a) Zona de mayor resolución, en la cual se separaron los cromosomas de S. cerevisiae cepa YNN295 de 260 a 600 Kpb. (b) Una zona pequeña de poca resolución donde se encuentran los cromosomas de 600 a 1,200 Kpb de esta misma cepa y (c) un área de mayor resolución donde se pueden observar los dos cromosomas más grandes de S. cerevisiae, de 1,250 y 1,300 Kpb hasta el límite superior de C. albicans, donde se puede situar una longitud de 5,000 Kpb.

Esta resolución diferencial puede deberse a la variación del pulso, de manera que para poder resolver mejor la zona b, sería necesario emplear un pulso entre 5 y 20 min o aumentar el tiempo de corrida con lo que se provocaría que éstas moléculas entraran dentro de la zona a.

En esta misma figura, en la región señalada con una flecha cercana a los pozos, se observa un efecto producido por la aplicación de pulsos muy largos, los cuales provocan que la electroforesis se lleve a cabo como una electroforesis convencional, sólo que primero en una dirección y luego en otra (Ver Fig 2).

Para fines prácticos, es de mayor utilidad la variación del pulso aplicado que el aumento del tiempo de corrida. De acuerdo a ésto, se variaron los pulsos a 2 a 10 min con voltaje constante, los resultados se muestran en la figura 10. En éste experimento se incluyeron trofozoitos de E. histolytica cepa HM-1.

En ésta electroforesis, no se obtuvo una zona de resolución arriba de las 1,200 Kpb (Zona c) y la zona de baja resolución b aumentó de grosor en S. cerevisiae cepa YNN295; pero en C. albicans se observa el patrón electroforético reportado y en esta misma región se encuentra la mayor parte del material genético de E. histolytica entre 1,200 y 5,000 Kpb.

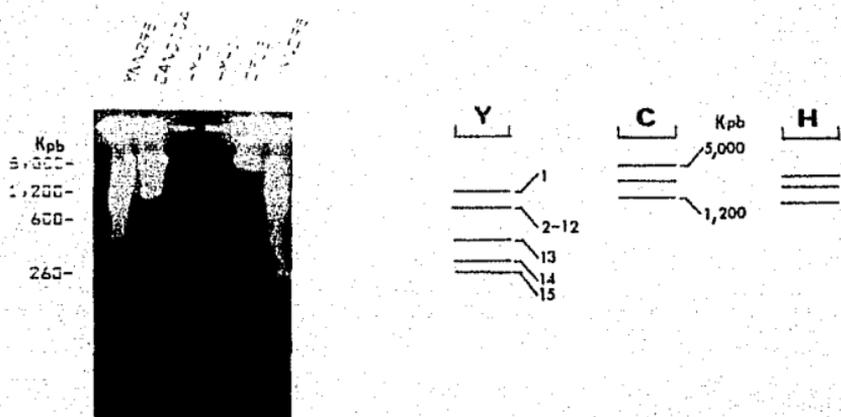


Fig 10. Efecto de la disminuci3n de los pulsos empleados.

El pulso se disminuy3 a 2 y 10 min a voltaje constante 4 V/cm y 72 hrs, con lo que se observan dos zonas de resoluci3n diferencial. Se puede observar en estas condiciones el patr3n electrofor3tico reportado de Candida albicans, aunque no se pudo obtener mayor resoluci3n en S. cerevisiae cepa YNN295. El ADN de E. histolytica cepa HM-1 se prepar3 con el m3todo de Schwartz y Cantor (1984) para levaduras y puede localizarse entre 1,200 y 5,000 Kpb. Tinci3n con bromuro de etidio.

El hecho de observar el material genético de E. histolytica en esa región de acuerdo al patrón electroforético de C. albicans y para evitar el efecto de barrido resultado de la movilidad de las moléculas bajo una fuerza de campo elevada, se decidió bajar el voltaje de acuerdo al aumento de los pulsos, según la segunda consideración mencionada.

Antes de intentar nuevamente con E. histolytica, se probó el efecto del voltaje, junto con tres pulsos diferentes en una misma corrida. Los resultados se observan en la figura 11, en ella se muestra una resolución homogénea en todos los intervalos de tamaños, aunque las bandas no se encuentran lo suficientemente separadas entre ellas, lo cual se debe a el tiempo de duración de la corrida. Por lo que era necesario comprobar la tercera consideración sobre el efecto del tiempo de corrida.

Dado que se tenía un intervalo de pulsos y de fuerzas de campo apropiadas para la resolución de moléculas de 260 a 5,000 Kpb y a que por resultados preliminares se podía colocar las moléculas de ADN cromosómico de E. histolytica dentro de este intervalo de pesos moleculares se decidió iniciar el estudio de E. histolytica.

## 2. Moléculas de ADN de tamaño cromosómico de Entamoeba histolytica

De acuerdo a los resultados mostrados en la figura 10, en donde se observan bandas muy débiles de material genético de E. histolytica, las cuales apenas se detectaron por medio de la tinción con bromuro de etidio, fue necesario mejorar la preparación del ADN cromosómico ya que se preparaba con el mismo método que para levaduras y alternativamente desarrollar otro método de tinción más sensible, como la tinción de plata en gel de agarosa (Gottlieb y Chavko, 1987).

