

27



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

EVIDENCIA DE LA PRESENCIA DE
HISTONAS EN TROFOZOITOS DE
Entamoeba invadens

U A N L
T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN BIOLOGÍA CELULAR
POR

BIOL. JOSE ANTONIO HEREDIA ROJAS



MONTERREY, N.L.

MARZO, 1988

320
EB
88

TM

Z 5 320

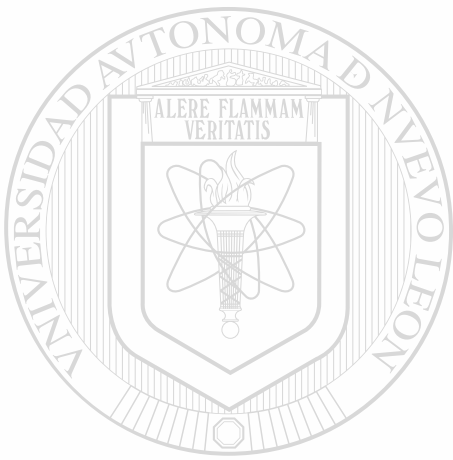
F C B

19 68

H 4



1020066408



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



DIRECCION GENERAL DE
ESTUDIOS DE POSTGRADO

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

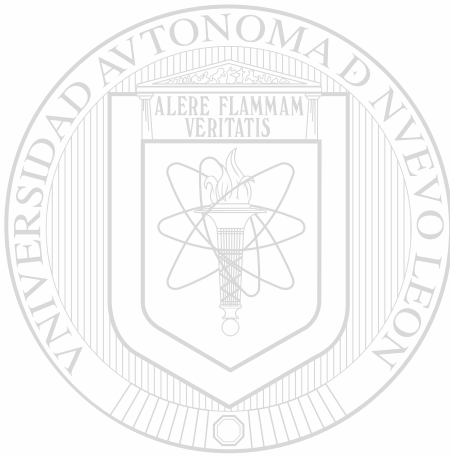


DIRECCION GENERAL DE
ESTUDIOS DE POSTGRADO,
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



EVIDENCIA DE LA PRESENCIA DE
HISTONAS EN TROFOZOITOS DE
Entamoeba invadens



UANL
T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRO

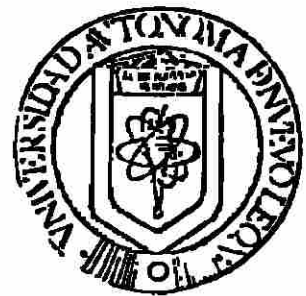
EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN BIOLOGIA CELULAR

POR

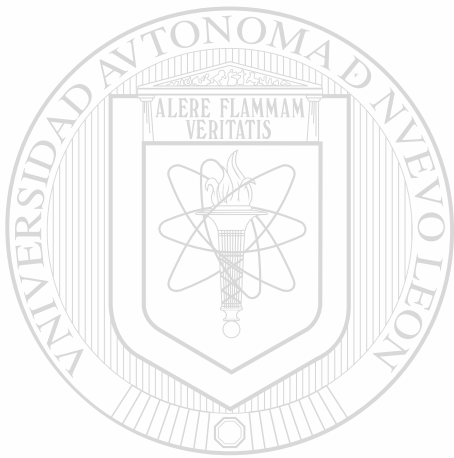
BIOL. JOSE ANTONIO HEREDIA ROJAS

MONTERREY, N.L.

MARZO, 1988



TM
Z5320
FCB
1988
H4



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



153320

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

EVIDENCIA DE LA PRESENCIA DE HISTONAS EN
TROFOZOITOS DE Entamoeba invadens

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
BIOLOGIA CELULAR

P O R
BIOL. JOSE ANTONIO HEREDIA ROJAS



U A N L

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

COMISION DE TESIS
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS


DIRECTOR:


DR. RAÚL GARZA CHAPA

SECRETARIO:


M.C. DIANA RESENDEZ PEREZ

VOCAL:


DRA. LAURA MA TREJO AVILA

DIRECTOR EXTERNO


BIOL. MARIO MORALES VALLARTA

D E D I C A T O R I A

A Dios y a su pueblo con reverencia,

A mis padres, José Antonio y Laura Carmen por su valioso ejemplo y su influencia sobre mi persona,



A mi esposa Laura Ernestina, mi mejor interlocutor,

UANL

A mis hermanos Luis Alberto y Norma Laura, brillantes estudiantes y destacados profesionales; fueron motivo de superación para mí,

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A mis alumnos y maestros,

A G R A D E C I M I E N T O S

A la Unidad de Investigación Biomédica del Noreste, en particular al Ex-Director Dr. Gilberto Molina Ballesteros y a su actual Director Dr. Gerardo Forsbach por el apoyo brindado por la institución a su cargo en la realización de una parte de este trabajo.

Muy especialmente al Dr. Salvador Luis Said Fernández por asesorarme y trabajar a mi lado durante parte del trabajo.

Al Dr. Raúl Garza Chapa, Presidente del jurado. Por la revisión crítica que hizo del escrito y por brindarme lo que es invaluable, su amistad y motivación para mi superación académica.

A la Dra. Laura Trejo Avila y a la M.C. Diana Resendez Pérez, por la revisión del escrito y las sugerencias dadas.

Al Biól. Mario Morales Vallarta quien aparte de ser un gran amigo, tuvo a bien dirigir la presente investigación.

Al Sr. Luis Gibaja del Depto. Audiovisual de la Fac. de Ciencias Biológicas y al Dr. Juan Antonio Luna por brindarme asesoría en cuanto al registro fotográfico de los geles.

A la Srta. Nora Silvia Barbosa Cavazos por el excelente trabajo mecanográfico de esta tesis.

A todas aquellas personas que colaboraron de alguna forma en la culminación de este trabajo, para ellos mi gratitud infinita.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

*Porque las cosas invisibles de él,
su eterno poder y deidad, se hacen
claramente visibles desde la creación
del mundo, siendo entendidas por
medio de las cosas hechas, de modo
que nadie podrá excusarse diciendo
que no sabe si Dios existe o no.*

Romanos 1:20

I N D I C E

	<u>pág.</u>
R E S U M E N	1
INTRODUCCION	3
ANTECEDENTES GENERALES	5
ANTECEDENTES DIRECTOS	12
HIPOTESIS Y OBJETIVO	13
MATERIALES Y METODOS	14
RESULTADOS	24
DISCUSION	38
<hr/>	
CONCLUSIONES	43
CONSIDERACIONES FINALES	44
LITERATURA CITADA	45
APENDICE	50



U A N L

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



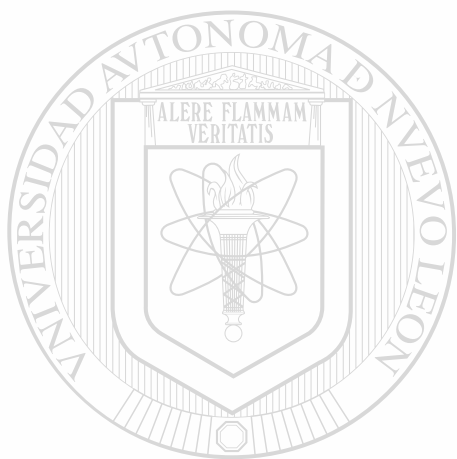
R E S U M E N

Las histonas son proteínas básicas muy conservadas, ricas en arginina y lisina que interactúan con el DNA en el complejo de la cromatina. En todas las células eucarióticas en donde las histonas han sido buscadas, éstas están presentes y en general, existen cinco clases principales: H1, H2A, H2B, H3 y H4. Muchos estudios han demostrado que las histonas, lejos de ser proteínas metabólicamente inertes, manifiestan cambios postraduccionales relacionados con diferentes estados fisiológicas celulares. La posible participación de tales proteínas en la regulación de la expresión genética ha sido objeto de mucha discusión en los últimos años.

No se ha encontrado a la fecha ningún trabajo que informe sobre histonas en Entamoeba, aunque existen trabajos realizados en otros protozoarios relacionados. En base a estos y otros antecedentes, se planteó la hipótesis siguiente: Debido a la presencia de histonas en varios géneros de la familia Amoebidae y en general en todos los eucariotes donde se han buscado, es posible la existencia de éstas proteínas en amibas del género Entamoeba. Con el fin de dar evidencia de la veracidad de esta hipótesis, se planteó el objetivo de: Determinar la presencia de histonas en trofozoitos de E. invadens, mediante patrones electroforéticos en geles de poliacrilamida.

El método de Bonner, et. al., 1968, para extracción de cromatina a partir de tejidos, así como el Hancock, et. al., 1968, para extracción de cromatina a partir de células cultivadas, no resultaron adecuados cuando se aplicaron en trofozoitos de E. invadens. Igualmente, resultaron negativos los intentos de purificación de núcleos para la extracción de histonas a partir de los mismos. Sin embargo, a través del método de Bonner, et. al., 1980, para extracción de histonas directamente de células, núcleos y tejidos, fue posible resolver mediante electroforesis en geles de poliacrilamida la presencia de algunas bandas de proteínas básicas que comigran con las bandas de timo de ternera, usado como testigo en este trabajo. Al menos dos de éstas bandas mantienen una movilidad igual aún cuando se corren en condiciones electroforéticas diferentes.

Después del análisis de los resultados del presente estudio se concluyó lo siguiente: 1).- Existe evidencia de la presencia de histonas en trofozoitos de Entamoeba invadens; 2).- Entre las posibles histonas presentes, están las H2A, H1, H2B o H3 y H4; 3).- Los métodos aquí probados para extracción de cromatina a partir de tejidos y células no son eficaces cuando se aplican a trofozoitos de E. invadens .



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

I N T R O D U C C I O N

El arreglo del material genético en el núcleo de las células eucarióticas, es uno de los puntos fundamentales en el estudio de la expresión génica y por lo tanto de la diferenciación celular. El DNA del complejo de nucleoproteína, lleva la información hereditaria, pero los componentes proteicos determinan su estructura (Bradbury, et. al., 1981; Lewin, 1980). Como la estructura de la cromatina esta relacionada directamente con su función, esto ha sido objeto de mucho debate en los últimos años.

Históricamente el término "cromatina" fue usado para describir el contenido del núcleo interfásico teñido con colorantes básicos y visualizado al microscopio de luz. Más recientemente el concepto es utilizado para denotar el complejo formado de DNA, proteínas y RNA del núcleo de las células eucarióticas.

Entre las proteínas de la cromatina, se encuentran las histonas, ricas en aminoácidos básicos tales como lisina y arginina, y las no-histonas, que son más bien acídicas en cuanto a su composición de aminoácidos (Lewin, 1980). Las histonas presentan una relación en peso de 1.1 a 1.3 con respecto al DNA y esta proporción es más o menos constante en las diferentes especies. Las relaciones DNA-RNA y no-histonas con el DNA varían de acuerdo al estado metabólico en que se encuentran las células o al tipo de tejido (Lewin, 1980).

El hecho de que las proteínas nucleares jueguen un papel muy importante en la determinación de la estructura del material genético e intervengan en fenómenos de diferenciación celular (Arceci, et. al., 1976; Elguin y Hood, 1973; Nguyen, et. al., 1980; Sanders, 1974), hace que la importancia de su estudio resulte fundamental. Además, el utilizar como modelo de estudio a Entamoeba invadens, contribuye al avance del conocimiento sobre parásitos de este género, ya que a pesar de ser un grave problema de salud pública en México y otros países, poco se ha estudiado este aspecto en E. invadens o en E. histolytica, éste último agente causal de la disentería amibiana en el ser humano.

Por otra parte, la gran semejanza morfológica y fisiológica entre las dos especies (Cheng, 1974; Kudo, 1966), permite pensar que los resultados obtenidos en una de ellas, pueden ser comparables para ambos organismos.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A N T E C E D E N T E S

ANTECEDENTES GENERALES:

Las proteínas cromosomales se dividen en dos grupos: las histonas y las no-histonas. Las histonas constituyen el principal componente cuantitativamente hablando en lo que respecta a proteínas cromatínicas (De Robertis y De Robertis, 1980; Karp, 1987), incluso existe un poco más de histonas por peso de DNA en el núcleo de células eucariotes (Lewin, 1980).

Desde cierto punto de vista, la cromatina puede ser considerada como una partícula de nucleoproteína en la cual las proteínas interactúan entre sí y con el DNA. Las interacciones concernientes a las histonas han sido bien caracterizadas en comparación con las de las no-histonas de las cuales poco se conoce (Cameron y Jeter, 1974).

En todas las células eucarióticas en donde las histonas han sido buscadas, éstas están presentes y en general existen cinco clases principales de histonas: H1, H2A, H2B, H3 y H4 (Bradbury, et. al., 1981; De Robertis y De Robertis, 1980; Giese, 1983; Karp, 1987; Lewin, 1980). En eritrocitos nucleados de aves, peces y anfibios, se ha encontrado una histona muy rica en lisina, la H5 y otra con propiedades parecidas pero solamente presente en testículo de tortuga, la H6 (Bradbury, 1978).

El análisis secuencial de histonas de una variedad de organismos, ha demostrado que éstas en general son altamente conservadas y que las histonas H3 y H4, son las más conservadas de todas las proteínas hasta ahora estudiadas (Bradbury, et. al., 1981; Isenberg, 1979; Karp, 1987). Esta resistencia de las histonas al cambio a través de la evolución, indica que cada uno de los residuos es esencial para la función biológica de estas proteínas. Por otra parte las histonas carecen de triptofano y sus secuencias exhiben una marcada asimetría en la distribución de residuos polares y apolares (Bradbury, et. al., 1981; Isenberg, 1979).

