

304406



UNIVERSIDAD SIMON BOLIVAR

ESCUELA DE BIOLOGIA

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U. N. A. M.

CARIOTIPO Y MAPEO CROMOSOMICO DE GENES
EN Entamoeba histolytica MEDIANTE LA APLICACION
DE LA ELECTROFORESIS TRANSVERSAL DE
CAMPOS ALTERNOS (TAFE)

TESIS CON
FALLO SIMON

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A :

MARIA LLANELA GAMBOA HERNANDEZ

MEXICO, D. F.,

1992



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.
Índice	i
Índice de figuras	iii
Índice de tablas	iv
Terminología	v
Resumen	1
Introducción	3
Ciclo de vida	3
Clasificación taxonómica	6
Importancia de <i>E. histolytica</i> como productor de amibiásis	6
Distribución mundial de la amibiásis	7
Características del DNA amibiano	7
Aislamiento de DNA	10
Organización de la cromatina en <i>E. histolytica</i>	11
Elementos extracromosomales en <i>E. histolytica</i>	12
Cromosomas de <i>E. histolytica</i>	13
Electroforesis de gradiente en campo de pulsos	16
Electroforesis de gradiente en campo de pulsos en <i>Plasmodium sp.</i>	17
Electroforesis de gradiente en campo de pulsos en <i>Trypanosoma sp.</i>	19
Electroforesis de gradiente en campo de pulsos en <i>Leishmania sp.</i>	20
Electroforesis de gradiente en campo de pulsos aplicado en el DNA del hongo <i>Candida albicans</i>	22
Electroforesis de gradiente en campo de pulsos en <i>E. histolytica</i>	22

INDICE
(continuación)

pag.

Genes descritos en <i>E. histolytica</i>	24
Electroforesis transversal de campos alternos en <i>Leishmania</i> sp.	27
Objetivos	29
Material y métodos	30
Resultados	44
Discusión	65
Conclusiones	72
Bibliografía	73
Apéndice	82

INDICE DE FIGURAS

Figura		pag.
1	Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	5
2	División nuclear de los trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	14
3	Cámara de electroforesis del sistema TAFE.	33
4	Electrodos utilizados en el sistema TAFE.	34
5	Componentes utilizados para la transferencia del gel.	37
6	Dirección que toman las moléculas de DNA durante la transferencia a papel.	38
7	Análisis electroforético TAFE y densitométrico del DNA de <i>E. histolytica</i> (HM1:IMSS) en las clonas L6, A y la C2-100.	47
8	Hibridación de las bandas cromosómicas de DNA amibiano con la sonda homóloga de DNA total.	52
9	Hibridación de las bandas cromosómicas de DNA amibiano con la sonda de DNA ribosomal.	53
10	Hibridación de las bandas cromosómicas de DNA amibiano con la sonda de actina.	54
11	Prueba de hibridación en las bandas cromosómicas del DNA amibiano con la sonda de tubulina.	55
12	Hibridación de las bandas cromosómicas de DNA amibiano con la sonda D 1.6 y D 1.	56
13	Prueba de hibridación en las bandas cromosómicas del DNA amibiano con la sonda de porina.	57
14	Prueba de hibridación en las bandas cromosómicas del DNA amibiano con la sonda Eix.	58
15	Análisis del DNA amibiano por TAFE en presencia de bromuro de etidio.	61
16	Gel bidimensional corrido por el sistema TAFE.	64

INDICE DE TABLAS

Tabla		pag.
I	Propiedades del DNA en <u>Entamoeba</u> sp.	9
II	Cromosomas de <u>E. histolytica</u> y de <u>E. invadens</u>	3
III	Sondas utilizadas para hibridar las bandas cromosomales de DNA amibiano.	40
IV	Número y peso molecular de las bandas obtenidas de las clonas de <u>E. histolytica</u>	46
V	Resultado de las hibridaciones cromosomales en las tres clonas de <u>E. histolytica</u> HM1:IMSS.	59
VI	Bandas cromosomales de DNA de <u>E. histolytica</u> , clona A y clona L6.	62

TERMINOLOGIA

A	Clona A, virulenta aislada a partir de HM1:IMSS.
DNA	Acido desoxirribonucleico.
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético.
HM1:IMSS	Cepa silvestre de <i>E. histolytica</i> , virulenta aislada de disentería en el IMSS (México).
kb	Kilobases
L6	Clona L6, deficiente en virulencia, aislada a partir de HM1:IMSS, obtenida en el C.I.E.A. (México)
Mb	Megabases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos-salina.
RNA	Acido ribonucleico.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano.
TYI-S-33	Medio de cultivo para <i>E. histolytica</i> .

RESUMEN.

El estudio genético de los protozoarios parásitos ha sido muy difícil debido a que carecen de mitósis típicas con fases de condensación de cromosomas y a que poseen ciclos de vida muy complejos con fases sexuales desconocidas o que se llevan a cabo dentro de sus huéspedes. El objetivo general fué:

Estudiar la organización del DNA de tres clones de Entamoeba histolytica mediante la electroforesis transversal de campos alternos (TAFE).

Para cumplir este objetivo se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- a) Analizar los cariotipos moleculares de tres clones A, L6 y C2-100 de Entamoeba histolytica mediante la técnica de electroforesis transversal de campos alternos (TAFE).
- b) Localizar en los cromosomas de Entamoeba histolytica por métodos de hibridación DNA-DNA los genes de tubulina, actina, ribosomal, D 1, D1.6, porlina y Eix.

Al trabajar con las clones de E. histolytica se observó que la clona A posee 6 bandas cuyo peso es de 3.0 a 0.3 Mb; la clona L6 presenta 7 bandas cuyo peso es de 3.0 a 0.35 Mb y la mutante C2-100 presenta 11 bandas cuyo peso es de 3.0 a 0.3 Mb.

Sobre los cariotipos moleculares se localizaron 7 genes por medio de la hibridación con sondas radioactivas, dichas sondas fueron: la sonda de DNA ribosomal de E. histolytica que se unió a 6 cromosomas en la clona A, 2 cromosomas en la clona L6 y 3 cromosomas en la clona C2-100. La sonda con la secuencia de actina de E. histolytica se unió a 4 cromosomas de la clona A, 3 cromosomas de la clona L6 y 3 cromosomas de la clona C2-100. La sonda de tubulina homóloga se unió a 6 cromosomas de la clona A, 2 cromosomas de la clona L6 y 2 cromosomas de la clona C2-100. La sonda D1.6 obtenida de E. histolytica se unió a 6 cromosomas de la clona A, 2 cromosomas de la clona L6 y 1 cromosoma de la clona C2-100. Se observó que esta sonda posee secuencias correspondientes a rDNA por lo que se cortó con enzimas de restricción, para obtener una sonda más corta de la que se eliminaron estos genes (sonda D 1). La sonda D 1 reconoció 4 cromosomas de la clona A y 2 cromosomas de la clona L6, no reconociendo cromosomas en la clona C2-100. Este DNA sirvió para establecer diferencia entre clones patógenos y no patógenos pero su producto proteico aún esta por definir. La sonda con la

secuencia de porina de Salmonella tify reconoció 5 cromosomas de la clona A, en la clona L6 no se reconocieron cromosomas, 1 cromosoma en la clona C2-100. La sonda Eix, secuencia muy abundante en E. Invadens dió señal en 3 cromosomas de la clona A y en E. invadens dió una señal muy intensa en el DNA, no pudiendose reconocer este en cromosomas individuales.

INTRODUCCION.

La amibiásis en el hombre es una enfermedad causada por *Entamoeba histolytica*. Este parásito lesiona diversos órganos, como hígado, pulmón, cerebro y piel, aunque con mayor frecuencia en el intestino grueso, donde penetra destruyendo la mucosa y el epitelio intestinal, provocando con esto lesiones necróticas (Martínez - Palomo, 1986).

Debido a la alta incidencia de amibiásis en nuestro país, ha sido necesario realizar estudios relacionados con la biología, detección y la epidemiología de este parásito (Ocadiz, 1988).

CICLO DE VIDA.

El parásito *E. histolytica* se le puede encontrar principalmente en las heces fecales del hombre en 3 formas:

a) TROFOZOITO.

El trofozoito es la forma vegetativa activa de *E. histolytica*, su tamaño oscila entre 7 y 40 micras, presenta formas variadas aunque generalmente es elongada, siendo menos activos aquellos que poseen forma esférica. Los trofozoitos tienen un ectoplasma hialino, separado del endoplasma, posee pseudópodos ectoplásmicos delgados y digitiformes, para desplazarse cuando esta a su temperatura óptima de 37°C. Su endoplasma presenta vacuolas, con glóbulos rojos, sin aparato de Golgi, retículo endoplásmico, organitos celulares comunes; presentan un núcleo excéntrico único (Martínez - Palomo, 1982).

b) EL PREQUISTE.

Estas son células incoloras, con formas redondas u ovals, su tamaño es más pequeño que los trofozoitos, pero mayor que los quistes, la formación de pseudópodos es muy lenta, por lo que esta forma del parásito no se desplaza (Martínez - Palomo, 1982).

c) EL QUISTE.

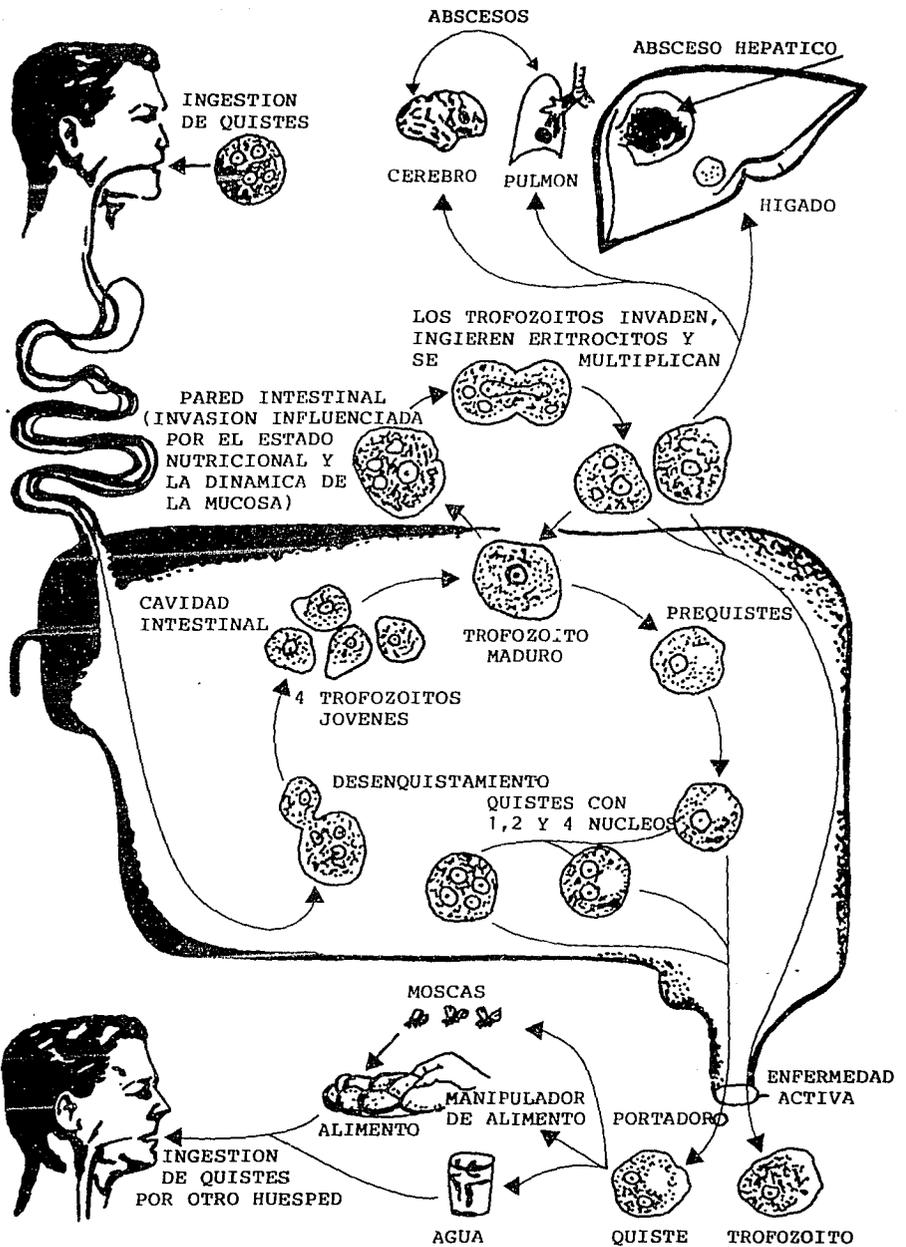
Son de forma redonda u oval, existen en gran variedad de tamaños (5 - 20 micras), dependiendo de su estado de madurez, pueden presentar de 1 a 4 núcleos, los que están delimitados por una membrana nuclear delgada, tiene condensaciones de

cromatina agregada sobre la superficie interna, un nucleólo central y presentan cuerpos cromáticos, los que son estructuras cilíndricas con punta roma (Martínez - Palomo, 1982).

El ciclo de vida de *E. histolytica* comienza cuando los quistes que es la forma infectiva son expulsados en las heces fecales. Un tiempo después estos son ingeridos por el hombre en los alimentos contaminados. Dentro del aparato digestivo, los quistes maduran debido a los jugos gástricos, neutros y alcalinos, rompiéndose las paredes del quiste, liberando un organismo con 4 núcleos que pasa por diferentes estadios metaquisticos, en los cuales el núcleo se divide para dar lugar a 8 núcleos. Posteriormente se presenta una división citoplasmática, que da origen a 8 trofozoítos (Martínez - Palomo, 1982). Los trofozoítos uninucleados se adhieren a la mucosa intestinal, pudiendo producir ulceraciones, provocando diarrea. Algunos trofozoítos son expulsados del tracto digestivo o pueden atravesar la pared intestinal e invadir los tejidos multiplicándose y produciendo daño, por lo que al trofozoito se le conoce como la forma invasiva. Los trofozoítos se dividen y después enquistan en el mismo huésped, siendo expulsados en las heces iniciando así un nuevo ciclo (Martínez - Palomo,1982). Dicho ciclo se resume en la **figura 1**.

Figura 1. Ciclo de vida de *E. histolytica*.

En la figura se muestra el ciclo de vida del parásito protozooario *E. histolytica*, dentro del hombre. Este presenta dos fases, una trofozoítica y otra quística. Este ciclo comienza con el quiste, el cual se adquiere al ingerir cualquier alimento contaminado o el agua, después pasa al estomago donde se inicia el desenquistamiento, de donde emerge un organismo tetranucleado, el que pasa por diferentes estadios metaquísticos, en los que se divide el núcleo en 8, posteriormente se presenta una división citoplásmica, la cual da origen 8 trofozoítos, el que se adhiere a la mucosa intestinal o algunos trofozoítos son expulsados del tracto digestivo o atraviesan la pared intestinal invadiendo los tejidos de otros órganos. Aquí los trofozoítos se dividen una o varias veces y enquistan en el mismo huésped, los cuales son expulsados en las heces para empezar un nuevo ciclo (Martínez - Palomo, 1982).



CLASIFICACION TAXONOMICA.

El género Entamoeba incluye numerosas especies que parasitan a vertebrados e invertebrados. La especie más conocida que parasita al hombre es E. histolytica que es la causante de la disentería amibiana.

La clasificación taxonómica del parásito, de acuerdo al Comité de Sistemática y Evolución de la Sociedad de Protozoólogos, (1982) es la siguiente:

Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Sarcodina
Superclase	Rhizopoda
Clase	Lobosea
Subclase	Gymnamoebia
Orden	Amoebida
Suborden	Tubulina
Género	<u>Entamoeba</u>
Especie	<u>histolytica</u>

IMPORTANCIA DE E. histolytica COMO PRODUCTOR DE AMIBIASIS.

E. histolytica se encuentra frecuentemente en el intestino grueso provocando la amibiásis intestinal, la forma en que puede presentarse puede ser:

- Disentería amébrica, provoca lesiones en la parte alta del colon.
- Colítis amébrica, la que provoca úlceras necróticas a lo largo del colon, afectando así las paredes intestinales, esta es una de las formas más severas de la amibiásis.

c) Ameboma, en la que se producen un conjunto de ulceraciones en el colon y el Intestino delgado, provocando que la persona baje de peso y presente fiebres muy altas. (Martínez-Palomo, 1986).

La amibiásis extraintestinal se presenta principalmente en el hígado, donde forma abscesos hepáticos existiendo con mayor frecuencia en hombres que en mujeres. En el cerebro, pulmones y en la piel, estos últimos casos es con menor frecuencia. (Martínez - Palomo, 1986).

Aproximadamente un 10% de la población mundial padece de amibiásis, en 1984 se encontró que de 500 millones de personas infectadas, 40 millones sufrieron colítis o abscesos extraintestinales y aproximadamente 40 mil muertes por la amibiásis (Rodríguez, 1990).

DISTRIBUCION MUNDIAL DE LA AMIBIASIS.

La frecuencia de amibiásis en el mundo, depende principalmente de las condiciones de higiene. En las regiones tropicales y subtropicales es más frecuente donde sus habitantes tienen recursos económicos escasos y bajo nivel cultural. Por lo tanto, se puede decir que los países que padecen con mayor frecuencia esta enfermedad son los llamados tercer mundistas. En un estudio realizado por Walsh (1986), se encontró que en América del Sur y en América del Norte, existen 95 millones de personas infectadas, de estas mueren entre 10 y 30 mil, en Asia existen 300 millones de personas infectadas, y mueren entre 20 y 50 mil personas, África tiene 85 millones de enfermos y mueren de 10 a 30 mil personas. En Europa hay cerca de 20 millones sin defunciones. De todo esto concluimos que en el mundo existen 500 millones de personas infectadas, muriendo entre 40 y 110 mil. (Walsh, J.A. 1986).

CARACTERISTICAS DEL DNA AMIBIANO.

De acuerdo a la presencia o ausencia de un núcleo se han clasificado a los seres vivos en dos grandes grupos:

- a) Los organismos procariontes, son aquellos que no poseen una membrana nuclear que delimiten su material genético.
- b) Los organismos eucariontes, cuyo material genético se encuentra delimitado por una membrana nuclear ó un núcleo definido.

La existencia de este núcleo implica un cambio muy importantes en la organizacin del material genético, dando como resultado diferentes mecanismos de regulación en la expresión del genoma (Torres, 1990).

El material genético en procariontes se encuentra contenido en una molécula de DNA circular cerrada acomplejada con RNA y proteínas en una estructura, llamada nucleoide. El nucleoide se encuentra asociado a la membrana plasmática en el punto de origen de la replicación y el DNA dispuesto en forma lineal mide aproximadamente 1250 micrómetros, y se compacta dentro de la célula para llevar a cabo sus funciones. El nucleoide tiene una apariencia fibrilar, se encuentra formado por DNA, RNA polimerasa, proteínas básicas y moléculas de RNA (Torres, 1990).

Las células eucarióticas se caracterizan por tener su material nuclear encerrado en una membrana nuclear. Dichas células sufren un ciclo celular y una división nuclear durante su desarrollo.

En este trabajo nos enfocaremos a estudiar la organización del DNA de *E. histolytica*, que es considerado como un organismo intermedio. ya que posee características de los procariontes y de los eucariotes; aunque posee un núcleo bien definido (dentro del cual existe RNA), carecen de mitocondrias y de aparato de Golgi.

Gelderman y col. (1971) propusó que la cantidad de DNA en los trofozoítos de *E. histolytica* puede ser constante, aunque se ha reportado diferentes cantidades de DNA en las cepas *E. histolytica* (Tabla I ; Hernández, 1985). López Revilla y Gómez (1978) encontraron que la cantidad de DNA por trofozoíto puede variar en una línea de cultivo axénico.

Hernández y col.(1986), realizaron un análisis del DNA de varias cepas y clonas de *E. histolytica* mediante un método directo, basado en la lisis celular *in situ* de los trofozoítos dentro de un gel de agarosa y la electroforesis del DNA amibiano. Los resultados obtenidos sugirieron que el DNA de *E. histolytica* esta organizado en poblaciones de diferentes tamaños, probablemente cromosomas. Aquel DNA que tuvo poca migración electroforética es difícil de interpretar y existen varias explicaciones posibles. Una de ellas propone que este DNA sea de origen viral, habiendo seguido un mismo camino evolutivo que el DNA del huésped, otra propone que las moléculas de DNA de alto peso molecular, esten formando parte de los cromosomas amibianos, o bien que sea DNA extracromosomal (Hernández y col., 1986).

TABLA I
PROPIEDADES DEL DNA EN Entamoeba sp.

CEPA	Pg/celula	Tm*	% G-C	Densidad en CsCl
<u>E. histolytica:</u>				
HK9	0.40 ⁽¹⁾	78.5 ⁽¹⁾	22.4 ⁽¹⁾	1.6882 ⁽³⁾
	1.50 ⁽²⁾			
	2.21 ⁽²⁾		27.6 ⁽³⁾	
	3.48 ⁽⁴⁾			
9.95 ⁽⁴⁾	78.5 ⁽¹⁾	22.4 ⁽¹⁾	1.6911 ⁽³⁾	
HM38				
F22				
200:NIH				
HM2	0.50 ⁽¹⁾	80.5 ⁽¹⁾	27.3 ⁽¹⁾	1.6897 ⁽³⁾
	8.86 ⁽²⁾			
	3.04 ⁽²⁾			
<u>E. invadens:</u>				
PZ	0.84 ⁽²⁾	83.0 ⁽¹⁾	33.4 ⁽¹⁾	
	0.37 ⁽¹⁾			
IP	0.32 ⁽¹⁾	80.0 ⁽¹⁾	26.1 ⁽¹⁾	
<u>E. laevis:</u>				
	0.09 ⁽¹⁾	85.0 ⁽¹⁾	38.3 ⁽¹⁾	1.6913 ⁽³⁾
	0.08 ⁽¹⁾	80.0 ⁽¹⁾	26.1 ⁽¹⁾	1.6912 ⁽³⁾
	2.30 ⁽⁴⁾			
<u>E. moshkovskii:</u>				
FIC	0.07 ⁽²⁾	82.3 ⁽¹⁾	31.7 ⁽¹⁾	
	1.00 ⁽¹⁾			

Este cuadro fué obtenido de la Tesis de Hernández, F 1985

(1) Gelderman y col., 1971. J. Parasitol 57:912

(2) López - Revilla y Gómez, 1978. Exp. Parasitol 44:243

(3) Reeves y col., 1971. J. Parasitol 57:939

(4) Hernández, 1985. Tesis de Maestría.

