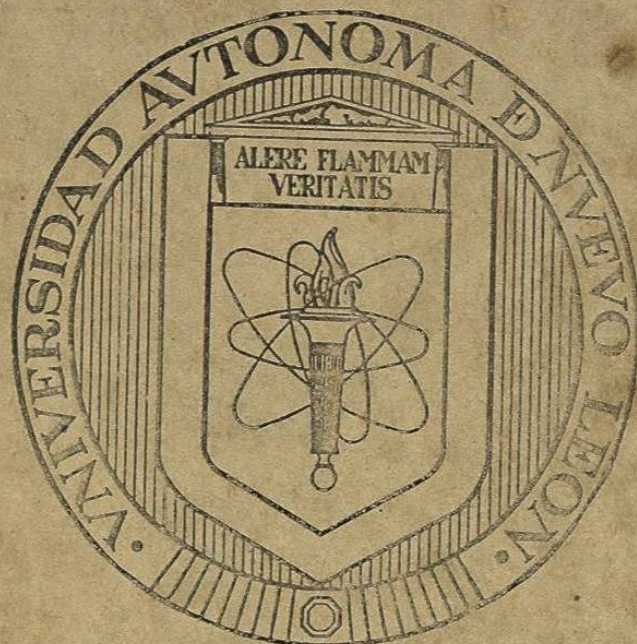


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE
RNA POLIMERASA DE LA CEPA PZ DE ENTAMOEBAS
INVADENS

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON LA ESPECIALIDAD
EN BIOLOGÍA CELULAR, POR EL O.B.P. JORGE MIGUEL-
SALDAÑA ACOSTA

MONTERREY, N.L.:

DICIEMBRE DE 1986.

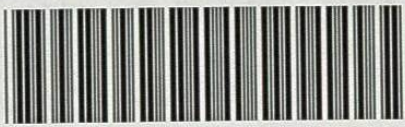
TM

Z5320

FCB

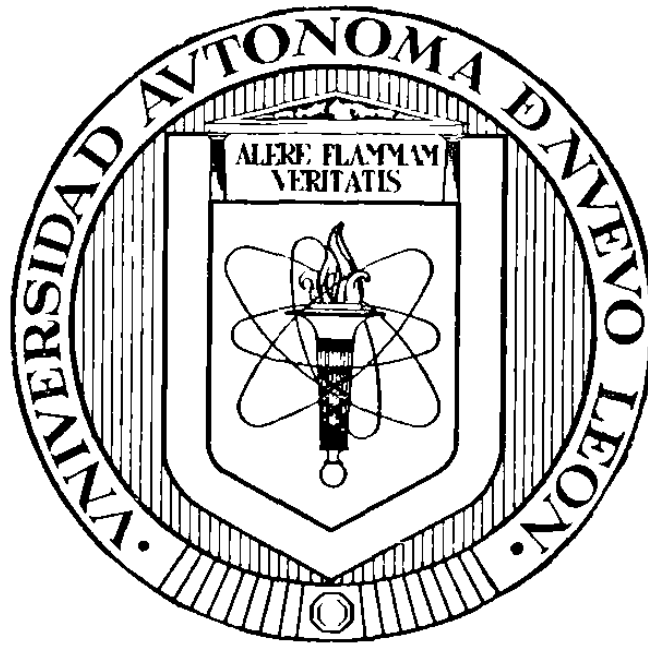
1986

S21



1020066496

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE
RNA POLIMERASA DE LA CEPA P7 DE ENTAMOEBA -
INVADENS

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON LA ESPECIALIDAD
EN BIOLOGÍA CELULAR, POR EL O.B.P: JORGE MIGUEL-
SALDAÑA ACOSTA

MONTERREY, N:L:

DICIEMBRE DE 1936.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS




Detección y Caracterización de la Actividad de RNA
polimerasa de la cepa PZ de Entamoeba invadens

Tesis

Presentada como requisito parcial para optar al
grado de Maestro en Ciencias con la especialidad
en Biología Celular. Por el QBP Jorge Miguel Saldana
Acosta

Aprobada:

Director



Dr. Salvador Said-Fernández

Secretario



Dra. Herminia Martínez de Said

Vocal



Dra. Laura Trejo Avila

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Genética Molecular y de Biología Celular, de las divisiones de Genética y Biología Celular respectivamente, de la Unidad de Investigaciones Biomédicas de Noreste. Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la asesoría de los Doctores Salvador Said Fernández y Francisco Javier Sanchez Anzaldo

A MIS PADRES:

Francisco v Petra Emilia

A MIS HERMANOS:

Pablo

Rita Patricia

Sergio Francisco

Rosa Isabel

Claudia Ana María

Ivan Amador

Luz Teresa

Juan de Dios Antonio

A MI ESPOSA:

Lizet

A MI DIRECTOR:

Dr. Salvador Sain-Fernández

INDICE:

Indice de Figuras	v
Lista de Abreviaturas.....	viii
Resumen.	x
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes Generales.....	1
2.1 Clasificación de las RNA polimerasas.....	3
2.2 Estructura Básica de las RNA polimerasas.....	4
2.3 Factores de Control de la Transcripción Génica.....	4
2.4 Pépticos reguladores asociados a la RNA polimerasa..	5
2.5 Transcripción y Diferenciación.....	8
3. Antecedentes Directos.....	9
3.1 Regulación de la expresión génica en <u>Entamoebas</u>	9
3.2 Encuistamiento de <u>Entamoebas</u> v <u>Acanthamoebas</u>	9
3.3 La RNA polimerasa de <u>Acanthamoeba castellanii</u>	10
4. Hipótesis.....	10
5. Secuencia del trabajo experimental.....	11
6. Materiales.....	12
7. Métodos.....	13
7.1 Métodos Generales.....	13
7.1.1 Cultivos bacterianos axénicos... ..	13
7.1.2 Cultivo de <u>Escherichia coli</u> ; cepa MX-384.....	13
7.1.3 Preparación del medio de cultivo CL.....	13
7.2 Método de cultivo de <u>Escherichia coli</u> , cepa MX-384.	13
7.2.1 Cultivo de la cepa de referencia <u>E. coli</u> MX-384... ..	13
7.2.2 Crecimiento de <u>E. coli</u> , MX-384.....	14
7.3 Cultivos amibianos axénicos.....	14
7.3.1 Cultivo axénico de la cepa PZ de <u>E. invadens</u>	14

7.3.2 Preparación de medio de cultivo para <u>E. invadens</u> cepa Z,	4
7.3.3 Preparación y almacenamiento del suero de caballo	5
7.3.4 Medio TPS 1	15
7.3.5 Cultivo de la cepa de referencia de <u>E. invadens</u> cepa PZ..	15
7.3.6 Preparación del amortiguador de fosfatos (PBS· Diamond 1968).	16
7.3.7 Tratamiento del material para cultivo de amibas..	16
7.3.8 Mantenimiento de la cepa de referencia.....	17
7.3.9 Propagación de la cepa amibiana...	18
7.3.10 Cosecha de amibas...	8
7.4 Método de ensayo para actividad de RNA polimerasa <u>in vitro</u>	18
7.4.1 Mezcla de ensayo completa	18
7.4.2 Composición, preparación y almacenamiento de las soluciones.	19
7.4.2.1 Amortiguador de lisis (AL) para bacterias.....	19
7.4.2.2 Amortiguador de lisis (LT) para trofozoítos..	20
7.4.2.3 Solución amortiguadora para el ensayo de la acti- vidad de RNA polimerasa (pre-mezcla: Pm)... ..	21
7.5 Líquido de centelleo	22
7.6 Obtención de extracto bacteriano crudo (Ex 1)	22
7.7 Obtención de extracto crudo amibiano	22
7.8 Obtención de la fracción nuclear (FN) amibiana cruda.....	23

Diagrama de flujo para la obtención de la fracción nuclear de <u>Entamoeba invadens</u> , cepa PZ.....	24
7.9 Ensayo de actividad de RNA polimerasa <u>in vitro</u>	25
7.9.1 Actividad de RNA polimerasa bacteriano	25
7.9.2 Actividad de RNA polimerasa amibiana.....	25
8. Resultados	29
9. Discusión.....	48
10 Conclusiones.....	53
11 Contribuciones y Perspectivas... ..	53
Bibliografía.....	56