Con respecto a la participación de las histonas en la estructura de la cromatina, es determinante, ya que la organización en forma de "nucleosomas" se atribuye precisamente a un complejo formado por un octámero que contiene dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. Aparte de este núcleo, hay aproximadamente 200 pares de bases asociadas al complejo y una copia de la histona H1 en la región que enlaza dos nucleosomas sucesivos, esto en última instancia es lo que da la apariencia de un "collar de cuentas" a la cromatina de los núcleos en interfase de las células eucariotes (Bradbury, *et. al.*, 1981; De Robertis y De Robertis, 1980; Giese, 1983; Karp, 1987; Lewin, 1980).

Una de las cuestiones más importantes acerca de las histonas y otras proteínas nucleares, ha sido su posible participación en el control de la expresión génica. Existe suficiente evidencia de que las proteínas nucleares juegan un triple papel en el complejo de la cromatina; estructural, enzimático y regulador de la expresión génica (Cameron y Jeter, 1974).

Una gran cantidad de experimentos iniciales se interpretaron como sugestivos de que las histonas son capaces de actuar como represores genéticos inespecíficos. La piedra angular de esta proposición fue el hallazgo de que el DNA desnudo es mucho mejor molde para la síntesis de RNA de lo que es el DNA incubado en presencia de histonas. En estos momentos se pensó que las histonas aunadas a las no-histonas, podrían trabajar en conjunto y regular la actividad transcripcional. En el esquema más aceptado se propuso que el enlace de las histonas con una región del DNA podría servir para bloquear la transcripción de ese sitio génico y que las no-histonas actuarían como antirrepresores al unirse de manera selectiva con secuencias particulares de DNA y bloquear así la unión de las histonas con el DNA y por lo tanto liberar la represión en una forma sumamente específica (Karp, 1987). De cualquier forma, el papel de las histonas en el control de la transcripción del gen todavía se debate.

Muchos estudios cuantitativos y cualitativos, y sobre la actividad metabólica de proteínas cromatínicas y nucleolares, han sido dirigidos a comprender fenómenos de causa-efecto, como ejemplos de esto podemos mencionar:

a).- Aquellos en los cuales se han estimulado las células mediante drogas, traumatismos, o la manipulación de técnicas de cultivo con el fin de observar cambios en las mismas, b).- Estudios encaminados a obtener información acerca del metabolismo de estas proteínas en fenómenos relacionados con el crecimiento celular y c).- Experimentos en donde las células son observadas antes, durante y después de una serie de eventos de diferenciación (Cameron y Jeter, 1974). En este último caso se centra el interés del futuro del presente trabajo, ya que de estar presentes histonas en amibas del género Entamoeba sería de sumo interés conocer sus cambios, si es que existen, durante las diferentes fases del ciclo de vida de las mismas.

A pesar de que las histonas, en particular la H3 y la H4 son altamente conservadas, hace tiempo se conocen modificaciones postraduccionales que en un momento dado podrían ser las responsables de su posible papel regulador de la expresión genética (Ruíz-Carrillo, et. al., 1975). Estas modificaciones son cambios postsintéticos controlados por enzimas, que involucran modificaciones químicas de las cadenas laterales de ciertos residuos, tales modificaciones consisten en: (Bradbury, et. al., 1981; De Robertis y De Robertis, 1980; Karp, 1987; Lewin, 1980, Pantazis y Bonner, 1981)

a).- Metilación. Las únicas histonas sujetas a metilación in vivo son las H3 y la H4, en la H4 el principal sitio de metilación es la lisina 20, mientras que en la H3 los sitios principales son los residuos de lisina 9 y 27 y la lisina 7 se considera un sitio menor. Esta modificación es considerada irreversible, su efecto es cambiar la basicidad y naturaleza hidrofóbica de la cadena lateral de la lisina, pero no la carga neta.

b).- Acetilación. Hay básicamente dos tipos de acetilación de histonas. El primero involucra la serina del N-terminal de las histonas H1, H2A y H4, estos cambios son irreversibles y están correlacionados con la síntesis de estas proteínas. El segundo tipo es la acetilación reversible de lisina en H2A, H2B, H3 y H4 que se ha observado en una gran cantidad de células, todos los sitios de acetilación están localizados en las regiones básicas del N-terminal. El efecto de la

acetilación en general es, convertir la cadena lateral básica de la lisina en acetyl lisina neutra y reducir así la carga neta básica de las regiones N-terminal de las histonas. Se ha informado que ocurren acetilaciones múltiples de las histonas en la fase S del ciclo celular y que el fenómeno muestra un rápido recambio lo cual sugiere que la acetilación de la proteína está involucrada en la síntesis de DNA. Aún más, se ha establecido una fuerte asociación entre la acetilación de las histonas y la expresión de genes activos.

c).- Fosforilación. Constituye una modificación reversible, la cual convierte los residuos de serina y treonina de neutros a negativamente cargados. La histona H1 es la que más se fosforila. Se han identificado tres tipos de fosforilación. 1). Fosforilación del residuo serina 37 dependiente de AMP cíclico, 2). Fosforilación in vitro de serina 105 por histona cinasa HK2, sin embargo este tipo no se ha observado in vivo y 3). Fosforilación extensiva de serinas y treoninas a través del ciclo celular y que ha sido llamada "fosforilación asociada al crecimiento".

d).- ADP-Ribosilación. Se ha visto que las histonas H1, H2A, H2B y H3 pueden unirse covalentemente a poli ADP ribosa. Esto modifica drásticamente las interacciones entre las histonas pero las consecuencias fisiológicas de esto aún no se han establecido con claridad.

e).- Proteína A24. La proteína A24, es una modificación específica de la histona H2A. Se le ha llamado así por su posición en geles sometidos a electroforesis bidimensional. Consiste básicamente de una proteína híbrida formada por unión de H2A y una proteína no-histónica llamada Ubiquitina, unidas covalentemente a través de un enlace isopeptídico entre el grupo amino de la lisina 119 de H2A y el carboxilo terminal de la ubiquitina. Aproximadamente un 10% de las moléculas de la histona H2A están en forma de A24. Se ha pensado que esta proteína está involucrada en estructura de cromatina, en cromatina inactiva o es parte de regiones especializadas de la misma.

Con base en lo dicho anteriormente podemos decir que las histonas del nucleosoma no son moléculas metabólicamente inertes, sino que al sufrir toda esa

serie de modificaciones podrían participar de alguna manera determinando estructura y/o participando en la función del material genético.

Sin embargo, el hecho de que las histonas sean muy constantes en lo que respecta a sus patrones electroforéticos en células y tejidos diferentes, así como sus oscilaciones cuali y cuantitativas a lo largo del ciclo celular, hizo pensar en un principio en un papel estructural pasivo para éstas (Lewin, 1980).

Ahora bien, existen trabajos que sugieren que la estructura misma de la cromatina, condicionada por el estado en que se encuentran las histonas puede ser determinante en la funcionalidad de la cromatina (Bradbury, et. al., 1981; Karp, 1987; Lewin, 1980).

Por lo general se ha encontrado que los agentes que incrementan la función genética incluyendo numerosas hormonas, también incrementan los niveles de acetilación de las histonas. De manera semejante, la disminución de actividad genética que acompaña a ciertos procesos de maduración como es el caso de la formación del espermatozoide o del eritrocito maduro, se acompañan de una disminución en los niveles de acetilación. Más aún, segmentos de la cromatina que son más susceptibles a la degradación la DNAasa I, son los mismos que contienen los niveles más altos de histonas acetiladas (Perry y Chalkley, 1982).

Por otro lado se ha dicho (Karp, 1987), que las histonas podrían tener relación con los fenómenos de envejecimiento, ya que la acetilación de las histonas decrece al envejecer un cultivo celular.

A pesar de que se comentó que las histonas carecen de especificidad de tejido, hay un trabajo (Seyedein y Kistler, 1979) donde se compara la histona H1 de testículo y de órganos somáticos de conejos y ratones y se observó que las poblaciones de H1 contienen al menos dos variantes que son escasos o están ausentes en los órganos somáticos. Otros estudios al respecto (Ruderman y Gross, 1974; Seale y Aronson, 1973), demuestran variaciones en cuanto a especificidad de tejido para H1 durante el desarrollo embrionario de erizo de mar. Así, H1

recientemente sintetizada forma una simple banda en geles de urea-ácido acético, se le llamó H1M por corresponder al estado de mórula durante la embriogénesis y con un peso molecular de 20,000 daltones. En el estado de gástrula se sintetiza una molécula de H1 llamada H1G la cual tiene un peso aproximado a 21,000 daltones. De todas formas, se tenía la duda de si la H1M y H1G eran de verdad proteínas diferentes o se trataba de la misma pero modificada. Posteriores estudios (Arceci, et. al., 1976; Ruderman, et. al., 1974) demostraron mediante la síntesis in vitro de proteínas a partir de RNA-mensajeros de H1M y H1G que en realidad son diferentes.

Por otra parte, en otro trabajo se demostró que al menos dos formas específicas de H1 aparecen durante la espermiogénesis de rata (Levinger, et. al., 1978).

Otro trabajo (Fisher y Laemmli, 1980) hizo pensar, que las modificaciones postraduccionales sufridas por las histonas juegan un papel importante durante el ciclo celular. Así, al estudiar los cambios en fosforilación de H1 durante el ciclo celular del moho del limo Physarum policephalum, se encontró que la acumulación de fosfato en H1 se incrementó marcadamente justo antes de la mitosis..

En el aspecto metodológico, se han presentado varios problemas en lo que concierne al estudio de histonas, dos de los principales son: la fácil degradación que ocurre durante su extracción (Stallwagen, et. al., 1968) y la tendencia que tienen las histonas a agregarse entre sí y formar complejos (Bradbury, et. al., 1981; De Robertis y De Robertis, 1980; Karp, 1987; Lewin, 1980) .

Con respecto a la degradación, se ha hecho indispensable la utilización de inhibidores de proteasas tales como el bisulfito de sodio o el fenil-metil-sulfonil-fluoruro en experimentos de aislamiento de estas proteínas (Bonner, et. al., 1980). Aún más, se ha identificado (Davie, et. al., 1986) la localización de una proteína no-histónica proteasa específica de la histona H2A, asociada con ésta en el complejo de cromatina.

Con referencia a la tendencia a agregarse que muestran las histonas, primeramente se observó la formación de dímeros (H2A, H2B) y también un complejo muy

fuerte consistente de H3-H4. Así mismo, forman complejos fuertes H2A y H3, H2B y H4, además complejos débiles H3 con H2B. No se ha informado de la participación de H1 en complejos de histonas (Bradbury, et. al., 1981).

Las histonas pueden ser aisladas directamente de tejidos y células, de núcleos purificados o a partir de preparaciones crudas de cromatina (Bonner, et. al., 1980). Tradicionalmente dos metodologías generales han sido usadas para aislar histonas (Murray, 1965): a).- Extracción con ácido; usualmente con ácido sulfúrico la cual brinda sulfatos de histona, b).- Extracción con sales seguida por precipitaciones con alcohol y acetona. Ambos métodos han resultado satisfactorios ya que cuando se separan las histonas mediante el uso de columnas de intercambio iónico de guanidina-HCl (Bonner, et. al., 1968), se obtienen iguales productos de elución si se parte de histonas extraídas con ácido o de aquellas separadas mediante fuerza iónica a través del uso de diferente concentración de sal.

Un trabajo clásico de separación electroforética de histonas desarrollado por Panyim y Chalkley (1969), demostró, mediante el uso de electroforesis en gels de poliacrilamida urea-ácido acético que, solamente cinco fracciones de histonas están presentes virtualmente en todas las células eucarióticas.

Más recientemente y con el uso de otras técnicas tales como electroforesis bidimensional, se han detectado variantes de estas proteínas asociadas a los cinco grupos principales (Bonner, et. al., 1980) .

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ANTECEDENTES DIRECTOS

En el ciliado Tetrahymena piriformis, se encontró que el macronúcleo contiene las cinco clases principales de histonas, sin embargo, bajo las mismas condiciones experimentales, en el micronúcleo no se encontraron ni H1 ni H3. La digestión con nucleasa de estafilococo, tanto del macro como del micronúcleo brindó unidades oligoméricas similares a las encontradas en la cromatina de organismos superiores (Gorovsky y Keevert, 1975) .

Existe un estudio basado en inmunofluorescencia indirecta que sugiere la presencia de histonas en especies de vida libre pertenecientes al orden Amoebida (Stewart y Beck, 1967), sin embargo, posteriormente este trabajo fue objetado por el hecho de que los antisueros usados pudieron no tener la especificidad apropiada para detectar lo que se buscaba (Sopina, et. al., 1979) ya que se usaron anticuerpos antinucleares humanos, dirigidos contra DNA ligado a histonas.

Más recientemente, utilizando antisueros específicos contra las cinco clases principales de histonas, también por inmunofluorescencia indirecta, se demostró que en amibas de vida libre se presentan las cinco histonas, sin embargo el grado de similitud entre fracciones homólogas de amibas y de timo de ternera varía; esto se puede interpretar en términos de distancia inmunológica, la mayor diferencia se encontró a nivel de la histona H1 (Sopina, et. al., 1979) .

No se ha encontrado a la fecha, ningún trabajo que informe sobre la presencia de histonas en amibas del género Entamoeba .

HIPOTESIS DE TRABAJO

Ante la situación descrita en antecedentes, se plantea la hipótesis siguiente: Debido a la presencia de histonas en géneros de la familia Amoebidae y en general en los eucariotes donde se han buscado, es posible la presencia de estas proteínas en amibas del género Entamoeba .

OBJETIVO

Determinar la presencia de histonas en trofozoitos de Entamoeba invadens, mediante patrones electroforéticos en geles de poliacrilamida.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

MATERIALES Y METODOS

Material biológico:

- a).- Tejido de timo de ternera. Fue obtenido del rastro municipal de la Cd. de Monterrey, N.L., México.
- b).- Células amibianas. Trofozoitos de la cepa Ip-1 de Entamoeba invadens, fueron proporcionadas por el Dr. José Juan Segura Luna, del Laboratorio de amibiasis experimental de la Unidad de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Equipo:

En el apéndice correspondiente se encuentran las especificaciones concernientes al equipo de laboratorio utilizado en el presente trabajo.