* Tm: Temperatura media de desnaturalización en °C

Por otra parte, el corte con enzimas de restricción del DNA aislado de los trofozoítos por medio de gradientes de cloruro de cesio-bromuro de etidilo mostró que existen secuencias repetidas en acuerdo a Gelderman (1971) quien hizo una comparación entre el tamaño de los genomas de diversas especies de amiba.

Albach, R. (1989), observó en los núcleos interfásicos de *E. histolytica* cromatina periférica cerca de la doble membrana nuclear, además encontró en la parte central una estructura nuclear fibrogranular llamada endosoma, y propuso que este es un sitio de condensación del DNA utilizado durante la división nuclear. La función de esta estructura no se puede decir con certeza aunque pudiera corresponder a un nucleólo (Albach, R., 1989). En el núcleo de *E. histolytica* se encuentra DNA, cuya cantidad es aproximadamente de 0.45 picogramos, la mayoría de este DNA se encuentra disperso en forma de eucromatina, la cual se encuentra relacionada con la síntesis del RNA mensajero. En la parte periférica del núcleo se localiza RNA, (esto no se encuentra en células eucarióticas), que se cree corresponde a RNA ribosomal, ya que está asociado con material granular cuyo tamaño es comparativo al de los ribosomas (Albach, 1989).

El estudio sobre la organización del DNA de *E. histolytica* es complicado por la dificultad para obtener suficiente material purificado, por lo que se requiere de grandes cantidades de cultivo amibiano. Además, la presencia de gran cantidad de nucleasas dificulta la extracción ya que los trofozoítos degradan rápidamente el DNA cuando se usan métodos de extracción convencionales, provoca disminución en el rendimiento y disminuye la posibilidad de obtener material de alto peso molecular (Hernández y col., 1986). Otra dificultad para el aislamiento del DNA amibiano es la gran cantidad de carbohidratos que acompañan al ácido nucleico durante la purificación (Albach, 1989; Pérez- Mutul y col., 1986).

La importancia del análisis de la organización del DNA en los protozoarios del género *Entamoeba*, es que los resultados que se obtengan puedan aplicarse para el desarrollo de metodologías de identificación de diferentes cepas. Además, de esta forma se puede estudiar la expresión y la organización del material genético, principalmente en localizar aquellos genes que se encuentran relacionados con la virulencia en diversos parásitos (Hernández y col., 1986).

AISLAMIENTO DEL DNA.

Un problema que se encontró al aislar el DNA de *E. histolytica* fué la presencia de proteínas y polisacáridos que copurifican con el DNA al extraerlo con solventes orgánicos y la gran cantidad de nucleasas amibianas que es necesario inactivar durante el proceso de la homogenización celular y purificación del DNA. Para superar estas dificultades fue necesario trabajar con concentraciones elevadas de EDTA que es un inhibidor de DNAsas y de la enzima proteinasa K que degrada eficientemente las proteínas contaminantes (Hernández y col.,1986; Pérez-Mutul y col.,1986; Ayala, 1989; Ocadiz, 1989).

Ayala (1989) probó diferentes métodos para el aislamiento del DNA de *E. histolytica*, y eligió el de Hernández y col. (1986), ya que este fue el que proporcionó mayor rendimiento, 7.35 picogramos de DNA por trofozoito y el material obtenido por este método es de mayor pureza, con 1.75 de densidad óptica 260/280 (Maniatis y col., 1982). El criterio del cociente 260/280 garantiza que las enzimas específicas para DNA (endonucleasas, exonucleasas o ligasas) actuen eficientemente. La integridad del DNA extraído por diferentes métodos se comprobó mediante la electroforesis en geles de agarosa y tinción del DNA con bromuro de etídio (Ayala, 1989).

ORGANIZACION DE LA CROMATINA EN *E. histolytica*.

Actualmente existen pocos estudios realizados sobre la organización de la cromatina amibiana, sin embargo, muchas de las clasificaciones a nivel de género y especie, se han realizado teniendo en cuenta las características estructurales de su núcleo (Torres, 1990).

La cromatina de *E. histolytica* esta organizada parcialmente en estructuras similares a nucleosomas, teniendo cada uno un diámetro de 10 nanómetros, lo que es comparable con los nucleosomas de las células eucarióticas, aunque los tamaños de los nucleosomas amibianos son heterogéneos (Torres, 1990). Los nucleosomas miden 130 pb, de acuerdo a lo determinado por digestiones con nucleasa micrococcal. Se han identificado 6 proteínas nucleares de 53, 34, 30, 25, 19 y de 16 kDa estas unen el DNA independientemente de la secuencia de nucleótidos. Estas proteínas se encuentran involucradas en la organización nucleosomal en *Entamoeba* y poseen características diferentes a las histonas (Torres, 1990).

No todas las secuencias de DNA presentes en la cromatina organizada son inactivas durante la transcripción, una pequeña proporción de la cromatina no organizada en nucleosomas corresponden a secuencias activas, se ha propuesto que la cromatina en Entamoeba podría formar dos compartimientos funcionales, uno que es inactivo y otro activo, en este último los genes se encuentran inmersos en secuencias no funcionales durante la transcripción (Torres, 1990).

ELEMENTOS EXTRACROMOSOMALES EN E. histolytica.

En la actualidad se realizan extensos estudios con respecto a los genes ribosomales repetidos de E. histolytica ya que pueden ser útiles para establecer las relaciones filogenéticas entre los diferentes géneros, además de ayudar a la identificación de especies y cepas (Bhattacharya y col., 1989).

En diversas especies de protozoarios los genes de RNA ribosomal son extracromosomales, existiendo como moléculas palindrómicas lineales o circulares (Long y Dawid, 1980). Los genes extracromosomales de RNA ribosomal se replican autonomamente durante la etapa vegetativa y tienen la capacidad para proporcionar a la célula una gran cantidad de RNAs ribosomales. En el caso de Paramecium (Findly y Gall, 1978) y Tetrahymena (Gall, 1974) se han reportado moléculas circulares y lineales. En el caso de Tetrahymena, los genes extracromosomales de RNA ribosomal se derivan de una copia integrada cromosomalmente, la cual es amplificada durante la formación de nuevos macronúcleos después de la conjugación (Engberg, 1985).

Huber y col. (1989), realizaron un mapeo de restricción del DNA de clones de la cepa HM1:IMSS de E. histolytica, encontrando una molécula de DNA circular de 24.6 Kb, cuya presencia fue confirmada al ser analizado el DNA de E. histolytica (aplicando la técnica de desenvolvimiento con citocromo) en el microscopio electrónico. Esta molécula circular tiene un tamaño en acuerdo al obtenido por el mapeo de restricción del DNA, posee un origen de replicación independiente, lo que permitiría la amplificación de estas moléculas en un alto número de copias. Además las moléculas de DNA ribosomal presentan 2 regiones grandes de invertidos repetidos (palíndromes) que miden 5.2 kb de largo. Huber y col. (1989) observó en el DNA ribosomal de la clona R-715 de E. histolytica que en ambas mitades de los repetidos invertidos, se encuentran localizados dos cistrones de RNA

ribosomal en una molécula de DNA ribosomal. Esto se ha encontrado en el DNA de los cloroplastos, donde los repetidos invertidos confieren estabilidad a la molécula que se someterá nuevamente a los eventos de la recombinación (Palmer y col., 1982). Estos repetidos invertidos son una característica estructural del DNA ribosomal de *E. histolytica*, quienes aseguran que estas moléculas se mantengan funcionando.

Otra característica estructural que se encontró en el DNA amibiano es la presencia de regiones de separación entre los repetidos invertidos, contienen gran cantidad de repetidos de DNAs. Estos elementos son comunes en otros organismos y tienen un papel importante en la transcripción del RNA ribosomal (Huber y col., 1989). Estas investigaciones podrían aplicarse en el desarrollo de un vector para la introducción de genes para ser copiados en un alto número en protozoarios (Huber y col., 1989).

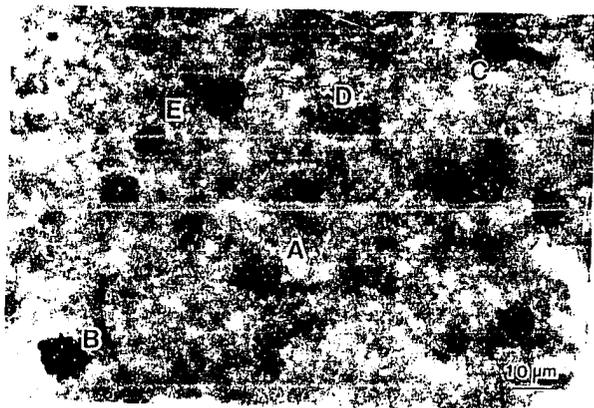
CROMOSOMAS DE *E. histolytica*.

Los cromosomas de *E. histolytica* no condensan durante la mitosis, siendo muy difícil su observación (Albach, 1989; Huang, M y col., 1991), por lo que existen autores que niegan la presencia de cromosomas en este parásito protozoario, sin embargo Albach (1989) describe la condensación del DNA amibiano en el endosoma, el cual se encuentra en el centro del núcleo.

Solís y col. (1986), pudo observar los cromosomas en las diferentes etapas de la división nuclear y dar un número aproximado de 12 a 16 cromosomas, además logró caracterizar cada una de las etapas de la división comparándolas con otras células eucarióticas. Para cumplir su propósito utilizó la colchicina, con la que se obtuvo una sincronización de los trofozoitos de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS clona L6, en cada uno de los estados de la división nuclear y una posterior observación al microscopio electrónico y el óptico. En base a sus observaciones propusieron un modelo de la división nuclear en *E. histolytica* o proceso endomitótico (no existe pérdida de la membrana nuclear durante el proceso), y es pleuromitótico (el huso acromático se dispone en forma bilateral durante la segunda fase de la división mitótica). Solís y col. (1986), divide el proceso mitótico en 4 fases, como se observa en la **figura 2**.

Figura 2. División nuclear de los trofozoítos de *E. histolytica*.

En esta autoradiografía se muestran los trofozoítos marcados con (3H) TdR, en donde se observan la división nuclear. (A) Interfase; (B) Profase; (C) Anafase temprana; (D) Anafase tardía; (E) Telofase.



La 1ª fase de la división, se observa la pérdida de la forma esférica del núcleo, presentando una protuberancia; el cariosoma central se presenta como un conjunto de condensaciones de material electrodensó (cromosomas amibianos), los microtúbulos se disponen radialmente asociados a los cromosomas; el material periférico está distribuido homogéneamente. Enseguida, el núcleo tiene dos protuberancias, en una de ellas se encuentran orientados los cromosomas con los microtúbulos asociados a ellos. En la 2ª fase de la división, se presenta un aumento en el tamaño de una de las protuberancias (en la que se encuentran orientados los cromosomas y microtúbulos), por lo que el núcleo pierde su forma redonda volviéndose alargada. Los cromosomas se han desplazado del centro del núcleo hacia uno de los extremos, observándose de 4 a 5 pares de estructuras cromosomales. Estas se encuentran inmersas en una red de microtúbulos, organizadas en haces, que salen del centro del núcleo y se orienta en forma divergente hacia la membrana nuclear, esto podría deberse a que la membrana nuclear no presenta discontinuidad. En la 3ª fase, el núcleo se presenta con una protuberancia muy crecida, que dará lugar a un núcleo hijo. El alargamiento del núcleo es irregular, diferenciándose así el nuevo núcleo. El material periférico está distribuido en forma irregular, la forma de los cromosomas de la 1ª y 2ª fase se ha perdido. La 4ª fase se caracteriza por presentar 2 o más núcleos en el citoplasma de la amiba como resultado de la división pleuromitótica intranuclear. Estos núcleos presentan características de núcleos en interfase, siendo su forma esférica, no aparece el cariosoma central en los núcleos, el material periférico entre ambos núcleos está distribuido en forma polarizada en algunas regiones de la periferia nuclear.

La división nuclear en *E. histolytica* clona L6, de manera análoga a la de la cepa Laredo descritas por Giquaud (1979), presenta una división nuclear ortomitótica, es decir es una mitosis cerrada e intranuclear (Orozco y col., 1988) aunque presenta algunas diferencias: En *E. laredo* los microtúbulos no se anclan a los corpúsculos del nucleoplasma, a diferencia de la clona L6 donde sí existe anclaje de los microtúbulos a un corpúsculo del nucleoplasma. Otra diferencia es la localización y la forma de huso acromático (Orozco y col., 1988).

ELECTROFORESIS DE GRADIENTE EN CAMPO DE PULSOS (PFGE).

La electroforésis en geles de agarosa es una herramienta para el análisis de moléculas de DNA menores de 50 kb, pero cuando se intentaron separar moléculas de DNA mayores de 50 kb se obtuvieron resultados poco satisfactorios.

La resolución en los geles de agarosa se ve disminuida cuando las moléculas de DNA son de tamaño muy grande, teniendo como resultado movilidades electroforéticas anormales. En algunos trabajos, con la finalidad de separar mejor las moléculas de DNA mayores de 50 kd, se utilizaron concentraciones de agarosa menores de 1% en los geles, presentandose problemas como la fragilidad del gel, tiempos de corrida muy largos y la poca resolución de moléculas mayores de 750 kb (Mathew y col.,1988; Simske, S.J. y Scherer,S. 1989) . Esta es una limitación para el estudio de los genomas de mamíferos, donde el tamaño de los cromosomas tienen un rango de 30 a 180 Mb (Barlow, 1989).

La solución a los problemas de electroforésis de moléculas de DNA mayores de 50 kb, fué el desarrollo de un sistema de electroforésis en gel con gradiente de campo pulsado (PFGE), (Schwartz y Cantor, 1983;1984) en el que se pueden separar moléculas de DNA de tamaño mayor de 2000 kb, con una resolución mucho mayor que cualquier otro tipo de electroforésis. En esta técnica, el DNA incluído previamente en una matriz de agarosa a partir de células integras es fraccionado por tamaño, a través de un gel de agarosa, por la aplicación de dos campos eléctricos perpendiculares aplicados alternadamente, uno de los cuales es heterogéneo, compuesto por un electrodo positivo y una serie de electrodos negativos. La alternancia de los campos perpendiculares, se realiza aplicando pulsos con una duración de 1 a 90 segundos, para la separación de moléculas de 30 a 2000 kb.

En el sistema PFGE la separación entre las moléculas depende del tiempo que necesitan las moléculas de DNA de mayor peso para responder a los cambios en la dirección del campo, el cual es comparativamente más largo que el que necesitan las moléculas de menor tamaño, por lo que la separación del DNA depende de la frecuencia con la cual los campos eléctricos se alternan.

La electroforésis PFG se aplicó primeramente en el análisis de los cromosomas de levadura, cuyo mapa de ligamiento genético es bien conocido, lo que sirvió para comprobar que las bandas resueltas de DNA de

alto peso molecular son cromosomas intactos (Schwartz y Cantor 1984). Van der Ploeg y col. (1985) demostraron que el genoma de *Trypanosoma* esta organizado en 7 cromosomas que miden entre 0.75 y 3 Mb. En estos estudios los autores observaron que en este parásito existe significativa variabilidad en la talla de las moléculas de DNA de las cepas y aun entre las clonas derivadas de la misma cepa, con lo que demostraron la gran plasticidad que posee el genoma de estos parásitos.

ELECTROFORESIS DE GRADIENTE EN CAMPO DE PULSOS (PFGE) EN *Plasmodium* sp.

Dore y col. (1986), describieron la clonación molecular de una secuencia telomérica del DNA de *P. berghei*, con lo cual mostraron que algunas características teloméricas se encuentran presentes en el genoma de otros organismos eucarióticos simples, esta parte terminal contiene hasta 70 secuencias repetidas, como el siguiente CCCTAAA. Estos mismos autores utilizando el sistema PFGE estudiaron los cromosomas de las especies del genero *Plasmodium*, *P. yoelli*, *P. chabaudi* y *P. falciparum*, observando que existen secuencias teloméricas homólogas, mientras que la región subteloamérica obtenida de *P. berghei*, se encuentra muy representada en dos de sus cromosomas, las cuales no han sido reconocidas en otras especies. Sharkey y col. (1988), analizaron el DNA de 6 clonas de *P. chabaudi* por medio de PFGE, utilizando dos tiempos de pulso diferentes, obteniendo como resultado 10 bandas de DNA, las cuales de acuerdo a los marcadores de levadura tienen tamaños entre 650 y 5000 kb. Para comprobar que estas bandas son cromosomas intactos se hibridó con secuencias teloméricas de *P. berghei* (Ponzi y col., 1985), mostrando que cada banda representa un cromosoma. En las bandas más pequeñas se observó hibridación más intensa, por lo que se sugiere que en estas migró más de un cromosoma por banda. Estas mismas bandas de DNA de *P. chabaudi* se hibridaron contra una secuencia de RNA ribosomal (rib.1) (Langsley y col., 1983), dando como respuesta señales en los cromosomas 5,6,8 y 10, aparentemente con la misma intensidad. El número de copias estimado de este gen que codifica al RNA ribosomal es de cuatro y estos datos sugirieron que una copia de este gen se encuentran distribuidas en los cromosomas de los ya enumerados. Sharkey y col. (1988) utilizando secuencias de cDNA y secuencias de RNA ribosomal (rib.1) (Langsley y col. 1983) localizadas en cromosomas específicos (marcadores cromosomales), identificó aquellos cromosomas que son homólogos en diferentes cepas localizando los genes de RNA ribosomal en

los cromosomas. En 6 clonas de *P. chabaudi* usando sondas que hibridan en los cromosomas 5 y 6 se encontró variabilidad en cuanto al tamaño de estos cromosomas en las diferentes clonas, por ejemplo el cromosoma 5 de las clonas CB y ER es más grande que el de las otras clonas de *P. chabaudi*, demostrando polimorfismo entre sus clonas, las cuales fueron originadas del cDNA de la cepa parental de *P. chabaudi*.

Corcoran y col. (1986), estudiaron el polimorfismo en el tamaño de los cromosomas de *P. falciparum* comparando el cariotipo molecular, obtenido por PFGE de tres clonas independientes de este parásito, dando como resultado que el número de cromosomas se mantuvo constante. Sin embargo cuando aplicaron las pruebas de hibridación con sondas específicas para cada cromosoma, estos autores encontraron que existía una diferencia en el tamaño de los mismos cuando estos fueron comparados con los cromosomas análogos de las clonas estudiadas. Observando que los cariotipos moleculares analizados de una línea clonal de este parásito, permanece constante a través de las fases asexuales del ciclo. Además estas pruebas de hibridación indicaron que las deleciones/duplicaciones son de las principales causas de polimorfismo en *P. falciparum*.

Sheppard y col. (1989), mediante PFGE obtuvieron los cariotipos moleculares de 4 cepas de *Plasmodium*, además de 3 subespecies de *P. chabaudi*. Cada uno de los cariotipos obtenidos posee 14 cromosomas, que miden entre 730 a 2000 kb. Las 4 cepas de *Plasmodium* analizados presentan poco polimorfismo en cuanto al tamaño de sus cromosomas. Sin embargo el cariotipo molecular de cada una de estas cepas es único y fácilmente reconocible de otras cepas.

Weber y col. (1988), mapeo 13 secuencias del DNA en 9 cromosomas en una cepa brasileña IMTM22 de *P. falciparum* (es posible que haya más cromosomas en los pozos o localizados en los cromosomas 6,7 u 8), con lo que fué posible localizar una secuencia por cromosoma. Kemp y col. (1986), mapeo un gen Ag 63, el cual se encontró en el cromosoma 5 y 6. Langsley y col. (1986) mapearon DNA en los cromosomas 1 y 6. Wellem y col. (1987) observaron que en *P. falciparum* durante su estado dentro del eritrocito, sintetiza una familia de proteínas, las que se caracterizan por tener gran cantidad de histidinas, lo cual es poco usual en las demás proteínas. Las proteínas de esta familia HRP-I son rica en histidina, asociada a las protuberancias de los eritrocitos infectados, HRP-II es una proteína rica en histidina, la cual es descargada dentro de un medio extracelular y la HRP-III su localización no ha sido bien establecida. Comparando las secuencias del

HRP-II y del HRP-III de una clona de P. falciparum, se ha visto que estos genes no se encuentran relacionados, localizándose una copia de la secuencia de este gen en cromosomas diferentes en este parásito. La homología entre HRP-II y HRP-III, implica que estos dos genes tienen su origen en la duplicación y divergencia de un ancestro común (Wellems y Howard, 1987). Los genes originados por duplicación o divergencia pueden variar en cuanto al número de copias y pueden encontrarse en forma de racimo como sucede con los genes de alfa y beta- globulina de humano (Maniatis y col. 1980) o pueden estar dispersos en todo el genoma, como la familia de multigenes de actina en Dictyostelium discoideum (Welker y col., 1986). Para estudiar los genes de HRP-II y HRP-III en el genoma de P. falciparum, se analizaron los patrones de herencia de ambos genes, los cuales se obtuvieron gracias a la cruce entre dos clones diferentes de P. falciparum, determinando el número de copias de estos genes y mapeando su localización cromosomal mediante el uso del PFGE. El resultado indicó que la proteína HRP-II es codificada por un par de alelos iguales en los dos parentales en tanto que la proteína HRP-III se heredó de uno de los parentales en toda la progenie examinada. El gen HRP-III se encuentra localizado en una región subtelomérica del cromosoma 13. Los estudios de crecimiento in vitro sugieren que los genes HRP II y III pueden afectar la proliferación del parásito en el eritrocito (Wellems y col. 1987).