INDICE DE FIGURAS

Figura	1.	Relación temporal de crecimiento de <u>E. coli</u> cepa MX-384.....	35
Figura	2.	Diagrama de flujo para la cuantificación de la síntesis de RNA <u>in vitro</u>	36
Figura	3.	Relación lineal entre actividad de RNA polimerasa y la cantidad de extractos totales de <u>E coli</u> , cepa MX-384.	37
Figura	4.	Relación temporal entre la actividad de RNA polimerasa de extractos totales de <u>E coli</u> , cepa MX-384 a 37°C	38
Figura	5.	Relación temporal del crecimiento de la cepa PZ de <u>Entamoeba invadens</u> en medio TPS-1.....	39
Figura	6	Relación entre la radiactividad asociada a material insoluble en ácido tricloroacético y la cantidad de extractos totales de trofozoítos de <u>E. invadens</u> , cepa PZ.....	40
Figura	7	Relación entre la cantidad de proteínas totales de una fracción nuclear subcelular amibiana enriquecida con núcleos y la incorporación de [³ H]-UTP a material insoluble en ácido tricloroacético	41
Figura	8	Relación temporal de la actividad de RNA polimerasa de <u>E. invadens</u> , cepa PZ.. .	42
Figura	9.	Relación de la concentración de [³ H]-UTP sobre la actividad de RNA polimerasa amibiana a 25°C.....	43

Figura 10.	Relación entre la temperatura y la incorporación de [3 H]-UTP a material insoluble en ácido tricloroacético por la fracción nuclear subcelular de <u>E. invadens</u> , cepa PZ.....	44
Figura 11.	Relación temporal sobre la actividad de RNA polimerasa de <u>E. invadens</u> , cepa PZ a 25°C	45
Figura 12.	Disminución de la radiactividad en el material insoluble en ácido tricloroacético por efecto de la ribonucleasa pancreática bovina.....	45
Figura 13.	Relación entre la radiactividad asociada a material insoluble en ácido tricloroacético y la cantidad de Actinomicina D.....	47

Se agradece al Dr. Salvador Said-Fernández, al Dr. Francisco Javier Sanchez Anzaldo, a la Unidad de Investigaciones Biomédicas del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social; al departamento de Medicina Nuclear del Hospital de Altas Especialidades No. 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social, a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León; al Dr. Fernando Bastarrachea Avila, al Dr. Rubén López-Revilla, al M.C. Luis J. Galan Wong, a la Dra. Herminia Martínez de Said, a la Dra. Laura Trejo, a la QFB. María de Jesús Guerra Guevara. al M.C. José Juan Segura Luna, a la Sra. Lizet Aragón de Saldaña, al Sr. Ricardo Aragón Arenas y al Sr. José Luis Paz.

Y a todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

D Ditiotreitól

E. A Etilen diaminotetraacetato de sodio

PPD 2,5-Difenil oxazol

PPDPF 2-2'-P-Fenilen bis-(5 fenil-oxazol)

Pm Solución amortiguadora para el ensayo de la actividad de RNA polimerasa

PBS Amortiguador salino de fosfatos

TP Trypticase-Panmede

TPS-1 Trypticase-Panmede-Suero

NaOH Hidróxido de Sodio

H₂O Agua

MgCl₂ Cloruro de Magnesio

K₂HPO₄ Fosfato de potasio dibásico

KH₂PO₄ Fosfato de potasio monobásico

2-M-Etol 2-Mercapto etanol

Panmede Hidrolizado de hígado

CSH Cold Spring Harbor

RESUMEN

En este trabajo se describe por primera vez un modelo experimental in vitro para analizar la actividad de RNA polimerasa de la cepa PZ de E. tanabea invadens. Además se analizó y caracterizó la actividad de RNA polimerasa de E. invadens, cepa PZ, cultivada en condiciones axénicas. Para ello se establecieron las condiciones para determinar y cuantificar la actividad de RNA polimerasa en extractos libres de trofozoítos de E. invadens. Una vez que se logró detectar actividad de RNA polimerasa en la fracción nuclear de E. invadens se determinó el efecto de los siguientes factores sobre dicha actividad: a) temperatura, b) tiempo de incubación, c) dosis de extractos amibianos y d) concentración de UTP y [³H] - UTP en la mezcla de ensayo.

La RNA polimerasa de E. invadens, cepa PZ, tiene las siguientes características: 1) es dependiente de la dosis de extracto, 2) del tiempo y 3) de la temperatura de incubación, 4) se inhibe casi totalmente por efecto de la Actinomicina D y 5) es criostable.

Las condiciones de ensayo definidas en este trabajo para RNA polimerasa de E. invadens cepa PZ, fueron las siguientes: i) temperatura de incubación 25°C; ii) tiempo de incubación máximo 10 min. iii) concentración de UTP no marcado, 0.625 mM, iv) concentración del sustrato radiactivo ([³H] - UTP 20.3 Ci/mmol) 4 µCi/100 µl y v) dosis de extracto amibiano (equivalente a la cantidad total de proteínas de la fracción nuclear) de 67.5 µg.

El uso del modelo experimental aquí descrito posiblemente permitirá incrementar el conocimiento sobre los factores que

regulan la expresión génica durante la diferenciación de E. invadens; También podría emplearse para analizar con detalle los mecanismos de control de la expresión génica durante el enquistamiento de E. invadens, que constituye un modelo de estudio de diferenciación celular relativamente simple.

1 INTRODUCCION

El proceso de transcripción génica se define como la transferencia de la información del DNA codificada como secuencia de desoxirribonucleótidos monofosfato a una secuencia complementaria de ribonucleósidos monofosfato en el RNA.

Este proceso depende básicamente de la actividad de las RNA polimerasas y su control constituye un importante paso en la modulación de la expresión génica. Lo cual, a su vez, regula directamente la síntesis de proteínas (traducción) e indirectamente todas las funciones celulares. Por ello, la transcripción génica es un sistema pleiotrópico de regulación.

2 ANTECEDENTES GENERALES

En 1955 se descubrió en extractos de Azobacter v nelandii, una enzima capaz de sintetizar RNA, la cual no requería DNA como molde. la polinucleótido fosforilasa, hasta ahora únicamente detectada en bacterias. Esta enzima no requiere DNA y puede bajo ciertas circunstancias sintetizar in vitro RNA o bajo ciertas otras degradarlo. Fue un elemento de fundamental importancia para decifrar el código genético (1-5) . En 1959 Weiss y Gladstone identificaron en hígado de rata otra enzima que sintetizaba RNA, con propiedades bioquímicas diferentes a la polinucleótido fosforilasa: la RNA polimerasa (6). En ese año Weiss encontró que las células de diversas clases y especies también poseían actividad de RNA polimerasa (7). Algunas de ellas fueron las siguientes: i) células hepáticas y de timo de ternera y cerdo, ii) células de rata obtenidas de hígado en regeneración y iii) células ascíticas de ratón. Esta primera etapa de investigación de los mecanismos de la transcripción culminó en 1960 con el hallazgo de Hurwitz, et al. quienes demostraron que la actividad de RNA polimerasa...

es dependiente de DNA 9) A part de entonces se ha obtenido una gran cantidad de información acerca de la ubicación de estas actividades enzimáticas y de su estructura y función

La actividad de RNA polimerasa dependiente de DNA es la responsable de transcribir la información genética almacenada en el DNA a una molécula de RNA (5-2)

La síntesis de RNA es un proceso muy complejo y relativamente poco conocido que consta de cuatro etapas principales i) selección y activación del sitio de iniciación en el molde ii) iniciación iii) alargamiento y iv) terminación (9,12-14); en la primera la RNA polimerasa se une al molde de DNA, localiza un sitio específico (el promotor, que sufre un cambio conformacional) en el cual puede iniciarse la transcripción (9, 15). Durante la iniciación la enzima cataliza la reacción de un ribonucleósido trifosfato púrico con otro ribonucleósido trifosfato cualquiera, originando un dinucleósido tetrafosfato (pppPupX) que permanece fuertemente unido al complejo DNA-RNA polimerasa (14, 16-18); En el alargamiento, la RNA polimerasa transcribe la secuencia de DNA insertando al dinucleósido tetrafosfato una molécula de uridina monofosfato (UMP) por cada adenosina monofosfato (AMP) localizada frente a la RNA polimerasa, una de guanosina monofosfato (GMP) por cada citidina monofosfato (CMP), una adenosina monofosfato (AMP) por cada timidina monofosfato (TMP) y una citidina monofosfato (CMP) por cada guanosina monofosfato (GMP) El polinucleótido se forma mediante enlaces fosfodiéster 3'-OH, 5'-PO₄ de los nucleótidos contiguos por efecto de la propia enzima. El final de la síntesis de RNA lo marcan secuencias específicas de terminación en el DNA llamadas terminadores, esta puede ser dependiente

del factor Rho ρ o independiente de él. (9-22)