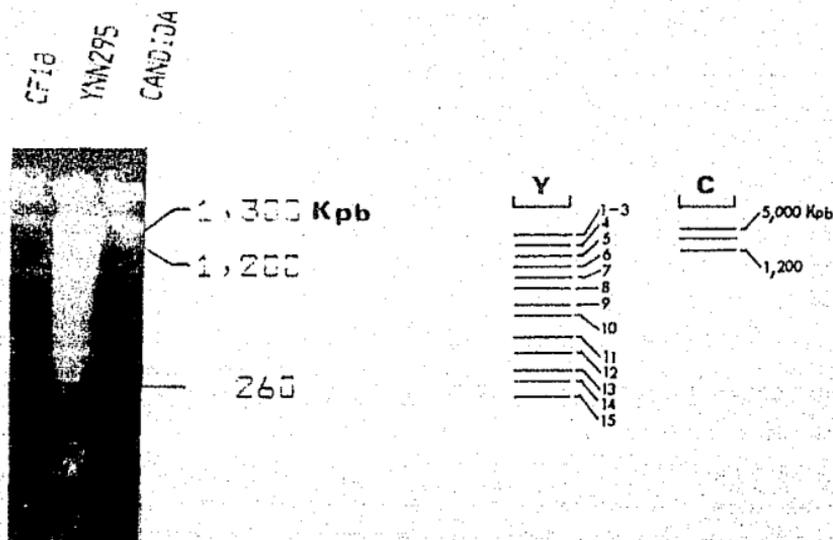


Fig 11. Efecto de la utilización de tres pulsos y bajo voltaje.

Se conjuntaron 2, 5 y 10 min de pulso a 4, 3 y 2 V/cm durante 68 hrs. Al disminuir el voltaje de acuerdo al pulso, se obtiene una resolución homogénea, aunque disminuye la distancia entre las bandas, con lo que debe aumentarse el tiempo de la corrida. Tinción de bromuro de etidio.

El método de obtención del ADN de E. histolytica se optimizó, hasta obtener el que se reporta en la sección de materiales y métodos y se monitoreó por medio de observaciones en microscopio para determinar la integridad de los trofozoitos durante el tratamiento y también por la recuperación del ADN en electroforesis convencional. Con este método es posible utilizar las muestras después de tres semanas de haberlas obtenido, almacenadas a 4 °C en EDTA 50 mM.

Simultáneamente se desarrolló el uso de la técnica de tinción de plata en geles de agarosa, con la cual pudo visualizarse el ADN de E. histolytica.

Los experimentos anteriores demostraron la existencia de una región de alta resolución  $\alpha$  (Fig 9) la cual puede ser alcanzada por moléculas de alto peso molecular por medio del incremento en los pulsos y la disminución de la fuerza del campo. Este conocimiento se aplicó para la resolución del ADN cromosómico de E. histolytica.

Los resultados obtenidos con E. histolytica cepa HM-1 se muestran en la figura 12, esta es la primera evidencia de la presencia de moléculas de ADN de tamaño cromosómico en E. histolytica. La cepa HM-1 presenta, una gran sensibilidad al método de obtención del ADN, que se refleja en el alto grado de degradación, problema que podría ser eliminado al mejorar aún más las condiciones de preparación de la muestra.

La intensidad de tinción observada a la altura de 5,000 Kpb en S. cerevisiae en la misma figura 12, puede ser el resultado de la acumulación de material genético atrapado en la matriz del gel, debido a una movilidad anómala en cierto tipo de estructura adoptada por el ADN al entrar al gel.

En E. histolytica se pueden ver seis bandas (Fig 12), que varían entre 1,200 y 5,000 Kpb de peso molecular y por la

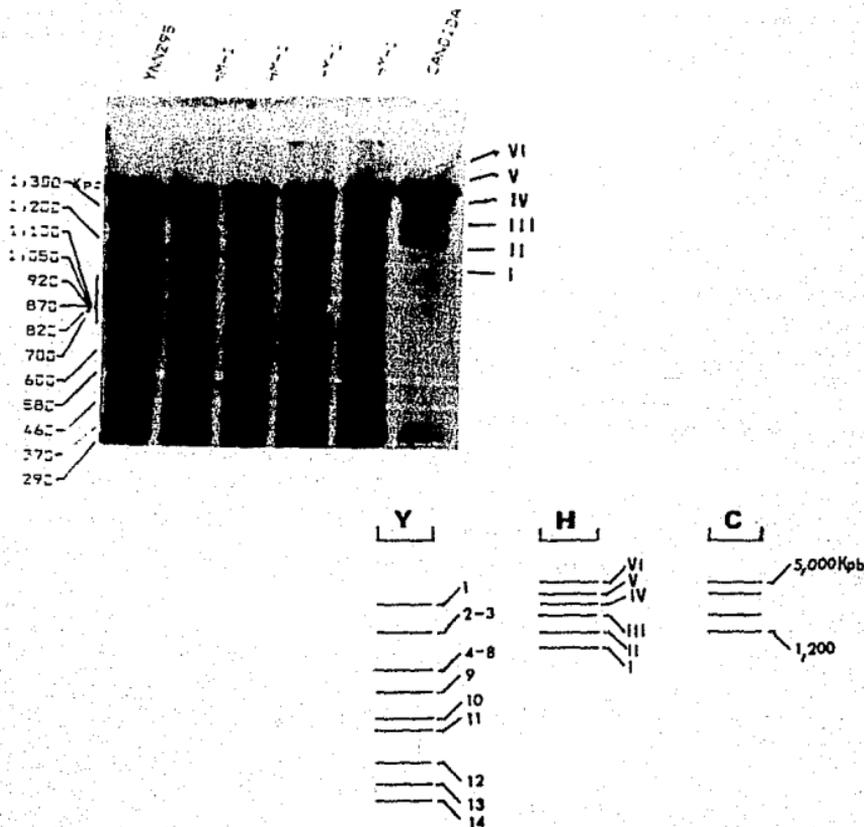


Fig 12. Patrón electroforético de Entamoeba histolytica HM-1:IMSS.