Reactivos:

Sobre la marcha de la metodología se mencionarán los reactivos y soluciones usadas, así mismo, en el apéndice correspondiente se presenta el origen de los mismos.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Lugares de trabajo:

Laboratorios de la división de Genética y Biología Celular de la Unidad de Investigación Biomédica del Noreste, I.M.S.S. y Laboratorio de Biología Celular y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L.

Plan de Trabajo:

En la figura 1, se presenta un esquema general de trabajo que indica las diferentes fases en que se llevó a cabo el estudio aquí presentado.

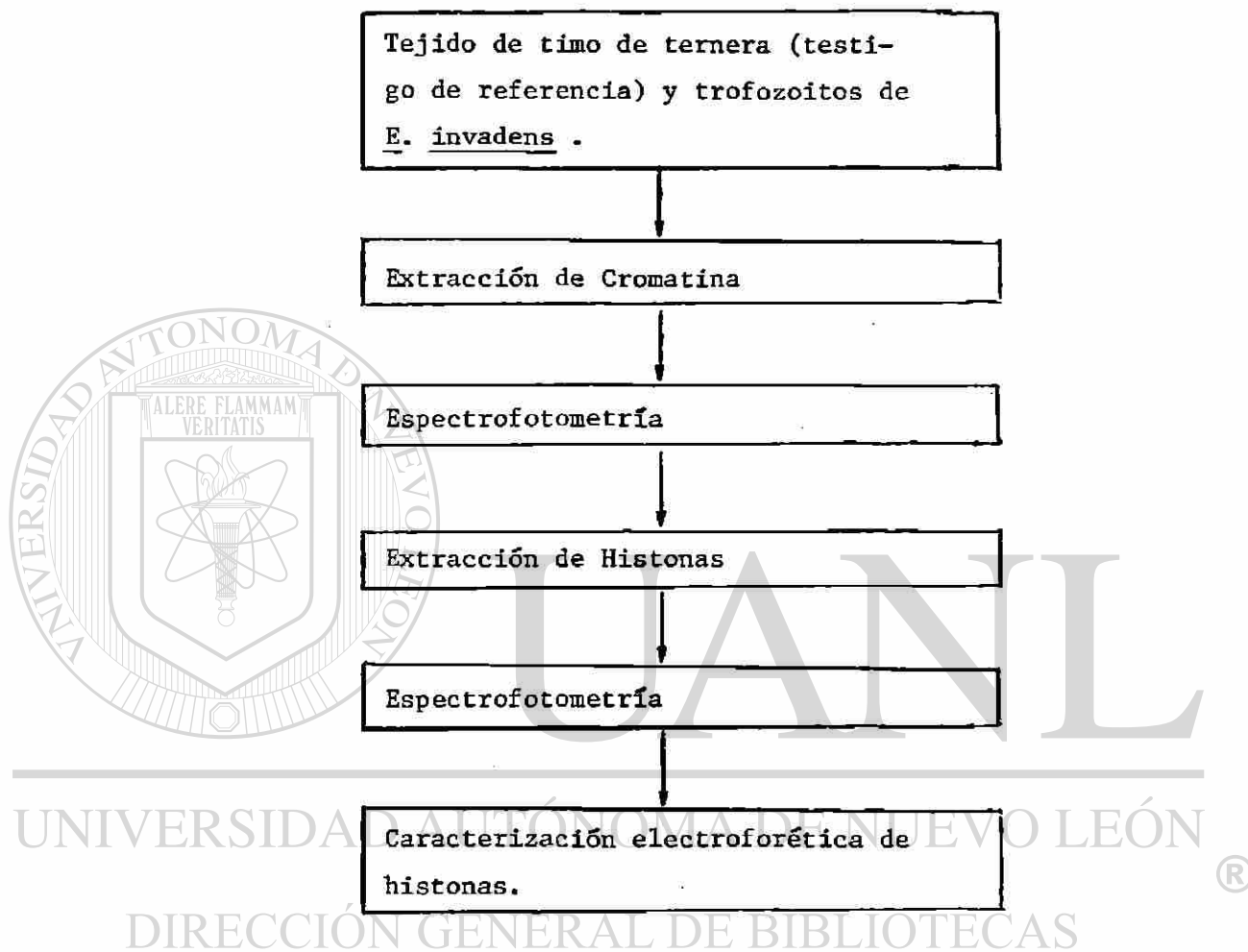


Fig. 1.- Esquema general del plan de trabajo. El tejido de timo de ternera fue usado como referencia en este estudio .

Establecimiento del cultivo de amibas:

Trofozoitos de la cepa Ip-1 de Entamoeba invadens, en fase exponencial de crecimiento, fueron cultivados de acuerdo a los métodos convencionales (López-Revilla y Rodríguez-Báez, 1981), en medio TPS-1 modificado de Diamond (1968).

Curva de crecimiento de las amibas:

Con objeto de llevar control acerca del crecimiento de las células amibianas, se determinó la cinética de crecimiento correspondiente. Se inocularon 24 tubos a 25°C con una cantidad inicial de 10^4 células/ml. Cada 24 h se realizó el conteo de las amibas por duplicado por un período de 12 días. La cuenta celular se realizó con una cámara hematocimétrica de Neu Bauer, previo enfriamiento de los tubos en baño de hielo por espacio de 10 min.

Extracción de cromatina de timo de ternera:

La metodología que se describe a continuación (Bonner, et. al., 1968), ha sido extensivamente probada para extraer cromatina de timo de ternera e hígado de rata mediante fuerza iónica intermedia. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Todos los pasos se llevaron a cabo a 4°C .

A 15 g de tejido de timo de ternera congelado a - 70°C se agregaron 200 ml de solución A y 2-Octanol(hasta una concentración final de 0.5%). Se homogenizó por espacio de 1 min en licuadora de laboratorio a la velocidad más alta y posteriormente por 4 min a la velocidad más baja. El homogenado se filtró a través de dos capas de papel miracloth. Se centrifugó el filtrado a 1500 x g por 10 min y se descartó el sobrenadante resultante. Se resuspendió el sedimento en 150 ml de solución A. Se centrifugó a 1500 x g por 10 min y se descartó el

sobrenadante. El sedimento resultante se resuspendió en 80 ml de solución A y se repitió el paso anterior. Se homogenizó el sedimento manualmente utilizando un homogenizador Elvenjhem Potter (10 golpes) en 80 ml de solución B. Se centrifugó este homogenado a 1500 x g por 10 min y se descartó el sobrenadante. Se repitió la homogenización del sedimento de igual forma que en el paso no. 7. Se centrifugó el homogenado a 4500 x g por 10 min y se descartó el sobrenadante. Se repitió la homogenización igual que en el paso 7 y se centrifugó a 12000 x g por 10 min. Se descartó el sobrenadante. Se repitió el paso anterior. El sedimento resultante se llevó a 15 ml con solución C y se agitó suavemente por espacio de 1 h. Se pusieron capas de 5 ml de esta suspensión sobre solución D (25 ml) en tubos de nitrocelulosa. Se mezclaron suavemente (con agitador de vidrio) los dos tercios superiores de cada tubo. Se centrifugó a 70,000 x g por espacio de 3 h. Se descartó el sobrenadante y a la pastilla gelatinosa inferior se le consideró "cromatina cruda". La cromatina se lavó con solución G mediante centrifugación a 30,000 x g por 20 min. La cromatina se dializó contra la misma solución G (dos litros) por 12 h.

Soluciones:

Sol. A = NaCl 0.075 M - Na₂EDTA 0.024 M - NaHSO₃ 0.05 M pH 8.0

Sol. B = Tris 0.01 M - Na₂EDTA 0.2 mM - Tritón X-100 0.1% - NaHSO₃ 0.05 M
pH 8.0

Sol. C = Tris 0.01 M - Na₂EDTA 0.2 mM - NaHSO₃ 0.05 M pH 8.0

Sol. D = Sacarosa 1.7 M - Tris 0.01 M - Na₂EDTA 0.2 mM - NaHSO₃ 0.05 M pH 8.0

Espectro de Absorción de Cromatina de timo de ternera:

Para corroborar la calidad del material extraído por el método anterior, se tomó una pequeña alícuota y se resuspendió en amortiguador Tris 0.01 M - Na₂EDTA 0.2 mM pH 8.0, en una relación final de 1:10. Se leyó al espectrofotómetro U.V. en un rango de longitud de onda de 230 a 320 nm., con intervalos

de 5 nm. El aparato fue ajustado a cero unidades de absorbancia, utilizando el mismo amortiguador en que se resuspendió la cromatina.

Extracción de histonas a partir de cromatina de timo de ternera (Johns, 1978).

Todas las operaciones se llevaron a cabo a 4°C y la cristalería fue pretratada con NaOH 10 N y horneada a 200°C por espacio de 2 h .

M é t o d o

La cromatina se colocó en un vaso de precipitado y se homogenizó por agitación magnética (en baño de hielo), 15 min . Se agregaron dos volúmenes de ácido sulfúrico 0.4 N más NaHSO₃ para una concentración final de 0.05 M y se mantuvo en agitación por 30-60 min . Se eliminó el precipitado mediante centrifugación a 5000 rpm por 10 min en centrífuga refrigerada Damon IEC DPR-6000. Se agregaron al sobrenadante cuatro volúmenes de etanol absoluto preenfriado a -70 °C y se dejó toda la noche a la misma temperatura. Se centrifugó a 5000 rpm por 15 min y se eliminó el sobrenadante. Se agregó a la pastilla aproximadamente 5 ml de acetona y se agitó manualmente por 2 min . Se centrifugó a 3000 rpm por 20 min y se eliminó el sobrenadante. Se repitió dos veces este lavado con acetona. Se liofilizó la pastilla y se obtuvo un "polvo blanco" al cual se le consideró como histonas.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Espectro de absorción de histonas:

Para determinar la absorbancia de las histonas extraídas, estas se diluyeron en agua destilada a una concentración aproximada de 1 mg/ml . Se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro de U.V. en el rango de los 220 a 300 nm. con intervalos de 5 nm.

Electroforesis de histonas en geles de poliacrilamida urea-acido acético de acuerdo a Panyim y Chalkley (Panyim y Chalkley, 1969).

Preparación de los geles:

Solución A = 60% de acrilamida (P/V) más Bis-acrilamida 0.4%

Solución B = Acido acético glacial 43.2% (V/V) más TEMED 4% (V/V)

Solución C = Persulfato de amonio 0.2% (P/V) disuelto en una solución de 4.0 M urea

Todas las soluciones se prepararon justo inmediatamente antes de utilizarse. La sol. A fue filtrada a través de papel filtro Wathman No. 1 .

Se mezcló inmediatamente antes de usarse:

Una parte de solución B; 5.0 ml

Dos partes de solución A; 10.0 ml

Cinco partes de solución C; 25.0 ml

Una vez hecha la mezcla, se colocó dentro de tubos de vidrio de 10 cm de longitud y 5 mm de diámetro interior (la longitud real de los geles fue de 9 cm). Se colocó luego una capa de agua destilada sobre cada gel y se dejaron así a temperatura ambiente hasta su polimerización (2 a 3 h).

Amortiguador de muestras: las histonas fueron disueltas en una solución que contenía 0.9 N de ácido acético y 15% de sacarosa.

Amortiguador para la cámara de electroforesis: se usó ácido acético a una concentración final de 0.9 N.

Pre-electroforesis: todos los geles fueron sometidos a este pretratamiento, con el fin de eliminar cargas diferentes a protones y aniones acetatos. La preelectroforesis se juzgó completa cuando el voltaje se hizo constante con respecto al tiempo lo cual ocurrió aproximadamente al cabo de 7 h .

Electroforesis en tubos: Se colocó la muestra sobre los geles con una micropipeta. Se usaron 10, 20 y 30 μ l de la muestra de histonas disuelta en el correspondiente amortiguador a una concentración final de 1 mg/ml . Se corrió por 3 h a 2.0 miliamperes por tubo.

Coloración de los geles: Los geles fueron sacados de los tubos, quebrando el tubo o haciendo resbalar el gel inyectando agua destilada entre las superficies del gel y el vidrio. Inmediatamente después los geles fueron colocados en tubos de vidrio que contenían colorante azul brillante de Coomassie al 0.5% disuelto en metanol absoluto al 50% más ácido acético al 7.5% . Así permanecieron inmersos en esta solución por espacio de 4 h. Al término de este tiempo los geles fueron colocados por 4 h en una solución desteñidora a base de metanol absoluto al 50% y ácido acético 7.5% y finalmente en una solución de metanol absoluto 5% más ácido acético al 7.5% hasta la definición de las bandas y que el colorante de fondo hubiese sido eliminado. En varias ocasiones, se aceleró la destinción de los geles elevando la temperatura a 60°C con la última solución desteñidora. Finalmente se procedió al registro fotográfico de los mismos.

Extracción de cromatina a partir de células cultivadas según Hancock y cols (1968).

Soluciones:

Pi/NaCl: NaCl 0.65 g más K_2HPO_4 0.28 g más KH_2PO_4 0.04 g en 100 ml. de agua destilada pH 7.5

Sol. E: Sacarosa 0.1 M en NaH_2PO_4 0.2 mM pH 7.5 titulado por KOH

Sol. F: Detergente Nonidet-P40 (NP-40) 0.5% (V/V) en Na_2EDTA 0.2 mM pH 7.5

Sol. G: Igual que la solución E pero a pH 8.5

Todas las operaciones se llevaron a cabo a 4°C

1.- Células lavadas con solución Pi/NaCl, se resuspendieron en solución E a una concentración final aproximada 5×10^6 cels./ml .