2.1 CLASIFICACION DE LAS RNA POLIMERASAS

En 1970 Reeder y Rutter identificaron en células eucarióticas tres formas de RNA polimerasa con propiedades cromatográficas y actividades catalíticas características, a las cuales les llamaron RNA polimerasa I II y III, respectivamente (23). Estas actividades pronto se identificaron en una gran variedad de células procarióticas y eucarióticas (cf 24-31). Se han descrito funciones y propiedades específicas para cada una de las tres variedades de RNA polimerasa de las células eucarióticas: a) la RNA polimerasa I transcribe fundamentalmente RNA ribosomal (RNAr) y es resistente a altas concentraciones (1000 $\mu\text{g/ml}$) de la micotoxina conocida como alfa-amanitina, b) la RNA polimerasa II transcribe principalmente precursores de RNA mensajero (RNAm) y su actividad se inhibe casi totalmente con concentraciones bajas (2 $\mu\text{g/ml}$) de alfa-amanitina y c) la RNA polimerasa III preferentemente transcribe RNA de transferencia (RNAt) y RNAr 5S. La inhiben concentraciones intermedias (500 $\mu\text{g/ml}$) de alfa-amanitina (cf 9, 24-35). La actinomicina D y el ácido aurintricarboxílico son otros antibióticos que inhiben la transcripción a una dosis de 0.2 a 50 $\mu\text{g/ml}$ y 5 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, su acción no es directamente contra la RNA polimerasa sino que compiten con ésta por el sitio de unión del molde de DNA (14, 36-38). Algunos metales divalentes como el plomo, cadmio, cobalto y cobre también inhiben esta actividad.

2.2 ESTRUCTURA BASICA DE LAS RNA POLIMERASAS

La RNA polimerasa de las bacterias estudiadas hasta ahora es una enzima con estructura cuaternaria compleja; su peso molecular es de 500 000 U. A.; está compuesta por un núcleo y varios factores. El núcleo de RNA polimerasa de Escherichia coli está compuesto por cuatro subunidades (protómeros) dos alfa, una beta y una beta prima. La beta prima tiene un peso molecular aproximado de 60 000, de 50 000 la beta y de 40 000 cada una de las cadenas alfa (16, 39-41).

Las isoenzimas de la RNA polimerasa de los organismos eucarióticos, hasta ahora estudiados, están formadas por un número mayor de protómeros que la de los procariotes, de 5 a 17 aproximadamente (24-27, 30, 42). Todas las RNA polimerasas (procarióticas y eucarióticas) poseen dos subunidades de peso molecular alto (120 000 a 240 000) las restantes tienen un peso molecular de 10 000 a 50 000 (10, 26, 43, 44).

2.3. FACTORES DE CONTROL DE LA TRANSCRIPCION GENICA.

El funcionamiento específico de la RNA polimerasa está sujeto a un complejo mecanismo de control en el que intervienen gran cantidad de factores. Algunos de ellos son los siguientes: i) secuencias nucleotídicas específicas en el DNA hacia el extremo 5' del sitio de iniciación, que ejercen distinta acción sobre la eficiencia y/o selectividad de la transcripción (15, 45-53), además de al efecto de potenciación (enhancer) descubierto independientemente en los laboratorios de J. Banerij y P. Chambon, en 1981, y posteriormente en otros (46, 54-57); ii) unión reversible de proteínas al DNA como: las proteínas nucleares ácidas invo-

lucradas en la regulación selectiva de la transcripción génica y las histonas, proteínas básicas nucleares consideradas como inhibidores no específicos de la transcripción (45, 58-63); iii) metilación de bases nucleotídicas, principalmente citidín-monofosfato en la posición 5' y en algunos casos adenosina monofosfato en la posición 6', estimulan o inhiben la transcripción (63-65); iv) asociación de polipéptidos al núcleo de la RNA polimerasa; (12,20 66-71) se han descrito un gran número de ellos, mencionaremos algunos más adelante; v) hormonas esteroideas y no esteroideas; virtualmente todas las hormonas han sido implicadas en esta faceta de regulación incluyendo aquellas que actúan vía AMPc y GMPc, como mediadores intracelulares (15,72-77); vi) iones metálicos; cationes divalentes como Mn^{++} , Mg^{++} , Ca^{++} , Zn^{++} , que intervienen como activadores (10,36) y iones de metales pesados Pb^{++} , Cd^{++} que actúan como inhibidores o represores transcripcionales: en las secuencias de DNA humano y de ratón para metalotioneína (46,79), y en DNA de timo de ternera y del fago T-4.

2.4. PEPTIDOS REGULADORES ASOCIADOS A LA RNA POLIMERASA.

La iniciación de la transcripción en sitios específicos es indudablemente un paso clave en el control de la síntesis del RNA mensajero eucariótico; para su estudio se han desarrollado sistemas de transcripción in vitro muy diversos, éstos son más difíciles de manipular que los sistemas bacterianos porque la eficiencia de iniciación transcripcional in vitro de células eucarióticas es menor que la de las bacterias. La eficiencia transcripcional de células eucarióticas en modelos in vitro puede mejorarse

si se usan extractos celulares crudos o factores proteicos (Sp 1, Sp 2) purificados de éstos. En extractos celulares de células HeLa se encontraron factores proteicos estimuladores y/o seleccionadores de promotores durante la iniciación de la transcripción (53,59-61,79); estos factores forman complejos de pre-iniciación estables con la región promotora y aseguran una adecuada y eficiente iniciación de la transcripción, tales factores son muy diferentes a los de los procariotes.

En procariotes la actividad génica además de ser regulada el nivel de iniciación de la síntesis de RNA puede ser controlada mediante modulación de la terminación de la transcripción a través de factores protéicos (S-10, S-1, pN, Rho) (19,20,80). Uno de los factores de regulación de la actividad de la RNA polimerasa de células procarióticas es el factor sigma que tiene un peso molecular de 86 000 U.A., determina la unión específica de la enzima durante la fase de iniciación y la dirección de la síntesis del RNA durante el alargamiento (9,69,81). En Escherichia coli se identificó otro componente, el factor Rho, que parece estar implicado en el proceso de terminación ya que en su ausencia la longitud de los mensajeros sintetizados in vitro es muy variable (20,21).

En E. coli se indentificaron otros factores que promueven la iniciación de la transcripción por la holoenzima de la RNA polimerasa: i) el factor Psi (Ψ , PM 70 000) estimula la síntesis de RNAr en plantillas de DNA de E. coli, esta actividad también la presenta la Q β replicasa; ii) el factor M (PM 85 000) incrementa la frecuencia de iniciación sobre el DNA de E. coli y los factores

T4 y T7; iii) el factor Y 1 (PM 95 000) estimula la iniciación específica sobre moldes de E. coli y los fagos Lambda y T4; iv) el factor CGA (PM 45 000) provee sitios de unión para la transcripción específica de operones sensibles a represión por catabolito sobre DNA del fago recombinante 80 Lac; v) los factores H (H 1, H 2, PM 10 000) en moldes de fagos Lambda y T4 y el factor D (PM 12 000) sobre DNA de E. coli y los fagos Lambda y T7 promueven sitios de unión para la transcripción específica. El factor L (PM 150 000) estimula la transcripción por el núcleo de polimerasa sobre moldes de E. coli y del fago T4 (67,68). En Bacillus subtilis se encontraron tres péptidos (sigma 55, sigma 37 y delta 21) que se asocian al núcleo de polimerasa; el factor sigma 55 tiene una función similar a la del factor sigma de E. coli además de unirse al DNA por si solo; el factor sigma 37 actúa en forma similar al factor sigma y confiere especificidad de promotor al núcleo de polimerasa y el factor delta 21 promueve la iniciación específica entre la holoenzima (constituida por el núcleo de polimerasa E y el factor sigma 55) y los promotores en el DNA (92).

A pesar de la impresionante lista de factores asociados a la RNA polimerasa, hasta ahora no se conocen todos los factores proteicos que determinan la fidelidad y la selectividad de la transcripción génica. Los cuales, a su vez son sólo un elemento de los que depende el correcto funcionamiento de una de las funciones celulares de mayor importancia biológica: la transcripción génica.