En las mismas condiciones del experimento mostrado en la figura 11, con una duración de la corrida de 120 hrs. En la parte superior del carril de S. cerevisiae cepa YNN295 se observa una banda donde se quedaron atrapadas algunas moléculas. En E. histolytica cepa HM-1, se resolvieron seis bandas cuyos pesos moleculares calculados de acuerdo a los marcadores de peso molecular son (de abajo hacia arriba): I. 1,100 Kpb; II. 1,150 Kpb; III. 1,250 Kpb; IV. 1,300 Kpb; V. 1,350-Kpb y VI. 5,000 Kpb. Tinción de plata.

intensidad de tinción de cada banda resuelta, se pueden identificar cuatro bandas sencillas y dos bandas que pueden contener varias moléculas, una de ellas a la altura de 1,200 pb y la otra en la parte superior de los carriles donde se encuentran las moléculas de mayor longitud que no pudieron ser resueltas.

Bajo las mismas condiciones electroforéticas en que se obtuvo el patrón electroforético de la cepa HM-1 se obtuvo el patrón de E. histolytica tipo Laredo, cuyos resultados se muestran en la figura 13. La cual presenta diferencias con el patrón obtenido con la cepa HM-1. Esta cepa presenta únicamente tres bandas, dos de ellas sencillas y la tercera banda que muestra a las moléculas no resueltas (Ver Figs 12 y 13).

En este organismo los problemas de degradación no son tan graves como en la cepa HM-1. De cualquier manera los resultados obtenidos hasta este momento son reproducibles en ambas cepas, los cuales se pueden mejorar para obtener la resolución de las bandas-cromosomas más grandes.

De cualquier manera la obtención de estos cariotipos moleculares parciales, proporcionan una base para estudios posteriores en E. histolytica de índole genética, de identificación o de diagnóstico.

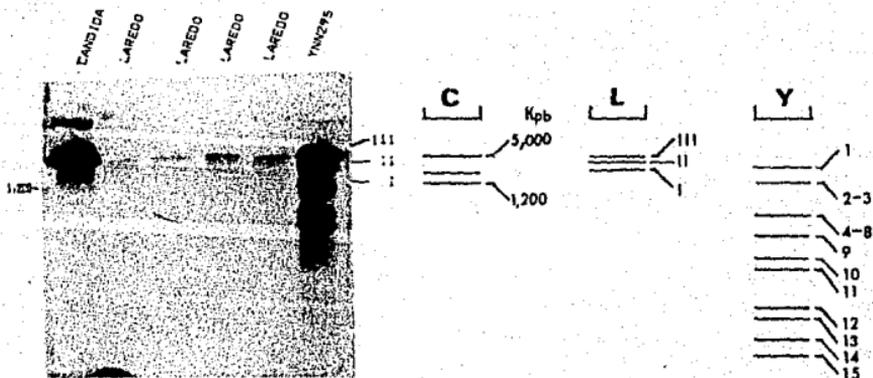


Fig 13. Patrón electroforético de *Entamoeba histolytica* tipo Laredo.

Las condiciones electroforéticas fueron las mismas de la figura 12. Se observan tres bandas-cromosomas en *E. histolytica* tipo Laredo señalados con los numeros I, II y III los pesos moleculares equivalen a los señalados como IV, V y VI de *E. histolytica* HM-1 en la figura 12. Tinción de plata.

## V. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede decir que el tamaño de las especies de ADN de mayor longitud que se resuelven se incrementa cuando se aumentan los pulsos (Figs 9 y 10). Al utilizar fuerzas de campo elevadas se observan bandas barridas. No se sabe si esto se debe a que las moléculas grandes se rompen al entrar a los poros del gel, pero sí que ocurre preferencialmente al utilizar voltajes altos y cuando se tiene una población heterogénea de moléculas (Mathew et al, 1988). En general se requiere la utilización de bajo voltaje para obtener moléculas de ADN de longitud de megabases en bandas definidas y bien resueltas (Smith et al, 1987a; Vollrath y Davis, 1987).

Para resolver el mismo tamaño de moléculas a bajo voltaje, que las resueltas a voltajes altos, es necesario aumentar el pulso. Esta variación del pulso con respecto al voltaje es totalmente empírica actualmente, aunque algunos autores reportan que pueden utilizarse combinaciones de fuerzas de campo y pulso, que mantengan aproximadamente constante el producto de estos valores (Vollrath y Davis, 1987). De manera que, a una fuerza de campo dada el intervalo de tamaños de moléculas de ADN separadas lo proporciona el pulso seleccionado, y así mismo se obtiene también, un compromiso con el tiempo de duración de la corrida. De manera que la utilización de voltajes bajos necesarios para evitar el barrido o falta de resolución de moléculas de ADN, requiere una duración de la corrida de varios días a semanas.