- 2.- Se centrifugó a 1500 x g por 7 min y se descartó el sobrenadante.
- 3.- Se resuspendió la pastilla celular de nuevo en sol. E pero ahora a una concentración de 1.5×10^7 céls./ml y se mezcló suavemente.
- 4.- Se agregó gota a gota un volumen de solución F y se mezcló a mano suavemente.
- 5.- Se puso una capa del lizado sobre 5 volúmenes de solución G.
- 6.- Se centrifugó a 3000 x g en rotor de columpio por 15 min y se removió cuidadosamente el sobrenadante.
- 7.- Se resuspendió la pastilla en un volumen de la sol. E y se volvió a poner una capa en sol. G .
- 8.- Se repitió el paso 6 .
- 9.- La pastilla resultante fue resuspendida en EDTA 0.2 mM más 0.2 mM Ditiotreitól y se homogenizó suavemente a mano.

Diálisis de los extractos de cromatina

Los extractos obtenidos por el método anterior, fueron dializados contra solución salina de fosfatos (Pi/NaCl) por espacio de 24 h en un volumen final de 2 l. a 4°C utilizando tubo de diálisis Spectrapor (Spectrum Medical Industries Inc. DI614-2) .

Extracción de histonas directamente a partir de células y tejidos según Bonner, et. al. (1980) .

A menos que se especifique lo contrario, todas las operaciones se llevaron a cabo a 4°C .

- 1.- 100×10^6 células previamente lavadas en solución Pi/NaCl se resuspendieron en una solución de Ditiotreitól (DTT) 10 mM más PMSF (Fenil-Metil-Sulfonil-Fluoruro) 1.0 mM.
- 2.- Se sonicaron mediante la aplicación de 4 ciclos de 30 seg con intervalos de 60 seg entre cada uno .
- 3.- Se observó al microscopio óptico de contraste de fases para constatar la lisis total de células y núcleos e inmediatamente el lizado fue llevado a 0.4 M con HCl concentrado.
- 4.- Se dejó reposar agitando intermitentemente por 20 min .

- 5.- Se centrifugó en microcentrífuga por 5 min y se descartó el precipitado.
- 6.- En el sobrenadante resultante se disolvieron 750 mg de urea por cada ml del mismo (conc.final 8.0 M urea) .
- 7.- Se agregaron 5 l de fenolftaleína 0.2% por cada ml de sobrenadante.
- 8.- Se agregaron la cantidad necesaria de microlitros de NH_3 concentrado hasta que la solución tomó un color ligeramente rosado.
- 9.- Se incubó por 5 min a temperatura ambiente.
- 10.- Se llevó todo a 1.0 M con ácido acético glacial .
- 11.- El extracto después de esto, puede usarse inmediatamente para electroforesis, colocándolo directamente sobre geles de PAA-Urea-ácido acético, con y sin Tritón X-100. El resto del extracto puede guardarse a -20°C .

Electroforesis de histonas en geles de placa de poliacrilamida (PAA)-
Urea-Acido acético Tritón X-100 (Bonner, et. al.,1980)

Se usaron geles discontinuos con y sin detergente.

Gel separador (cantidades para 30 ml)

Acrilamida 60%	7.5 ml
Bisacrilamida 2.5%	1.2 ml
Acido acético glacial	1.8 ml
TEMED	0.15 ml
NH_3 concentrado	0.09 ml
Urea (cristales)	14.4 g

Se mezclaron todos los reactivos (se calentó ligeramente para disolver la urea) y se ajustó el volumen a 27.4 ml con agua.

Se desgasificó la muestra en desecador mediante una bomba de vacío por espacio de 15020 min .

Posteriormente se agregó a la mezcla 0.6 ml. de Tritón X-100 al 25% (P/V). Finalmente se agregaron 2.0 ml de solución de riboflavina al 0.004 %. Esto último se hizo en la obscuridad. Rápidamente se colocó el gel entre placas de vidrio de 14 cm de ancho a una altura de 10 cm y grosor de 1.5 mm . Se colocó sobre el gel una capa de agua de 2 a 3 cm y se dejó polimerizar en presencia de

luz fluorescente toda la noche.

Gel concentrador (cantidades para 20.0 ml)

Acrilamida 60%	1.1 ml
Bisacrilamida 2.5%	1.3 ml
Acido acético glacial	1.2 ml
TEMED	0.1 ml
NH ₃ concentrado	0.06 ml
Urea (cristales)	9.6 g

Se mezcló todo y se ajustó el volumen a 18.7 ml con agua (se calentó ligeramente para disolver la urea). Se desgasificó la solución igual que para el gel separador.

Se agregó 1.3 ml de solución de riboflavina y se colocó sobre el gel separador previamente gelificado. La polimerización se aceleró con luz fluorescente la cual tardó aproximadamente tres horas.

Amortiguador para la cámara de electroforesis: consistió de glicina 0.1 M y ácido acético 1.0 M.

Electroforesis: se corrió a amperaje constante, 10 miliamperes por espacio de 10 a 14 h. En este caso no se requirió de pre-electroforesis.

Coloración de los geles: se tiñeron con azul brillante de Coomassie al 0.1 % disuelto en ácido acético 5% y etanol absoluto al 40% por espacio de 30 a 45 min . Terminado este tiempo se destiñeron los geles en una solución a base de ácido acético 5% y 20% de etanol absoluto.

También, ciertos geles fueron teñidos con colorante amido negro al 0.1% disuelto en ácido acético 0.7% y etanol absoluto 30% durante toda la noche (12 h) y posteriormente se destiñeron con ácido acético 0.7% más etanol absoluto 30% .

R E S U L T A D O S

I.- Cultivos celulares y cinética de crecimiento

La figura 2 muestra la curva de crecimiento de trofozoitos de Entamoeba invadens cepa IP-1 cultivados en medio TPS-1. Las cuentas celulares se hicieron por duplicado y cada uno de los puntos representa el promedio. Puede observarse que el crecimiento es exponencial desde el primer día, lo que indica una buena condición fisiológica de las células. Al noveno día se alcanzó el máximo de crecimiento y se inició una fase estacionaria. Aunque no se continuaron las cuentas diarias después de 12 días, algunos cultivos permanecieron hasta 45 días después de iniciados. En estos cultivos viejos, las células eran apreciablemente más grandes (resultados no mostrados).

II.- Extracción de cromatina de timo de ternera

En la figura 3 se observa el espectro de absorción de la cromatina obtenida del timo de ternera. Se notó un máximo de la curva a los 259 nm. A 300 nm la absorbancia es apenas un 8% de la que se obtiene en el pico máximo.

III.- Espectro de absorción y electroforesis de histonas de timo de ternera

El espectro de absorción de los extractos de histonas de timo de ternera (figura 4), muestra una máxima absorbancia a 220-230 nm, mínima absorbancia hacia los 300 nm y un ligero "hombro" en la curva se observó a 280 nm.

Por otra parte, la electroforesis de los mismos extractos histónicos, resultó en un patrón de 5 bandas similar al descrito por Panyim y Chalkley (figura 5).

IV.- Extracción de cromatina a partir de trofozoitos de E. invadens

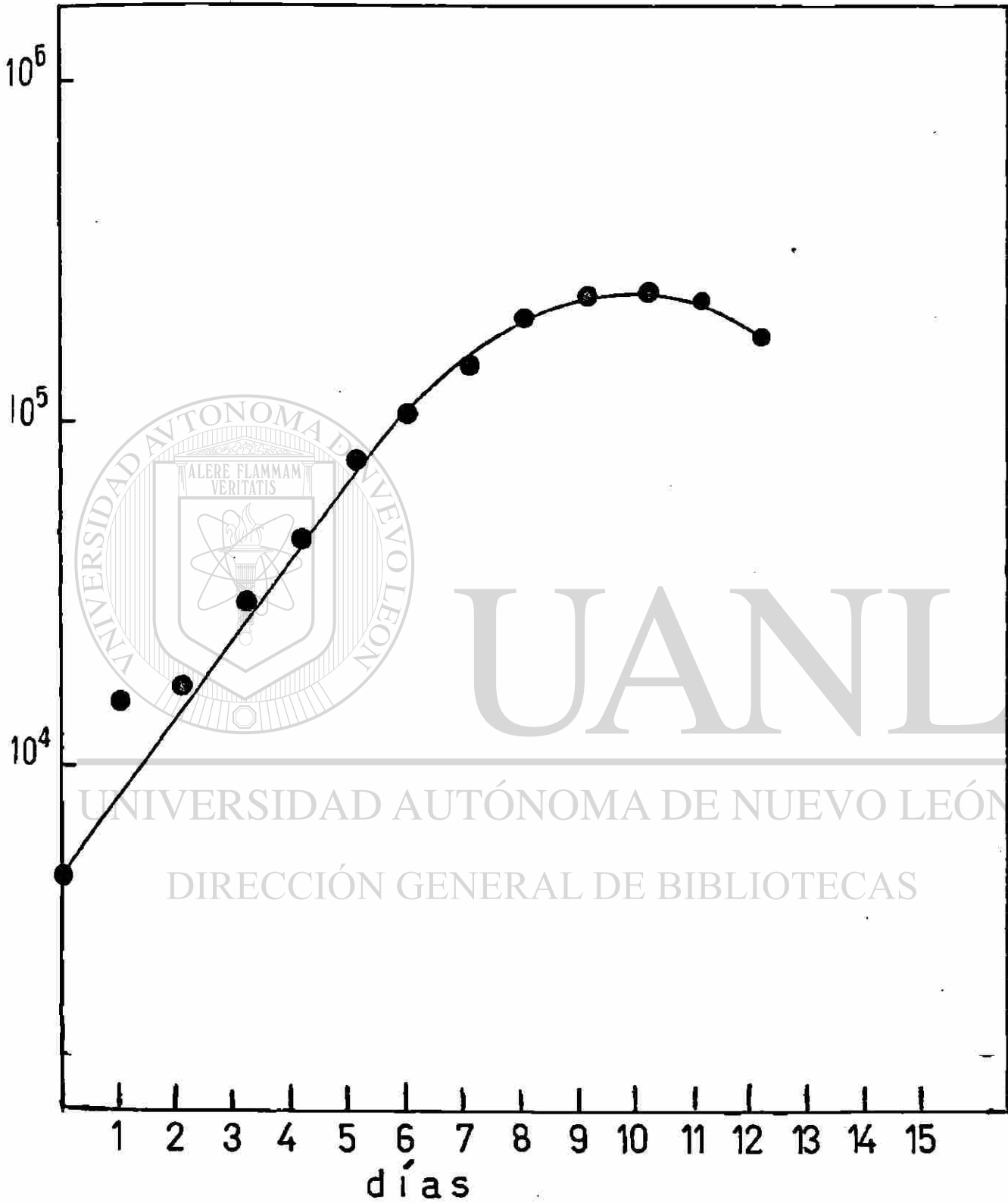


Fig. 2.- Cinética de crecimiento de trofozoitos de Entamoeba invadens cepa IP-1, crecidos en medio TPS-1 .



Fig. 3.- Espectro de absorción de cromatina de timo de ternera

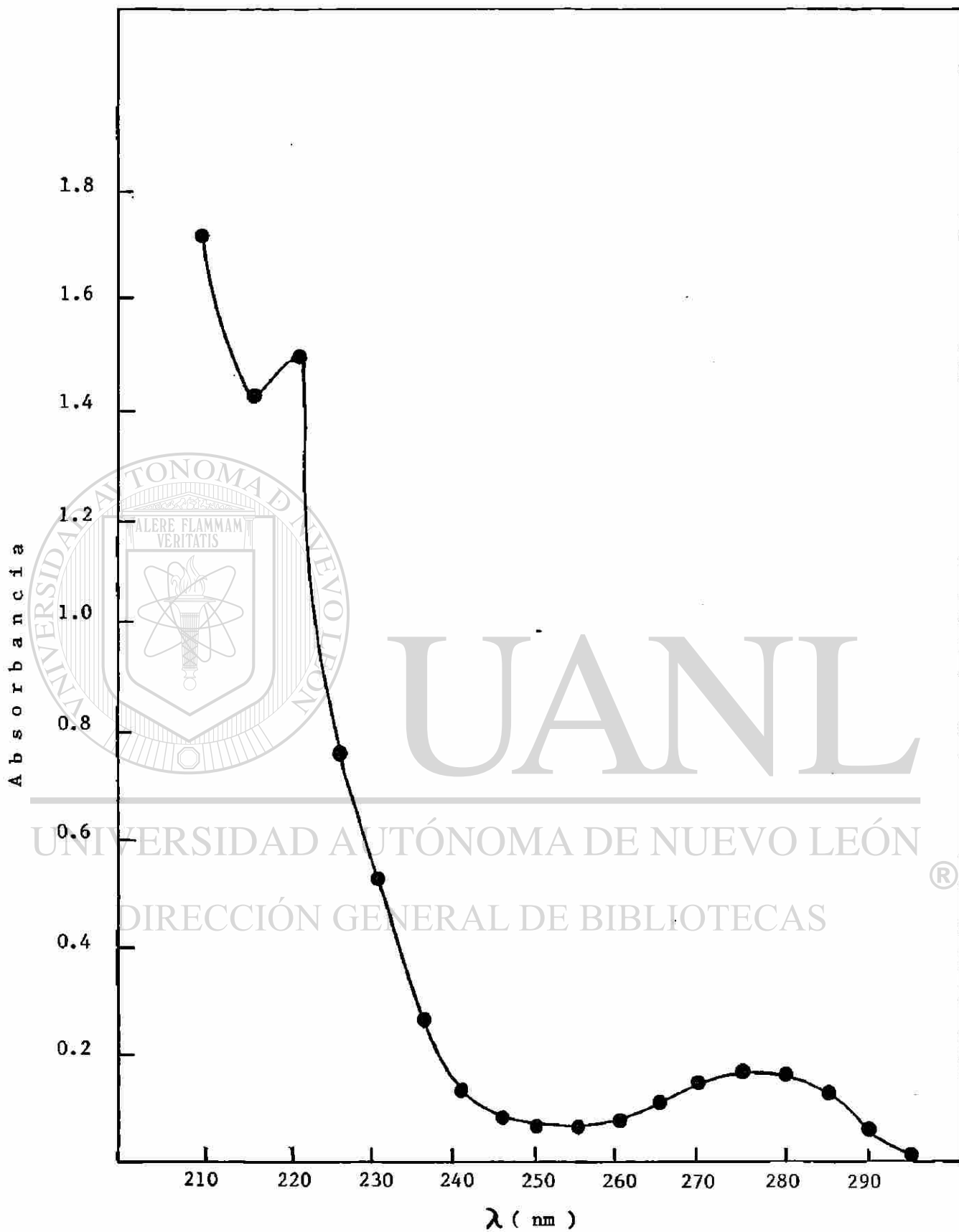


Fig. 4.- Espectro de absorción de histonas aisladas a partir de cromatina de timo de ternera.