2.5. TRANSCRIPCIÓN Y DIFERENCIACIÓN.

La función génica selectiva tiene un papel importante en la diferenciación celular. La diferenciación es la transformación de una célula en otra u otras morfológica y funcionalmente diferentes. La diferenciación puede ser considerada como un proceso en el cual la información génica pre-existente se expresa en forma diferente en células que contienen genomas idénticos, mediante una secuencia definida de activación y/o represión de genes. Por lo tanto, la diferenciación celular implica la síntesis preferencial de algunas proteínas específicas (83-87). Flickinger y cols. en 1965 encontraron un incremento en la capacidad transcripcional de la cromatina durante los diferentes estadios del desarrollo de gástrula de rana a larva (84).

Los experimentos más reveladores sobre el papel concreto de la transcripción en el desarrollo se refieren a los efectuados en ratas con hepatectomía parcial por Church y McCarty, donde encontraron evidencias de que el estado inicial de regeneración parece involucrar la reactivación de algunos genes activos en hígado embrionario pero reprimidos en el hígado adulto (87). Y los efectuados por Lauffer y cols. en 1982 con núcleos aislados de Dictyostelium discoideum, donde encontraron que aproximadamente 2 000 a 3 000 mRNA's regulados (RNAs del estado de agregación) son inducidos cuando las amibas forman agregados multicelulares. El nivel de la mayoría de estos mRNA's regulados es reducido por disgregación de las amibas y restaurado por AMPc (86).

3. ANTECEDENTES DIRECTOS.

3.1. REGULACION DE LA EXPRESION GENICA EN ENTAMOEBAS. Un modelo relativamente simple para el estudio de la regulaci3n de la expresi3n g3nica.

Los protozoarios del g3nero Entamoeba se caracterizan por tener dos estados morfol3gica y fisiol3gicamente distintos: uno m3vil, el trofozoito y otro inm3vil, el quiste. A este g3nero pertenecen pr3cticamente todas las especies de amibas que habitan en el intestino de los metazoarios (88-90).

El ciclo biol3gico del g3nero Entamoeba es relativamente sencillo, los quistes que son la forma infectiva y de resistencia se forman en la luz del intestino grueso, son expulsados con las heces. Si despu3s de cierto tiempo son ingeridos por un nuevo hu3sped, en el intestino grueso se libera una amiba metaquistica tetranucleada que finalmente se divide en ocho trofozoitos pequeños; en el proceso de enquistamiento el trofozoito pierde su movimiento pseudopodal característico originando formas redondeadas u ovaladas (los prequistes), hay una disminuci3n en la velocidad de sntesis de sus productos (RNAs) y acumulaci3n de gluc3geno. Despu3s sintetiza una pared celular y da lugar a la formaci3n del quiste. Este proceso muy probablemente esta sujeto a una transcripci3n selectiva de genes (83,90-93).

3.2. ENQUISTAMIENTO DE ENTAMOEBAS Y ACANTHAMOEBAS.

Muchas cepas de varias especies del g3nero Entamoeba se han aislado de animales infectados y actualmente pueden cultivarse ax3nicamente in vitro (94,95). Hasta hace poco tiempo s3lo en Entamoeba invadens pod3a inducirse la diferenciaci3n celular in vitro.

Peró recientemente Said-Fernandez et al. descubrieron un método para incucir la iniciación del enquistamiento in vitro de Entamoeba histolytica (96-99).

Hasta ahora se conoce muy poco sobre la actividad de RNA polimerasa de las especies del género Entamoeba; sin embargo, esta actividad esta bien caracterizada en Acanthamoeba castellanii, un protozoario que pertenece al mismo orden de la especie amibiana que fué utilizada como modelo (27,32,33,42,100, 101).

3.3 LA RNA POLIMERASA DE ACANTHAMOEBA CASTELLANII.

En Acanthamoeba castellanii como en todas las células eu-
carióticas estudiadas hasta ahora, se han identificado tres tipos de RNA polimerasa: a) la I, con un peso molecular de 515 000 U.A., consta de 10 subunidades cuyos pesos moleculares varían entre 10 000 y 185 000 U.A.; sintetiza principalmente RNAr, en una mezcla de reacción regulada a pH 7.9. Es resistente a 1 mg/ml de alfa-amanitina (27); b) la RNA polimerasa II, pesa 530 000 U.A., consta de 12 subunidades de 10 000 a 193 000 U.A. y sintetiza preferentemente RNAm (42); c) finalmente la RNA polimerasa III con un peso molecular de 630 000 U.A. consta de 17 subunidades, cuyo peso varía entre 12 000 y 169 000 U.A., sintetiza básicamente RNAt (32). Todas ellas se han purificado en columnas de intercambio ionico (27,42,100,101).

4. HIPOTESIS

La actividad de RNA polimerasa se ha encontrado en todas las células donde se ha buscado, incluyendo el protozoario Acanthamoeba castellanii, cuyo orden Amoebida, es común al género

Entamoeba (4,24,25,27,32,33,42,88,100). Análogamente al diseñar este proyecto se esperaba encontrar y caracterizar la actividad de RNA polimerasa en extractos libres de trofozoítos de Entamoeba invadens.

5. SECUENCIA DEL TRABAJO EXPERIMENTAL.

El trabajo experimental se desarrolló en dos etapas. Durante la primera se establecieron las condiciones para detectar y cuantificar la actividad de RNA polimerasa en extractos libres de trofozoítos de E. invadens, fue necesario adoptar y optimizar la mezcla de ensayo de A. castellanii (27,32,33) donde se consiguió determinar la actividad de esta enzima. Una vez que se logró detectar actividad de RNA polimerasa en la fracción nuclear de E. invadens se inició la segunda etapa del proyecto que consistió en la caracterización de la actividad enzimática analizando el efecto de los siguientes factores sobre la incorporación de [³H]-UTP: a) temperatura, b) tiempo de incubación c) dosis de extractos amibianos y concentración de los siguientes componentes de la mezcla de ensayo, d) concentración de sustrato específico UTP y e) concentración de [³H]-UTP que contiene el radioisótopo marcador; además de pruebas de especificidad como el efecto de la concentración de RNAasa exogena y Actinomicina D sobre la incorporación de [³H]-UTP.

6. MATERIALES.

A) REACTIVOS.

Los siguientes reactivos procedían de 1) sigma Chemical Company (Saint Louis, Missouri, E.U.A.): Trisma-base, Sacarosa, Seroalbúmina bovina (fracción V), Lisozima de clara de huevo, Acido Desoxirribonucleico de timo de ternera, dextrosa, $\frac{1}{2}$ Mercapto etanol (2-M-Etol), Ditiotrei-tol (DTT); 2) de Productos Químicos Monterrey S.A. (Nuevo León, México): Cloruro de sodio, Desoxicolato de sodio, Cloruro de potasio, Metanol, Acido clorhídrico, Acido tricloroacético, Hidróxido de sodio; 3) de Harleco S.A. (México, D.F.): Dextrano, Etilenglicol, Etilen-diamino-tetra-acetato de sodio, Fosfato de potasio monobásico; 4) De Merck, S.A. (México, D.F.) Extrán líquido, cloruro de magnesio, Floruro de sodio, 2,2-p-fenilen Bis-(5-feniloxazol) para mediciones de centelleo (POPOP), Cisteína, Fosfato de potasio dibásico, Ribonucleasa pancreática bovina, Actinomicina D; 5) de Packard Co. (Illinois, E.U.A.) 2,5-Difeniloxazol (PPD) grado centelleo; 6) De Fisher Scientific Company (New Jersey, E.U.A.) Naftaleno; 7) De Calbiochem Co. (San Diego, Cal. E.U.A.): Guanidintrifosfato (GTP) Adenosintrifosfato (ATP), Citidintrifosfato (CTP), Uridintrifosfato (UTP); 8) New England Nuclear Company (Boston, Massachusetts E.U.A.) Uridintrifosfato con tritio [^3H]-UTP 20.3 Ci/mol); 9) Paines and Byrne Limited (Greenford, Inglaterra): Panmede; 10) Biofluids Co. U.S.A.: Suero de caballo.

7. METODOS

7.1. METODOS GENERALES.

7.1.1. Cultivos bacterianos axénicos

Se utilizó la cepa MX-384 de E. coli que caracterizó y donó a nuestro cepario el Dr. Fernando Bastarrachea Avila del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Esta cepa deriva de la cepa CSH-41 de E. coli de la colección Cold Spring Harbor.