Además de la pérdida de artefactos electroforéticos, otra ventaja que aporta la utilización de fuerzas de campo bajas es que la temperatura deja de ser un factor importante en las electroforesis, con lo que se obtiene mayor reproducibilidad en los experimentos.

La resolución diferencial observada sugiere la acción de diferentes mecanismos de resolución en cada sección del gel, debidos al voltaje y pulso empleados. En las regiones a y c de la figura 9, se observa claramente la relación del peso molecular sobre el tiempo requerido para la reorientación de la molécula, al cambiar la dirección del campo eléctrico, como ha sido propuesto por Schwartz y Cantor (1984). Las moléculas en estas regiones emplean gran cantidad del pulso en su reorientación y sólo un poco de tiempo en migrar a través del gel. La diferencia entre estas dos zonas se debe a la utilización de un voltaje alto en la zona a (4 V/cm) lo cual provoca un efecto de barrido y distorsión de las bandas, y un menor voltaje en c (2 V/cm). Se ha observado que el empleo de un voltaje alto al inicio de la corrida provee mejores resultados en la entrada del material a los poros del gel, pero en términos de resolución sobre todo de moléculas grandes se recomienda usar voltajes bajos. En la región b (Ver Fig 9), las moléculas se reorientan quizá muy rápidamente en el intervalo de pulso, por lo que se obtiene poca resolución. Se supone, que la separación de las moléculas de ADN ocurre cuando el tiempo de reorientación de las moléculas es menor que el pulso. De manera que las bandas observadas en la parte superior de los carriles de E. histolytica y C. albicans en las figuras 8 a 13, a la altura de 5,000 Kpb contienen todas las moléculas con tiempos de reorientación más largos que el pulso empleado.

Existe un límite de resolución proporcionado por la fuerza del campo eléctrico y el pulso utilizados, cuando se mantienen constantes la temperatura y la concentración de la agarosa, y por arriba de este límite, las moléculas no se resuelven. Por ejemplo, a fuerzas de campo normalmente utilizadas para la separación de las moléculas menores de 2 Mpb, las moléculas de S. pombe cepa CF18 no se resuelven y quedan atrapadas como se observa en la figura 10. Esto mismo puede ser aplicado al material que no ha podido resolverse en E. histolytica y C. albicans como se muestra en la misma figura.

Existen varios modelos que intentan proporcionar una explicación cuantitativa de esta técnica de acuerdo al tiempo de reorientación que ocupan las moléculas del ADN, al cambiar la dirección del campo eléctrico (Slater y Noolandi, 1986; Viovy, 1987; Southern et al. 1987 y Deutsch, 1987). Otros autores proponen bases teóricas de la resolución del ADN cromosómico. basados en el tiempo de reorientación y migración en relación al pulso y voltaje aplicados (Mathew et al. 1988; Cantor et al. 1988 y Smith et al. 1987a y b). Pero hasta el momento ninguno de ellos puede explicar totalmente la fisicoquímica del método de ECEA. La mayoría de los datos concuerdan en que las moléculas adoptan configuraciones altamente extendidas pero el mecanismo de reorientación permanece sin esclarecer. Por lo que es un método azaroso, aún en la determinación y selección de las condiciones experimentales para obtener la resolución deseada.

De cualquier manera los datos presentados aquí deben contribuir al conocimiento de la técnica de ECEA.

Dado que el tamaño del genoma de los organismos varía desde 4 millones de pares de bases de Escherichia coli hasta 3,300 millones de pares de bases de un mamífero típico, tener un ADN de tamaño cromosómico intacto o en fragmentos grandes es de gran ayuda para la realización de estudios de genética y de ADN recombinante.

La importancia de la técnica de ECEA, se hace evidente con la obtención de cariotipos moleculares de organismos de importancia como es el caso de E. histolytica. En este caso la técnica de ECEA resuelve 6 bandas de tamaño cromosómico en la cepa HM-1 (Fig 12) y 3 en E. histolytica tipo Laredo (Fig 13). Siendo esta la primera evidencia de la presencia de moléculas de tamaño cromosómico en E. histolytica, aunque no se obtuvo el cariotipo molecular completo, el cual puede ser resuelto al utilizar diferentes condiciones electroforéticas, para posteriormente identificar los cromosomas.

La técnica de ECEA ha sido utilizada en la identificación, clasificación y diagnóstico clínico de varios protozoarios parásitos (Holmes et al. 1986; Walliker et al. 1987; Van der Ploeg et al. 1985; Corcoran et al. 1986; Engman et al. 1987 y Van der Ploeg et al. 1984), lo que aumenta en gran escala la importancia del método. En este sentido, la aplicación de esta técnica en el grupo de Entamoeba puede proporcionar información útil en la clasificación, actualmente se clasifican únicamente por el número de núcleos en el quiste maduro, por comparación de los cariotipos y pueden ser una herramienta útil para el conocimiento de las características responsables de la variabilidad observada inter-cepas similar a la reportada en otros protozoarios parásitos.