ELECTROFORESIS DE GRADIENTE EN CAMPO DE PULSOS (PFGE) EN Trypanosoma sp.

Van der Ploeg y col. (1984), estudiaron por PFGE los cromosomas de Trypanosoma brucei, obteniendo 3 cromosomas de aproximadamente 2000 kb, 6 cromosomas de 200 a 700 kb y cientos de minicromosomas de 50 a 150 kb. Una vez obtenido el cariotipo molecular se realizaron pruebas de hibridación con sondas de DNA de los genes de los antígenos variables de superficie (VSG) 118 y 221, y observaron que las copias básicas de los genes aparecen en el DNA de alto peso molecular. Masake y col. (1988), obtuvieron mediante la aplicación de la electroforesis de alternación de campo ortogonal (OFAGE) el carlotipo de 117 clones de T. congolense, de 54 cepas de la costa de Kenia. Esta misma técnica se ha aplicado para caracterizar T. brucei (Van der Ploeg y col., 1984), así como T. congolense (Majlwa y col., 1986). Engman y col. (1987), obtuvieron el cariotipo de 6 cepas y 6 clones de Trypanosoma brucei, encontrando que su genoma esta formado por 16 cromosomas que van de 200 a 2000 kb. Sobre estos cromosomas se hicieron

pruebas de hibridación con las sondas específicas de los genes de tubulinas, RNA ribosomal y proteínas de choque térmico. Gracias a la localización de estos genes se marcaron diferencias entre las clonas y cepas de *T. brucei* las cuales se encuentran relacionadas con la heterogeneidad fenotípica que se encuentra en este tipo de parásito.

ELECTROFORESIS DE GRADIENTE EN CAMPO DE PULSOS (PFGE) EN *Leishmania* sp.

Comeau y col.,1986; Bishop y col.,1987, mostraron polimorfismo en los cariotipos moleculares obtenidos en una amplia variedad de especies de *Leishmania* y entre cepas de la misma especie de áreas geográficas separadas. Pages y col. (1989), estudiaron el cariotipo de 21 cepas y 14 clonas de *Leishmania infantum* (agente causante de la leishmaniasis cutánea y visceral), aplicando la técnica del PFGE en el DNA de este parásito, dando como resultado variaciones tanto en la talla de los cromosomas que va de 270 a 2600 kb, como en el número de bandas resueltas que varía de 24 a 31. Además con las pruebas de hibridación con sondas de DNA específicas para cada cromosoma en los Southern blot de los geles obtenidos por el PFGE, se observó que se presenta una diferencia de más menos 50 kb en la talla de los cromosomas homólogos de diferentes cepas. Para explicar este polimorfismo estos autores propusieron la realización de rearrreglos intercromosomales tales como la traslocación o eventos intracromosomales como la amplificación/ deleción en las secuencias del DNA. Este polimorfismo cromosomal fué observado en *T. cruzi* (Gibson y Miles, 1986), así como en *P. falciparum* (Corcoran y col.,1986). Con los resultados obtenidos en este trabajo se sugiere una hipótesis en cuanto a un cambio genético ocasional durante la fusión nuclear en *Leishmania*, como se observó recientemente en *T. brucei*, donde Jenni y col, 1986, al realizar pruebas de hibridación sobre el cariotipo molecular de este parásito, encontraron que posee un 50% más de DNA nuclear que el de sus parentales, esto demuestra que la adición de material cromosomal es por parte de los dos parentales (Wells y col.,1987). Este exceso de DNA puede ser deletado durante las sucesivas divisiones mitóticas en los huéspedes mamíferos (Paindavoine y col.,1986). Bishop y col. (1987) obtuvieron un cariotipo de *Leishmania* formado de 22 cromosomas, como mínimo, en un stock de *L. donovani*. El tamaño de los cromosomas va de 270 a 4000 kb. El polimorfismo observado en la talla de los cromosomas de *Leishmania* sirvió para distinguir las subespecies *L. d. donovani*, *L. d. infantum*, y *L. d. chagasi* del stock de *L. donovani*. Se observó

con pruebas de hibridación con sondas obtenidas de los mismos cromosomas aplicadas en las diferentes subespecies que existe una translocación entre los cromosomas, lo cual contribuye al polimorfismo. También fue mapeado el gen de beta-tubulina con la sonda heteróloga de *L. brucei* (Seebeck y col. 1983) y la señal apareció en los cromosomas 21, 22, 13 y 7 siendo más intensa en los cromosomas 21 y 22. El gen de alfa-tubulina se encontró en el cromosoma 9. El arreglo de los genes de alfa y beta-tubulina se encuentran muy conservados en esta especie.

La resistencia a drogas es un fenómeno asociado con el polimorfismo en el tamaño de los cromosomas en las poblaciones de parásitos. En *L. tropica* seleccionadas *in vitro* son líneas resistentes al metotrexato, las que presentan una considerable amplificación de su DNA (Coderre y col., 1983; Beverley y col., 1984). Algunas de las secuencias amplificadas fueron inicialmente extracromosomales y se mantuvieron por selección con el metotrexato. Además se generaron líneas de parásitos con secuencias amplificadas integradas en tandem en el DNA cromosomal (Beverley y col. 1984). Tras una fuerte presión selectiva puede dar lugar a fluctuaciones muy grandes en cuanto a la abundancia del DNA repetitivo, lo que trae como consecuencia polimorfismo en el tamaño de los cromosomas de los parásitos (Corcoran y col. 1986).

Comeau y col. (1986), obtuvieron los cariotipos de *L. mexicana amazonensis*, *L. chagasi*, *L. major*, *L. donovani* y *L. braziliensis* por medio de la electroforesis ortogonal de campos alternos (OFAGE) y localizaron en los cromosomas los genes de alfa tubulina y los genes de RNA ribosomal, cada uno de los cuales fueron mapeados en cromosomas únicos. El gen de beta tubulina se encontró en más de un cromosoma, y se demostró su localización la cual varía en las diferentes especies.

Samaras y col. (1987) mostraron que las cepas de *L. major* de la misma área geográfica presentan poco polimorfismo en cuanto a su tamaño cromosomal, a diferencia de aquellas cepas de diferentes áreas geográficas, en las cuales existe una diferencia significativa en los tamaños cromosomales. Con el uso de sondas para genes específicos se demostró que en los genomas de las diferentes especies de *Leishmania* han ocurrido rearreglos cromosomales durante su evolución.

ELECTROFORESIS DE GRADIENTE EN CAMPO DE PULSOS (PFGE) APLICADO EN EL DNA DEL HONGO *Candida albicans*.

La electroforesis PFG no solo se ha aplicado en parásitos protozoarios, sino también a otros microorganismos como en el hongo *Candida albicans*, donde Lasker y col. (1989), aplicaron dos variantes de este tipo de electroforesis. Una, la electroforesis de campos alternos (OFAGE) y la electroforesis de inversión de campo (FIGE), con las cuales obtuvieron 8 bandas cromosomales y con el análisis de hibridación de estas se dedujo que tiene un genoma haploide, con un mínimo 8 cromosomas.

ELECTROFORESIS DE GRADIENTE EN CAMPO DE PULSOS (PFGE) EN *E. histolytica*.

Debido a la gran variación en el contenido de DNA por trofozoíto (Lopez-Revilla y Gomez, 1978) y el poco conocimiento que se tiene de la composición genética de cada cromosoma individual, hace más difícil de explicar la ploidía en el parásito *Entamoeba* sp.

El estudio del DNA de *Entamoeba histolytica* con la electroforesis de gradiente de campo en pulsos es muy reciente. Valdes y col. (1990) reportaron por primera vez el cariotipo molecular de este parásito del hombre y el de *E. invadens*, el cual es un parásito de reptiles. En este análisis se utilizaron 3 condiciones de corrida diferentes, con las cuales lograron resolver el DNA de *E. histolytica* en 6 a 9 bandas que miden aproximadamente de 300 a 2000 kb y el DNA se encuentra formado de 16 a 22 cromosomas grandes y 31 cromosomas pequeños. En el caso de *E. invadens* se obtuvieron de 4 a 5 bandas que miden entre 300 y > 2000 kb, resolviéndose 4 cromosomas grandes y 6 cromosomas pequeños (Tabla II). Se realizaron pruebas de hibridación con una sonda ribosomal de *T. brucei*, con la que se observó una banda de 1100 kb, en *E. histolytica* cepa HM1:IMSS y una banda de 1000 kb en la clona A de la misma cepa (en ambas cepas se muestra hibridación en el origen). En *E. invadens* únicamente hibridó la sonda ribosomal en el origen. Se calculó que en *E. histolytica* existen $10^{7.5}$ pb y en *E. invadens* de $10^{7.0}$ pb por genoma haploide. Estos cálculos se obtuvieron haciendo modificaciones del método descrito por Scholler y col. (1986) para *Leishmania* y estan en acuerdo a Gelderman y col. (1971), con los experimentos de renaturalización del DNA en *E. histolytica*. Estos resultados también estuvieron de acuerdo con los de Solís y col. (1988), quienes describieron de 12 a 16 cromosomas en

TABLA II
CROMOSOMAS DE E. histolytica Y DE E. invadens

<u>E. histolytica</u>								<u>E. invadens</u>				
HM1-IMSS				Clona A				Clona IP-1v				
No. Banda	Talla	D	N	No. Banda	Talla	D	N	No. Banda	Talla	D	N	
1	2000	5920	1	1	2308	9670	2	1	2000	28560	2	
2	1800	10460	2	2	1872	4920	1	2	1900	20840	1	
3	1500	8540	2	3	1218	16450	5	3	1800	16100	1	
4	1100	12400	3	4	1000	14870	6	4	300	14490	6	
5	780	6650	3	5	782	16610	8					
6	575	8970	5	6	455	10840	9					
7	400	5720	5									
8	300	9920	12									
9	280	11420	14									
Número de cromosomas resueltos			47					31				
Total de pares de bases calculados			$10^{7.6}$					$10^{7.6}$				

(Tabla tomada de Valdes y col. 1990)

base a las estimaciones que fueron obtenidas por la adición del producto de la medida de las bandas, multiplicando por el número de moléculas presentes en cada banda.

GENES DESCRITOS EN *E. histolytica*.

Recientemente se ha demostrado que las sondas del DNA pueden ser empleadas para la detección y tipificación de parásitos como *Leishmania*, *Filaria*, *Trypanosoma* y *E. histolytica* (Tannich y col., 1989). En *E. histolytica* se han aislado secuencias de DNA para diferenciar cepas patógenas de las que no lo son. Tannich y col. (1989), construyeron bancos genómicos de *E. histolytica* de la cepa patógena HM1:IMSS y de la cepa no patógena SAW:1734, extrayendo todo el RNA celular de ambas cepas con isotiocianato de guanidina, enseguida el RNA poly(A) se purificó por cromatografía. El DNA complementario fue preparado por el método de Gubler y Hoffmann (1983). El DNA complementario de la clona (cEH-P1) originado de la cepa patógena HM1:IMSS, la cual se utilizó como sonda, lo mismo sucedió con el DNA complementario de la clona cEH-NP1 originada de la cepa no patógena SAW:1734. Ambas sondas se sometieron a la prueba de hibridación sobre el DNA de 4 cepas patógenas y 5 cepas no patógenas de *E. histolytica*, dando como resultado en el Southern blot dos patrones distintos de hibridación, uno que es característico para las amibas patógenas y otro diferente del anterior para las no patógenas. En dicho reporte Tannich y col. 1989 identificaron dos secuencias de cDNA, las cuales ayudan a identificar entre cepas patógenas y no patógenas de *E. histolytica*, esta diferencia se comprueba cuando se hibrida una sonda de actina de *E. histolytica*, sobre fragmentos de restricción del genoma amibiano, donde se obtiene una diferencia entre ambas cepas, ya que la cepa patógena HM1:IMSS presenta una banda adicional de aproximadamente 3.5 kb. Lo cual demuestra una diferencia genética entre las cepas patógenas y aquellas que no lo son.

Otro gen que ha sido ampliamente estudiado en *E. histolytica* ha sido el de actina, proteína componente del citoesqueleto. Esta proteína ha sido estudiada en organismos eucarióticos, es evolutivamente conservada y esto permitió que por su comparación de las actinas ya caracterizadas se identificara la proteína de *E. histolytica* (Huber y col., 1988). Huber y col. (1987) caracterizaron y clonaron el gen de actina para este fin, ellos contruyeron un banco genómico complementario de DNA de *E. histolytica* cepa 200:NIH, en el fago lambda gt10 (Huber y col. 1987). En este estudio fueron aislados el

cDNA de tres clonas (A, B y C), cada una de estas tres clonas fué hibridado con distintos RNAm de *E. histolytica* cepa 200:NIH. De esta selección por hibridación se obtuvieron dos polipéptidos de 39kDa y 41kDa de la clona C, ambos fueron traducidos *in vitro* y son el producto de un RNAm único. De la clona A se obtuvo otro RNAm el cual codifica para un polipéptido de 43 kDa. dicho polipéptido es el mejor producto de traducción en el RNAm de *E. histolytica*. Huber y col. (1987), sugieren que por el peso molecular y la abundancia de este polipéptido se pueda tratar de la actina de *E. histolytica*, ya que se conoce que esta proteína es altamente expresada en diversos organismos eucarióticos, además de que el peso molecular y algunas propiedades de esta proteína, ya reportada anteriormente es similar al que se obtuvo en este estudio (Gadasi, H. 1982, Meza, I. y col., 1983). Al analizar la secuencia de aminoácidos que codifican para actina de *E. histolytica*, se observó que esta se asemeja a la actina muscular de mamífero (Vandekerckhove, J. y Weber, K. 1978). La actina amibiana posee un residuo N-terminal de glicina, el cual no es muy usual en las actinas de otros organismos, esta característica fué encontrada en *Dictyostelium* (Vandekerckhove, J. y Weber, K. 1980) y *Acanthamoeba castellanii* (Nellen, W. y Gallwitz, D. 1982).

Huber y col. (1988) realizaron un análisis de la secuencia del gen que codifica para ferredoxina de *E. histolytica* y el papel que juega esta molécula en el transporte electrónico. Aunque este protozoo carece de mitocondrias y su transporte electrónico no ha sido bien estudiado, lleva acabo un metabolismo limitado tanto aeróbico como anaeróbico. Se cree que el transporte de electrones de *E. histolytica*, ocurre por una vía que posee flavinas y hemoproteínas y no han sido encontrados los citocromos. Huber y col. (1987) en estudios previos estudiaron la expresión de los genes de actina en *E. histolytica*, para lo cual aislaron el DNA complementario y caracterizaron tres clonas (A, B y C). Una de estas clonas (DNA complementario de la subclona B), se obtuvo de un RNAm pequeño de 500 nucleótidos, detectado por Northern blot. Mediante el aislamiento del DNA complementario y el análisis de las secuencias de la subclona B, se obtuvo el contenido de un gen estructural que codifica para apoferrredoxina. Además esta clona fue usada en la prueba para la identificación de clonas de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS que tienen un genoma que codifica para el gen de ferredoxina.

La molécula de DNA que codifica para el gen de ferredoxina, contiene dos cortas regiones no codificadoras en los extremos, la 5' y 3' de 9 y 25 nucleótidos respectivamente, las cuales no son comunes en los organismos eucarióticos. El extremo 5' es una región no traducible detectada por el análisis

de la extensión del primer, así como una región corta terminal 3'. Estas mismas características se encontraron cuando se realizó el análisis secuencial del gen de actina en *E. histolytica* (Huber y col., 1987), por lo que se puede decir que es una característica de los genes de este parásito.

La secuencia de aminoácidos de la ferredoxina de *E. histolytica* se asemeja a la ferredoxina tipo clostridial en que posee un arreglo de cisteínas caracterizado por la coordinación de 2 centros 4 Fe- 4S, no existiendo aminoácidos aromáticos en la región N-terminal de la proteína (estos residuos se relacionan con el transporte electrónico), lo cual es un carácter distintivo y conservado de las ferredoxinas clostridiales. La ferredoxina de *E. histolytica* es parte de una familia de hasta dos genes que codifican para dicha proteína.

Debido a que *E. histolytica* es una célula microaerófila, es altamente susceptible al metronidazol, la cual es una droga antimicrobiana, con alta toxicidad selectiva para anaeróbios y microaeróbios (Muller, M. 1981; Muller, M. 1983), se cree que la activación de la droga se debe a la reducción de su grupo nitro, por una baja en el potencial redox del sistema de transporte electrónico. Esta reducción del metronidazol ha sido demostrada *in vitro* por una reducción de la ferredoxina en *Clostridium pasteurianum*, en esta se observa que la ferredoxina puede transferir directamente electrones al metronidazol, sin la participación de enzimas (Lindmark, D.G. y Muller, M., 1976). En el caso de la ferredoxina en *E. histolytica* existe una activación directa del metronidazol (Huber y col., 1988).

Samuelson y col. (1990), identificaron segmentos múltiples de 344 bp del DNA amibiano, similar al gen humano de resistencia a multidrogas (mdr), usando primers en regiones conservadas de P- glicoproteínas y la reacción en cadena de la polimerasa. Para el estudio de los mecanismos de la resistencia a drogas en *E. histolytica*, Orozco y col. (1985) clonó en agar trofozoítos de la cepa virulenta HM1:IMSS de *E. histolytica*, estos autores mutagenizaron esta clona A con el agente etilmetanosulfonato (EMS) y seleccionaron una mutante la cual fué resistente a la emetina, llamada clona C2. Para mantener su fenotipo resistente a la droga se cultivó con emetina después de un año. Interesantemente la clona C2 también es resistente a la colchicina, la cual es una droga que no se relaciona con la anterior. Las células tumorales llegan a ser resistentes a las múltiples drogas quimioterapéuticas *in vitro*, dentro de las cuales se incluyen la adriamicina, colchicina, actinomicina D y la vinblastina, las cuales atacan a las células. El flujo de las drogas en las células tumorales es específicamente inhibido en los canales del ión calcio.

Asociado al fenotipo de la célula de la resistencia a drogas se encuentra la sobreexpresión de una proteína de 170 kDa, la P- glicoproteína, la cual tiene actividad de ATPasa. El gen *mdr* el cual codifica para esta P- glicoproteína, fué aislado de las células tumorales resistentes a drogas, y fue amplificado. La secuencia del DNA complementario del gen *mdr* muestra una proteína con dos mitades homólogas, una que es hidrofóbica y otra hidrofílica. Samuelson y col. (1990) realizaron la prueba de Northern, con los productos de la PCR del gen *mdr*, identificando el RNAm amibiano con una longitud de 4.5- 5 kb. el cual es similar al RNAm reportado de 5 kb del gen *mdr* de mamífero. Estos RNAm del *mdr* se incrementaron hasta 7 veces en la mutante amibiana (clona C2) resistentes a la emetina cuando fue comparada con la clona A de la misma cepa. Además la expresión de los RNAm del gen *mdr* se incremento de 3 a 4 veces cuando la clona mutante C2 fué crecida bajo la presencia de la droga, contra aquellos parásitos de la clona A fueron crecidos con emetina. En este trabajo se obtuvieron una familia de genes de *mdr* en *E. histolytica*, los cuales podrían estar relacionados con la resistencia a drogas del parásito, ya que estos genes se encuentran sobreexpresados en aquellas mutantes resistentes a drogas (Samuelson y col., 1990).

Las pruebas del aislamiento del DNA, no unicamente facilita el estudio de la organización genómica en parásitos como *E. histolytica*, sino que ayudarán a encontrar respuestas relacionadas con las bases moleculares de la patogenicidad (Tannich y col., 1989).

ELECTROFORESIS TRANSVERSAL DE CAMPOS ALTERNOS (TAFE) EN *Leishmania* sp.

Con este tipos de electroforesis Giannini y col. (1990), obtuvieron el cariotipo de 5 stock de *L. major*, resultando 10 cromosomas de aproximadamente 350 a 1000 kb, en este trabajo se dió un polimorfismo en cuanto a la talla de los cromosomas, ya que cada cepa tiene un cariotipo molecular característico, cuando estos cromosomas son separados por la electroforesis (PFG) (Giannini y col., 1986). No es muy frecuente que en las clonas de una misma cepa tengan cariotipos que difieran por una o mas bandas. No obstante a esta variabilidad, se encuentran similitudes que relacionan a las diferentes cepas de *Leishmania*, las cuales son suficientes para clasificarlas en esta especie cuando se realiza un análisis de su cariotipo molecular en una variedad clínica o en el laboratorio. Ocurre con gran frecuencia el polimorfismo en cuanto a la talla de los cromosomas de las cepas

de Leishmania, lo cual indica que existe una reorganización cromosomal en miembros de una misma población, bajo condiciones de laboratorio así como en la naturaleza. En las especies de Plasmodium se ha descrito ya lo altamente mutable que son sus cariotipos moleculares bajo condiciones de laboratorio o en el campo (Corcoran y col., 1988). Giannini y col. (1990), aplicaron la electroforesis PFG y la TAFE, para demostrar la variabilidad cromosomal durante su ciclo de vida, comparando estos resultados con cariotipos moleculares de Leishmania cultivados bajo diferentes condiciones de laboratorio. Cuando se compararon los cariotipos moleculares de Leishmania obtenidos por la electroforesis PFG y la TAFE fueron similares, como fué el número de bandas resueltas, aunque se presentaron algunas diferencias como la intensidad de las bandas resueltas, también la compresión de las bandas de 600 kb separadas por el sistema PFGE, lo cual no sucedió con el sistema TAFE. Se ha observado alto grado de plasticidad en el genoma de L. major en algunos cromosomas, lo cual se ha reportado en otras especies de Leishmania como es en L. donovani (Bishop y col., 1987; Bishop y col. 1989), L. torontolae y L. braziliensis (Giannini y col., 1986).