7.1.2. Cultivo de Escherichia coli cepa MX-384.

Para cultivar axénicamente a las bacterias se empleó caldo Luria (CL), cuya composición para 1 000 ml fue la siguiente: Bactotripton 10.0 g; Extracto de levadura 5.0 g; Cloruro de sodio 0.5 g; Hidróxido de sodio 1 N 2 ml y glucosa al 20% 10 ml.

7.1.3. Preparación del medio de cultivo CL.

Se disolvieron los componentes en 980 ml de agua tridestilada y se ajustó el pH de la solución a 7.0 con NaOH 1 N; se distribuyó en matraces de 500 ml en Erlenmeyers de 100 ml con tapones de algodón y gasa, se esterilizó en el autoclave a 121°C por 15 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadieron 10 ml de glucosa esterilizada por filtración (Filtros Millipore de 0.22 μ m de poro) a cada matraz.

7.2 METODO DE CULTIVO DE ESCHERICHIA COLI CEPA MX-384.

7.2.1. Cultivo de la cepa de referencia E. coli MX-384.

Un matraz Erlen Meyer de 250 ml, con 50 ml de CL, fue inoculado con una asada de E. coli cepa MX-384 y crecido toda la noche a 31°C con agitación rotatoria de 300 rpm.

7.2.2. Crecimiento de E. coli cepa MX-384.

Con 2 ml del cultivo inducido se sembró un matraz Erlenmeyer de 500 ml, con 100 ml de CL estéril. Con ello se obtuvo una dilución del inóculo de 1:50. Enseguida se determinó la densidad óptica de la suspensión en un colorímetro Klett-Summerson a 450 nm. Esta determinación correspondió al tiempo cero del cultivo, el cual se incubó a 31°C con agitación rotatoria de 300 rpm. Se tomó nuevamente la densidad óptica del cultivo a tiempos variables para determinar su crecimiento (Fig. 9).

7.3. Cultivos Axénicos Axénicos.

Se emplearon cultivos axénicos de trofozoítos de la cepa PZ de Entamoeba invadens, donada por el Dr. Rubén López-Revilla del centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, departamento de Biología Celular.

7.3.1. Cultivo axénico de la cepa PZ de E. invadens.

Para cultivar la cepa PZ de E. invadens se empleó el medio de crecimiento TPS-9, descrito por Diamond (1968), del que se eliminó la mezcla vitamínica de acuerdo a la modificación de López-Revilla y Rodríguez-Báez (1981).

7.3.2. Preparación del medio de cultivo para E. invadens, cepa PZ.

7.3.2.1. Medio basal (TP).

Triptoná o Peptona de caseína 5.0 g; Panmeda 10.0 g; D (4) glucosa 2.5 g; L-Cisteína 0.5 g; ácido ascórbico 0.1 g; cloruro de sodio 2.5 g; fosfato de potasio monobásico 0.3 g; fosfato de potasio dibásico 0.5 g. Se disolvieron los componentes en 50 ml de agua tridestilada caliente; se centrifugó la solución en tubos

cónicos graduados de 50 ml con tapón de rosca a 230 x g por 15 min a 4°C. Se descartó el precipitado y se ajustó el pH de la solución sobrenadante a 7.0 con hidróxido de sodio 10 N y se aforó a 500 ml con agua tridestilada estéril. Con esta solución se sirvieron: a) 11 ml en tubos para cultivo de 16 x 125 mm, de borosilicato, con tapón de rosca (Corning), b) 50 ml en botellas de 60 ml para cultivo de células (Bellco), con tapón de rosca o c) 1 500 ml en frascos para agitación magnética de 2 000 ml de capacidad total ("Spinner", Bellco), se esterilizaron en el autoclave a 121°C por 15 min y se almacenaron a 26°C hasta su uso por no más de dos semanas.

7.3.3. Preparación y almacenamiento del suero de caballo.

El suero de caballo congelado en frascos de 500 ml con tapón de rosca, se sumergió en baño de agua (BA) a 36°C hasta descongelarse, enseguida se calentó a 56°C por 30 min en BA, se secaron las botellas por fuera y se distribuyó el suero en alícuotas de 10 ml en tubos estériles de borosilicato de 16 x 100 mm, con tapón de rosca (Corning). Se incubaron las alícuotas a 37°C por 5 días para comprobar su esterilidad y después se almacenaron a -20°C hasta su uso.

7.3.4. Medio TPS-1.

El medio completo TPS-1 se preparó hasta el momento de emplearse. Se añadió asepticamente suero de caballo al medio basal TP a una concentración final de 9.1% (V/V).

7.3.5. Cultivo de la cepa de referencia E. invadens, PZ.

En 3 tubos para cultivo de 16 x 125 mm, de borosilicato, con tapón de rosca (Corning) con 11 ml de TPS-1 se inocularon en for-

na estéril 1 000 unidades/ml y se incubaron a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por nueve días; al término de éstos, de las mejores se hizo una nueva pesada en bruto

7.8.6. Preparación del amortiguador de fosfatos (PBS; Diamond 1968) a 1

Componentes: Cloruro de sodio 6.5g; fosfato de potasio diésico básico 2.9 g; fosfato de potasio monobásico 0.5 g. Se mezclaron y disolvieron los componentes en agua tridestilada; se ajustó el pH a 7.4-7.5 con NaOH a N y se aforó la solución en litros. Se distribuyó el PBS en botellas de dilución de leche (de borosilicato, Corning) con tapón de rosca en cáscotas de 100 ml. Las botellas con PBS se esterilizaron a 121°C por 15 min y se almacenaron a 4°C .

7.8.7. Tratamiento del material para cultivo de amebas

El lavado de la cristalería para evitar los contaminantes pasivos á) enjuague por 2 min en una solución comercial de hipoclorito de sodio diluida al 1% en agua corriente; b) tallado con escobillón; c) cuatro enjuagues con agua corriente; d) enjuague por 2 min en ácido clorhídrico al 1% y tallado con escobillón; e) siete enjuagues con agua corriente; f) tres enjuagues con agua destilada; g) secado a temperatura ambiente colocando el material boca abajo en canastillas metálicas; los tubos y las botellas ya secas, con los cuellos y bocas de las últimas cubiertas con hojas dobles de papel aluminio y se hermearon a -200°C por 2 h y se almacenaron en gavetas cerradas.

Las pipetas serológicas cortas (Balice) y las pipetas Pasteur se lavaron de la siguiente manera: a) remojo en Extran

líquido al 1% por 12 h; b) enjuague en lavador de pipetas (Sifón) por 30 min; c) remojo en mezcla crómica por 12 h; d) enjuague en sifón por 9 h; e) dos enjuagues por inmersión en agua destilada. Las pipetas se secaron en el horno a 200°C por 60 min, colocadas con la punta hacia arriba en canastillas metálicas, se envolvieron en papel aluminio y se esterilizaron en el autoclave; después se llevaron al horno a 200°C por 4 h.

Los tapones de los tubos se lavaron en Extrán líquido al 1% por 12 h, enjuague en agua corriente, remojo en ácido clorhídrico al 1% por 12 h, lavado con estobiflón, enjuague por siete veces con agua de la llave y tres veces con agua destilada. Estos se dejaron escurrir para secarlos.

Los bulbos para pipetas serológicas y para pipetas Pasteur se esterilizaron 15 min a 121°C en frascos de vidrio con boca ancha y tapa de pesca. Los bulbos contaminados con material biológico se esterilizaron con autoclave por 20 min, después de lavarlos como los tapones.

9.2.8: Mantenimiento de la cepa de referencia $^{\circ}\text{C}$

La cepa de referencia se mantuvo resuspendiendo 10^6 células/ml en tres tubos diferentes por vez, e inoculando los cultivos a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por nueve días, al término de éstos se observaron los cultivos con un microscopio invertido para comprobar su morfología y movilidad. El mejor de éstos fue empleado para la siguiente resiembra. Se conservaron los tubos de la última resiembra hasta comprobar el crecimiento de los trófozoítos y la ausencia de contaminación en los cultivos recién sembrados.

7.3.9. Propagación de la cepa amibiana.

Cuando se requirieron cultivos masivos (para el "Spinner"), estos se iniciaron a partir de un tubo de referencia con 1.5×10^6 amibas/ml, para tener mayor rendimiento de material para los ensayos (fracción nuclear).

7.3.10. Cosecha de amibas.

Esta se efectuó mediante enfriamiento de los cultivos en agua-hielo por 10 min y centrifugación a 600 rpm por 15 min a 4°C ; se desechó el sobrenadante y se obtuvo una pastilla de amibas, esta pastilla se lavó dos veces con PBS repitiendo la centrifugación a 600 rpm por 15 min a 4°C . Las amibas lavadas fueron utilizadas de inmediato.