Este es el caso de E. histolytica tipo Laredo, aislada del tracto digestivo humano, morfológicamente idéntica a E. histolytica a nivel de microscopio, pero con diferencias genotípicas y fenotípicas importantes como es su habilidad para crecer a temperatura ambiente y en condiciones extremas de hipotonicidad. A ésto se añade el hecho de que son no patogénicas lo cual, podría acercarlas filogenéticamente a E. moshkovskii, con la diferencia de que éstas son de vida libre. Otras investigaciones bioquímicas (Reeves y Bischoff, 1966) muestran una relación cercana entre E. histolytica tipo Laredo y E. moshkovskii.

De especial significado taxonómico en cuanto a las diferencias genotípicas entre E. histolytica y E. histolytica tipo Laredo, es el bajo grado de homología de secuencias repetitivas del ADN de E. histolytica HM-1 con el ADN de E. histolytica tipo Laredo (Battacharya et al. 1988).

Los estudios reportados aquí, basados en la obtención de un cariotipo molecular parcial, proveen fuerte evidencia para la separación de E. histolytica tipo Laredo de E. histolytica a nivel de especie, ya que las diferencias en el cariotipo

mostrado, pueden considerarse, como otra evidencia de diferencias a nivel de genotipo.

El análisis de los cariotipos moleculares obtenidos en el presente estudio, muestra que E. histolytica tipo Laredo presenta un número menor de bandas resueltas, lo cual apoya la evidencia de que este organismo presenta cinco veces menos cantidad de ADN que E. histolytica típica (Martínez-Palomo, 1982).

Los cariotipos de miembros de diferentes especies pueden distinguirse uno de otro y posiblemente puedan ser observadas diferencias en el cariotipo obtenido en ECEA de varias cepas de E. histolytica, lo cual tendría gran utilidad en el diagnóstico y en el estudio de la variabilidad observada en los miembros de E. histolytica, ya que esto permitiría identificar los cariotipos causantes de esta variabilidad y si éstos se producen por medio de rearrreglos cromosómicos o deleciones con pérdida del material genético o por la falta de una presión selectiva, lo cual podría permitir fluctuaciones en el ADN repetitivo.

Es necesario aumentar el número de cepas analizadas por medio de ECEA, para la identificación de los polimorfismos, esto reafirmaría su validés taxonómica y sería interesante esclarecer si los cariotipos moleculares pueden ser correlacionados con el grado de patogenicidad de diferentes cepas de E. histolytica.

APENDICE

Modificando las condiciones electroforéticas de pulso y voltaje de manera que se pudieran resolver todas las bandas reportadas en S. cerevisiae cepa YNN295 y C. albicans se obtuvieron los resultados mostrados en la figura 14.

En ella se observa una resolución homogénea, es decir no hay zonas de diferente separación, por lo que pueden separarse todas las bandas de los marcadores de peso molecular utilizados.

Las condiciones empleadas se seleccionaron de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio. Los pulsos se aumentaron gradualmente y al mismo tiempo se disminuyó el voltaje. Así, inicialmente se utilizó un pulso de 2 min con una fuerza de campo de 4 V/cm, condiciones en las que se esperaba obtener la resolución de las moléculas de menor peso molecular. La separación de las moléculas más grandes se obtuvo al utilizar un pulso de 15 min y 1 V/cm dentro de la misma corrida electroforética. En estas condiciones de bajo voltaje la duración de la corrida se aumentó a 12 días.

El patrón electroforético de los organismos utilizados como marcadores de peso molecular es igual al reportado, pero como puede verse en la figura 14 el cariotipo obtenido de C. albicans es parcial, es decir quedan por resolver algunas bandas.

En esta misma figura se observa el patrón electroforético de E. histolytica tipo Laredo, el cual no presenta diferencias en cuanto a número de bandas con el presentado en la figura 13.

Por los resultados obtenidos en esta cepa, se puede decir que se han encontrado las condiciones ideales para resolver las bandas-cromosomas de las diferentes cepas de E. histolytica.