También se hicieron pruebas de hibridación con sondas de genes homólogos, las cuales se aplicaron a los cariotipos obtenidos, encontrando que existe un alto grado de secuencias homólogas en aquellas bandas de talla similar. Los stocks que se utilizaron fueron aislados desde hace 25 años y de una amplia área geográfica, estos presentan una conservación en la talla de sus cromosomas, por lo que se concluye que esto es una característica del cariotipo de las cepas de L. major.

La importancia del análisis de la organización del DNA en los protozoarios del género Entamoeba, es que los resultados que se obtengan se pueden aplicar para el desarrollo de metodologías de identificación de diferentes cepas, además de esta forma se puede estudiar la expresión y la organización del material genético, principalmente en localizar aquellos genes que se encuentran relacionados con la virulencia en diversos parásitos (Hernández y col., 1986).

OBJETIVO GENERAL.

Estudiar la organización del DNA de tres clonas de Entamoeba histolytica mediante la electroforesis transversal de campos alternos (TAFE).

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Analizar los cariotipos moleculares de las clonas A, L6 y C2-100 de Entamoeba histolytica mediante la técnica de electroforesis transversal de campos alternos (TAFE).
2. Localizar en los cromosomas de Entamoeba histolytica por métodos de hibridación DNA-DNA, los genes de tubulina, actina, ribosomal, D 1, D 1.6, porina y Eix.

MATERIAL Y METODOS:

1. CULTIVO DE TROFOZOITOS DE *Entamoeba* sp.

Los trofozoítos de *E. histolytica* (HM1:IMSS) clona L6 (Orozco y col. 1983), clona A (Orozco y col. 1982), clona C2-100 (Emr) (Herna'ndez. 1985; Ayala y col. 1990) y *E. invadens* clona IP- 1V, cepa que produce amibiásis en reptiles; (Valdés, 1990) fueron cultivados axénicamente en medio TYI-S-33 (Diamond y col, 1978). suplementado con suero de ternera al 20%. mezcla de vitaminas de Diamond al 2% (KC Biologicals) y antibióticos (penicilina 0.25 UI/ml y estreptomocina 35 microgramos/ml). Todas las clonas de *E. histolytica* se cultivarán a 37°C, mientras que *E. invadens* clona IP-1v se cultivó a temperatura ambiente.

Para cosechar los trofozoítos, los tubos (de vidrio de borosilicato de 16 x 125mm con tapa de rosca) con los cultivos en fase logarítmica de crecimiento (de 1 a 1.5×10^5 amibas/ml de medio) se incubaron a 0°C durante 10 minutos. Fué necesario agitar suavemente los tubos para despegar los trofozoítos de las paredes de vidrio. De la suspensión amibiana fría se tomaron inóculos para continuar el cultivo de la línea celular.

2. PREPARACION DEL DNA AMIBIANO POR LA INCLUSION DE TROFOZOITOS EN AGAROSA BAJO PUNTO DE FUSION Y LISIS IN SITU.

Para estudiar el DNA de *E. histolytica* y *E. invadens* por la técnica de electroforésis de campo alterno transversal (TAFE) las células se incluyeron en bloques de agarosa por la técnica de lisis in situ de los trofozoítos amibianos, de acuerdo a los métodos descritos por Van der Ploeg y col.(1984) ; Valdés y col. (1990). De 3 a 4×10^6 trofozoítos se lavaron a 4°C una vez con 30 ml. de una solución de EDTA 0.35M disuelto en solución PBS (fosfatos 10mM- cloruro de sodio 0.14M a un pH de 7.4). A las células se les añadió un volumen igual de agarosa de bajo punto de fusión al 1.4% (Beckman) a 50°C; la mezcla se homogenizó con la ayuda de una pipeta Pasteur previamente calentada y la suspensión resultante se vació en un formador de bloques rectangulares de 200 microlitros (bloques rectangulares de 1.6 x 0.2 x 1 cm) y se pusieron sobre hielo durante 5 minutos. Una vez que los bloques solidificaron, se sumergieron en una mezcla de lisis compuesta de EDTA 0.5 M (pH 9.5) · Laurilsarcosinato de sodio al 1% (Sigma Chem. Co. S. L. Mo.) con 2 mg/ml de proteinasa K

(Sigma) y se incubaron a 50°C por 48 horas. Posteriormente se cambiaron a una solución amortiguadora de almacenamiento formada por tris 1 mM (pH 8) - EDTA 50 mM y se almacenaron a 4°C.

3. ELECTROFORESIS TRANSVERSAL EN GEL DE CAMPOS ALTERNOS (TAFE)

La electroforesis de campo alterno transversal (TAFE) se realizó con un aparato Gene Line (Beckman Instruments, Palo Alto, Ca.) Este sistema consta de los siguientes componentes:

a) Cámara de electroforesis.

Una cámara cuyas dimensiones son de 30 x 8.9 x 18.7 cm. posee una capacidad de 3.5 lt (**figura 3**). La cámara esta hecha de acrílico claro y contiene en la parte media de su superficie unos rieles en los cuales es sostenido el gel en forma vertical durante la electroforesis, así como durante la transferencia. La cámara puede aceptar dos tipos de electrodos: los electrodos TAFE y electrodos para realizar la técnica de transferencia del gel a papel de nitrocelulosa (Beckman, 1988).

b) Electrodos.

Los electrodos TAFE son dos pares colocados uno enfrente del otro, de tal forma que el ángulo entre los campos eléctricos producidos es de 115°. En la **figura 4** se representa a los cátodos, como "N" y "E", los ánodos como "S" y "W", por los que los pares estan formados por N/S y E/W. Los electrodos de transferencia proporcionan una corriente constante unidireccional (Beckman, 1988).

c) Controlador.

El controlador es una parte del sistema que ejecuta el tiempo de corrida, la duración de cada pulso, la corriente o voltage para cada uno de los estados. Durante la corrida, el control ejecuta automáticamente cada estado del programa escogido sin la

intervención de un operador. Cuando los estados ya han sido ejecutados, el control retira la electricidad de los electrodos y de la fuente de poder. Si por alguna causa es interrumpida la corrida el control recuerda el punto donde el programa fué interrumpido, continuando desde este punto cuando la situación se normaliza (Beckman, 1988).

d) Sistema de enfriamiento de la cámara.

El sistema de enfriamiento se encuentra formado por dos partes: Uno es la parte de enfriamiento y el otro es el intercambiador de calor en forma de serpentín. La bomba hace circular la solución amortiguadora que se encuentra dentro de la cámara de electroforésis hacia el serpentín, donde es enfriado y devuelto nuevamente a la cámara (Beckman, 1988).

e) Fuente de poder.

La fuente de poder es capaz de suministrar una corriente o un voltaje constantes durante la operación. Esta fuente de poder puede ser operada automática o manualmente (Beckman, 1988).

Condiciones electroforéticas de la técnica TAFE.

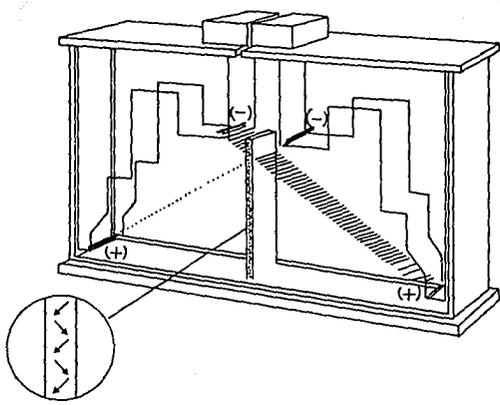
Para realizar la electroforésis TAFE se preparó el gel de 7.5 x 10 x 0.7 cm. Para esto se fundieron 0.6g de agarosa de baja endosmosis (L.E. Beckman), en 3 ml de solución amortiguadora Tris-boratos-EDTA (TBE) 1x (Maniátis y col., 1989). El molde fué colocado en una superficie plana para facilitar su manejo y este se inclinó con la ayuda de un soporte, pues esta posición facilitó el vaciado de la agarosa y evitó la formación de burbujas. Enseguida se colocó el peine para formar pocitos (este posee 9 dientes de 1.3 x 0.3 x 0.5 cm y la separación entre cada diente es de 0.2 cm) (Beckman, Inst. 1988), y el gel se dejó enfriar a 4°C.

Una vez sólido el gel, se sacó el peine cuidadosamente y en cada uno de los pocitos se introdujeron los bloques conteniendo DNA amibiano. Finalmente estos se sellaron con agarosa al 0.6% a 50°C. El gel se sacó del

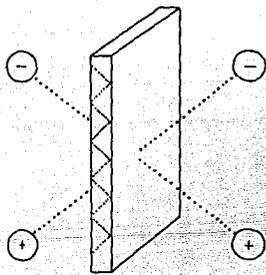
FIGURA 3. Cámara de electroforésis del sistema TAFE.

A) En esta se muestra la cámara de electroforésis, los electrodos con los respectivos polos tanto positivos (cátodo) como los negativos (ánodo), los cuales funcionan durante la electroforésis TAFE, así como se muestra el principio básico sobre la migración de las moléculas de DNA durante la electroforésis. La electroforésis TAFE trabaja al igual que otras técnicas de campo pulsado, lo cual produce una reorientación periódica de las moléculas de DNA bajo la influencia de la alternancia de dos campos eléctricos. **B)** La técnica TAFE emplea una geometría tridimensional, causando que las moléculas de DNA corran en forma de zig-zag a través de lo ancho del gel. **C)** Se observa el resultado de esta técnica TAFE donde en la cara del gel aparecen los carriles que migraron en líneas rectas.

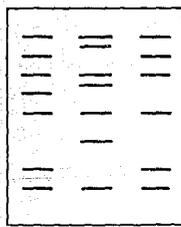
A



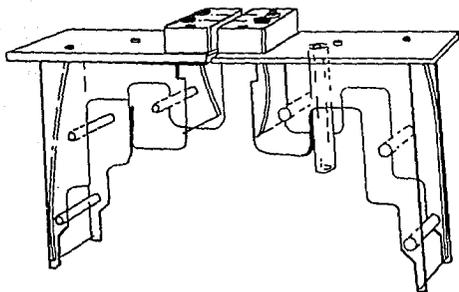
B



C



A



B

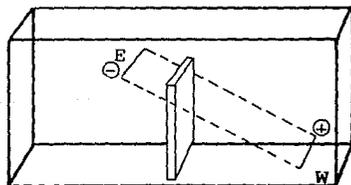
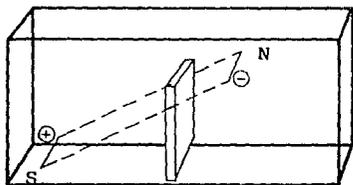


FIGURA 4. Electroodos utilizados en el sistema TAFE.

A) Se muestran los electroodos utilizados durante la electroforésis TAFE. **B)** se muestran como es que funcionan ambos electroodos, ya que el polo negativo del primer electrodo trabaja con el cátodo del segundo electrodo y visceversa, de tal forma que cada período de tiempo se forma un campo eléctrico, lo cual hace que las moléculas de DNA sean reorientadas y corran a largo del gel.

molde y se colocó entre los rieles que se encuentran en la parte media de la cámara de electroforesis.

El programa de corrida en todos los experimentos constó de dos estados, con las condiciones siguientes:

PROGRAMA 1

ESTADO 1: 280 mA (130 volts iniciales) por 48 horas con pulsos de 3 min.

ESTADO 2: 400 mA (150 volts iniciales) por 24 horas con pulsos de 8 min.

Una vez terminada la corrida del gel, este se tiñó con una solución de bromuro de etidio a una concentración de 5 microgramos/ml durante 5 minutos, se enjuagó y se observó en el transiluminador de luz ultravioleta (UVP, Inc.). El gel se fotografió con una cámara fotográfica Polaroid M-P4 usando película Polaroid tipo 55 o tipo 57, usando filtros amarillo (Kodak Wratten 2A) utilizando una abertura del diafragma con valor de 8 y 1.5 s de tiempo de exposición.

El tamaño de las bandas observadas en el gel corrido por TAFE se obtuvieron al graficar en papel similogarítmico de 3 ciclos por 7 divisiones, en el paralelo de las "y", el peso molecular de las bandas en kilobases $\times 10^2$ y en el paralelo de las "x" la migración de las bandas en centímetros. Tomando como base tanto la migración como el peso molecular de estándares (marcadores de peso molecular), uniendo los puntos se formó una recta, en la cual se localizaron las migraciones en centímetros de cada una de las bandas de la clona L6, A y C2-100 (**figura 7 B ver resultados**).

4. TRANSFERENCIA DEL GEL A PAPEL DE NITROCELULOSA.

Para hacer la transferencia del gel de agarosa, el DNA primero se depurizó con ácido clorhídrico 0.2N durante 5 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. El gel se enjuagó con agua bidestilada y enseguida el DNA se desnaturalizó con hidróxido de sodio 0.4N durante 60 minutos y en agitación suave; el gel se neutralizó con una solución compuesta por Tris 1M - NaCl 1.5M a pH 7.5, dos veces durante 15 minutos y el gel se

enjuagó con agua bidestillada y con amortiguador de transferencia 1x (glicina 1.25mM, hidróxido de sodio 1.14mM) durante 60 min, en agitación suave. Para realizar la transferencia en la cámara del GeneLine, se colocaron 3.5 lt de amortiguador de transferencia 1x a una temperatura de 12 a 14°C. Enseguida se hizo una especie de sandwich (de 6.5 x 10 cm) formado por una placa de plástico perforada, encima de la que se coloca una fibra Scotch Brite; arriba de esta una hoja de papel filtro (Whatman 3M) previamente cortado al tamaño del gel y humedecido con amortiguador de transferencia. Enseguida, se colocó el gel y sobre este el papel de nitrocelulosa (Schleicher and Schuell, Republica Federal Alemana); para cerrar el sistema se colocó por orden, el papel filtro, la fibra Scotch Brite y finalmente la placa de plástico perforada. **(figura 5)**. En cada una de estas interfases hay que tener cuidado de no dejar burbujas que impidan una transferencia eficiente. Formado el sandwich, este se puso en forma vertical dentro de los rieles de la cámara de electroforésis **(figura 6)**, finalmente se pusieron los electrodos de transferencia. La transferencia se realizó a una temperatura de 12 a 14°C y con el siguiente programa (especificado por el fabricante):

PROGRAMA 2

ESTADO 1: 100 volts por 2 horas aplicado solo al electrodo A.

El papel transferido se secó en un horno de vacío (NAPCO Scientific Company, U.S.A. Mod. 583) a una temperatura de 80°C durante 2 horas.

5.HIBRIDACION.

Para localizar las secuencias de DNA en los cromosomas obtenidos por la técnica TAFE, el papel de nitro celulosa con el DNA amibiano se hibridó con sondas de DNA conocido. Para esto el papel se trató a 42°C por 12 horas con solución de prehibridación (solución salina de citrato(SSC) 6x, solución de Denhardt's 10 x, dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1%, formamida desionizada al 50% y DNA desnaturalizado de esperma de salmón 100 microgramos/ml) (Levine, J. y col.,1988). Posteriormente la membrana se hibridó a 42°C durante 12 horas con el DNA marcado con alfa-fosforo 32 dATP y que fué marcado siguiendo la técnica de "Random Primer" (Ausubel, M. y col., 1989) disuelta en solución de hibridación (solución salina de citrato (SSC) 5x, sol. de Denhardt 10x, dodecil sulfato de sodio al 1%, formamida desionizada al 50%

FIGURA 5. Componentes utilizados para la transferencia del gel.

Se muestra el orden en que deben acomodarse los elementos que conforman el "sandwich", para realizar la transferencia del gel al papel de nitrocelulosa. Al construir este complejo es necesario tener cuidado de no dejar burbujas de aire entre cada uno de los elementos. Además se muestra la manera de sujetar el sandwich colocarlo en los rieles centrales de la cámara de transferencia.

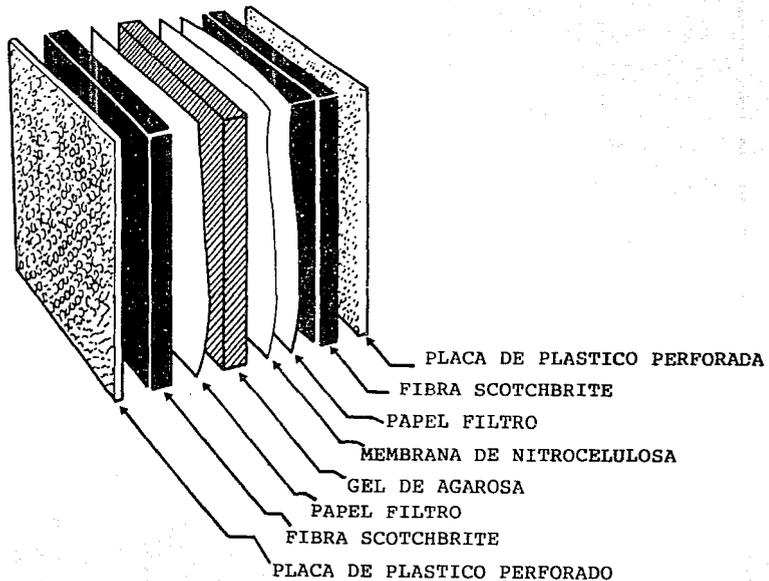
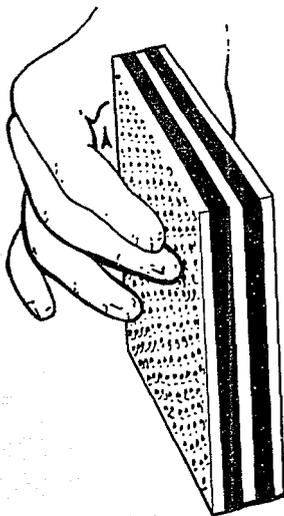
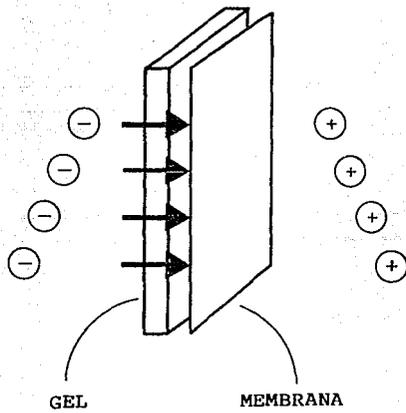


FIGURA 6. Dirección que toman las moléculas de DNA durante la transferencia a papel.

En este esquema se muestra la manera en que las moléculas de DNA corridas en el gel son transferidas al papel de nitrocelulosa. Durante esta técnica la corriente viaja en una sola dirección, las moléculas de DNA cargadas negativamente salen del gel dirigiéndose a la membrana.



y DNA desnaturalizado de espermatozoos de salmón 100 microgramos/ml) (Levine, J. y col., 1988). Con el propósito de eliminar aquellas partículas de DNA que se unieron inespecíficamente al papel se hizo una serie de lavados consecutivos a la membrana con una solución de SSC 5x - SDS 1% a 42°C durante 15 minutos, repitiéndose el mismo procedimiento de lavado con las soluciones SSC 2.5x - SDS 1%, SSC 1x - SDS 1%, y SSC 0.1x - SDS 1% (65°C), esto se realizó cuando el DNA marcado era amibiano (homólogo) con respecto al DNA transferido, sin embargo cuando el DNA marcado no era amibiano (heterólogo), solo se hicieron lavados con SSC 5x - SDS 1% y SSC 2.5x - SDS 1% a 42°C o temperatura ambiente. Enseguida se puso la membrana en contacto con placas sensibles a rayos X (Película Kodak X-OMAT K GBX-2) a -70°C (Levine, J. y col., 1988).

6. EXTRACCION DE PLASMIDOS E INSERTOS.

Para obtener las moléculas de DNA que se usarán como sondas en esta trabajo se utilizó la técnica de lisis por ebullición para preparar el DNA de los plásmidos adecuados (**Tabla 3**). Para esto una colonia bacteriana se inoculó en 5 ml de medio Luria-Bertani, creciéndola a 37°C durante toda la noche. Se transfirieron 1.5 ml del cultivo anterior a un tubo de 2 ml y las células se centrifugaron durante 20 segundos; el sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió en una solución de lisis (cloruro de sodio 10mM, tris-Cl 10mM pH 7.5, EDTA 1 mM). La pastilla celular se volvió a resuspender, por agitación en vortex en 300 µl de la solución compuesta por tris-Cl 50mM pH 8, sacarosa 8%, triton-X-100 al 5%, EDTA 50mM (STET), conteniendo 20 microlitros de lisozima a 5 microgramos/ml. El tubo se colocó en hielo por 10 min, pasándolo enseguida en agua hirviendo 45 segundos. La muestra se centrifugó nuevamente por 20 min, dando como resultado una pastilla que contiene residuos de bacterias y un sobrenadante que contiene el DNA plasmídico; este se cogió con una pipeta y se introdujo en un tubo nuevo, mezclándolo con 200 microlitros de isopropanol frío. Enseguida, la muestra se puso a una temperatura de -20°C por 15 min y se volvió a centrifugar durante 5 minutos (el isopropanol frío precipitó el DNA del plásmido y el RNA celular). El sobrenadante se quitó invirtiendo el tubo, y agitando varias veces, dejando secar la pastilla al vacío, hasta que esta se vió escamosa. La pastilla se resuspendió en 50 microlitros de agua tridestilada (Ausubel y col., 1989).