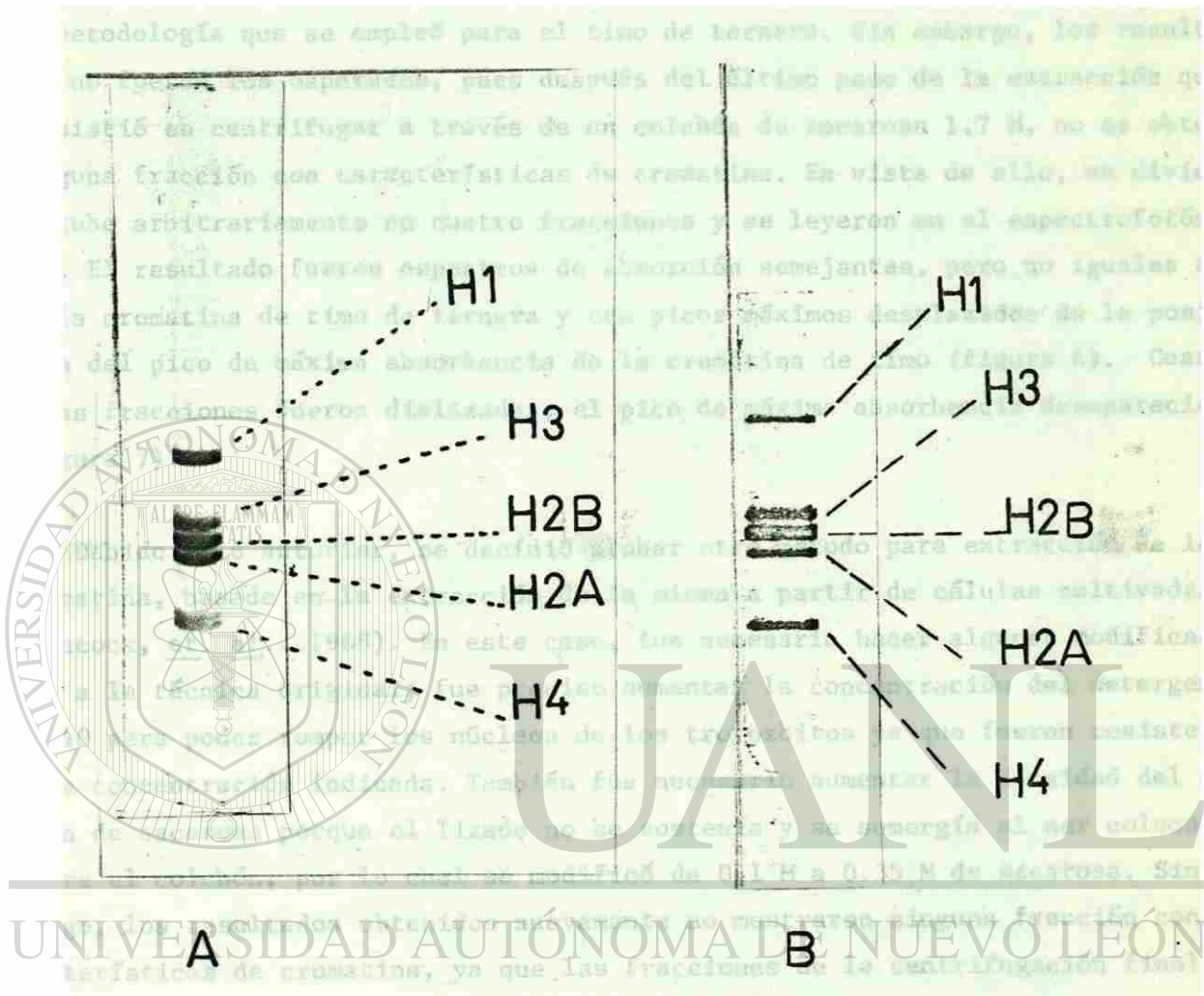


Fig. 5.- Electroforesis de histonas en gels cilíndricos de poliacrilamida-urea-ácido acético: A).- patrón de histonas aisladas en este trabajo; B).- patrón informado por Panyim y Chalkley para histonas de timo de ternera.

Con los resultados descritos en las secciones anteriores, se pensó que se estaba en posibilidad de proceder con las células amibianas, basados en la misma metodología que se empleó para el timo de ternera. Sin embargo, los resultados no fueron los esperados, pues después del último paso de la extracción que consistió en centrifugar a través de un colchón de sacarosa 1.7 M, no se obtuvo ninguna fracción con características de cromatina. En vista de ello, se dividió el tubo arbitrariamente en cuatro fracciones y se leyeron en el espectrofotómetro. El resultado fueron espectros de absorción semejantes, pero no iguales al de la cromatina de timo de ternera y con picos máximos desplazados de la posición del pico de máxima absorbancia de la cromatina de timo (figura 6). Cuando estas fracciones fueron dializadas, el pico de máxima absorbancia desapareció (figura 7).

Debido a lo anterior, se decidió probar otro método para extracción de la cromatina, basado en la extracción de la misma a partir de células cultivadas (Hancock, et. al., 1968). En este caso, fue necesario hacer algunas modificaciones a la técnica original; fue preciso aumentar la concentración del detergente NP-40 para poder romper los núcleos de los trofozoitos ya que fueron resistentes a la concentración indicada. También fue necesario aumentar la densidad del colchón de sacarosa porque el lizado no se sostenía y se sumergía al ser colocado sobre el colchón, por lo cual se modificó de 0.1 M a 0.35 M de sacarosa. Sin embargo, los resultados obtenidos nuevamente no mostraron ninguna fracción con características de cromatina, ya que las fracciones de la centrifugación final en colchón de sacarosa, mostraron espectros de absorción con picos máximos también desplazados del pico de máxima absorbancia de la cromatina, semejante a lo obtenido con el método de extracción de cromatina que se usó para el timo de ternera (figura 6). Al igual que en el método anterior, cuando estas fracciones fueron dializadas, el pico de máxima absorbancia desapareció (figura 7).

V.- Extracción y electroforesis de histonas directamente de trofozoitos y tejidos

La figura 8 muestra los resultados obtenidos con la electroforesis de los extractos ácidos obtenidos directamente de amibas y de timo de ternera (Bonner, et. al., 1980).

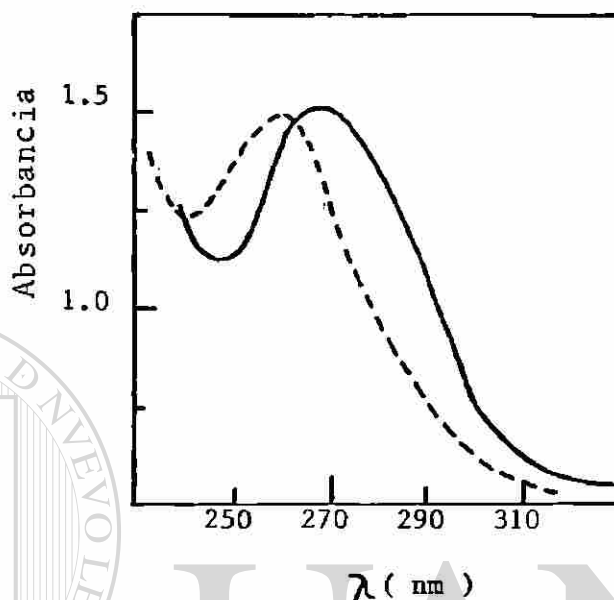
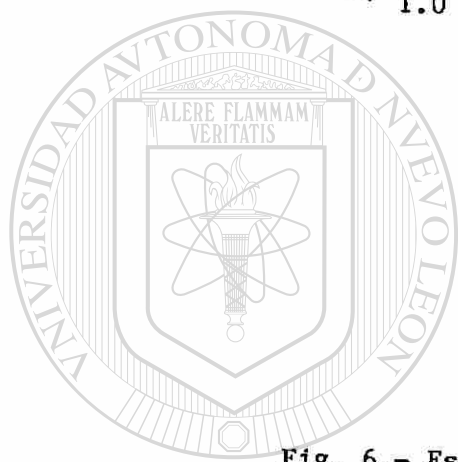
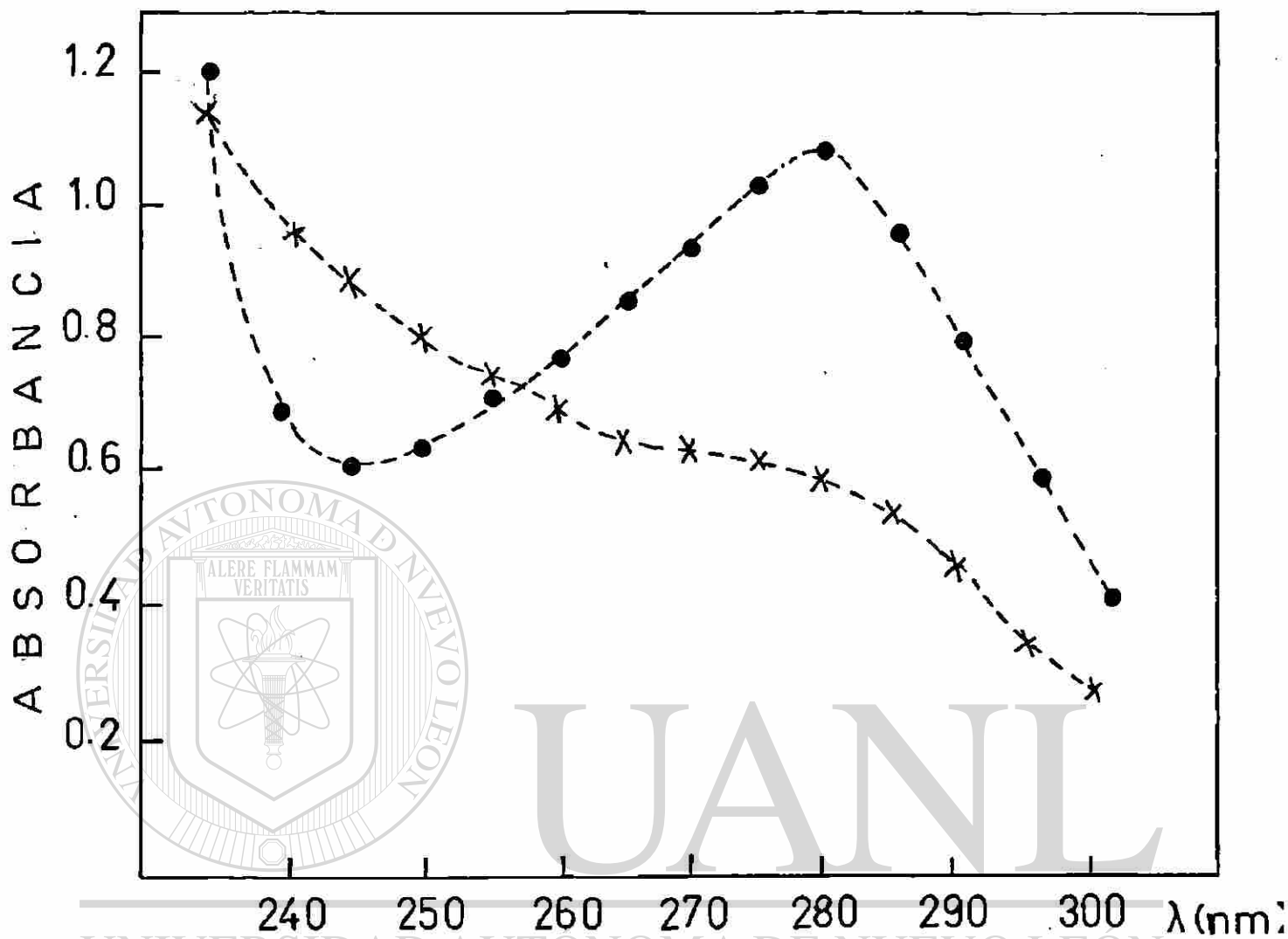


Fig. 6.- Espectro de absorción (curva continua) de

fracciones provenientes de la centrifugación en colchón de sacarosa del extracto de trofozoitos de *E. invadens* tratados con el método de extracción de cromatina para timo de ternera (Bonner, *et. al.*, 1968) y con un método basado en la extracción de la misma a partir de células en cultivo (Hancock, *et. al.*, 1968). Los espectros fueron básicamente iguales con ambos métodos. La curva discontinua representa el espectro de absorción esperado.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Fig. 7.- Espectro de absorción (●-●) de fracciones provenientes de la centrifugación en colchón de sacarosa, del extracto de trofozoitos de *E. invadens*. La curva (*-*) representa el espectro que brindaron las mismas fracciones después de ser dializadas.