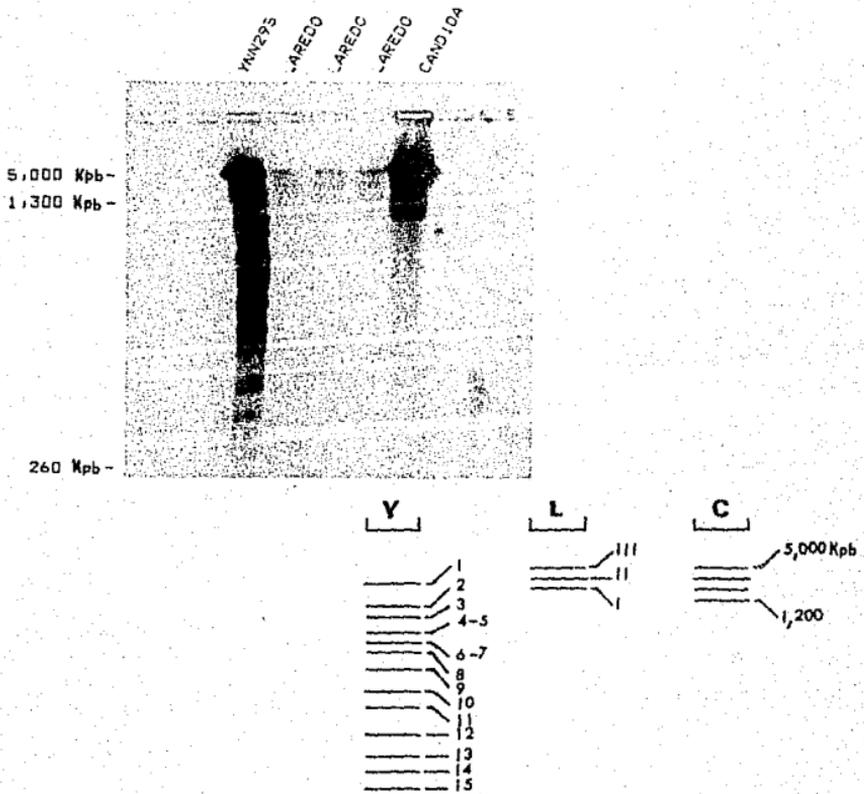


Fig 14. Obtención del patrón electroforético completo de *S. cerevisiae* cepa YNN295.

Las condiciones fueron las siguientes: Pulsos 2, 3.5, 5, 10 y 15 con 4, 2, 2, 2.5, 1.8 y 1 V/cm, con una duración de la corrida de 12 días. Se observan los cariotipos reportados de los marcadores de peso molecular *S. cerevisiae* cepa YNN295 y *C. albicans*. Se observa el patrón electroforético de *E. histolytica* tipo Laredo mostrado en la figura 13, con mejor separación de las bandas. Por lo que las condiciones de separación del grupo de las Entamoeba han quedado establecidas. Tinción de plata.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Adam, R.D., Nash, T.E. y Welles, T.E. (1988) The Giardia lamblia trophozoite contains sets of closely related chromosomes. Nucl. Acids. Res. 16:10, 4555-4567.
2. Alagón, C.A., y Posani, P.L. (1983) Electroforesis en Mensaje Bioquímico. Depto. de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM. Vol. VI p227-272.
3. Aley, S.B., Srott, W.A. y Cohn, Z.A. (1980) Plasma membrane of Entamoeba histolytica. J. Exp. Med. 152, 391-404.
4. Annand, R. (1986) Pulsed field gel electrophoresis: a technique for fractionating long DNA molecules. Trends in Genet. 278-283.
5. Battacharya, S., Rattacharya, A. y Diamond, L.S. (1988) Comparison of repeated DNA from strains of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. Mol. Biochem. Parasitol. 27, 257-262.
6. Bell, L. y Byers, B. (1983) Separation of Branched from linear DNA by two-dimensional gel electrophoresis. Anal. Biochem. 130, 527-535.
7. Bernards, A., Kooter, J.M., Michels, P.A.M., Moberts, R.M. y Borst, P. (1986) Pulsed field gradient electrophoresis of DNA digested in agarose allows the sizing of the large duplication unit of a surface antigen gene in trypanosomes. Gene 42, 313-322.
8. Burke, D.T., Carle, G.F. y Olson, M.V. (1987) Science 236, 806-812.
9. Cantor, C.R., Gaal, A. y Smith, C.L. (1988) High-Resolution Separation and Accurate Size Determination in Pulsed-Field Gel Electrophoresis of DNA. 3. Effect of Electrical Field Shape.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Biochemistry, 27, 9216-9221.

10. Carle, G.F., Frank, M. y Olson, M.V. (1986) Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic Inversion of the electric Field. Science 232, 65-69.

11. Carle, G.F., y Olson, M.V. (1981) Separation of Chromosomal DNA Molecules from Yeast by Orthogonal field Alternate Gel Electrophoresis. Nucl. Acids. Res. 12:14, 5647-5664.

12. Carle, G.F. y Olson, M.V. (1985) An Electrophoretic Karyotype for Yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 3756-3760.

13. Cervantes, A. y Martínez-Palomo, A. (1980) Estudio del ciclo vital de Entamoeba invadens mediante cinematografía espaciada. Archivos de Investigación Médica. (México, 11, Suppl. 1, 31-40).

14. Chu, G., Vollrath, D. y Davis, R.W. (1986) Separation of Large DNA molecules by Contour-Clamped Homogeneous Electric Fields. Science 234, 1582-1585.

15. Collins, F.S., Drumm, M.L., Cole, J.L., Lockwood, W.K., Vande Wonde, G.F. y Iannuzzi, M.C. (1987) Construction of a General Human Chromosome Jumping Library, with Application to Cystic Fibrosis. Science 235, 1046-1049.

16. Cooper, T.G. (1977) The tools of Biochemistry. Wiley-Interscience publication. USA p194-233.

17. Corcoran, L.M., Forsyth, P.K., Bianco, E.A., Brown, G.V. y Kemp, D.J. (1986) Chromosome Size Polymorphisms in Plasmodium falciparum can involve deletions and are frequent in natural parasite populations. Cell 44, 87-95.