7.4. Método de ensayo para actividad de RNA polimerasa in vitro.

Se utilizó básicamente el método de Spindler, et.al. (1978). El volumen final de las mezclas de ensayo fue de 100 μl .

7.4.1. Mezcla de ensayo completa.

Cada mezcla contenía: Tris-HCl 50 mM (pH 7.9 a 30°C); 2 mg/ml de seroalbúmina bovina (fracción V); 2-mercapto-etanol 4.0 mM; MgCl_2 1.67 mM; NaF 6.25 mM; ATP, GTP, CTP 0.625 mM respectivamente; UTP 0.048 mM; DNA de timo de ternera 0.33 mg/ml y [^3H]-UTP 1 μCi . El orden de adición de los componentes de las mezclas de ensayo fue el mismo antes descrito.

Se describe enseguida el método detallado de preparación de las soluciones, las cuales requirieron procesos de esterilización y almacenamiento diferentes, a fin de conservarlas por tiempos largos.

7.4.2. Composición, preparación y almacenamiento de las soluciones.

Estas son mezclas complejas de reactivos, muchos de los cuales son termolábiles y se precipitan cuando se esterilizan en autoclave, mezclados con otros; por ello se elaboraron las soluciones madre por separado y con ellas las soluciones de trabajo. Se almacenó independientemente cada reactivo y las mezclas de trabajo se prepararon inmediatamente antes de cada experimento. Cada uno de los reactivos fueron disueltos en agua tridestilada estéril y se distribuyeron en tubos de borosilicato con tapón de rosca de 13 x 100 mm, en alícuotas de 2 ml, se esterizaron por calor húmedo, los reactivos termoestables y por filtración los termolábiles. Para esto último se emplearon membranas (Millipore Corporation Bedford, Ma, E.U.A.) de 2.5 cm de diámetro y poros de 0.22 μ m. Los tubos se almacenaron a -20°C individualmente, con el nombre de la solución, concentración y fecha de elaboración respectivos. La concentración de las soluciones madre se indicó con un número seguido de una X (p.e., 10 X significa que la concentración de una solución dada era diez veces mayor que la concentración final de trabajo 1 X).

7.4.2.1. Amortiguador de lisis (AL) para bacterias.

Se integró con las soluciones 1 a 3, las cuales se adicionaron secuencialmente a la pastilla celular de los cultivos de E. coli cepa MX-384.

Solución 1

Se formó mezclando las soluciones 1A, 1B, 1C y agua tridestilada estéril, en proporciones de 1:5:1:3,0

Solución 1A: Frizma base 0.1 M pH 7.9 ($01.24 \text{ g}/100 \text{ ml}$) esterilizada en autoclave; solución 1B: Sacarosa $50 \text{ g}/100 \text{ ml}$ esterilizada por filtración; solución 1G: Cloruro de sodio 4.0 M ($5.84 \text{ g}/100 \text{ ml}$) esterilizada en autoclave

Solución 2

Resultado de la mezcla de las soluciones 2A; 2B; 2C y agua tridestilada estéril: 6:5:1:6:40

Solución 2A: Frizma base 3.0 mM ($36.33 \text{ g}/100 \text{ ml}$) esterilizada en autoclave; solución 2B: EDTA 0.5 mM ($19.62 \text{ g}/100 \text{ ml}$) esterilizada en autoclave; solución 2C: Lisozima de clara de huevo, 40 mg/ml esterilizada por filtración.

Solución 3

Se mezclaron las soluciones 3A; 3B; 3C y agua tridestilada estéril: 2:2:1:5.

Solución 3A: Cloruro de sodio 5.0 M ($29.3 \text{ g}/100 \text{ ml}$) esterilizada en autoclave; solución 3B: EDTA 0.01 M ($3.72 \text{ g}/100 \text{ ml}$) esterilizada en autoclave; solución 3C: Desoxicélato de sodio 0.8% ($33.16 \text{ g}/100 \text{ ml}$) esterilizada por autoclave

1.4.2.2. amortiguador de lisis (LT) para trofozoítos.

Se mezclaron las soluciones 3C y 3y inmediatamente antes de usarse para preparar la solución de trabajo 0 KC

Solución 4

Resultado de la mezcla de las soluciones 4A a 4E y 3C en las siguientes proporciones (1:1:2:4:0:4). Solución 4A: Frizma base 0.1 M ($12.1 \text{ g}/100 \text{ ml}$) esterilizada en autoclave; solución 4B: Cloruro de potasio 0.25 M ($6.86 \text{ g}/100 \text{ ml}$) esterilizada en autoclave; solución 4C: Fenil-metano-sulfonil-borato (FMSF) 15.0 mM

017.42 mg/100 ml) esterilizada por filtración; solución 4D: EDTA 0.5 M (58.61 mg/100 ml) esterilizada en autoclave; solución 4E: Glicerol 50% (V/V) esterilizada en autoclave; solución 4F: DTT 0.1 M (77.12 mg/100 ml) esterilizada en autoclave.

3.4.2.3. Solución amortiguadora para el ensayo de la actividad de RNA polimerasa (pre-mezcla: PM) 1

Se compuso de las soluciones 5 a 12 las cuales se mezclaron inmediatamente antes de usarse para preparar la solución de trabajo X.

Proporción de las soluciones en la pre-mezcla: 1 vol. de cada una de las soluciones 5 a 12 y 8 vol. de agua tridestilada estéril.

Solución 5: Triznabasa 0.1 M (18.61 g/100 ml) pH 7.5. Repartida en alícuotas de 2 ml y esterilizada en autoclave; solución 6: Beroalbúmina bovina (fracción V) 40 mg/ml (4.0 g/100 ml) esterilizada por filtración y repartida en alícuotas de 1 ml; solución 7: 2-mercapto-etanol 0.08 M (5.6 ml/100 ml) repartida en alícuotas de 2 ml y esterilizada en autoclave; solución 8: Cloruro de magnesio 0.0334 M (63.18 g/100 ml) repartida en alícuotas de 2 ml y esterilizada en autoclave; solución 9: Cloruro de sodio 0.125 M (0.525 g/100 ml) repartida en alícuotas de 2 ml y esterilizada en autoclave; solución 10: GTP 0.0125 M (0.74 g/100 ml), CTP 0.0125 M (0.70 g/100 ml), ATP 0.0125 M (0.76 g/100 ml). Esterilizados por filtración y repartidos en alícuotas de 100 μ l; solución 11: Ácidos desoxirribonucleicos (DNA) de timo de ternera 6.8 mg/ml (0.68 g/100 ml), disuelto en agua tridestila-

da estéril y almacenada en recipientes estériles, en alícuotas de 200 μ l; solución 12: [3 H]-UTP 20 μ Ci (200 μ B/ml). Preparado con agua tridestilada estéril en condiciones estériles y repartido en alícuotas de 200 μ l.

7.5 Líquido de centellas de Bray.

Se preparó mezclando los siguientes reactivos en el orden de aparición respectivo: 1-4 dioxano 300 ml; metanol 100 ml; etilenglicol 20 ml; PPO 4.0 g/l; POPOR 0.2 g/l; naftaleno 50.0 g/l. Una vez disueltos completamente se aforsó la mezcla a 1 litro con 1-4 dioxano y se conservó a temperatura ambiente en un recipiente obscuro.

7.6 Obtención de extracto bacteriano crudo (Ex 1).

El cultivo en fase estacionaria se congeló rápidamente en hielo seco-etanol y se descongeló a chorro de agua, la pastilla bacteriana fue cosechada por centrifugación a $17\ 000 \times g$ por 10 min; ésta fue lizada (0.5 ml) por la adición secuencial de las soluciones siguientes: 1 ml de solución 1, a 0°C por 15 min; 0.25 ml de solución 2, a 0°C por 5 min y 1.25 ml de solución 3, a 10°C por 10 min. De este extracto se tomaron 200 μ l para cuantificar proteínas por el método de Lowry, et al (1951), el resto de la muestra se mezcló con un volumen de glicerol al 25% se distribuyó en alícuotas de 300 μ l. Se conservó a -70°C hasta su uso.