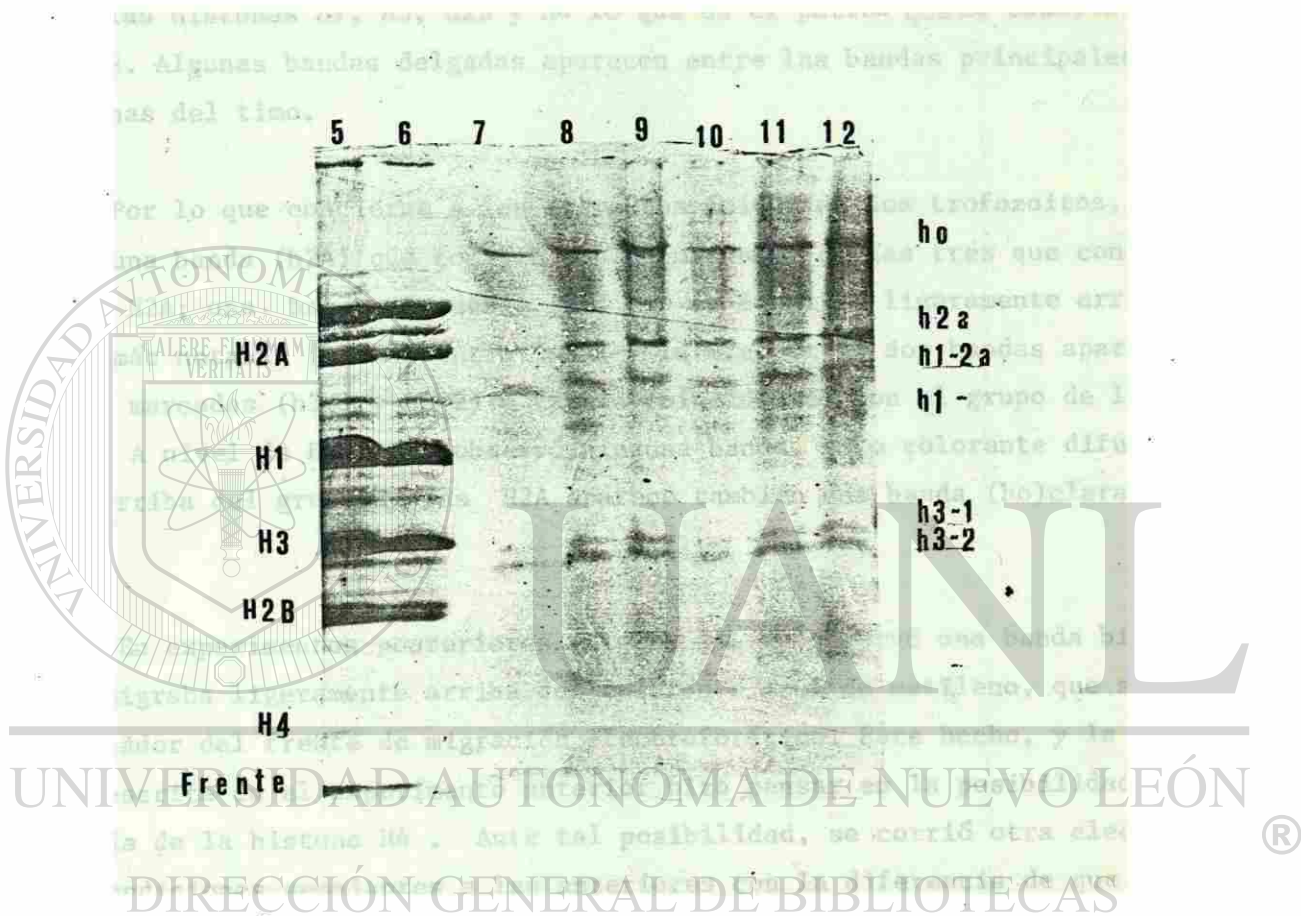


Fig. 8.- Patrones electroforéticos de histonas en gels de placa de PAA-urea-ácido acético-tritón X-100. En los carriles 5 y 6 se localizan extractos ácidos de timo de ternera. Los carriles del 7 al 12 muestran extractos ácidos amibianos. Tinción: azul de Coomassie.

Los carriles 5 y 6 muestran extractos ácidos de timo de ternera, mientras que los carriles del 7 al 12, los extractos ácidos de trofozoitos (el 7 con 50 μ l de muestra aplicada; 8, 9 y 10 con 100 μ l, y 11 y 12 con 150 μ l). Bajo estas condiciones, el grupo de las histonas H2A corre más retrasado que el resto de las mismas (véanse carriles 5 y 6), le sigue con mayor movilidad en forma sucesiva las histonas H1, H3, H2B y H4 lo que da el patrón que se observa en la figura 8. Algunas bandas delgadas aparecen entre las bandas principales de las histonas del timo.

Por lo que concierne a los extractos ácidos de los trofozoitos, éstos muestran una banda (h2A) que comigra con la más baja de las tres que conforman la zona de H2A; una banda más débil (h1) que se localizó ligeramente arriba de H1 y otra más notable (h1-2a) entre la h1 y la h2a. Otras dos bandas aparecen claramente marcadas (h3-1 y h3-2) y fueron coincidentes con el grupo de las H3 del timo. A nivel de H4 no se observó ninguna banda, solo colorante difuso. Además, por arriba del grupo de las H2A aparece también una banda (ho)claramente definida.

En experimentos posteriores (figura 9), se observó una banda bien definida que migraba ligeramente arriba del colorante azul de metileno, que se usó como indicador del frente de migración electroforético. Este hecho, y la banda difusa descrita en el experimento anterior hizo pensar en la posibilidad de la presencia de la histona H4 . Ante tal posibilidad, se corrió otra electroforesis en condiciones semejantes a las anteriores con la diferencia de que la banda del colorante azul de metileno se dejó correr justo hasta la orilla inferior del gel y que dos juegos de muestras fueron colocados en el gel. Al terminar la corrida electroforética el gel fue dividido en dos partes, cada una de las cuales llevaba un juego de muestras. Una parte fue teñida con azul brillante de Coomassie y la otra con amido negro. Los resultados de este experimento se ven en la figura 10. En la porción teñida con azul de Coomassie 10-A, las bandas ya descritas en los extractos de amibas siguen presentes, pero en la zona de H4 se ve una banda débil un tanto difusa. En el extracto de timo, sin embargo aparece una mancha apenas perceptible.

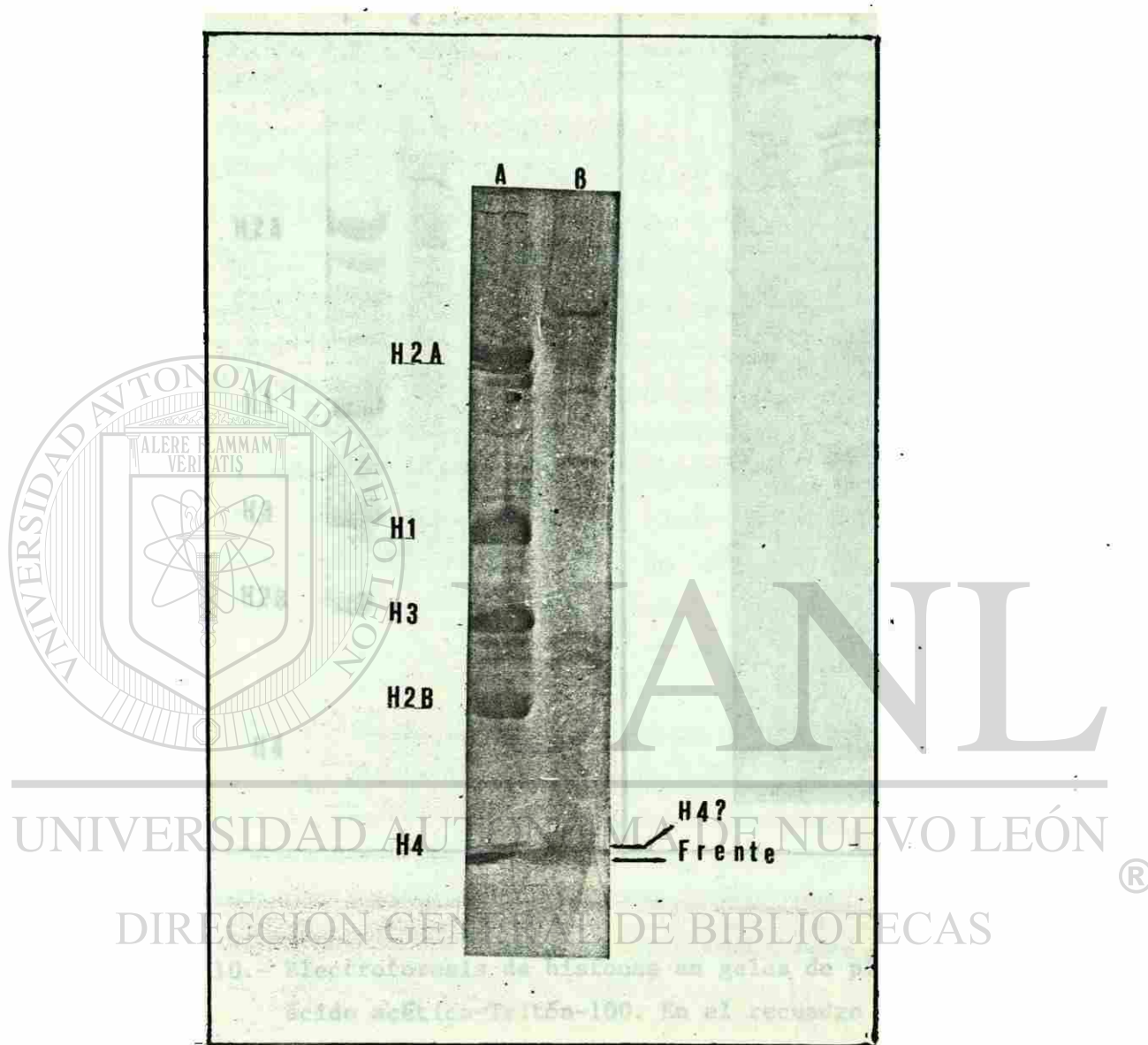
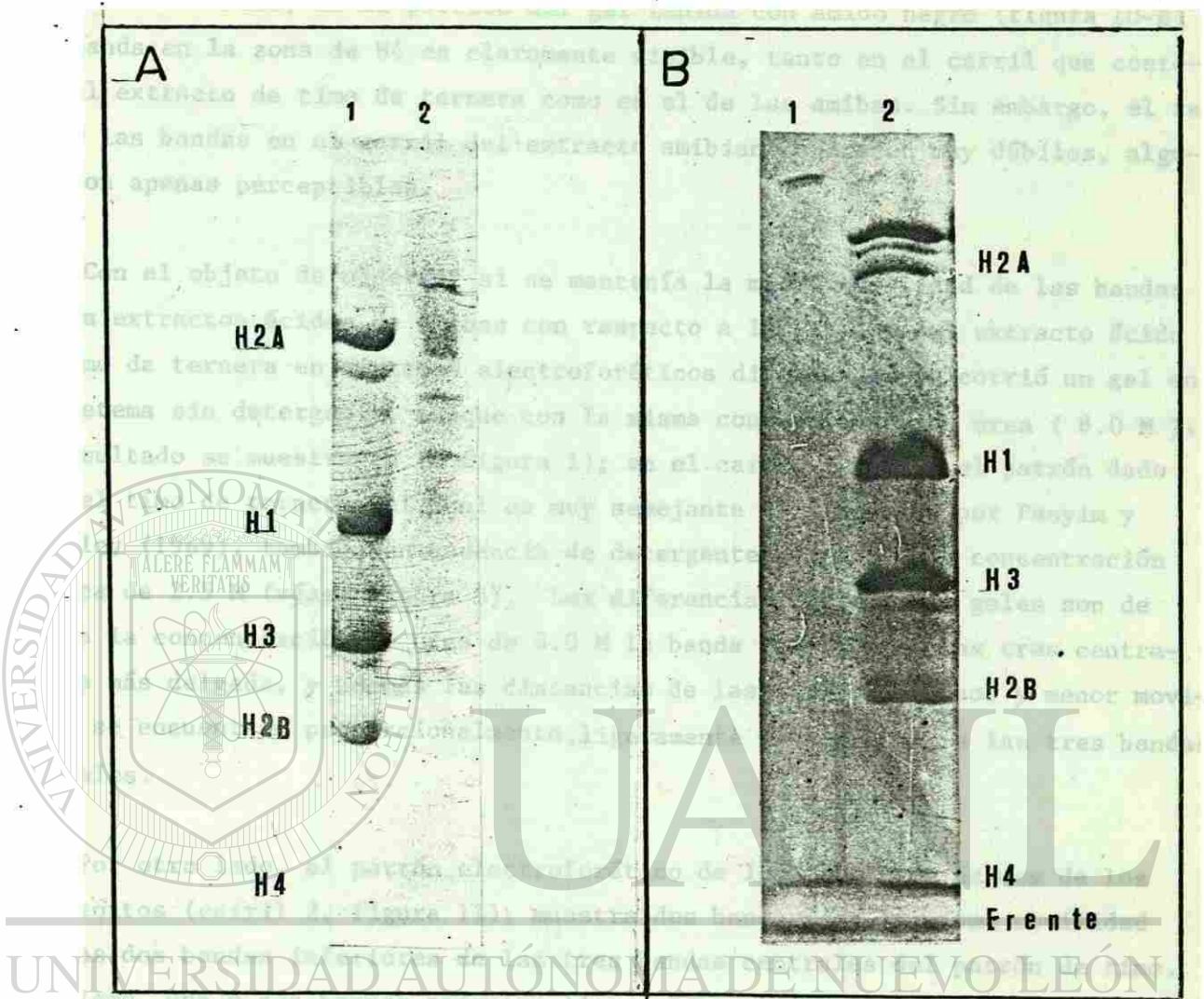


Fig. 9.- Patrones electroforéticos de histonas en geles de placa de PAA-urea-ácido acético-tritón X-100. El carril A corresponde al extracto ácido de timo de ternera y el B al extracto amibiano. -

Tinción con azul brillante de Coomassie.