18. Deutsch, J.M. (1987) Phys. Rev. Lett. 59, 1255-1258.

19. Engman, D.M., Reddy, L.V., Donelson, J.E. y Kirchoff, L.V. (1987) Trypanosoma cruzi exhibits inter- and intra-strain heterogeneity in molecular karyotype and chromosomal gene location. Mol. Biochem. Parasitol. 22, 115-123.
20. Fangman, W.L. (1978) Separation of very large DNA molecules by gel electrophoresis. Nucl. Acids. Res. 5:653.
21. Faust, E.C., Russell, P.F. y Jung, R.C. (1974) Parasitología clínica. Ed. Salvat. México, p133-170.
22. Fincham, J.R.S. (1979) Fungal genetics 4a. Ed. Press. University of California.
23. Garvey, E.P. y Santi, D.V. (1986) Stable amplified DNA in drug-resistant Leishmania exist as extra chromosomal circles. Science 233, 535-540.
24. Gelderman, A.H., Bartgis, I.L., Keister, D.B. y Diamond, L.S. (1971a) A comparison of genome sizes and thermal-denaturation-derived base composition of DNAs from members of Entamoeba (histolytica group). J. Parasitol. 57:4, 912-916.
25. Gelderman, A.H., Keister, D.B., Bartgis, I.L. y Diamond, L.S. (1971b) Characterization of the deoxiribonucleic acid of representative strains of Entamoeba histolytica, Entamoeba histolytica like amoebae and Entamoeba moshkovskii. J. Protozool. 57:4, 906-911.
26. Gemmill, R.M., Coyle-Morris, J.F., McPeeK, F.D., Ware-Urbe, L.F. y Hecht, F. (1987) Construction of long-range restriction maps in human DNA using pulsed field gel electrophoresis. Gene Anal. Tech. 4, 191-131.

27. Gibson, W.C. y Miles, M.A. (1986) The karyotype and ploidy of Trypanosoma cruzi. EMBO J. 5:6, 1299-1305.
28. Gottlieb, M. y Chavko, M. (1987) Silver staining of native and denatured eucaryotic DNA in agarosa gels. Anal. Biochem 165, 33-37.
29. Hardy, D.A., Bell, J.S., Long, E.D., Lindsten, T. y McDevitt, H.D. (1986) Mapping of the class II region of the human major histocompatibility complex by pulsed-field electrophoresis. Nature 323, 453-455.
30. Holmes, G.S., Schittini, M., Keithly, J., Warburton, P.W., Cantor, C.R. y Vand der Ploeg, L.H.T. (1986) Karyotype analysis of Leishmania species and its use in classification and clinical diagnosis. Science 237, 762-765.
31. Kenwrick, S., Patterson, M., Speer, A., Fishbeck, K. y Davies, K. (1987) Molecular analysis of the Duchenne Muscular Distrophy Region using Pulsed Field Gel Electrophoresis. Cell 48, 351-357.
32. Klotz, L.C. y Zimm, B.H. (1972) Size of DNA determined by viscoelastic measurement: Results on Bacteriophages Bacillus subtilis and Escherichia coli. J. Mol. Biol. 72:779.
33. Kohli, J., Hattinger, H., Munz, R., Strauss, A. y Thuriaux, P. (1977) Genetics 87, 471-489.
34. Langsley, G., Sibill, L., Mattei, D., Falanga, P. y Mercereau-Pujalon, O. (1987) Karyotype comparison between P. chabaudi and P. falciparum: analysis of a P. chabaudi cDNA containing sequences highly repetitive in P. falciparum. Nucl. Acid. Res. 15:5, 2203-2211.

35. Larson, J.J., Nicholson, A.W. y Siegel, a. (1987) Field inversion of large DNA fragments using an inexpensive unit. *Biotechniques*, 5:3, 228-231.
36. Lawrance, S.K., Smith, C.L., Srivastava, R., Cantor, C.R. y Weissman, S.M. (1987) Megabase-scale mapping of the HLA gene complex by pulsed field gel electrophoresis. *Science* 235:13, 1387-1390.
37. Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, E.C., Poljansky, G., Sprague, U., Vayra, J. y Wallace, F.G. (1980) A newly revised classification of the Protozoa. *J. Protozool.* 27:1, 37-58
38. López-Revilla, R. y Gómez, R. (1978) Entamoeba histolytica, Entamoeba invadens and Entamoeba moshkovskii: Fluctuations of the DNA content of axenic trophozoites. *Exp. Parasitol.* 44, 243-248.
39. López-Revilla, R. y Gómez, R. (1986) Trophozoite and nuclear size, DNA base composition and nucleotide sequence homology in several *Entamoeba* species. *J. Protozool.*
40. Martínez-Palomo, A. (1982) The biology of Entamoeba histolytica. Research studies press. New York. pp161.
41. Mathew, M.K., Smith, C.L. y Cantor, C.R. (1988) High-Resolution Separation and Accurate Size Determination in Pulsed-Field Gel Electrophoresis of DNA. 2. Effect of Pulse Field Time and Electric Field Strength and Implications for Models of the Separation Process. *Biochemistry*. 27, 9210-9216.
42. Mathews, H.M., Moss, D.M. y Visvevara, G.S. (1986) Analysis of antigens from membrane and soluble fractions of Entamoeba histolytica. *J. Protozool.* 33:3; 328-334.