TABLA III

SONDAS UTILIZADAS PARA HIBRIDAR LAS BANDAS CROMOSOMALES DE DNA AMIBIANO

SONDA	FRAGMENTO AL QUE CODIFICA	ORIGEN	No. BASES
DEB 1.6	A genes ribosomales y a parte de la secuencia de la sonda D 1.	<u>E. histolytica</u> Clona A	1600 pb
DEB 1	A genes ribosomales.	<u>E. histolytica</u> Clona A	1000 pb
Eix	Probablemente a secuencias que codifican para la enzima quitina sintetaza de <u>E. Invadens</u> .	<u>E. Invadens</u>	428 pb
DNA ribosomal	Secuencias homólogas a los genes de RNA ribosomal 28S.	DNA Plasmidico pH6	1400 pb
PORINA	Secuencias del gen ompC que codifica para la porina de membrana externa de <u>Salmonella tify</u> .	DNA Plasmidico pMY-III	1000 pb
ACTINA	Secuencias del gen que codifica para la proteína del citoesqueleto actina.	<u>E. histolytica</u> Clona A	235 pb
DNA Total	Secuencias del gen que codifica para el DNA Total.	<u>E. histolytica</u> Clona L6	600 pb
TUBULINA	Secuencias del gen que codifica para la proteína del citoesqueleto tubulina.	<u>E. histolytica</u> Clona L6	700 pb

7. MARCAJE DEL DNA POR LA TECNICA RANDOM PRIMER.

El DNA se marcó con dATP-alfa fosforo 32 (Amersham, 10 microCuries/microlitro), para marcar de 25 a 50 ng de DNA (actividad específica 1.2×10^9 dpm/microgramo), para lo que el DNA se disolvió en una solución amortiguadora TE 1x (Tris-HCl 10mM pH8, EDTA 1mM pH8), a una concentración tal que 25 - 50 ng pudieran añadirse al volumen de reacción en no más de 37 microlitros. El DNA se desnaturalizó calentando 5 minutos en un baño de agua a 100°C y se enfrió en hielo por 2 minutos. De esta forma, el DNA quedo de cadena sencilla. Al DNA desnaturalizado, se le añadieron 5 microlitros de la mezcla de desoxinucleótidos, 5 microlitros de la mezcla de hexanucleótidos y 5 microlitros de dCTP alfa fosforo 32 (3000 Curies/mmol) y 1 microlitro del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (2U/microlitro). La mezcla de reacción se incubó a 37°C por 30 minutos, la reacción se detuvo agregando 50 microlitros de amortiguador STE. Para eliminar el (γ - 32 P-ATP) que no se incorporó se paso por una columna de 1 ml. de Sephadex G- 50 y se centrifugó a 3000 r.p.m. por 4 minutos y se congelaron las sondas de DNA ya marcadas (Ausubel, 1989).

8. PRUEBA DE DENSITOMETRIA EN PLACAS DE AUTORADIOGRAFIA.

Una vez que se obtuvieron las placas de autoradiografía donde dieron señal las diferentes sondas en el DNA transferido a papel, las placas fueron sometidas a densitometría para verificar el número de bandas marcadas por las sondas, así como el número de moléculas de DNA que se encuentran en cada una de las bandas resultantes de las hibridaciones y las que fueron resueltas en los geles de agarosa por el sistema TAFE. Dicha prueba se realizó en un espectrofotómetro Beckman DU-7, leyendose a una longitud de onda de 550 nanómetros y el aparato dibujo automáticamente las curvas sobre el papel. Este método fué descrito por Scholler y col. (1986) y modificado para Entamoeba por Valdés y col. (1990). De los barridos obtenidos se obtuvieron los siguientes datos: a) número de kilobases de cada una de las bandas(s) de *E. histolytica* clona L6, clona A y clona C2-100, que fueron calculados en base a los marcadores de peso molecular (levadura y *E. chabaudi*); b) la densidad relativa que se obtiene por el pesado de cada pico (derivado de los barridos) correspondiente a las bandas del gel y expresado como el porcentaje del peso total, multiplicado por 10^3 ; c) número de moléculas de DNA por banda (N), que se calculó dividiendo la densidad relativa entre la talla de cada banda, (el

pico con la menor cantidad de moléculas de DNA, se tomó arbitrariamente como un cromosoma). Para calcular el número total de pares de bases, se sumó la cantidad total del DNA en el gel (80%) y la cantidad de DNA contenida en los pozos (20%). (Valdés y col., 1990)

9. GEL Y BLOQUES DE AGAROSA TRATADOS CON BROMURO DE ETIDIO CORRIDOS BAJO LA ELECTROFESIS TAFE.

Para conocer si existen moléculas circulares en el DNA de *E. histolytica* se corrieron geles con el sistema TAFE en presencia de bromuro de etidio. Para esto los bloques de agarosa de bajo punto de fusión preparados con el DNA de *E. histolytica* clona A, clona L6 y *P. chabaudi* (cepa AS), se incubaron en 1 ml de solución amortiguadora TBE 1x con una concentración de 0.05 microgramos/ml de bromuro de etidio, a temperatura ambiente y con agitación lenta durante dos periodos de tiempo, el primero constó de dos horas y el segundo durante toda la noche. Enseguida se colocaron los bloques en un gel preparado con 0.6g de agarosa de baja endosmosis; 57 ml de agua desionizada; 3 ml de solución amortiguadora TBE 10x y 1 microlitro de solución de bromuro de etidio cuya concentración es de 5 microgramos/ml (concentración final de 0.05 microgramos/ml) (Beverley, M. 1988). El gel se corrió bajo la electrofóresis TAFE con 3.5 lt de solución amortiguadora TBE 1x con una concentración de bromuro de etidio de 0.05 microgramos/ml, con las condiciones de corrida usuales.

10. GEL BIDIMENSIONAL CORRIDO POR EL SISTEMA TAFE.

a) PRIMERA DIMENSION.

Las moléculas de DNA de *E. histolytica* también se analizaron por medio de geles bidimensionales corriendo las muestras usando dos condiciones. Para esto se preparó un gel de acuerdo a las condiciones usuales para el sistema TAFE, colocando en este los bloques que contienen incluido el DNA de *Saccharomyces cerevisiae*, *Plasmodium chabaudi* y *E. histolytica* clona A y la primera dimensión se corrió bajo las condiciones usuales:

PROGRAMA 4

ESTADO 1: 280 mA por 48 hrs con pulsos de 3 min.

ESTADO 2: 400 mA por 24 hrs con pulsos de 8 min.

b) SEGUNDA DIMENSION.

Para la segunda dimensión se preparó un gel con agarosa 0.4 g, 3 ml de solución amortiguadora TBE 10x y 57 ml de agua bidestilada. Además se suprimió el espacio ocupado por los pozos, ya que en este se colocó el carril de la clona A corrido en la 1a. dimensión, poniendo como controles un bloque de DNA de *E. histolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* y *P. chabaudi*. Una vez colocadas las muestras se sellaron con agarosa de bajo punto de fusión y este gel se corrió bajo las siguientes condiciones:

PROGRAMA 5

ESTADO 1: 280 mA por 36 hrs con pulsos de 5 min.

ESTADO 2: 400 mA por 18 hrs con pulsos de 8 min.

Tanto en la 1a y la 2a dimensión se utilizó durante la corrida la solución amortiguadora de TBE 1X. El gel de agarosa resultante se transfirió y se hibridó con la sonda de actina de como se describió en materiales y métodos. El papel hibridado se lavó en condiciones estrictas y se expuso a placas de rayos X durante 15 días a -70°C.

RESULTADOS.

SEPARACION DE CROMOSOMAS DE *E. histolytica* (HM1:IMSS) CLONAS L6, A y C2-100 MEDIANTE ELECTROFORESIS TRANSVERSAL DE CAMPOS ALTERNOS (TAFE).

La electroforesis convencional separa fragmentos de DNA de tamaño pequeño (< 50 Kilobases) en geles horizontales o verticales, pero estos frecuentemente dejan poco clara la separación de aquellos fragmentos de DNA de alto peso molecular (> 50 kilobases). La razón es que estas moléculas, esencialmente de formas globulares, son tan largas que no se mueven a través de los poros del gel. Si el voltaje que se aplica es lo suficientemente alto, estas moléculas se alargan formando estructuras lineares que se mueven dentro del gel. Pero estas moléculas lineares se mueven con la misma velocidad, dando como resultado bandas discretas no resueltas. (Beckman, 1988). Por esta razón en este trabajo se aplicó la electroforesis de campo pulsado, en la cual no existe limitación en la separación de moléculas de gran tamaño, ya que dichas moléculas son reorientadas periódicamente de una dirección del campo eléctrico a otra. La movilidad de estos fragmentos esta en función a su talla y una vez que las moléculas son reorientadas estas se mueven a través del gel en forma alargada. Junto con el cambio en la dirección de las moléculas del DNA, esta la alternación en la polaridad de los campos eléctricos.

Para la aplicación de la técnica TAFE fué necesario separar las moléculas de DNA de tamaño cromosomal de las células, embebiendo los trofozoítos amibianos en bloques de agarosa para después desproteinizarlos. Dichos bloques fueron colocados en el origen de un gel de agarosa 1%, así el DNA amibiano fué separado al aplicar la electroforesis TAFE.

En la **figura 7A** se muestra un gel de agarosa al 1% sometido a las condiciones TAFE y teñido con bromuro de etidio, poniendo como muestras bloques con DNA de *E. histolytica* (HM1:IMSS) clona L6 (L6), clona A (A) y clona C2-100 (C2-100). Como marcadores de peso molecular se utilizó DNA de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (S.c.) y *Plasmodium chabaudi* (P.c.).

En este gel se observó un patrón de bandeo propio para cada una de las clonas probadas, pero en cada uno de los experimentos realizados con esta técnica bajo las mismas condiciones se observa el mismo patrón de bandeo. Las bandas obtenidas se numerarán a partir de las que presentaron la menor migración.

A continuación se dará una descripción de la localización y peso de cada una de las bandas separadas en las distintas clonas.

***E. histolytica*(HM1:IMSS) CLONA A.**

En el caso de la clona A (A) se separaron 20 bandas (**figura 7A y 7C**), con un rango entre > 3.0 a 0.3 Mb. El tamaño de cada una de las bandas se presenta en la **tabla IV** así como de los marcadores de peso molecular *S. cerevisiae* (S.c.) y *E. chabaudi* (P.c.).

***E. histolytica* (HM1:IMSS) CLONA L6.**

En la clona L6 (L6) se observaron 16 bandas (**figura 7A y 7C**), en un rango de tamaño entre > 3.0 a 0.35 Mb. El tamaño de cada una de las bandas se detalla en la **tabla**

***E. histolytica* (HM1:IMSS) CLONA C2-100.**

En la clona C2-100 (C2-100) fueron separadas 13 bandas (**figura 7A y 7C**), con un rango de tamaños entre 2.8 y aproximadamente 0.3 Mb. El tamaño de las bandas resueltas en el experimento se muestra en la **tabla IV**.

Como se observa en aquellas bandas de la clona A y L6 cuya migración fué menor de 2.4 cm (es decir las mas cercanas al pozo) únicamente se da un peso tentativo mayor de 3.0 Mb, esto se debe a que el sistema TAFE a esta distancia pierde linealidad, lo cual fué observado cuando se trato de extrapolar dichas bandas en la gráfica semilogarítmica para obtener los pesos moleculares de las bandas. (**figura 7B**).

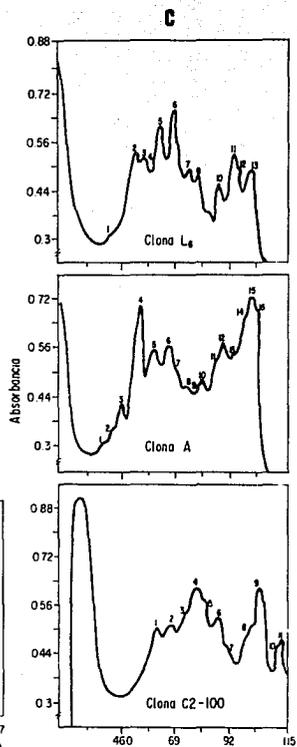
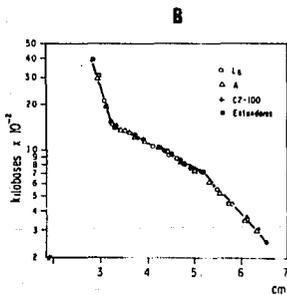
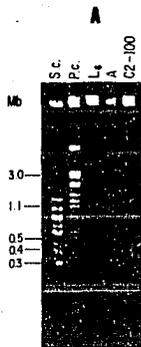
El análisis densitométrico de las fotografías de los geles según el método de Scholler y col. (1986) resultó que el número de cromosomas obtenido para cada una de las clonas era demasiado alto, arriba de 150 cromosomas para las clonas L6, A y C2-100 tuvo un número cromosómico de 32. Por otra parte, la complejidad del genoma calculado a partir de los datos densitométricos fué muy alto, en nada comparables con los resultados obtenidos por Valdés y col. (1990). Tomando como el 100% el total del DNA presente en el gel se comprobó que para las tres clonas el 30% del DNA queda en el pozo, entrando al gel entre 71 y 76%, formando bandas de diferentes intensidades, dichos

TABLA IV
NUMERO Y PESO MOLECULAR DE LAS BANDAS OBTENIDAS
DE LAS CLONAS DE Entamoeba histolytica

MARCADORES						CLONAS DE <i>E. histolytica</i> (HM1:IMSS)								
<i>P. chabaudi</i>			<i>S. cerevisiae</i>			L6			A			C2-100		
No. Banda	Migrac. (cm)	Peso (Mb)	No. Banda	Migrac. (cm)	Peso (Mb)	No. Banda	Migrac. (cm)	Peso (Mb)	No. Banda	Migrac. (cm)	Peso (Mb)	No. Banda	Migrac. (cm)	Peso (Mb)
I	2.8	3.8	I	3.2	1.5	I	1.5	<3.0	I	1.9	>3.0	I	2.8	2.8
II	3.3	1.42	II	3.9	1.28	II	1.9	<3.0	II	2.0	>3.0	II	3.1	1.89
III	3.7	1.28	III	4.3	1.0	III	2.2	<3.0	III	2.2	>3.0	III	3.2	1.5
IV	3.95	1.185	IV	4.7	0.85	IV	2.95	3.1	IV	2.4	>3.0	IV	3.3	1.42
V	4.2	1.04	V	4.9	0.76	V	3.05	2.1	V	2.9	3.0	V	3.6	1.33
VI	4.55	0.92	VI	5.25	0.7	VI	3.25	1.47	VI	3.1	1.89	VI	3.8	1.23
VII	4.8	0.82	VII	5.7	0.46	VII	3.6	1.33	VII	3.3	1.42	VII	4.1	1.09
VIII	5.2	0.73	VIII	6.5	0.26	VIII	3.7	1.28	VIII	3.5	1.39	VIII	4.5	0.92
						IX	4.1	1.09	IX	3.55	1.36	IX	4.8	0.82
						X	4.4	0.96	X	3.75	1.26	X	5.4	0.59
						XI	4.6	0.89	XI	3.9	1.18	XI	5.75	0.45
						XII	4.8	0.82	XII	4.2	1.04	XII	6.1	0.35
						XIII	5.2	0.73	XIII	4.4	0.96	XIII	6.3	0.3
						XIV	5.5	0.55	XIV	4.7	0.85			
						XV	5.8	0.44	XV	5.0	0.74			
						XVI	6.1	0.35	XVI	5.3	0.63			
									XVII	5.5	0.53			
									XVIII	5.75	0.45			
									XIX	6.1	0.35			
									XX	6.3	0.3			

Figura 7 . Análisis electroforético (TAFE) y densitométrico del DNA de *E. histolytica* (HM1:IMSS) de las clonas L6, A y C2-100.

A). Se observa en el gel teñido con bromuro de etídio, las bandas del DNA amibiano de la clona A, L6 y C2-100, el cual fué fraccionado por la electroforésis TAFE. El peso molecular de dichas bandas cromosómicas se encuentra descrito en Megabases, los cuales se obtuvieron en base a los marcadores de peso molecular (*S. cerevisiae* y *P. chabaudi*). **B).** Muestra la gráfica resultante de los pesos moleculares de las tres clonas L6, A y C2-100, teniendo como base para su obtención los pesos moleculares de los estandares (levadura y *P. chabaudi*). En las bandas de la clona L6 y A cuya migración fue mayor de 2.4 cm (las mas cercanas al pozo), se da un peso tentativo mayor de 3.0 Mb, debido a que el sistema TAFE a esta distancia pierde linealidad. **C).** Se muestran los barridos de las bandas cromosómicas del DNA de las clonas L6, A y C2-100, estos barridos se obtuvieron por la lectura de las placas de rayos X en un espectrofotómetro. Cada uno de los picos obtenidos en las diferentes clonas se enumeraron, algunos de estos picos tenían más de una banda resuelta por el sistema TAFE.



datos si concuerdan con los de Valdés y col. (1990). De acuerdo a estos datos obtenidos se pudo deducir que las bandas de DNA obtenidas por el sistema TAFE, no se encontraban completamente resueltas, es decir una bandas puede contener a su vez dos o mas bandas del mismo peso molecular, por esta razón el peso en kilobases y el número de bandas es demasiado alto.

PRUEBAS DE HIBRIDACION DEL DNA CROMOSOMAL DE *E. histolytica*(HM1:IMSS) CLONAS L6, A, C2-100 CON DIFERENTES SONDAS MOLECULARES.

Con el propósito de localizar secuencias de DNA, correspondientes a genes conocidos, en los cromosomas de *E. histolytica*(HM1:IMSS) clona L6, clona A y clona C2-100, el DNA amibiano fraccionado por TAFE, se transfirió a papel de nitrocelulosa y se hibrido' con 8 diferentes sondas moleculares marcadas con P³². Las sondas probadas fueron las siguientes:

a) DNA Total. El DNA marcado para este experimento se obtuvo marcando todo el DNA de *E. histolytica* clona L6. Esta prueba se hizo con el propósito de verificar el número de bandas vistas en los geles teñidos con bromuro de etidio (**figura 8A**). El papel con los cromosomas transferidos fue tratado en condiciones estrictas de hibridación, (se inició el tratamiento de lavado con una solución de SSC 5x- SDS al 1% a 42°C, finalizando con una solución de SSC 0.1x- SDS 1% a 65°C). Como resultado de la hibridación, en la placa que estuvo expuesta 16 horas (**figura 8B**) se obtuvieron señales de bandas cuyo peso molecular se encuentra entre 3 a 1.3 y 0.3 Mb, así como señales poco intensas o nulas en aquellas bandas cuyo peso molecular es de 1.0 a 0.5 Mb las cuales aparecen muy leves en el gel teñido con bromuro de etidio. Sin embargo, estas bandas se hicieron más evidentes cuando la exposición de la placa fué de 96 horas (**figura 8C**).

b) DNA ribosomal. Para estudiar la organización del DNA ribosomal se usó una sonda de 1400 kb, originada de DNA amibiano y que codifica para los genes de RNA ribosomal (Samuelson y col. 1989). Esta prueba se realizó en condiciones de astringencia estricta; se expuso el papel de nitrocelulosa marcado radioactivamente en placas de rayos X durante un

tiempo de 2 días a -70°C (**figura 9**). Se observó que en la clona A, la sonda hibridó en bandas de 3.0, 1.89, 1.42, 1.39, 1.36, 1.18 Mb y en la banda de 0.3 Mb en donde la señal fué menos intensa comparada con las bandas anteriores (**figura 9B**); en la clona L6 se tuvo señal en las bandas de peso 1.47, 1.33 Mb y en la clona C2-100 en las bandas de peso 1.5, 0.3 Mb. La señal de 0.3 Mb de C2-100 al igual que en la clona A es de poca intensidad. Por otra parte, se observó una señal muy intensa en los orígenes (pozos) de las tres clonas, esto se puede deber a la presencia de DNA amibiano que no pudo entrar al gel.

c) Actina. Otra sonda fué la secuencia que codifica para la proteína del citoesqueleto actina (Meza, l., 1983) obtenida a partir del DNA de *E. histolytica* clona A (**figura 10**). El papel de nitrocelulosa hibridado fué tratado bajo condiciones estrictas y se expuso en placas de rayos X un tiempo de 15 días a -70°C . Esta sonda hibridó en la clona A en las bandas con un peso de 1.42, 1.39, 1.36, 0.3 Mb; en la clona L6 en las bandas 1.47, 1.09, 0.35 Mb y en la clona C2-100 en las bandas 1.33, 1.23, 0.59 Mb (**figura 10B**). Las señales obtenidas con esta sonda no son tan claras como las obtenidas en la sonda ribosomal o la sonda de tubulina. En cuanto a los orígenes se obtiene una señal de mayor intensidad en la clona C2-100, menos intensa en la clona A y muy tenue en la clona L6.