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Fig. 10.- Electroforesis de histonas en geles de placa de PAA-urea-ácido acético-Tritón-100. En el recuadro A se presenta la porción de gel teñido con azul brillante de Coomassie, el carril 1 corresponde al extracto ácido de timo de ternera y el 2, al de amibas. En el recuadro B, se presenta la porción teñida con Amido negro en el carril 1 se encuentra el extracto ácido de amibas y en el 2, el de timo de ternera.

Por otro lado, en la porción del gel teñida con amido negro (figura 10-B) una banda en la zona de H4 es claramente visible, tanto en el carril que contenía el extracto de timo de ternera como en el de las amibas. Sin embargo, el resto de las bandas en el carril del extracto amibiano aparecen muy débiles, algunas son apenas perceptibles.

Con el objeto de observar si se mantenía la misma movilidad de las bandas de los extractos ácidos de amibas con respecto a las bandas del extracto ácido de timo de ternera en sistemas electroforéticos diferentes, se corrió un gel en un sistema sin detergente, aunque con la misma concentración de urea (8.0 M.), el resultado se muestra en la figura 11; en el carril 1, se ve el patrón dado para el timo de ternera, el cual es muy semejante al informado por Panyim y Chalkley (1969), también en ausencia de detergente pero con una concentración de urea de 2.5 M (véase figura 5). Las diferencias entre ambos geles son de que: a la concentración de urea de 8.0 M la banda inferior de las tres centrales es más delgada, y además las distancias de las bandas de mayor y menor movilidad se encuentran proporcionalmente, ligeramente más cercanas a las tres bandas centrales.

Por otro lado, el patrón electroforético de los extractos ácidos de los trofozoítos (carril 2, figura 11), muestra dos bandas con la misma movilidad que las dos bandas inferiores de las tres bandas centrales del patrón de timo. Así mismo, una o dos bandas aparecen ligeramente arriba de la banda de timo de menor movilidad (banda superior) y tres o cuatro bandas con aún menos movilidad. El patrón de amibas no presentó bandas correspondientes con la banda superior de las tres bandas centrales de timo de ternera ni con su banda de mayor movilidad.



Fig. 11.- Electroforesis de histonas en geles de placa de PAA-urea-ácido acético. El carril 1 corresponde al extracto ácido de tino de ternera y el 2, al extracto ácido de amibas. Teñidos con azul de Coomassie.

D I S C U S I O N

Los resultados presentados en lo que concierne al establecimiento de los cultivos de trofozoitos y su cinética de crecimiento, concuerdan con una cinética normal para cultivos en óptimas condiciones fisiológicas (López-Revilla y Rodríguez-Báez, 1981).

Por otra parte, el espectro de absorción de cromatina de timo de ternera presentado en la figura 3, es esencialmente similar a los presentados en previos trabajos de aislamiento de cromatina (Marushige y Bonner, 1966), lo que demuestra la alta pureza de ésta. Así mismo, el espectro de absorción de histonas aisladas de dicha cromatina de timo, presentó las características de absorban-
cia ya informadas para este tipo de proteínas (Bonner, et. al., 1968) con un pico de máxima entre 220-230 nm y escasa absorbancia a 280 nm. La alta pureza de estas histonas, fue confirmada por electroforesis en el sistema ya descrito; ya que los resultados brindaron un patrón esencialmente idéntico al presentado por Panyim y Chalkley (1969), para la separación electroforética de histonas de timo de ternera.

El hecho de que la cromatina extraída de timo de ternera y las histonas extraídas de ésta fueron obtenidas con una alta pureza, demuestra que la metodología usada funcionó eficientemente.

El fracaso en la obtención de la cromatina de trofozoitos mediante las técnicas usadas para el timo de ternera (Bonner, et. al., 1968) y para células en cultivo (Hancock, et. al., 1968), puede tener varias explicaciones; una de ellas es que las enzimas lisosomales hayan degradado la cromatina, a pesar de que para evitar esto fue utilizado bisulfito de sodio como inhibidor de proteasas, además de un tratamiento contra proteasas y nucleasas al material de vidrio. Pese de que este experimento se repitió al menos cuatro ocasiones en cada caso (con el método empleado en el timo de ternera y otras tantas veces con el método basado en la extracción a partir de células cultivadas), no es posible descartar definitivamente esta alternativa ya que no fueron utilizados otro tipo de inhibidores de

proteasas o nucleasas, además de que se ha informado previamente que en células amebianas, en particular Entamoeba invadens y E. histolytica hay fuertes actividades proteolíticas y nucleolíticas (Avila, et. al., 1985).

Otra explicación a la falla para la extracción de cromatina de amibas por los métodos mencionados, es que ésta guarde características diferentes a la cromatina de eucariotes superiores y se requiera de modificaciones especiales en la metodología usada para su extracción. Otra posibles alternativa, es que en estas células existan constituyentes que pueden asociarse a histonas y alterar sus propiedades. En este sentido, existen lípidos los cuales se unen a las histonas y alteran su comportamiento cromatográfico (Fazal y Cole, 1977) .

Los espectros de absorción de las fracciones de la centrifugación final en colchón de sacarosa que fueron semejantes a los de la cromatina de timo de ternera pero desplazada su máxima absorbancia hacia longitudes de onda mayores (figura 6), se explican por la presencia del detergente en los homogenados. ya que después de dializadas las fracciones, el pico de máxima desaparecía (figura 7), y el espectro de absorción del detergente solo (NP-40) fue semejante al obtenido en la figura 6 .

— Posteriormente, con objeto de extraer las histonas directamente a partir de una fracción nuclear de trofozoitos, se realizaron intentos de purificación de núcleos a base de lisis celular con detergentes no iónicos (NP-40 y Tritón® 100), pero no se obtuvo repetitividad en estas pruebas (resultados no mostrados).

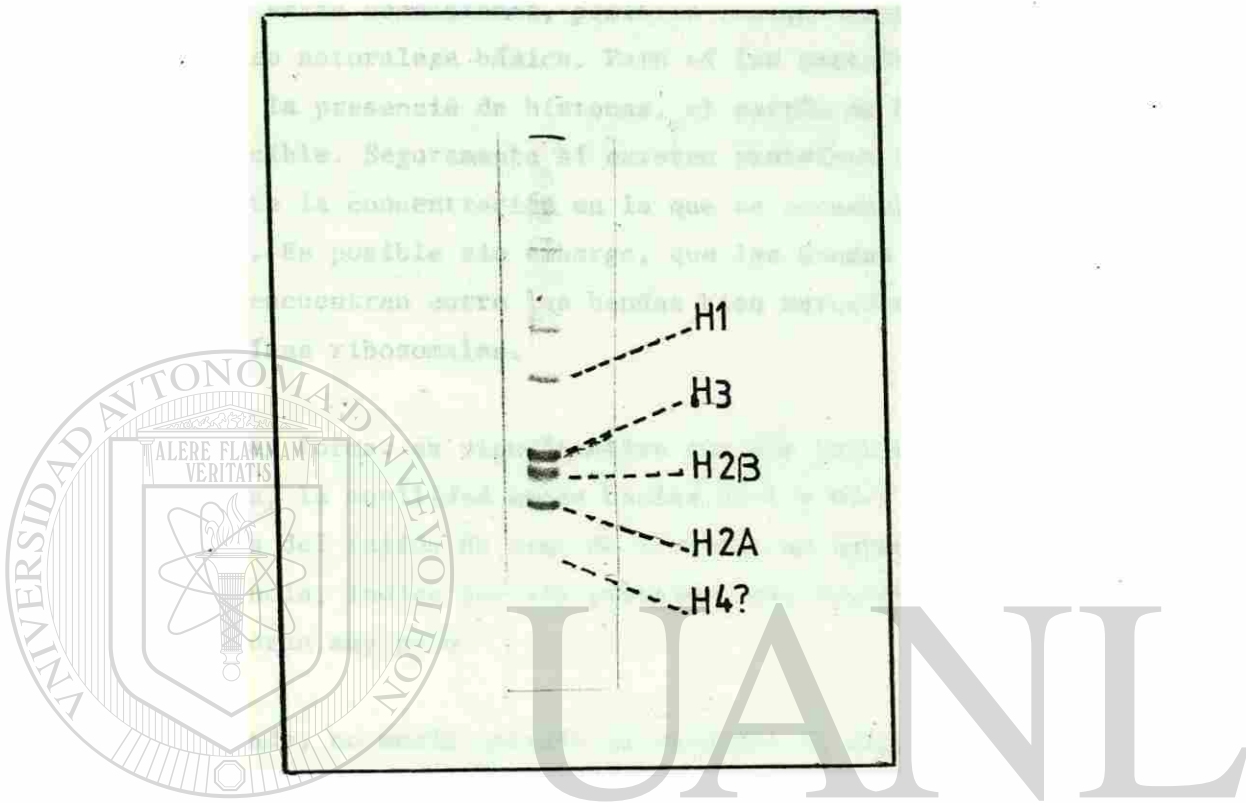
Por otra parte, la aplicación de Bonner y cols., (1980), sí dió el patrón de bandas esperado para la electroforesis de histonas de timo de ternera y la resolución de seis bandas en los extractos ácidos de amibas (figura 8). De estas seis bandas, la h2a que comigra con una de las variantes de H2A y las h3-1 y h3-2 que comigra con variantes de la H3 y la h1 que comigra ligeramente arriba de H1, sugieren la presencia de histonas en amibas. El resto de las bandas (h1-2a y h0) no presentan comigración con histonas de timo.

Posteriormente la presencia de una banda difusa (h4) que comigró con H4 de timo de ternera, fue confirmada (figura 9), al repetirse su presencia en una nueva corrida electroforética en la que el gel fue teñido con amido negro (figura 10-A), más no en el gel que fue teñido con azul de Coomassie (figura 10-B).

No conocemos la razón del porqué algunas veces la histona H4 no aparece cuando el gel se tiñe con azul brillante de Coomassie. Este fenómeno también se presentó cuando las histonas de timo de ternera fueron corridas en electroforesis con las condiciones de Panyim y Chalkley en geles de tubo (figura 12).

El hecho de que aún en sistemas electroforéticos diferentes (ausencia de tritón X-100) la movilidad de dos bandas permanezca comigrando con dos de las bandas de histonas de timo de ternera y una más permanezca ligeramente arriba de la H1 (figura 11) sugiere que las proteínas que forman estas bandas son iguales o muy semejantes. Previamente se ha informado, que la histona H1 es la que presenta más variantes entre las histonas (Lewin, 1980), y por lo tanto no se descarta la posibilidad de que la banda que se mueve ligeramente arriba de la H1 en los dos sistemas usados, sea una variante de tal histona.

En este último gel (figura 11), el patrón de histonas de timo de ternera es muy semejante al descrito por Panyim y Chalkley, sin embargo, tal patrón está dado usando una concentración de 2.5 M de urea, mientras que el que se usó en este trabajo se realizó con 8.0 M urea. Por esto es posible que aún con un patrón de bandas semejante al de Panyim y Chalkley, algunas podrían estar cambiadas de posición. De cualquier manera, la similitud de migración en el gel no es suficiente para la identificación de histonas (Fazal y Cole, 1977). Así mismo, marcadas diferencias de migración en los geles no demuestran que las histonas no son homólogas, por ejemplo, las homólogas H2A y H2B de timo de ternera y de chícharo (Pisum sativum) migran muy diferente tanto en geles de ácido acético-urea como en geles con dodecil sulfato de sodio (SDS) (Spincker e Isenberg, 1977). Sin embargo, los métodos con geles sí pueden indicar el número de histonas, y así, los extractos ácidos indican por lo menos la presencia de cuatro bandas.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Fig. 12.- Patrón electroforético de histonas de timo de

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ternera en gel cilíndrico de PAA-urea-ácido acético, de acuerdo al método de Panyim y

Chankley. Nótese la ausencia de bandas en la región de H4. La muestra usada aquí, es la misma que fue utilizada en un experimento previo en donde sí apreciación una banda para H4 (ver figura 5-A) .

El método usado aquí para determinación de la presencia de histonas, tiene el inconveniente de que cualquier proteína básica del citoplasma podría traer interferencia en los patrones electroforéticos, ya que se trata de un extracto ácido crudo. En estas condiciones, posibles contaminantes son las proteínas ribosomales dada su naturaleza básica. Pero si las proteínas ribosomales realmente enmascararan la presencia de histonas, el patrón de bandas de timo de ternera no sería reconocible. Seguramente sí existen proteínas ribosomales en el gel, pero posiblemente la concentración en la que se encuentran es muy inferior a la de las histonas. Es posible sin embargo, que las bandas delgadas poco distinguibles que se encuentran entre las bandas bien marcadas de las histonas sean debidas a proteínas ribosomales.

De cualquier forma, es significativo que aún bajo condiciones electroforéticas diferentes, la movilidad entre bandas h3-1 y h3-2 de trofozoitos con sus correspondientes del tejido de timo de ternera, se hayan mantenido igual. Esto en última instancia, indica que las proteínas que conforman estas bandas son semejantes o difieren muy poco.