7.7. Obtención de extracto crudo ambiente.

Para la obtención de los extractos totales (ET) se prepararon cultivos ambientales y se cosecharon por centrifugación. A una pastilla de amibas lavada, se le añadieron dos volúmenes de amortiguador de lisis LT. Mediante un homogenizador de cristal

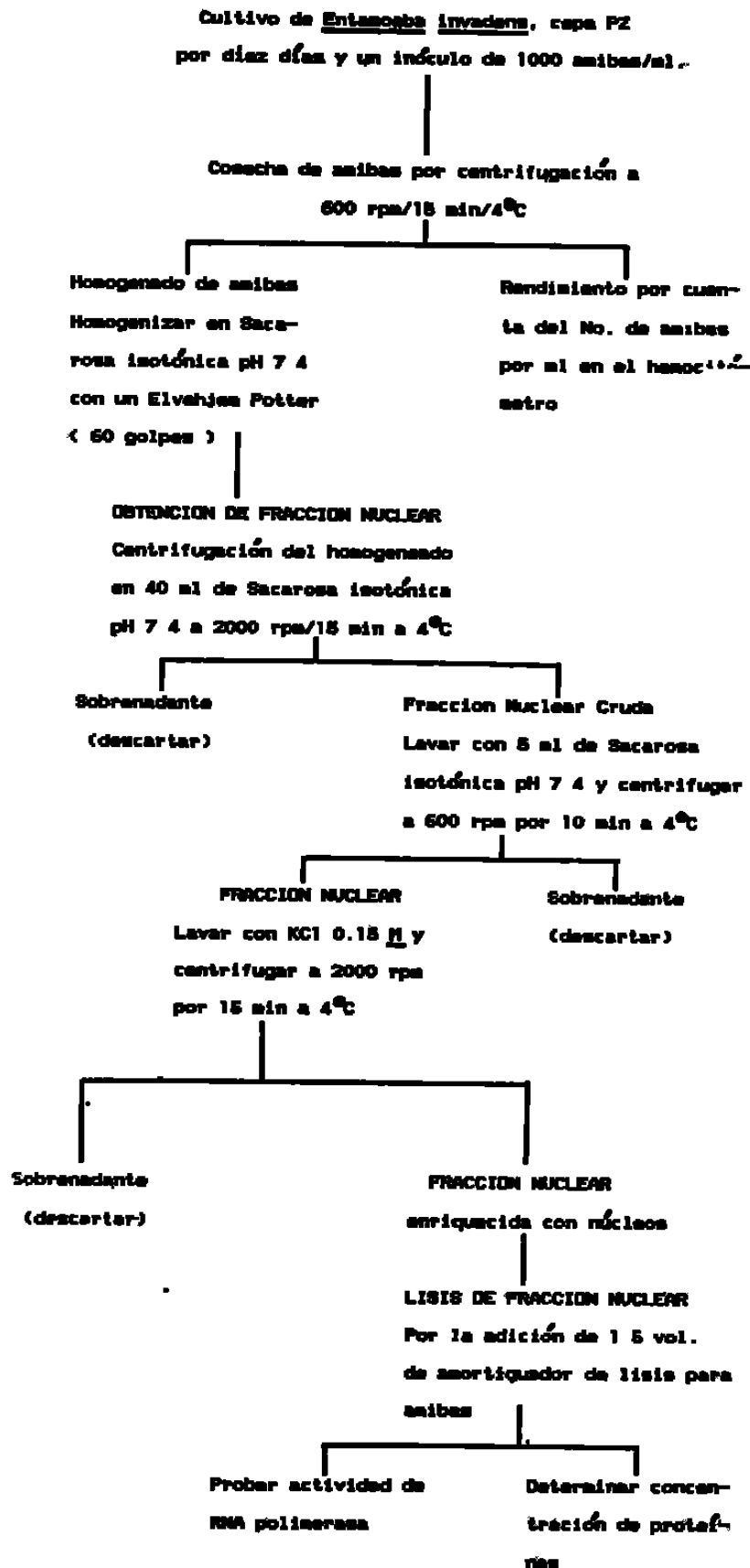
con émbolo de teflon Elven:em-potter accionado con motor a 1 000 rpm. se homogenizó con 40 golpes De este homogenado se hicieron observaciones directamente al microscopio en contraste de fases o en campo claro de preparaciones teñidas con cristal violeta para descartar la posibilidad de contaminación con otros microorganismos

El extracto obtenido se conservó en alícuotas de 500 µl a -70°C y una extra de 200 µl para cuantificar su contenido proteico por el método de Lowry, et al. (1951).

7.8. Obtención de la fracción nuclear (FN) amibiana cruda.

Para la purificación parcial de los núcleos de trofozoítos se cosecharon las amibas, se homogenizaron en dos volúmenes de sacarosa isotónica pH 7.4 (sacarosa, 0.25 M; NaCl, 0.01 M; CaCl₂, 0.005 M y MgCl₂ 6 H₂O, 0.005 M). Se centrifugó el homogenado en 40 ml de sacarosa isotónica pH 7.4 en tubos Falcon de 50 ml con tapón de rosca a 2 000 rpm por 15 min y a 4°C Fue retirado el sobrenadante con pipeta serológica y bulbo, se lavó el precipitado (fracción nuclear) con 5 ml de sacarosa isotónica pH 7.4 en un tubo de borosilicato, cónico, graduado, de 15 ml con tapón de rosca. La pastilla resultante se lavó con 10 ml de KCl 0.15 M, se resuspendió en la misma solución y se centrifugó nuevamente en iguales condiciones que antes La pastilla nuclear así obtenida se lizó mediante 1.5 volúmenes de amortiguador LT y agitación de esta suspensión contra el fondo del tubo con una pipeta Pasteur y bulbo. El lizado nuclear se conservó a -70°C hasta su uso.

DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA OBTENCION DE LA FRACCION
NUCLEAR DE ENTAMOBA INVADENS, CEPA PZ



7.9 Ensayo de actividad de RNA polimerasa *in vitro*.

La síntesis fue iniciada a 30 °C con la adición del extracto total o fracciones subcelulares amebianas. La reacción se detuvo al adicionar a cada tubo 5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5% a 4 °C en agua-hielo. Las mezclas se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio, Whatman GF/C de 2.4 cm de diámetro; los filtros se lavaron seis veces con TCA al 5% a 4 °C y seis veces con etanol frío, se colocaron en viales de centelleo líquido y se secaron al horno a 90 °C durante 60 min. Se añadieron 5 ml de líquido de centelleo (Bray). Las mezclas de centelleo líquido se dejaron en la oscuridad a 4 °C por 12 h. La radiactividad incorporada al material insoluble en TCA se determinó en un contador de centelleo líquido TRACOR-5000, ajustado a 58% de eficiencia (Fig. 2).

7.9.1 Actividad de RNA polimerasa bacteriana.

En tubos de borosilicato (Pyrex) de 12 x 75 mm (limpios y horneados) numerados en series de tres, se depositaron 55 µl de la pre-mezcla de ensayo y cantidades variables de la solución LT para ajustar los volúmenes. En seguida se añadieron volúmenes variables de Ex 1 y se incubaron inmediatamente a 37 °C en BA por 20 min (Fig. 3) y hasta por 28 min en los ensayos efectuados con dosis constantes de Ex 1 (30 µl) y tiempos de incubación variables (Fig. 4).

7.9.2. Actividad de RNA polimerasa amebiana.

En tubos de borosilicato de 12 x 75 mm (limpios y horneados) numerados en series de tres, se añadieron 55 µl de Pm y cantidades variables (de 0 a 25 µl) de LT, a menos que se especifique algún cambio en algún experimento. La reacción se inició por la

adición del extracto crudo amibiano o la fracción subcelular e incubación a 30°C. La actividad de RNA polimerasa fue determinada mediante la incorporación de [³H]-UTP a material insoluble en ácido tricloroacético de acuerdo al método de Lau, et al. (1980). (105)

7.9.2.1. Relación temporal del crecimiento de la cepa PZ de Entamoeba invadens a 25°C en medio TPS-1.

Se incubaron 39 tubos con TPS-1 fresco con 1 000 amibas por ml a 26°C por tiempos variables, de 0 a 12 días. Cada 24 h se eligieron al azar tres tubos para determinar el número de trofozoítos/ml. Después fueron descartados, eligiendo otros tres para la siguiente determinación. La figura 5 representa el promedio \pm desviación estándar (D.E.) de estas determinaciones.

7.9.2.2. Relación entre la radiactividad asociada a material insoluble en ácido tricloroacético y la cantidad de extractos totales de trofozoítos de Entamoeba invadens, cepa PZ.