d) Tubulina. La sonda con la secuencia de la proteína del citoesqueleto tubulina se obtuvo del DNA de *E. histolytica* clona L6 (Sanchez y col. enviado a publicación). Esta sonda se hibridó en un papel de nitrocelulosa transferido con el DNA amibiano, tratado bajo condiciones de estricta astringencia y se expuso en placas de rayos X durante un periodo de 15 días a -70°C (**figura 11**). Resultaron señales para la clona A en las bandas de un peso de 3.0, 1.89, 1.42, 1.39, 1.36, 1.26 Mb; en la clona L6 en las bandas 3.1, 1.47 Mb y en la clona C2-100 en las bandas 1.5, 1.42 Mb (**figura 11B**), la intensidad de estas bandas fué muy leve comparando las señales presentadas en la clona A y L6. En las tres clonas se dieron señales muy intensas en los orígenes, esto pudo deberse a que la cantidad de DNA contenido en cada bloque o que la cantidad de DNA atrapado en el pozo era mayor.

e) **Sonda D 1.6.** La sonda D 1.6 fué seleccionada, a partir del cDNA de la clona A, con el propósito de identificar secuencias que se expresen en clonas virulentas y no en clonas no virulentas. D 1.6 mide 1.6 kb, esta posee secuencias de genes ribosomales y además contiene un fragmento llamado D 1 el cual realmente sirve para distinguir las clonas virulentas de las no virulentas (Lazard y col. enviado a publicación). La sonda D 1.6 se hibridó bajo condiciones estrictas y fué expuesta en placas de rayos X durante un periodo de 8 horas a temperatura ambiente (**figura 12**). En la clona A, D 1.6 dió señal en las bandas cuyo peso es de 3.0, 1.42, 1.39, 1.36, 1.18, 0.3 Mb ; en la clona L6 en las bandas 1.47, 0.35 Mb y en la clona C2-100 en la banda de 1.89 Mb (**figura 12B**). En las tres clonas se observaron señales en los orígenes con gran intensidad.

f) **Sonda D 1.** La sonda D 1 se obtuvo a partir del fragmento D 1.6 por la aplicación de enzimas de restricción, este fragmento mide 1000 kb (Lazard y col. enviado a publicación). La hibridación con esta sonda se realizó bajo condiciones estrictas exponiéndose bajo las mismas condiciones que la sonda D 1.6. Las señales observadas fueron, en el caso de la clona A en las bandas 3.0, 1.42, 1.39, 1.36 Mb; en la clona L6 en las bandas 1.47, 0.35 Mb y en la clona C2-100 no se presentó señal (**figura 12 C**). Con esta sonda se presentó señal en los orígenes pero no con la misma intensidad de la sonda anterior, esto puede deberse a la cantidad de DNA contenida por bloque.

g) **Porina.** Como sonda en estos experimentos se usó una secuencia de *Salmonella typhi* de 1000 pb que codifica para el producto ompC que corresponde a la proteína porina presente en la membrana externa (Felayo, 1991). Para este experimento la hibridación del papel de nitrocelulosa transferido con el DNA amibiano, se hizo bajo condiciones relajadas de hibridación (SSC 5x - SDS al 1% a 42°C) y el papel se expuso en placas de rayos X durante 15 días a - 70°C. Las señales resultantes fueron muy leves (**figura 13**). en la clona A apareció en las bandas 1.42, 1.39, 1.36 1.26, 1.04 Mb; en la clona L6 no se presentó señal y en la clona C2-100 en la banda 1.23 Mb (**figura 13 B**). En cuanto a los orígenes se observó una fuerte señal en la clona L6, comparada con la clona A y C2-100.

h) Sonda Eix. La secuencia Eix corresponde probablemente al gen que codifica para la enzima quitina sintetasa de *E. invadens* clona IP-1v y mide 428 kb (Valdés y col. 1991 enviado a publicación). La sonda se hibridó en un papel de nitrocelulosa transferido con DNA de *E. histolytica* clona A y con DNA de *E. invadens* clona IP-1v (**figura 14**). Esta sonda dió una señal muy intensa como se observa en la **figura 14 B**, en el DNA de *E. invadens* (IP-1v), de tal forma que no se pudieron distinguir las bandas presentes: en la clona A las señales fueron en las bandas 1.42, 1.39, 1.36 Mb.

Los resultados obtenidos de la hibridación de cada una de las sondas con los cromosomas de las clonas L6, A y C2- 100 se resumen en la siguiente **tabla V**.

Figura 8. Hibridación de las bandas cromosómicas de DNA amibiano con la sonda homóloga de DNA total.

A). Se observa en el gel de agarosa corrido por el sistema TAFE el patrón de bandeo de la clona L6(L6), A(A), C2-100(C2-100), el cual fué teñido con bromuro de etídio. **B).** Muestra la prueba de hibridación del DNA de *E. histolytica* clona L6, clona A y clona C2-100 con DNA total, fué lavado en condiciones de estricta astringencia y expuesto en dos ocasiones en placas de rayos X, siendo la primera exposición de 16 horas a -70°C , observandose en la **C)** la segunda exposición de 96 horas a -70°C .

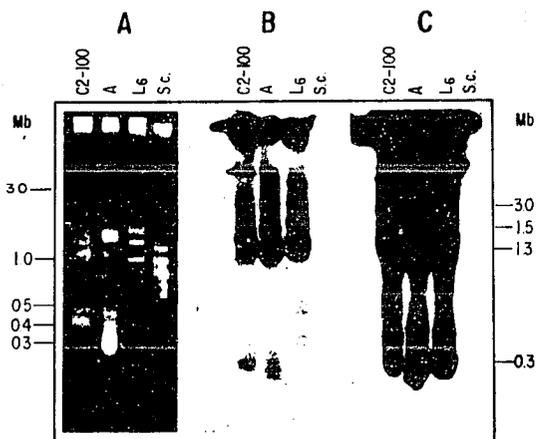


Figura 9. Hibridación de las bandas cromosómicas de DNA amibiano con la sonda de DNA ribosomal.

A). Muestra el gel teñido con una solución de bromuro de etidio, corrido con la electroforesis TAFE, bajo las condiciones descritas en materiales y métodos, con muestras de levadura (S.c.), clona L6(L6), clona A(A) y clona C2-100(C2-100). Este gel fué transferido a papel de nitrocelulosa e hibridado con una sonda de DNA ribosomal, lavado en condiciones de estricta astringencia y expuesto en placas de rayos X durante un tiempo de 2 días a -70°C , los resultados obtenidos se muestran en la **figura 9B**.

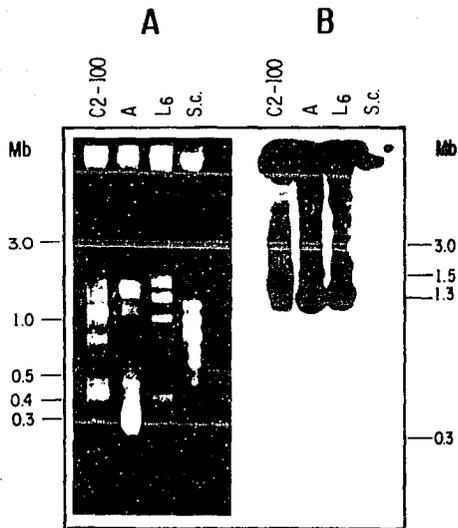


Figura 10. Hibridación de las bandas cromosómicas del DNA ambiental con la sonda de actina.

A). Se muestra un gel teñido con una solución de bromuro de etidio, corrido con la electroforesis TAFE, bajo las condiciones anteriormente mencionadas en materiales y métodos, con muestras de levadura (lev), clona L6(L6), clona A(A) y clona C2-100 (C2- 100). este gel fue transferido a nitrocelulosa e hibridado con una sonda de actina, lavado bajo condiciones de alta astringencia y expuesto en placas de rayos X durante un tiempo de 15 días a - 70°C. Los resultados que se obtuvieron se presentan en la **figura 10 B.**

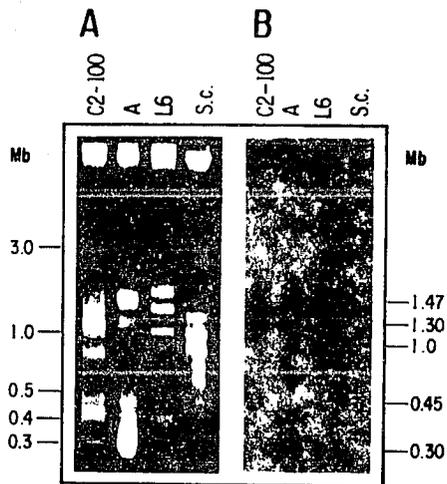


Figura 11. Prueba de hibridación en las bandas cromosómicas del DNA amibiano con la sonda de tubulina.

A) Se observa el gel teñido con bromuro de etidio, corrido con la electroforésis TAFE, bajo las condiciones descritas en materiales y métodos, con muestras de levadura(S.c.), clona L6(L6), clona A(A) y clona C2-100 (C2-100), este gel fué transferido a papel de nitrocelulosa e hibridado con una sonda de alfa tubulina, lavado bajo condiciones de alta astringencia, el papel expuesto en placas de rayos X durante un tiempo de 15 días a -70°C. Los resultados se muestran en la **figura 11 B**.

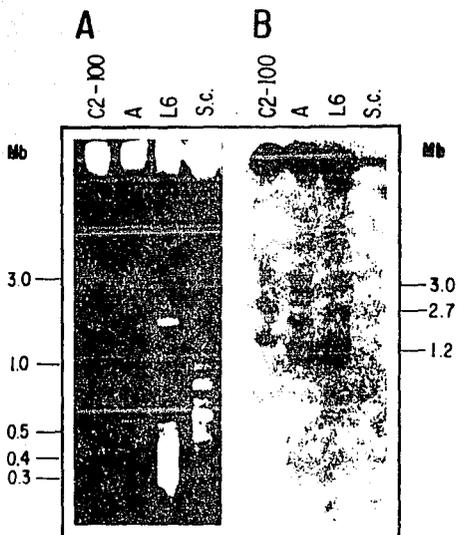


Figura 12. Hibridación de las bandas cromosómicas de DNA amibano con la sonda D 1.6 y D 1.

A) Se observa el gel teñido con bromuro de etidio corrido con la electroforesis TAFE, bajo las condiciones redactadas en materiales y métodos, con muestras de levadura (S.c.), clona L6(L6), clona A(A) y clona C2-100(C2-100), los geles se transfirieron a papel de nitrocelulosa y los papeles resultantes se hibridarán con las sondas D 1 (**figura 12 A**) y D 1.6 (**figura 12 B**), ambos tratados en condiciones estrictas de astringencia y expuestos a placas de rayos X durante 8 horas a temperatura ambiente.

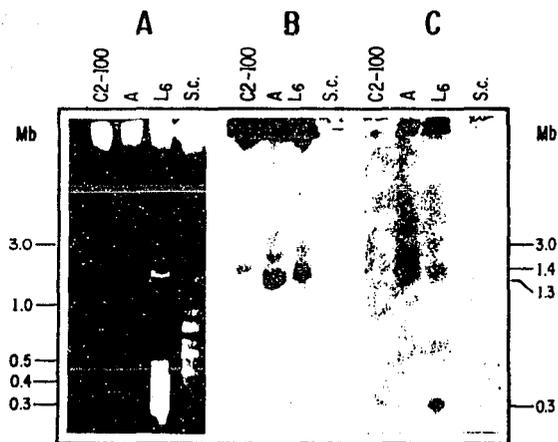


Figura 13. Prueba de hibridación en las bandas cromosómicas del DNA amibiano con la sonda de porina.

A) Se observa el gel teñido con bromuro de etídio, corrido con la electroforésis TAFE, bajo las condiciones descritas en materiales y métodos, con muestras de levadura (S.c.), clona A(A), y clona C2- 100 (C2-100), el gel se transfirió a papel de nitrocelulosa, este fué hibridado con la sonda heteróloga de porina, lavandose en condiciones de baja astringencia y el papel de expuso en placas de rayos X durante 15 días a -70°C. Los resultados de estas pruebas de hibridación se muestran en la **figura 13 B**.

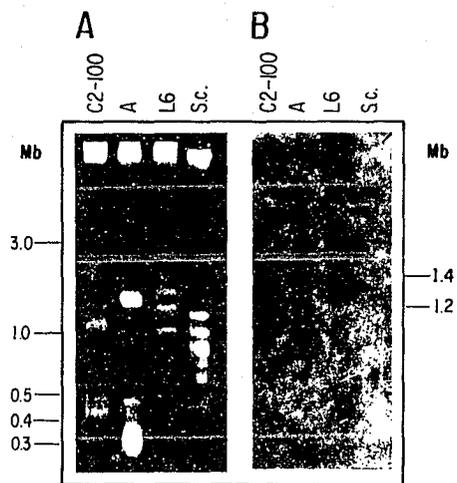


Figura 14 . Prueba de hibridación en las bandas cromosómicas del DNA amibiano con la sonda Eix.

A) Se observa un gel teñido con bromuro de etidio, corrido con la electroforésis TAFE, bajo condiciones descritas en materiales y métodos, con muestras de levadura (S.c.), Trypanosoma brucei (T.b.) (marcadores de peso molecular), clona A(A) y E. invadens clona IP-1v(Ip-1v). Este gel se transfirió a papel de nitrocelulosa y fué hibridado con la sonda heteróloga Eix . Este papel fué tratado bajo condiciones de estricta astringencia, además se expuso en placas de rayos X durante un periodo de 8 días a -70°C , los resultados obtenidos se observan en la **figura 14 B**.

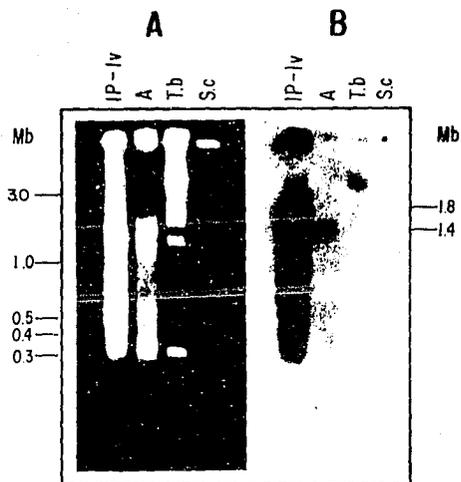


TABLA V
RESULTADO DE LAS HIBRIDACIONES CROMOSOMALES
EN LAS TRES CLONAS DE *E. histolytica* HM1:IMSS

Banda	Clona A		Clona L6		Clona C2-100	
	Peso (Mb)	Sonda	Peso (Mb)	Sonda	Peso (Mb)	Sonda
I	<3.0	----	<3.0	----	1.8	----
II	<3.0	----	<3.0	----	1.89	D 1.
III	<3.0	----	<3.0	----	1.6	Tub. Rib.
IV	<3.0	----	3.1	Tub.	1.42	Tub.
V	3.0	Tub. D 1. D 1.6 Rib.	2.1	D 1.6	1.33	Act.
VI	1.89	Tub. Eix. Rib.	1.47	Tub. Act. D 1 D 1.6 Rib.	1.23	Act. Por.
VII	1.42	Tub. Act. Por. Eix. D 1 D 1.6 Rib.	1.33	Rib.	1.09	----
VIII	1.39	Tub. Act. Por. Eix. D 1 D 1.6 Rib.	1.28	----	0.92	----
IX	1.36	Tub. Act. Por. Eix. D 1 D 1.6 Rib.	1.09	Act.	0.82	----
X	1.26	Tub. Por.	0.96	----	0.69	Act.
XI	1.18	Rib.	0.89	----	0.45	----
XII	1.04	Por.	0.82	----	0.36	----
XIII	0.96	----	0.73	----	0.30	Rib.
XIV	0.85	----	0.55	----	----	----
XV	0.74	----	0.44	----	----	----
XVI	0.63	----	0.36	Act. D 1	----	----
XVII	0.53	----	----	----	----	----
XVIII	0.46	----	----	----	----	----
XIX	0.35	----	----	----	----	----
XX	0.30	Act. Rib.	----	----	----	----

ANALISIS DEL DNA DE *E. histolytica* POR TAFE EN PRESENCIA DE BROMURO DE ETIDIO.

Como se observó en la **tabla V** las clonas A y L6, presentaron 3 bandas de alto peso molecular (> 3.0 Mb), donde no se observó ningún tipo de hibridación, lo mismo sucedió con aquellas bandas cuyo peso se encuentra entre 0.9 a 0.4 Mb. Debido a esto se trató de buscar una explicación del por que con ninguna de las sondas tratadas se había logrado una señal, por esta razón se llegó a pensar que estas bandas se trataban de concatámeros de DNA, es decir son moléculas circulares del DNA cuya estructura esta superenrollada. Para verificar esta hipótesis, se recurrió a la bibliografía donde se encontró que Beverley en 1988 describió que la migración electroforética de las moléculas circulares de DNA son sensibles a concentraciones bajas de bromuro de etidio mobilizandolas cuando son expuestas a una electroforésis. Por esta razón bloques de agarosa con cromosomas amibianos se incubaron y se corrieron con una solución de bromuro de etidio cuya concentración final era de 0.05 microgramos/ml. Las bandas que se observaron fueron muy tenues y coinciden en cuanto a su migración con aquellas que mostraron señal con las sondas (**figura 15A**) (**Ver tabla VI**).

Al analizar los barridos obtenidos por densitometría del gel corrido en presencia de bromuro de etidio, se observó, en el caso de la clona A unicamente 5 picos debido a la resolución del equipo, por lo que un pico no representa una sola banda, como es el caso del pico 1 en el cual se estan abarcando 2 bandas cuyo peso se encuentra entre 3 a 1.8 Mb, en el caso de la clona L6 cada pico en el barrido si corresponde a cada una de las bandas cromosomales.

Figura 15. Análisis del DNA ambiental por TAFE en presencia de bromuro de etidio.

A) Se muestra un gel teñido con bromuro de etidio, corrido con la electroforesis TAFE bajo las condiciones descritas en materiales y métodos, con muestras de *P. chaubaudi* (P.c.), clona A(A) y clona C2-100(C2-100), tratadas con una solución de bromuro de etidio a una concentración de 0.05 microgramos/ml. En la **figura 15 B** se muestran los barridos de la clona A y de la clona L6, donde los picos numerados corresponden a las bandas que se observan en el gel.

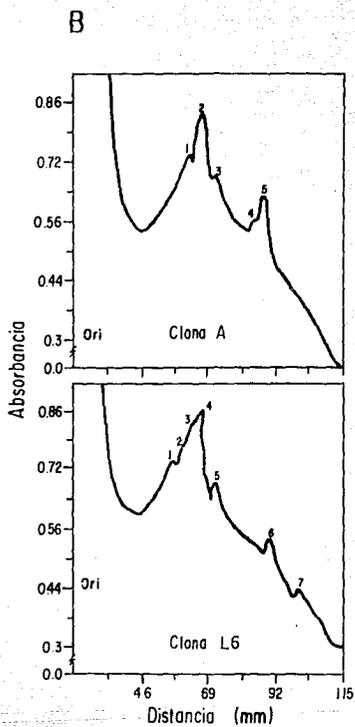


TABLA VI
BANDAS CROMOSOMALES DE DNA DE
E. histolytica, CLONA A Y CLONA L6

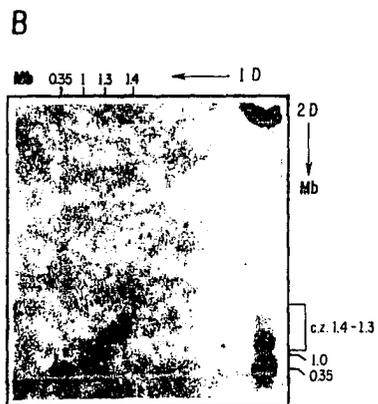
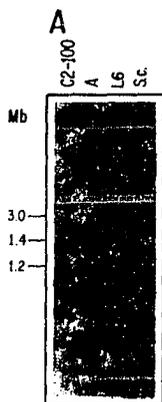
<u>E. histolytica</u> HM1:IMSS			
<u>Clona A</u>		<u>Clona L6</u>	
No. de Banda	Peso (Mb)	No. de Banda	Peso (Mb)
I	3.0	I	3.0
II	1.89	II	2.1
III	1.40 - 1.3	III	1.47
IV	1.26	IV	1.3
V	1.18 - 1.04	V	1.09
VI	0.3	VI	0.8
		VII	0.35

GEL BIDIMENSIONAL CORRIDO POR EL SISTEMA TAFE.

Con el fin de conocer cuantos cromosomas existen en cada una de las bandas de los geles TAFE se hizo el análisis del DNA ambiental usando dos condiciones de corrida en un gel bidimensional de la clona A. En el cual se realizó la hibridación con la sonda de actina, observando que en el carril unidimensional (2D) las bandas señaladas por esta sonda son las mismas que se presentaron anteriormente (**figura 16A**). Además, en la región separada por las dos condiciones de corrida se presentó una secuencia de 8 puntos en dirección de las bandas unidimensionales señaladas por la hibridación, a una razón de dos puntos por banda lo que sugiere que cada una de estas bandas posee 2 cromosomas. La medida aproximada de estos puntos es los dos primeros (mas cercanos al origen) son de 1.4 a 1.3 Mb, el punto en la parte intermedia es de 1 Mb y los dos últimos de 0.35 Mb los cuales se consideran como minicromosomas.

Figura 16. Gel bidimensional corrido por el sistema TAFE.

A) Se observa el resultado de la hibridación con la sonda de actina en las bandas cromosómicas de la clona L6 (L6), A (A) y C2-100 (C2-100), las cuales fueron resueltas por el sistema TAFE bajo condiciones de la primera dimensión. **B)** Muestra un gel corrido con el sistema TAFE bidimensionalmente, bajo las condiciones descritas en materiales y métodos, con las muestras de la clona A (**1D**) corrido en la primera dimensión, el cual es sometido a la segunda dimensión; **carril 2D** muestra de DNA de la clona A corrido en la segunda dimensión y levadura (S.c.), dicho gel se tiñó con una solución de bromuro de etídeo y fue transferido a papel de nitrocelulosa, en el cual posteriormente se aplicó la prueba de hibridación con la sonda de actina, dando como resultado señales circulares que corresponden con la dirección de las bandas obtenidas en el **carril 2D**.