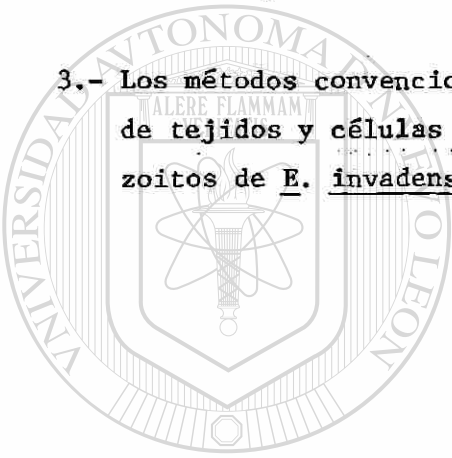
Por otro lado, no sería extraña la ausencia de algunas histonas en los trofozoitos de E. invadens, pues es conocido que en eucariotes inferiores tales como levaduras, está ausente la histona H1 (Elgin, 1975) y que en el micronúcleo del ciliado Tetrahymena no existen las histonas H3 y H1 (Gorovsky y Keevert, 1975).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CONCLUSIONES

De acuerdo al análisis de los resultados presentados en este trabajo, se concluye lo siguiente:

- 1.- Existe evidencia de la presencia de histonas en trofozoitos de Entamoeba invadens .
- 2.- Entre las posibles histonas presentes están las del grupo H2A, H1, H2B o H3 y H4.
- 3.- Los métodos convencionales para extracción de cromatina a partir de tejidos y células no son eficaces cuando se aplican a trofozoitos de E. invadens.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CONSIDERACIONES FINALES

Como pudo verse, el desarrollo de este trabajo, fue substancialmente cambiante, ya que la estrategia experimental propuesta en un principio para obtención de resultados con las amibas (ver figura 1), se vió interrumpida por el hecho de que no se pudo extraer la cromatina a partir de los trofozoitos de E. invadens. De todas formas, pudo llegarse a presentar la evidencia de la presencia de histonas en este organismo.

Creemos que una vez establecida la presencia de histonas en trofozoitos de E. invadens, una más fuerte evidencia podría llevarse a cabo mediante:

1.- El uso de anticuerpos para identificar cuáles bandas del patrón electroforético del extracto ácido de amibas cruzan inmunológicamente con histonas de timo de ternera. Esto sería posible al considerar el hecho de que las histonas son de las proteínas más conservadas.

2.- Una serie de ensayos electroforéticos de extractos ácidos de amibas, cambiando la concentración final de urea. Al respecto de ésto, se ha informado que la separación entre variantes de histonas puede facilitarse cambiando la concentración de urea en el sistema (Zweidler, 1978).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LITERATURA CITADA

- Arceci, R.J., Senger, D.R. and Gross, P.R. (1976): The programmed switching lysine rich histone synthesis at gastrulation. *Cell*. 9: 171-178.
- Avila, E.E., Sánchez-Garza, M. and Calderon, J. (1985): Entamoeba histolytica and Entamoeba invadens sulfhydryl dependent proteolytic activity. *J. Protozool.* 31(1): 163-166.
- Bonner, J., Chalkley, G.R., Dhamus, M., Fambrough, D., Fujimura, F., Huang, R.C., Hubermann, J., Jensen, R., Marushige, K., Ohlenbusch, H., Olivera, B. and Widholm, J. (1968): Isolation and characterization of chromosomal nucleoproteins. *Methods in Enzymol.* 128: 3-64 .
- Bonner, W.M., West, M.H.P. and Stedman, J.D. (1980): Two-dimensional gel analysis of histones in acid extracts of nuclei, cells, and tissues. *Eur. J. Biochem.* 109; 17-23.
- Bradbury, E.M. (1978): *Methods in cell biology*. Vol . XVI Academic Press N.Y. Chapter 10: 179-181.
-
- Bradbury, E.M., Maclean, N. and Matthews, H.R. (1981): *DNA, Chromatina and Chromosomes*. First Edition Blacwell Sci. Publications. ®
- Cameron, I.L. and Jeter, J.R. (1974): *Acidic proteins of the nucleus*. Monograph of cell Biology. Academic Press N.Y.
- Cheng, T.C. (1974): *General Parasitology*. Academic Press N.Y. Second Edition.
- Davie, J.R., Numerow, L. and Delcuve, G.P. (1986): The Non-histone chromosomal protein H2A-Specific protease, is selectively associated with nucleosome containing histone H1. *J. Biol. Chem.* 261(22); 10410-10416.

De Robertis, E.D.P. and De Robertis, E.M.F. (1980): Cell and Molecular Biology. Seventh Edition. Saunders College Edit. Phil. USA.

Diamond, L.S. (1968): Techniques of axenic cultivation of Entamoeba histolytica (Scheudin) and Entamoeba histolytica like amoeba. J. Parasitol. 54: 1047.

Elgin, S.C.R. (1975): Chromosomal proteins and Chromatin structure . Ann. Rev. Biochem. 725-774.

Elgin, S.C.R. and Hood, L.E. (1973): Chromosomal proteins of Drosophyla embryos. Biochem. 12: 4984-4992.

Fazal, M. and Cole, R.D. (1977): J. Biol. Chem. 252: 4068-4072.

Fischer, S.G. and Laemmli, U.K. (1980): Cell cycle changes in Physarum pollicepalum histone H1 phosphate; Relationship to deoxyribonuclei acid binding and chromosome condensation. Biochem. 19; 2240-2246.

Giese, A.C. (1983): Fisiología Celular y General. Quinta Edición. Editorial Interamericana.

Gorovsky, M.A. and Keevert, J.B. (1975): Subunit structure of a naturally occurring chromatin lacking histones F1 and F3. Proc. Nat. Acad. Sci. Vol. 72 (9) 3536-3540.

Hancock, R., Faber, A.J. and Fakan, S. (1968): Methods in cell Biology. Vol. XVII Academic Press. Chapter 5 pp. 35.

Isenberg, L. (1979). Histones. Ann. Rev. Biochem. 48: 159-191 .

Johns, E.W. (1978): Methods in Cell Biology. Vol. XVI Academic Press, N.Y. Chapter 11 pp. 183-203.

Karp, G. (1987): *Biología Celular*. Primera edición en español Mc-Graw Hill Publ.

Kudo, R.R. (1966): *Protozoología*. Editorial C.E.C.S.A. México, segunda edición pág. 426-427.

Levinger, L.F., Carter, Ch. W., Kumarco, K.K. and Irvin, J.L. (1978): Cross-referencing testis specific nuclear proteins by two dimensional gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 253(15); 5232-5234.

Lewin, B. (1980): *Gene Expression*. Vol. 2 (Eucaryotic chromosomes) Second Ed. John Wiley and Sons, N.Y.

López-Revilla, R. y Rodríguez-Báez, J. (1981): *Manual para cultivo axénico de Entamoeba histolytica*. editado por CONACYT México, D.F.

Marushige, K. and Bonner, J. (1966): Template properties of liver chromatin. *J. Mol. Biol.* 15: 160-174.

Murray, K. (1965): The basic proteins of cell nuclei. *Ann. Rev. Biochem.* 34: 209-246.

Nguyen Thi Man, Morris, G.E. and Cole, R.J. (1980): Two dimensional gel analysis of nuclear proteins during muscle differentiation in vitro. I.- Changes in nuclear protein content. *Exp. Cell. Res.* 126: 375-382.

Pantazis, P. and Bonner, W.M. (1981): Quantitative determination of histone modification. *J. Biol. Chem.* 256(9): 4669-4675.

Panyim, S. and Chalkley, R. (1969): High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. *Arch. of Biochem. and Biophys.* 130: 337-346.

Perry, M. and Chalkley, R. (1982): Histone acetylation increases the solubility of chromatin and occurs sequentially over most the chromatin. *J. Biol. Chem.* (13): 7336-7347.

Ruderman, J.V., Baglioni, C. and Gross, P.R. (1974): Histone mRNA and Histone synthesis during embryogenesis. *Nature* (247): 286-298.

Ruderman, J.V. and Gross, P.R. (1974): Histones and histone synthesis in sea urchin development. *Develop. Biol.* 36: 286-298.

Ruíz-Carrillo, A., Wangh, L.J. and Allfrey, V.G. (1975): Processing of newly synthesized histone molecules. *Science* 190: 177-190.

Sanders, L.A. (1974): Isolation and Characterization of the non-histone chromosomal proteins of developing avian erithroid cells. *Biochem.* 13: 527-534.

Seale, R.L. and Aronson, A.I. (1973): Chromatin associated proteins of the developing sea urchin embryo I. Acid soluble proteins. *J. Mol. Biol.* 75: 647-658.

Seyedein, S.M. and Kistler, W.S. (1979): H1 histone subfractions of mammalian testes. 2.- Organ specificity in mice and rabbits. *Biochem.* 1376-1379.

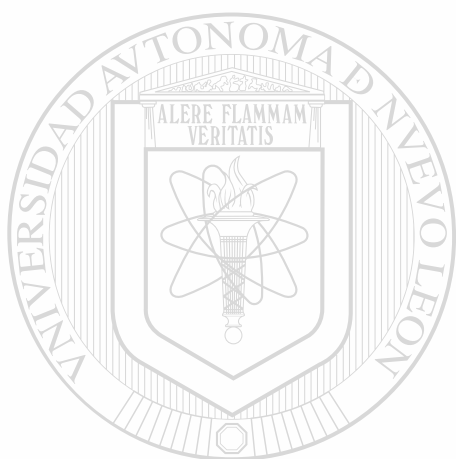
Sopina, V.A., Ivanova, S.B., Lipskaya, A.A., Bers, E.P., Vodopyanova, L.G., Afon'Kin, S.Y. and Kozlov, A.V. (1979): A study on histones in amoeba nuclei by indirect immunofluorescence method. *Exp. Cell Res.* 121: 299-306.

Spinker, S. and Isenberg, I. (1977): *Biochem.* 16: 1819-1826.

Stallwagen, R.H., Reid, B.R. and Cole, R.D. (1968): Degradation of histones during the manipulation of isolated nuclei and deoxiribonucleic protein. *Biochimica et Biophysica Acta* 155: 581-592.

Stewart, J.M. and Beck, J.S. (1967): Distribution of the DNA and the DNA-Histone antigens in the nuclei of free living and parasitic sarcomastigophora. *J. Protozool.* 14(2): 225-231.

Zweidler, A. (1978): *Methods in Cell Biology*. Vol. XVII Academic Press,
N.Y. Chapter 16: 223-233.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A P E N D I C E

Especificaciones del equipo utilizado y origen de los reactivos:

EQUIPO:

- 1.- Balanza analítica Sartorius
- 2.- Balanza granataria Ohus autotarable
- 3.- Incubadora Thelco GCA-Precisión Scientific No. 22-AF-6
- 4.- Campana de Flujo Laminar Vecco Hecho en México.
- 5.- Cámara de Newbauer mejorada, Hematocitómetro American Optical
- 6.- Centrífuga clínica Sol Bat.Mod J-12 (México)
- 7.- Licuadora de laboratorio de 2 velocidades Waring USA.
- 8.- Centrífuga refrigerada Damon IEC DPR-6060
- 9.- Centrífuga refrigerada Damon IEC B-20 y rotor No. 870
- 10.- Potenciómetro Digital Corning 109
- 11.- Homogenizador Elvehjem Potter de 50 ml de capacidad
- 12.- Plancha y agitador magnético Tehrmolyne Type 1000
- 13.- Tubos de nitrocelulosa para ultracentrifugación Beckman (50 ml)
- 14.- Ultracentrífuga Beckman Mod. L5-50E con rotor de columpio SW-41
- 15.- Centrífuga refrigerada Beckman Mod. JA-21 con rotor JA-20
- 16.- Tubo de diálisis Spectrapor. Spectrum Medical Industries INC. D1614-2 USA.
- 17.- Espectrofotómetro Carl Zeiss PMQ III
- 18.- Horno seco Robertshaw 300°C
- 19.- Liofilizadora Labconco
- 20.- Cámara de electroforesis para tubos Buchler
- 21.- Fuente poder Camag serie 730-809
- 22.- Pipetores Eppendorf de volumen fijo 10, 20 y 50 1
- 23.- Potenciómetro Digital Orion Research 1501
- 24.- Sonicador Lab.line Ultratipe Melrose P. III 60160
- 25.- Microscopio compuesto con condensador de contraste de fases binocular
Carl Zeiss
- 26.- Fotomicroscopio Binocular Carl Zeiss

- 27.- Microcentrífuga Eppendorf Mod. 5414
- 28.- Pipetor digital Eppendorf 2-10 1 No. 22 33 350-0
- 29.- Pipetor digital Eppendorf 10-100 1 No. 22 33 355-1
- 30.- Puntillas plásticas Sybron Brinkmann Cqt. No.22 35 133-8 .
- 31.- Cámara de electroforesis y equipo accesorio para geles de placa Bio-Rad
Mod. Protean 16 cm serie 16HF-9067
- 32.- Fuente poder para electroforesis Buchler 3-1500
- 33.- Película fotográfica Kodack Plus X-Pan asa 125
- 34.- Papel para impresión fotográfica Kodalith Ortho tipo 3

Origen de los reactivos:

- 1.- Baker J.T. Chemicals: Bisulfito de sodio, 2-Octanol.
- 2.- Bio-Rad: Azul brillante de Coomassie, Acrilamida, Temed (N, N,N'N'-Tetra-
metilendiamina), Persulfato de amonio, Amido negro .
- 3.- Estaman (Kodack): Bis-acrilamida .
- 4.- Mallinckrodt: urea en cristales .
- 5.- Merck: Metanol absoluto, L-cisteína, Acido ascórbico, Peptona de caseína,
Acetona y Etanol absoluto.
- 6.- Nutritional Biochemicals Corporation: Riboflavina
- 7.- Paines and Byrne Limited (England): Panmede
- 8.- Productos químicos Monterrey, S.A.: Fosfato de sodio monobásico, Fosfato
de sodio dibásico, Sacarosa, Acido sul-
fúrico, Acido clorhídrico, Hidróxido de
amonio.
- 9.- Sigma Chemical Co.: Trizma base, Tritón X-100, Nonidet P-40 (NP-40), Acril-
amida, Fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMSF), Ditiotreitól
(DTT).