43. McLaughlin, J. y Aley, S. (1985) The biochemistry and functional Morphology of *Entamoeba*. *J. Protozool.* 32:2, 221-240.
44. McPeck, F.D.Jr., Coyle-Morris, J.F. y Gemmill, R.M. (1986) Separation of large DNA molecules by modified Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis. *Anal. Biochem.* 156, 274-285.
45. Mirelman, D. (1987) Ameba-Bacterium relationship in amebiasis. *Microbiol. Rev.* 51:2, 272-284.
46. Niwa, O., Matsumoto, T. y Yanagida, M. (1986) Construction of a mini-chromosome by deletion and its mitotic and meiotic behaviour in fission yeast. *Mol. Gen. Genet.* 203, 397-405.
47. Povstka, A., Pohl, T., Barlow, D., Frischaut, A.M. y Lehrach, H. (1987) Construction and use of human chromosome jumping libraries from Not-I digested DNA. *Nature* 325, 353-355.
48. Reeves, R.E. y Bischoff, J.M. (1969) Classification of *Entamoeba* species by means of electrophoretic properties of amebal enzymes. *J. Parasitol.* 54, 594-600.
49. Reeves, R.E., Lushbaugh, T.S. y Montalvo, F.E. (1971) Characterization of deoxyribonucleic acid of *Entamoeba histolytica* by cesium chloride density centrifugation. *J. Protozool.* 57:5, 939-944.
50. Richards, C.S., Goldman, M. y Cannon, L.T. (1956) Cultivation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba histolytica* like strains at reduced temperature and behaviour of the amebae in diluted media. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 15, 648-655.
51. Rickwood, D. y Hames, B.D. (1985) Gel electrophoresis of nucleic acids. A practical approach. Oirl press, Oxford, Washington, D.C. p1-59.

52. Schleif, R.F. y Wensink, P.C. (1981) Practical Methods in molecular Biology. Springer-Verlag. N.Y.
53. Schwartz, D.C., Saffran, W., Welsh, J., Hass, R., Holdenberg, M. y Cantor, C.R. (1983) New Techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging. Cold. Spring Harbor. Symp. Quant. Biol. 47, 189-195.
54. Schwartz, D.C. y Cantor, C.R. (1984) Separation of yeast chromosome sized DNAs by pulsed field gel electrophoresis. Cell 37, 67-75.
55. Serwer, P. (1981) Improvements in procedures for electrophoresis in dilute agarose gels. Anal. Biochem. 112:351.
56. Slater, G.W. y Noolandi, J. (1986) Biopolymers 25, 431-454.
57. Smith, C.L., Matsumoto, T., Niwa, O., Klco, S., Fan, J., Yanagida, M. y Cantor, C.R. (1987a) An electrophoretic karyotype for Schizosaccharomyces pombe by pulsed field gel electrophoresis. Nucl. Acids. Res. 15:11.
58. Smith, C.L., Econome, J. G., Schutt, A., Klco, S. y Cantor, C.R. (1987b) A physical map of the Escherichia coli K12 Genome. Science 236, 1448-1453.
59. Snell, R.G. y Wilkens, R.J. (1986) Nucl. Acids. Res. 14, 4401-4406.
60. Southern, E.M., Annand, R., Brown, W.R.A. y Fletcher, D.S. (1987) A model for the separation of large DNA molecules by crossed field gel electrophoresis. Nucl. Acids. Res. 15, 5925-5943.
61. Stewart, G., Furst, A. y Audalovic, N. (1988) Transverse alternating field electrophoresis. Product Application Focus,

Biotechniques 6:1.

62. Tinoco, I. Jr., Saver, K. y Wang, J.C. (1980) Fisicoquímica. Principios y aplicaciones en las ciencias biológicas. Prentice-Hall, Inc. Colombia.

63. Turmel, C. y Lalande, M. (1982) Resolution of Schizosacharomyces pombe chromosome by field inversion gel electrophoresis. Nucl. Acids. Res. 16:10.

64. Umesono, K., Hiraoka, Y., Toda, T., y Yanagida, M. (1983) Curr. Genet. 7, 123-128.

65. Vand der Ploeg, L.T.H., Schwartz, D.C., Cantor, C.R. y Borst Piet (1984) Antigenic variation in Trypanosoma brucei analysed by electrophoretic separation of chromosome sized DNA molecules. Cell. 37, 77-84.

66. Van der Ploeg, L.H.T., Smith, M., Ponnudurai, T., Vermeulen, A., Meuwissen, J.H.E.T. y Langsley, G. (1985) Chromosome-sized DNA molecules of Plasmodium falciparum. Science 229, 658-661.

67. Van Ommer, G.J.B., Verkirk, J.M.H., Hofker, M., Mónico, A.P., Kunkel, L.M., Ray, P., Worton, R., Weiringa, B., Bakker, E. y Pearson, P.L. (1986) Cell 47, 459-504.

68. Violy, J.L. (1987) Biopolymers 26, 1929-1940.

69. Vollrath, D. y Davis, R.W. (1987) Resolution of DNA molecules greater than 5 megabases by countour-clamped homogeneous electric fields. Nucl. Acids. Res. 15:19.

70. Walliker, D., Quakyi, I.A., Wellems, T.E., McCutchan, T.F., Szafrman, A., London, W.T., Corcoran, L.M., Burkot, T.R. y Carter, R. (1987) Genetic Analysis of the human Malaria Parasites Plasmodium falciparum. Science 236, 1661-1666.

71. Whittaker, R H. (1969) New concepts of kingdoms of organisms.  
Science 163. 150-160.