DISCUSION

PREPARACION DE DNA AMIBIANO POR INCLUSION DE AMIBAS EN BLOQUES DE AGAROSA Y LISIS *in situ*.

Para estudiar los cromosomas de *E. histolytica*, por medio del sistema TAFE se aplicó la técnica de lisis *in situ* en bloques de agarosa la cual ya ha demostrado su utilidad en varios microorganismos que no poseen mitosis típicas como *Trypanosoma* (Van der Ploeg 1984), levadura (Avdalovic 1988), etc.

Por medio de este método fué posible obtener el DNA amibiano sin degradación aparente. De acuerdo con el número de amibas incluidas en los bloques de agarosa y la cantidad de DNA por trofozoíto reportada por Hernández (1985) y López- Revilla (1978), la concentración de DNA por bloque es aproximadamente de 3 - 5 microgramos. Esta concentración de DNA se ve confirmada con lo que reportó Higgins y Gardiner (1988) quienes observaron que con una concentración de 1 a 10 microgramos de DNA por cada muestra se puede obtener una buena resolución de bandas cromosómicas, cuando estas son corridas por el sistema TAFE (Barlow, D., 1989). Con la inclusión de DNA en bloques de agarosa también observamos que el material se mantiene íntegro por lo menos un 1 año.

ELECTROFORESIS TRANSVERSAL DE CAMPOS ALTERNOS (TAFE) APLICADA EN EL DNA AMIBIANO.

Debido a la ausencia en la condensación cromosómica durante la división mitótica en *E. histolytica*, para estudiar la organización genómica de este parásito fué necesario aplicar técnicas que permitieran la separación de moléculas grandes del DNA, como la electroforésis de campos pulsados (PFGE) (Valdés y col. 1990) las cuales se han utilizado para estudiar la organización cromosomal de algunos protozoarios parásitos tales como *Leishmania* y *Trypanosoma*.

Para obtener mejores resultados se implementó otro sistema el cual basa sus principios en las electroforésis de campos pulsados, con un manejo sencillo y proporcionará una mejor resolución en la separación del DNA. Dicho sistema es la electroforésis transversal de campos alternos (TAFE), donde la alternancia de los campos eléctricos es ortogonal en cada uno de los electrodos, pero es transversal con respecto al plano del gel, de esta manera

cada carril del gel se encuentra sujeta al mismo campo eléctrico, los pulsos del campo eléctrico entre los dos electrodos, provoca que el DNA descienda a través del grosor del gel en forma de zig-zag, esto trae como consecuencia que los carriles con las diferentes muestras corridas sean separadas en carriles lineales paralelos, lo que permite comparar entre una muestra y otra. En el sistema TAFE, se tiene una mejor resolución que en otros sistemas de electroforesis pulsada, además de una separación de los fragmentos grandes de DNA (mayores de 1Mb), debido a su configuración del equipo, a las condiciones del amortiguador y del voltaje.

ANALISIS DEL DNA AMIBIANO CON LA ELECTROFORESIS TRANSVERSAL DE CAMPOS ALTERNOS (TAFE).

El número, peso y organización de los cromosomas de *E. histolytica* ha sido estudiado por varios investigadores. Hernández y col.(1986) reportaron que el DNA de *E. histolytica* esta organizado en 4 poblaciones discretas, las cuales tienen un peso molecular de 50 kb, dichos resultados fueron obtenidos por la técnica de lisis *in situ* de los trofozoítos y la electroforesis en geles de agarosa. Orozco y col. (1988) observaron las fases y los estados de la división celular de los trofozoítos, en una de las cuales se logró observar en microscópio electrónico entre 12 y 16 cromosomas orientados hacia los polos nucleares, estos estudios se llevaron acabo por la sincronización con colchicina de los trofozoítos. Valdés y col. (1990) usando la técnica PFGE separaron 9 bandas del DNA de *E. histolytica* (HM1:IMSS), de la clona A *E. histolytica* (HM1:IMSS) fueron separadas 6 bandas y en *E. invadens* 4 bandas. Dichos resultados se obtuvieron al aplicar 3 tipos de condiciones de corrida, por la reproducibilidad en los patrones de bandeo y las pruebas de hibridación se comprobó que estas moléculas eran cromosomas.

Albach (1990) trató de separar cromosomas del DNA amibiano por medio del sistema PFGE, obteniendo bandas que tienen un peso de 500 a 50 kb, no teniendo buena resolución en las bandas, probablemente por degradación. A pesar de que se había probado que el DNA amibiano está organizado en moléculas discretas, tal vez cromosomas, no se había definido con exactitud su número, talla y organización.

En este trabajo fué posible separar moléculas de DNA amibiano con la aplicación del sistema TAFE obteniéndose los cariotipos moleculares de *E. histolytica* (HM1:IMSS) clona L6, A y C2-100, dando como resultado fragmentos cuyo peso es desde 3.0 a 0.35 Mb. En la clona L6 se observaron 16 bandas, en la clona A 20 bandas y en la clona C2-100 13 bandas, sin

presentarse zonas de compresión. Al comparar estos resultados con los obtenidos por Valdés y col. (1990), se vieron diferencias en cuanto al número de bandas y migración del DNA en la clona A. esto se puede explicar ya que el sistema TAFE es diferente al PFGE, aunque el propósito de ambas es el mismo. Estas diferencias se deben principalmente a las condiciones de corrida, las cuales son muy importantes para que el DNA fraccione en las diferentes moléculas cromosomales que tiene, ya que si estas condiciones no son adecuadas, se presentan zonas de compresión o bien el DNA se queda en los pozos del gel, dando como resultado poca resolución en las bandas.

Valdés y col. 1990, ya habían descrito variaciones entre cepas y clonas de E. histolytica, en este trabajo se observaron variaciones en cuanto al número y talla de las bandas entre la clona A, L6 y C2-100. Una característica notable de los cromosomas de los protozoarios cuando son separados por el sistema de electroforesis de campo pulsado en este caso TAFE, puede existir variación en cuanto a la talla de los cromosomas homólogos en las diferentes clonas y cepas. En este polimorfismo se ven involucrados varios mecanismos como la traslocación, la amplificación y delección de secuencias en el DNA, esto ha sido observado en clonas de Leishmania infantum (Pages y col., 1989), en L. donovani (Bishop y col., 1987) y en L. major (Holmes y col., 1990). Este polimorfismo es muy marcado cuando se comparan los patrones de bandedo de la clona A (parental) con respecto a su descendiente clona C2-100, ya que en la clona A se resolvieron 20 bandas y en la clona C2-100 unicamente se obtuvieron 13 bandas, esta reducción en el número de bandas, (desaparición y aparición de bandas), se sugiere que se deba a la existencia de rearrreglos espontáneos a nivel del genoma o delecciones subtaloméricas que son inducidas por las clonaciones o bien puede deberse a que los organismos se encuentren en ambientes de stress, tal como se ha demostrado que ocurre en Trypanosomas (Bernards, A. y col., 1983). De acuerdo a todas las variaciones observadas en los cariotipos de las tres clonas estudiadas, al ser comparadas entre sí, sugiere que el cariotipo molecular amibiano es altamente mutable, como se ha visto en Plasmodium (Corcoran y col., 1988).

ANALISIS DENSITOMETRICO EN EL DNA DE E. histolytica (HM1:IMSS) Y DNA AMIBIANO TRADADO CON BROMURO DE ETIDIO.

El análisis densitométrico tiene la finalidad de definir el número de moléculas de DNA que se encuentran en cada una de las bandas resueltas en los geles de agarosa. Muestras de DNA resueltas por TAFE bajo las

condiciones electroforéticas mencionadas anteriormente y teñidas con bromuro de etídio, se fotografiaron y el negativo se analizó mediante un densitómetro. Los resultados sirvieron para verificar el número de bandas que se observaron en el gel teñido con bromuro de etídio. El análisis de los resultados densitométricos fué realizado por el método de Scholler y col. (1986) y modificado por Valdés y col. (1990) para el DNA amibiano, dicho método relaciona intensidad de la tinción con el peso molecular y cantidad total de DNA del organismo. De acuerdo con este análisis en la clona A se observaron 20 bandas, las cuales se encuentran organizadas en alrededor de 300 cromosomas, en el caso de la clona L6 se obtuvieron 16 bandas organizadas en 150 cromosomas y en C2-100 se observaron 11 bandas constituidas en 31 cromosomas. Además con el análisis densitométrico se observo que del 28 al 30 % del total del DNA permanecía en el pozo, mientras que un 68 a 70% migró al gel, formando bandas. Al asignar los pesos moleculares a cada una de las bandas, observamos que existió una diferencia con respecto a los pesos moleculares de los marcadores, sobre todo en aquellas bandas de alto peso molecular, esto se debe a que el sistema en la zona cuyo peso es mayor a 3.0 Mb pierde linealidad, por lo que las bandas localizadas en estas zonas se consideran con un peso mayor de 3.0 Mb. Los resultados anteriores cuando son comparados con los obtenidos por Valdés y col. (1990), coinciden, por la cantidad de DNA amibiano que migró en el gel, pero no están de acuerdo con el número cromosómico obtenido para la clona A, ya que en el trabajo de Valdés se reporta un número de 31 cromosomas y en este trabajo se obtuvieron más de 300 cromosomas. Una diferencia tan grande en el número de cromosomas puede deberse a que las condiciones utilizadas en el sistema TAFE resolvieron moléculas lineales (bandas cromosomales) y moléculas circulares de DNA con diferencias en migración debidas a su organización (concatámeros). Las poblaciones de DNA circular son elementos comunes en los genomas de procariontes y eucariontes (Rush, y col. 1985). Por otra parte la amplificación de genes se ha observado en organismos que son resistentes a drogas en los cuales los genes aparecen como necesarios para la resistencia aumentan su número y muy a menudo estas copias son de DNA circular extracromosomal. Este DNA amplificado por lo general es de peso molecular grande arriba de 4.0 Mb. Beverley (1988) reportó la presencia de este DNA circular amplificado en *L. major*, que migra junto con las moléculas lineales en una electroforésis PFG. Beverley con el objeto de evitar que estas moléculas circulares migraran con las lineales (cromosomales), aplicó un tratamiento en el que el DNA tenía que ser incubado con bromuro de etídio (0.05 microgramos/ml). El bromuro de etídio lo que provoca es cambiar la configuración de las moléculas circulares,

provocando una disminución de los pesos moleculares aparentes. En algunos experimentos los bloques de DNA amibiano se tratarón con bromuro de etíldio, obteniendo como resultado la disminución en el número de bandas en las clonas A y L6 donde su número era muy alto. Principalmente las bandas que desaparecieron son aquellas cuyo peso molecular se encontraba arriba de 3.0 y entre 1.0 y 0.4 Mb. Dando como resultado final en el caso de la clona A, 6 bandas con un peso de 3.0 a 0.3 Mb, lo que coincide con el presentado por Valdés y col.(1990) para la clona A (**Ver tabla II en introduccion**) y en el caso de la clona L6 7 bandas cuyo peso se encuentra entre 3.0 y 0.35 Mb. En la **tabla VI** se presentan las bandas cromosómicas enumeradas con sus respectivos pesos moleculares tanto en la clona A como en la clona L6, dichas bandas pudieran corresponder a cromosomas.

Para comprobar el número de cromosomas por banda se realizó un experimento en el cual se corrió un gel bidimensionalmente, con el sistema TAFE, este posteriormente fué hibridado con una sonda de actina. Debido a las condiciones de corrida (ver materiales y métodos), no se observaron todas las bandas en su totalidad, ya que estas se comprimieron en 4 bandas, ya que estas condiciones separaron los cromosomas que contienen genes de actina y el resultado de la hibridación fué la presencia de 2 señales en forma de manchas redondas escalonadas en dirección a cada una de las bandas corridas en 1a. dimensión, lo cual comprueba que en cada una de estas bandas marcadas con actina existen dos cromosomas.

PRUEBAS DE HIBRIDACION DEL DNA CROMOSOMAL DE E. histolytica (HM1:IMSS) CLONA L6, A Y C2-100.

Con la aplicación de esta prueba es posible comprobar la integridad del DNA y verificar si las bandas representadas en el patrón electroforético representan verdaderos cromosomas. La prueba se realizó con 7 sondas de DNA, las cuales dieron señales en los orígenes, esto lo podemos explicar por el DNA amibiano atrapado en los pozos, que debido a la complejidad de su estructura y la presencia de desechos celulares impiden la migración al gel. La prueba con DNA total amibiano da señal en los orígenes por la razón anteriormente mencionada, esta sonda se utilizó como un control para verificar el número total de bandas obtenidas comparando con el observado al teñir con bromuro de etíldio. La presencia de moléculas que en la hibridación captaron gran cantidad de radioactividad sugirió la presencia de moléculas de DNA altamente repetidas correspondientes a bandas de alto peso molecular aparentemente superior a 3.0 Mb, también entre 1.3 y 1.4 Mb, las cuales

aparecen en forma escalonada, en las tres clonas. Estos resultados fueron similares a los obtenidos con una sonda ribosomal homóloga (Samuelson, 1989), lo que está de acuerdo con el conocimiento de que el DNA ribosomal es altamente repetido (Battacharya y col., 1988; Huber y col., 1989). Dichos resultados contrastaron con los obtenidos por Valdés y col. (1990) quienes hibridaron las bandas cromosomales de la clona A con una sonda ribosomal de *Trypanosoma brucei* (heteróloga), teniendo como respuesta, señales en el origen así como en una banda de 1.1 Mb. Una posible explicación para estas diferencias es que estos autores utilizaron una sonda ribosomal heteróloga y se ha demostrado que la intensidad de la señal depende de la región del DNA ribosomal que se utilice como sonda (Lazard y col. enviado para publicar; Samuelson y col. 1990; Grodberg y col. 1990). En cuanto a la señal presente en el origen del gel para las tres clonas una posible explicación es que el DNA ribosomal circular de 24.5 kb (Huber y col. 1989), está formado tanto por moléculas relajadas que migran dentro del gel (moléculas lineales), así como otras moléculas circulares que se quedan atrapadas en los pozos por complejidad estructural. Con la sonda de tubulina se observaron señales de hibridación en las clonas en bandas cuyo peso se encuentra entre 1.3 y 3.0 Mb, estas señales son muy semejantes a las obtenidas con la sonda ribosomal, es decir las bandas se presentan en forma escalonada, esto también puede deberse a que las secuencias de tubulina se encuentran en varias moléculas y en alto número de copias. Las sondas D 1.6 y D 1 se obtuvieron con el fin de diferenciar entre clonas virulentas y no virulentas, sin embargo como ambas sondas comparten un fragmento, sus señales de hibridación en las bandas cuyo peso se encuentra entre 1.3 a 3.0 Mb son muy semejantes. La sonda D 1.6 presenta señales de hibridación en las tres clonas no presentando diferencia entre clona virulenta y no virulenta. Sin embargo en la sonda D 1, si se presenta una diferencia, ya que la clona A y L6 presentan señales en las bandas que van de 1.3 a 3.0 Mb, pero en la clona A no hay señal en la banda de 0.3 Mb y en la clona L6 si existe, además que en esta sonda la clona C2-100 no presentó ninguna señal de hibridación tanto en el origen como en la zona de bandas, lo que demuestra que en este fragmento del DNA la clona sufrió probablemente una delección. Al interpretar estos resultados, la sonda D 1 si presenta diferencia entre las clonas virulentas y las no virulentas a pesar de tener ese fragmento común en ambas. En las sondas D 1.6 y D 1, hibridarán con patrones semejantes a los de la sonda de DNA ribosomal, lo que sugiere, además de otras evidencias obtenidas por secuenciación parcial (Lazard comunicación personal), que estas sondas poseen regiones ribosomales. Las señales de hibridación de la actina fueron muy leves, este gen se encuentra en bandas con tamaño entre 1.0 a 1.4 y 0.3 Mb. La sonda de porina es heteróloga,

esta secuencia codifica para una proteína de membrana cuya función es la de formar "poros" de difusión, que permitan el paso de sustancias hidrofílicas de bajo peso molecular, dicha proteína ha sido descrita en *S. tippy*, sin embargo existe la posibilidad de que en amiba pueda ser otra proteína que tenga una función semejante, esta secuencia no se encuentra en la clona L6, pero en A y C2-100 sí, esto puede deberse a que ambas poseen un genoma muy semejante, ya que A es la clona parental de C2-100. La sonda Eix de *E. invadens*, probablemente codifica para la quitina sintetasa esta es una enzima que actúa sobre la proteína quitina, la cual forma las cápsulas de los quistes de amiba, debido a esto, dicha enzima es de gran importancia ya que por medio de ella podría desaparecer este estado de la amiba. Dicha sonda se probó en la clona A, *T. brucei* y *E. invadens*, dando una señal muy intensa en *E. invadens* no diferenciando las bandas. En la clona A dió señal en las bandas cuyo peso se encuentra entre 1.8 y 1.4 Mb y en *T. brucei* en una banda arriba de 2.0 Mb, lo que sugirió que es una secuencia altamente conservada. Con esta sonda se observó que los orígenes presentan muy poca señal de hibridación, lo que indica que las moléculas de DNA que poseen esta secuencia si se resuelve en el gel.

APLICACIONES DE LA ELECTROFORESIS DE CAMPO ALTERNO TRANSVERSAL (TAFE).

Con la aplicación de la electroforesis TAFE en el DNA de *E. histolytica* fué posible resolver moléculas entre 3.0 y 0.3 Mb, lo cual no había sido descrito anteriormente, y se hizo la descripción preliminar de la localización de secuencias de DNA en este cariotipo molecular, posibilitando así el establecimiento de la relación entre las moléculas de DNA y sus grupos de enlace.

Estos estudios serán la base de la construcción de un mapa de ligamiento del parásito *E. histolytica* y de la comprensión de los mecanismos de regulación de su expresión genética.

CONCLUSIONES

- 1) Con la electroforesis de campo alterno transversal (TAFE) se obtuvieron los cariotipos de *E. histolytica* (MH1:IMSS) clona L6 con 7 bandas, clona A con 6 bandas y clona C2-100 con 13 bandas, con tamaños aparentes entre 3.0 a 0.3 Mb.
- 2) Las bandas observadas en la clona L6 tienen una talla aparente en un rango entre 3.0 a 0.35 Mb; en la clona A van de un rango entre 3.0 Mb y en la clona C2-100 de 3.0 a 0.3 Mb.
- 3) De acuerdo con los antecedentes descritos y los resultados obtenidos en este trabajo, se ha demostrado que la electroforesis de campo alterno transversal (TAFE), es una técnica de suma importancia dentro de la biología molecular, ya que por medio de esta es posible estudiar moléculas de DNA de alto peso molecular de aquellos organismos en los que no existen una condensación cromosomal en las fases de su ciclo celular, como es el caso de *E. histolytica*.
- 4) Se observaron diferencias en la organización de los cromosomas entre las clonas A y L6 originadas de una misma cepa *E. histolytica* la HM1:IMSS.
- 5) Por el patrón electroforético se sugiere que existen numerosas poblaciones de DNA circular.
- 6) Se encontraron diferencias de organizaciones cromosómicas en la clona parental A y su descendiente clona C2-100, sugiriendo que se indujeron rearrreglos durante el proceso de clonación y/o el cultivo independiente posterior.
- 7) Con las pruebas de hibridación DNA-DNA se localizaron 8 genes en los cromosomas de las clonas L6, A y C2-100, los cuales se pueden localizar en más de un cromosoma.

BIBLIOGRAFIA:

- 1) Albach, R. A. (1989). Nucleic acids of E. histolytica. J. Protozool. 36(2), 179-205.
- 2) Avdalovic, N. and Furst, A. (1988). Saccharomyces cerevisiae whole chromosome DNA separation. Beckman Instruments, Inc.
- 3) Ayala, E. P. (1989). Aislamiento de genes de E. histolytica que participan en su antigenicidad o virulencia. Tesis para obtener el grado en Maestro en Ciencias. CINVESTAV, IPN. Me'xico.
- 4) Barlow, D. (1989). Pulsed-field gel electrophoresis. Genome 31, 465-466.
- 5) Beckman. (1988). The Gene Line system. Beckman Instruments, Inc. U.S.A. 35 pp.
- 6) Bernards, A., Michels, P. A. M., Lincke, C.R. and Borst, P. (1983). Growth of chromosome end in multiplying trypanosomes. Nature 303, 592-597.
- 7) Beverley, M. S. (1988). Characterization of the 'unusual' mobility of large circular DNAs in pulsed field-gradient electrophoresis. Nucleic Acids Research 16(3), 925-939.
- 8) Beverley, S. M., Coderre, J. A., Santi, D. V. and Schmicke, R. T. (1984). Unstable DNA amplifications in methotrexate-resistant Leishmania consist of extrachromosomal circles with relocalize during stabilization. Cell 38, 431-439.
- 9) Bhattacharya, S., Bhattacharya, A., Diamond, S. L. and Soldo, T. A. (1989). Circular DNA of E. histolytica encodes ribosomal RNA. J. Protozool. 36(5), 455-457.
- 10) Bishop, R. P. and Miles, M. A. (1987). Chromosome size polymorphisms of Leishmania donovani. Mol. Biochem. Parasitol. 24, 263-272.
- 11) Coderre, J. A., Beverley, S. M., Schimke, R. T. and Santi, D. V. (1983). Over production of a bifunctional thymidylate synthetase-dihydrofolate reductase and DNA amplification in methotrexate resistant Leishmania tropica. Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 2132-2136.

- 12) Comeau, A. M., Miller, S. I. and Wirth, D. F. (1986). Chromosome location of four genes in Leishmania. Mol. Biochem. Parasitol. 21, 161-169.
- 13) Comité de Sistemática y Evolución de la Sociedad de Protozoólogos. (1982). Nueva clasificación de los protozoarios. Facultad de ciencias. Laboratorio de Protozoología. UNAM. pp 38.
- 14) Corcoran, A. M., Forsyth, K. P., Bianco, A. C., Brown, G. V. and Kemp, D. J. (1986). Chromosome size polymorphisms in P. falciparum can involve deletions and are frequent in natural parasite population. Cell 44, 161-169.
- 15) Corcoran, L. M., Thompson, J. K., Walliker, D. and Kemp, D. J. (1988). Homologous recombinations within subtelomeric repeat sequence generates chromosome size polymorphisms in P. falciparum. Cell 53, 807-813.
- 16) Dame, J. B. and Mc. Cutchan, T. F. 1983. The four ribosomal DNA units of the malaria parasite P. berghei. J. Biol. Chem. 258, 6984-6990..
- 17) Diamond, L. S., Harlow, D. R. and Cunnick, C. C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of E. histolytica and other Entamoeba. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72, 431pp
- 18) Dore, E., Pace, T., Pozl, M., Scotti, R. and Frontali, C. (1986). Homologous telomeric sequences are present in different species of the genus Plasmodium. Mol. Biochem. Parasitol. 21, 121-127.
- 20) Edman, U., Meza, F. and Agabian, N. (1987). Genomic and cDNA actin sequences from a virulent strain of E. histolytica. Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 3024-3028.
- 21) Engberg, J. (1985). The ribosomal RNA genes of Tetrahymena structure and function. Eur. J. Cell. Biol. 36, 131-136.
- 22) Engman, M. D., Reddy, V. L., Donelson, E. J. and Kirchoff, V. L. (1987). Trypanosoma cruzi exhibits inter and intra strain heterogeneity in molecular karyotype and chromosomal gene location. Mol. Biochem. Parasitol. 22, 115-123.

- 23) Findly, R. C. and Gall, J. G. (1978). Free ribosomal RNA genes in Paramecium are tandemly repeated. Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 3312-3316.
- 24) Gall, J. G. (1974). Free ribosomal RNA genes in the macronucleus of Tetrahymena. Proc. Natl. Acad. Sci. 71, 3078-3081.
- 25) Gelderman, A. H., Bartgis, I. L., Keister, D. B. and Diamond, L. S. (1971). A comparison of genome sizes and thermal-denaturation-derived base composition of DNAs from several members of E. histolytica group. J. Parasit. 57, 912-916.
- 26) Gelderman, A. H., Keister, D. B., Bartgis, I. L. and Diamond, L. S. (1971). Characterization of the deoxyribonucleic acid of representative strains of E. histolytica, E. histolytica like amoebae and E. moshkovskii. J. Parasit. 57, 906-911.
- 27) Giannini, H. S., Curry, S. S., Tesh, B. R. and Van der Ploeg, L. H. T. (1990). Sized conserved chromosomes and stability of molecular karyotype in cloned stocks of Leishmania major. Mol. Biochem. Parasitol. 39, 9-22.
- 28) Giannini, S. H., Schittini, M., Keithly, J. S. K., Warburton, P. W., Cantor, C. R. and Van der Ploeg, L. H. T. (1986). Karyotype analysis of Leishmania species and its use in classification and clinical diagnosis. Science 232, 761-765.
- 29) Giquaud, C. D. (1979). Etude de l'ultrastructure du noyau et de la mitose de E. histolytica. Biologie Cellulaire 35, 305-312.
- 30) Hernández, F., Ocadiz, R. y Orozco, E. (1986). Análisis de la organización del DNA de varias cepas y clonas de E. histolytica. Arch. Invest. Méd. 17 (Supl): 107-112.
- 31) Holmes, G. S., Curry, S. S., Tesh, B. R. and Van der Ploeg, L. H. T. (1990). Size-conserved chromosomes and stability of molecular karyotype in cloned stocks of L. major. Mol. Biochem. Parasitol. 39, 9-22.
- 32) Huang, M., Chaudhuri, G., Chang, P. K., Albach, A. R. (1991). Field Inversion vs. orthogonal pulsed-field analysis of E. histolytica chromosomal DNA. Congreso de la India.
- 33) Huber, M., Garfinkel, L., Gitler, C., Mirelman, D., Reve, M. and Rozenblatt, S. (1987). E. histolytica: cloning and

- characterization of actin cDNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* 24, 227-235.
- 34) Huber, M., Garfinkel, L., Gitler, C., Mirelman, D., Revel, M. and Rozenblatt, S. (1988). Nucleotide sequence analysis of an *E. histolytica* ferredoxin gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* 31, 27-34.
- 35) Huber, M., Koller, B., Gitler, C., Mirelman, D., Revel, M., Rozenblatt, S. and Garfinkel, L. (1989). *E. histolytica* ribosomal RNA genes are carried on palindromic circular DNA molecules. *Mol. Biochem. Parasitol.* 32, 285-296.
- 36) Jenni, L., Marti, S., Schweizer, J., Betschart, B., Le Page, R. W. F., Wells, J. M., Tait, A., Painsavoine, P., Pays, E. and Steinert, M. (1986). Hybrid formation between African trypanosomes during cyclical transmission. *Nature* 322, 173-175.
- 37) Kemp, D. J., Coppel, R. L., Stahl, H. D., Blanco, A. E., Corcoran, L. M., Mc. Intyre, P., Langford, C. J., Favaloro, J. M., Crowther, P. E., Brown, G. V., Mitchell, G. F., Culvenor, J. G. and Anders, R. F. (1986). Genes for antigens of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* 91, 5083-5108.
- 38) Kemp, D. J., Corcoran, L. M., Coppel, R. L., Stahl, H. D., Blanco, A. E., Brown, G. V. and Anders, R. F. (1985). Size variation in chromosomes from independent cultured isolates of *Plasmodium falciparum*. *Nature* 315, 347-350.
- 39) Langsley, G., Hyde, J. E., Goman, M. and Scaife, K. G. (1983). Cloning and characterisation of the rRNA genes from the human malaria parasite *P. falciparum*. *Nucleic Acids Research* 11, 8703-8717.
- 40) Langsley, G., Sibilli, L., Mattei, D., Falanga, P. and Mercereau-Puijalon, O. (1987). Karyotype comparison between *P. chabaudi* and *P. falciparum*: analysis of a *P. chabaudi* cDNA containing sequences highly repetitive in *P. falciparum*. *Nucleic Acids Research* 15, 2203-2211.
- 41) Lasker, A. B., Carle, F. G., Kobayashi, S. G. and Medoff, G. (1989). Comparison of the separation of *Candida albicans* chromosome-sized DNA by pulsed field gel electrophoresis techniques. *Nucleic Acids Research* 17, 3783-3793.

- 42) Levine, J. (1988). Hybridization of probes to DNA blotted membranes. Beckman Instruments, Inc.
- 43) Lindmark, D. G. and Müller, M. (1976). Anitrichomonad action mutagenicity and reduction of metronidazole and other nitro imidazoles. *Antimicrob. Agents Chemother.* 10, 476-482.
- 44) Long, E. O. and Dawid, I. B. (1980). Repeated genes in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 49, 727-764.
- 45) Lopez-Revilla, R. and Gomez, R. (1978). *E. histolytica*, *E. invadens* and *E. moshkovskii*: Fluctuations of DNA content of axenic trophozoites. *Exp. Parasitol.* 44, 243-248.
- 46) Majiwa, P. A. O., Young, J. R., Hamers, R. and Matthyssens, G. (1986). Minichromosomal variable surface glycoprotein genes and molecular karyotypes of *T. (Nannomonas) congolense*. *Gene* 41, 183-192.
- 47) Maniatis, T., Fritsch, E. F., Lauer, J. and Lawn, R. M. (1980). The molecular genetics of human hemoglobins. *Ann. Rev. Genet.* 14, 145-178.
- 48) Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. (1989). *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Lab. N.Y.
- 49) Martínez-Palomo, A. (1986). *Amebiasis*. Elsevier N.Y. U.S.A. 269 pp.
- 50) Martínez-Palomo, A. (1982). *The biology of E. histolytica*. Research Studios Press. Great Britain, 161 pp.
- 51) Masake, A. R., Nyambati, M. V., Nantulya, M. V., Majiwa, O. A., Moolo, K. S. and Mosoke, J. H. (1988). The chromosome profiles of *T. congolense* isolates from Kilifi, Kenya and the relationship to serodeme identity. *Mol. Biochem. Parasitol.* 30, 105-112.
- 52) Mathew, K. M., Smith, L. C. and Cantor, R. Ch. (1988). High resolution separation and accurate size determination in pulsed-field gel electrophoresis of DNA. 1. DNA size standards and effect of agarose and temperature. *Biochemistry* 27, 9204-9210.
- 53) Meza, F., Sabanero M., Cazares F. and Bryan J. (1983). Isolation and characterization of actin from *E. histolytica*. *The Journal of Biological Chemistry* 258(6), 3936-3941.

- 54) Müller, M. (1981). Action of clinically utilized 5-nitro imidazoles of microorganisms. Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 26, 31-41.
- 55) Müller, M. (1983). Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa. Surgery 93, 165-170.
- 56) Nellen, W. and Gallwitz, D. (1982). Actin genes and actin messenger RNA in *Acanthamoeba castellanii* nucleotide sequence of the sp11 actin gene. I. J. Mol. Biol. 159, 1-18.
- 57) Ocañal, Q. R. (1989). Análisis de la organización del DNA de varias cepas y clonas de *E. histolytica* y especies relacionadas. Tesis de licenciatura. UNAM. México.
- 58) Orozco, E., Hernández, F. and Rodríguez, M. A. (1985). Isolation and characterization of *E. histolytica* mutants resistant to emetine. Mol. Biochem. Parasitol. 15, 49-59.
- 59) Orozco, E., Guarneros, G. y Martínez-Palomo, A. (1982). Clonas de *E. histolytica* deficientes en fagocitosis deficiencia en virulencia. Arch. Invest. Méd. (Méx) 13 (supl.3), 137-143.
- 60) Orozco, E., Guarneros, G., Martínez-Palomo and Sánchez, T. (1983). *E. histolytica* phagocytosis as a virulence factor. J. Exp. Med. 158, 1511-1521.
- 61) Orozco, E., Solís, F. J., Dominguez, J., Chávez, B. and Hernández, F. (1988). *E. histolytica*: cell cycle and nuclear division. Experimental Parasitology 67, 85-95.
- 62) Orozco, E., Suarez, M. E. and Sanchez, T. (1985). Different adhesion phagocytosis and virulence in clonas from *E. histolytica* strain HM1:IMSS. Int. J. Parasitol. 15, 655-660.
- 63) Pagés, M., Bastien, P., Veas, F., Rossi, V., Bellis, M., Wincker, P., Rioux, A. J. and Roizés, G. (1989). Chromosome size and number polymorphisms in *L. infantum* suggest amplification/deletion and possible genetic exchange. Mol. Biochem. Parasitol. 36, 161-168.
- 64) Palmer, J.D. and Thompson, W.F. (1982). Chloroplast DNA rearrangements are more frequent when a large inverted repeat sequences is lost. Cell 29, 537-550.
- 65) Pelayo, R. y Pavón, L. S. (1988). Elaboración de un inmuno adsorbente para la purificación de porinas de *Salmonella typhi*. Tesis de Licenciatura. UNAM México.

- 66) Perez-Mutul, J., Cazares, F. and Meza, I. (1986). Isolation and initial characterization of DNA from *E. histolytica* HM1:IMSS. Arch. Invest. Me'd. (Mex.) (supl. 17), 113-119.
- 67) Ponzi, M., Pace, T., Dore, E. and Frontali, C. (1985). Identification of a telomeric DNA sequence in *P. berghei*. EMBO J. 4, 2991-2995.
- 68) Pozio, E., Gramiccia, M., Gradoni, L. and Amerio, O. (1985). Isolation of the agent causing cutaneous leishmaniasis in Italy and its visceralization in inbred hamsters. Trans. P. Soc. Trop. Med. Hyg. 79, 260-261.
- 70) Rodríguez, R. (1990). Proteínas y genes que participan en la interacción de *E. histolytica* con la célula blanco. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. CINVESTAV, IPN. México.
- 71) Rush, M. G. and Misra, R. (1985). Plasmid 14, 177-185.
- 72) Samaras, N. and Spithill, W.T. (1987). Molecular karyotype of five species of *Leishmania* and analysis of gene locations and chromosomal rearrangements. Mol. Biochem. Parasitol. 25, 279-291.
- 73) Samuelson, J., Ayala, P., Orozco, E. and Wirth, D. (1990). Emetine-resistant mutants of *E. histolytica* overexpress mRNAs for multidrug resistance. Mol. Biochem. Parasitol. 38, 281-290.
- 74) Samuelson, J., Soto-Acuna, R., Reed, S., Biagi, F. and Wirth, D. (1989). DNA hybridization probe for clinical diagnosis of *E. histolytica*. Journal of Clinical Microbiology 27(4), 671-676.
- 75) Sánchez, S. M. (1991). Aislamiento y caracterización de los genes de tubulina de *E. histolytica*. Tesis Doctoral. (Manuscrito en preparación).
- 76) Schwartz, D.C. and Cantor, C. R. (1984). Separation of yeast chromosome sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell 37, 67-75.
- 77) Schwartz, D.C., Saffrau, W., Welsh, J., Haas, R., Goldenberg, M. and 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.

- 78) Seebeck, T., Whittaker, P. A., Imboden, M., Hardman, N. and Braun, R. (1983). Tubulin genes of *T. brucei*: A tightly clustered family of alternating genes. Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 4634-4638.
- 79) Sharkey, A., Langley, G., Patarapotikul, J., Mercereau-Pujalon, O., Mc. Lean, P. A. and Walliker, P. (1988). Chromosome size variation in the malaria parasite of rodents *E. chabaudi*. Mol. Biochem. Parasitol. 28, 47-54.
- 80) Sheppard, M., Thompson, K. J., Anders, F. R., Kemp, J. D. and Lew, M. A. (1989). Molecular karyotyping of the rodent malarial *E. chabaudi*, *E. berghei* and *E. vinckei*. Mol. Biochem. Parasitol. 34, 45-52.
- 81) Simske, S. J. and Scherer, S. (1989). Pulsed-field gel electrophoresis of circular DNA. Nucleic Acids Research 17 (11), 4359-4365.
- 82) Solís, M. F. (1986). Transformación genética y división nuclear en *E. histolytica*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. CINVESTAV. México.
- 83) Solís, F., Chávez, B. y Orozco, E. (1986). Fases de la división nuclear en *E. histolytica*. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 17 (Supl. 1). 95.
- 84) Tannich, E., Horstmann, D., Knobloch, J. and Arnold, H. (1989). Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *E. histolytica*. Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 5118, 5122.
- 85) Torres, G. H. (1990). Estudio sobre la organización de la cromatina de *E. histolytica*. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. CINVESTAV, IPN. México.
- 86) Unnasch, T. R. and Wirth, D.F. (1983). The avian malaria *P. lephuræ* has a small number of heterogeneous ribosomal RNA genes. Nucleic Acids res. 11, 8443-8459.
- 87) Valdés, J. Hernández, F., Ocádiz, R. and Orozco, E. (1990). Molecular karyotype of *E. histolytica* and *E. invadens*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 84, 537-541.

- 88) Vandekerckhove, J. and Weber, K. (1978). Mammalian cytoplasmic actins are the products of at least two genes and differ in primary structure in at least 25 identified positions from skeletal muscle actins. Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 1106-1110.
- 89) Vandekerckhove, J. and Weber, K. (1980). Vegetative Dictyostellium cells containing 17 actin genes express a single major actin. Nature 284, 475-477.
- 90) Van der Ploeg, L. H. T., Cornellison, C.A., Michels, P. A. and Borst, P. (1984). Chromosome rearrangements in T. brucei. Cell 39, 213-221.
- 91) Van der Ploeg, L. H. T., Schwartz, D. C., Cantor, C. R. and Borst, P. (1984). Antigenic variation in T. brucei analysed by electrophoretic separation of chromosome-sized DNA molecules. Cell 37, 77-84.
- 92) Walsh, J.A. (1986). Problems in the recognition and diagnosis of amebiasis: Estimation of the global magnitude to morbidity and mortality. Rev. Infect. Dis. 8, 228pp.
- 93) Weber, L. J. (1988). P. falciparum: Mapping genes to nine parasite chromosomes. Experimental Parasitology 65, 148-153.
- 94) Welker, D. L., Hirth, K. P., Romans, P., Noegel, A. Firtel, R. A. and Williams, K. L. (1986). The use of restriction fragment length polymorphisms and DNA duplications of study the organization of the actin multigene family in Dictyostellium discoideum. Genetics 112, 27-42.
- 95) Wellems, E. T., Walliker, D., Smith, L. C., Do Rosario, E. V., Maloy, L. W., Howard, J. R., Carter, R. and Mc. Cutchan, F. T. (1987). A histidine rich protein gene marks a linkage group favored strongly in a genetic cross of P. falciparum. Cell 49, 633-642.
- 96) Wells, J. M., Prospero, T. D., Jenni, L. and Le Page, R. W. F. (1987). DNA contents and molecular karyotypes of hybrid T. brucei. Mol. Biochem. Parasitol. 24, 103-116.

APENDICE.

Medio TYI-S-33 (Diamond y col. 1978)

Ac. ascórbico	0.2g
Biosato (digerido pancreático)	30.0g
Cisteína	1.0g
Citrato férrico	23.6mg
Cloruro de sodio	2.0g
Dextrosa	10.0g
Fosfato de potasio dibásico	1.0g
Fosfato de potasio monobásico	0.6g
Agua desionizada	840.0ml
pH 6.8	

Medio TYI-S-33 completo.

Suero bovino completo	2.0ml
Medio TYI-S-33	10.0ml

Solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS).

Cloruro de potasio	0.2g
Cloruro de sodio	8.0g
Fosfato de potasio monobásico	0.2g
Fosfato de sodio dibásico	1.15g
Agua bidestilada	1000.0ml
pH 7	

Acido etilen-diamino-tetraacético (EDTA) 0.8 M

EDTA	67.2g
Agua desionizada	250.0ml
Hidróxido de sodio	20.0g

Solución de cloruro de sodio 5M.

Cloruro de sodio	29.22g
Agua desionizada	100.0ml

EDTA 0.5 M con solución de PBS

EDTA (sal disódica)	186.1g
PBS	800.0ml
pH 8	

Solución de Tris 1 M

Tris	12.11g
Agua desionizada	100.0ml
pH 8	

Agarosa para hacer bloques. (Beckman, 1988)

EDTA 0.8M	25.0ml
Tris 1.0M	0.1ml
Sol. cloruro de sodio 0.5M	0.04ml
Agarosa de bajo punto de fusión	0.14g
Agua desionizada	7.36ml

Sol. Laurilsarcosinato de sodio 10%

Laurilsarcosinato de sodio	10.0g
Agua desionizada	100.0ml

Sol. de lisis

EDTA 0.5M	9.0ml
Laurilsarcosinato de sodio 10%	1.0ml
Proteinasa K 20mg/ml	0.005ml
pH 9.5	

Sol. amortiguadora de almacenamiento de bloques

EDTA 0.8M	6.25ml
Tris 1.0M	0.1ml
Agua desionizada	93.6ml

Sol. amortiguadora TBE 10x

Tris Base	108.0g
Ac. bórico	55.0g
Aforar con agua desionizada a 1000ml.	
pH 8.5	

Gel de Agarosa (Beckman, 1988)

Agarosa L.E. bajo punto de fusión	0.6g
Sol. amortiguadora TBE 10x	3.0ml
Agua desionizada	57.0ml

Ac. clorhídrico 0.2N

Ac. clorhídrico conc.	6.56ml
Agua desionizada	1000.0ml

Sol. de hidróxido de sodio 0.4N

Hidróxido de sodio	16.0g
Agua desionizada	1000.0ml

Sol. Neutralizadora

Cloruro de sodio	43.83g
Tris	60.55g
Agua desionizada	500.0ml
pH 7	

Sol. amortiguadora de transferencia 40x

Sol. Glicina 0.2M	50.0ml
Sol. Hidróxido de sodio 0.2N	45.5ml
Agua desionizada	104.5ml

Sol. amortiguadora de transferencia 1 x

Sol. amortiguadora de transferencia 40x	82.05ml
Agua desionizada	3200.0ml

Sol. Denhardt's 100x

Albumina de suero bovino (BSA)	2.0%
Sol. Ficoll	2.0%
Sol. Polivinilpirrolidona	2.0%

Sol. salina de citrato (SSC) 20x

Cloruro de sodio 3 M	175.0g/lit
Citrato de sodio 0.3M	88.0g/lit
pH 7	

Sol. salina de citrato (SSC) 1x

Sol. salina de citrato 2.5x	200.0ml
Agua desionizada	500.0ml

Sol. dodecil sulfato de sodio (SDS) 1%

Dodecil sulfato de sodio	1.0g
Agua desionizada	100.0ml

Sol. de prehibridación

SSC 20x	15.0ml
SDS 5x	10.0ml
Sol. Denhardt's 100x	2.5ml
Formamida desionizada 30%	25.0ml
DNA(esperma de salmón)	
20microgramos/ml	250.0microlitros
Agua desionizada	50.0ml

Sol. amortiguadora STE

Tris-Cl
Sol. Cloruro de sodio
EDTA
pH 7.5

10.0mM
10.0mM
1.0mM