En tubos de borosilicato de 12 x 75 mm esteriles y horneados, numerados en series de tres, se depositaron 55 μ l de Pm, cantidades variables (45 μ l a 0 μ l) de amortiguador L1 5/0 al 7- cuotas crecientes (0 a 45 μ l) de ET. Se incubaron por 20 min a 30°C en BA. La radiactividad incorporada a material insoluble en TCA se determinó de acuerdo a los métodos ya descritos.

7.9.2.3. Relación entre la cantidad de proteínas totales de una fracción nuclear subcelular amibiana enriquecida con núcleos y la incorporación de [³H]-UTP a material insoluble en ácido tricloroacético.

Se inició la reacción mediante la adición por triplicado de

cantidades variables de núcleos amibianos, expresado como cantidad de proteínas totales. El volumen de la mezcla de ensayo se ajustó a 100 μ l con 55 μ l de Pm, y volúmenes variables del amortiguador LT. Los tubos se incubaron a 30°C en BA por diez min. La reacción se detuvo como se ha descrito previamente. La radiactividad incorporada a material insoluble en TCA se cuantificó de acuerdo a los métodos ya descritos.

7.9 2.4. Relación entre la cantidad de proteínas totales de la fracción nuclear amibiana y la actividad de RNA polimerasa

Se añadieron por triplicado cantidades crecientes de proteínas de la fracción nuclear (de 0 a 125 μ g) a tubos que contenían 55 μ l de Pm. Los volúmenes se ajustaron a 100 μ l con LT y se incubaron a 30°C por diez minutos. Se detuvo la reacción y se determinó la radiactividad incorporada a material insoluble en TCA.

7.9 2.5 Relación temporal de la actividad de RNA polimerasa de Entamoeba invadens, cepa PZ a 30°C.

En tubos de borosilicato se sirvieron por triplicado 55 μ l de Pm, 20 μ l de amortiguador LT y 25 μ l de la fracción nuclear con 112.5 μ g de proteínas totales. Se incubaron a 30°C por tiempos variables de 0 a 20 min. Se detuvo la reacción y se determinó la radiactividad incorporada.

7.9 2.6 Relación de la concentración de UTP y [³H]-UTP sobre la actividad de RNA polimerasa amibiana.

En mezclas de ensayo con 50 μ l de Pm y 25 μ l de fracción nuclear (114.25 μ g de proteínas totales) y cantidades variables de [³H]-UTP, de 1 a 4 μ Ci y de UTP de 0.048 mM a 0.625 mM. Se incubaron a 30°C por 10 min.

7.9.2.7. Relación entre la temperatura y la síntesis in vitro de RNA amibiano.

Las mezclas de reacción contenían 50 μ l de Pm, 20 μ l de una solución de [3 H]-UTP con 0.20 μ Ci/ μ l, 5 ml de UTP 0.577 mM y 65 μ g de proteínas nucleares, todo ajustado a 100 μ l. Las mezclas se incubaron por 10 min. a temperaturas variables, entre 15 y 30°C.

7.9.2.8. Respuesta temporal de la actividad de RNA polimerasa de Entamoeba invadens, cepa PZ a 25°C.

En mezclas de ensayos con 75 μ l de Pm y 25 μ l de fracción nuclear (67.5 μ g de proteínas totales). Se incubaron a 25°C por tiempos variables de 0 a 15 min.

7.9.2.9. Efecto de la ribonucleasa pancreática bovina, sobre el RNA amibiano neosintetizado.

A las mezclas de síntesis pre-incubadas por 10 min a 25°C se añadieron 2 Unidades Kunitz de ribonucleasa pancreática bovina (10 μ l de una solución con 20 μ g/ml). Las mezclas se reincubaron a 25°C por tiempos variables, entre 0 a 90 min y se determinó la radiactividad incorporada a material insoluble en TCA.

7.9.2.10. Efecto de la Actinomicina D sobre la síntesis de RNA amibiano.

A las mezclas de reacción se agregaron cantidades variables de Actinomicina D (entre 0 a 20 μ g) y se determinó la radiactividad incorporada a material insoluble en TCA, después de 10 min de incubación a 25°C.

8 RESULTADOS

Los resultados obtenidos son el promedio de tres experimentos independientes.

8.1.1 Relación temporal del crecimiento de Escherichia coli

La cepa MX-384 de E. coli creció bien en caldo Luria y alcanzó su máxima densidad a las 3.3 h de incubación a 31°C con agitación rotatoria de 300 rpm a una dilución de inóculo de 1:50 (Fig. 1).

8.1.2. Relación temporal del crecimiento de la cepa PZ de Entamoeba invadens.

El incremento de el número de amibas en cultivo axénico en TPS-1 mostró una relación logarítmica con respecto al tiempo de incubación, en un lapso de diez días. No presentó fase de adaptación (Lag); lo cual indica que las amibas se encontraban en óptimas condiciones fisiológicas. El máximo rendimiento obtenido, con un inóculo de 1 000 amibas/ml se registró al onceavo día con una densidad de $1.47 \times 10^6 \pm D.E. 0.14 \times 10^6$ amibas por ml (Fig. 5).

Aún cuando la actividad de RNA polimerasa es ubicua, en Entamoeba invadens no se ha descrito y no se conocían las condiciones de ensayo para determinar su actividad in vitro. Por ello fue necesario diseñar, una mezcla de ensayo partiendo de alguna ya descrita para detectar la actividad homóloga de un organismo genéticamente cercano a Entamoeba. Elegimos la mezcla de ensayo para la actividad de RNA polimerasa del protozoario Acanthamoeba castellanii. Como no fue factible obtener una cepa certificada de A. castellanii, que nos sirviera como testigo en cada experimento, durante el desarrollo de este trabajo fue ne-

esario entor es adaptar a la mezcla de A. castellanii un método para detectar una actividad de RNA polimerasa bien conocida, la de Escherichia coli.

8.1.3 Relación entre la actividad de RNA polimerasa y la cantidad de extracto total de Escherichia coli.

En la mezcla de ensayo para A. castellanii fue posible detectar la actividad de RNA polimerasa de E. coli. Mostró una relación lineal a la dosis de proteínas bacterianas hasta por 917 μg .

La máxima incorporación fue de $6\ 200 \pm 967$ dpm con 20 min de incubación a 37°C (Fig. 3).

8.1.4 Relación temporal entre la actividad de RNA polimerasa de extractos totales de E. coli, cepa MX-384 a 37°C .

La actividad de RNA polimerasa bacteriana se incrementó linealmente con respecto al tiempo de incubación en la mezcla de ensayo para la RNA polimerasa de A. castellanii, en un lapso de 12 min. La incorporación máxima fue de $13\ 635 \pm 1\ 521$ dpm con 655 μg de proteínas totales (Fig. 4).

8.1.5 Relación entre la radiactividad asociada a material insoluble en TCA y la cantidad de extractos totales de trofozoítos de E. invadens.

Al intentar detectar actividad de RNA polimerasa en ET de E. invadens, cepa PZ en la mezcla de reacción para A. castellanii en vez de incorporación de $[^3\text{H}]\text{-UTP}$ se encontró una disminución asintótica de la radiactividad basal en los filtros de fibra de vidrio con respecto a la cantidad de material ambiental. Esta

disminución fue equivalente al 83% de la radiactividad atrapada inespecíficamente en los filtros (Fig. 6). Como los resultados de la incubación de las mezclas de ensayo fueron contrarios a los esperados. Es decir como se obtuvo una función de pendiente negativa, en vez de positiva, con respecto a la cantidad de extractos ambientales totales añadidos, se decidió analizar la fracción nuclear rica en RNA polimerasa y relativamente escasa de actividades microlíticas no deseadas para este propósito.

8.1.6 Relación entre la actividad de RNA polimerasa ambiental y la cantidad de núcleos, expresada como masa de proteínas totales

En la fracción nuclear, más depurada que las muestras anteriores sí fue posible detectar actividad de RNA polimerasa en la mezcla de ensayo para A. castellanii. La incorporación de [³H]-UTP a material insoluble en TCA mostro' una relación lineal con respecto a la cantidad de núcleos, hasta con 93 µg de proteínas totales (Fig. 7), a los 10 min de incubación a 30°C. La máxima incorporación fue de 900 ± 600 dpm.

8.1.7 Relación temporal de la actividad de RNA polimerasa ambiental

La incorporación de [³H]-UTP a material insoluble en TCA se incremento' rápidamente en el primer minuto de incubación, seguido de una meseta entre 1 y 8 min y después disminuyo' notablemente hasta que, a los 20 min la radiactividad era sólo el 43% con respecto a la incorporación máxima alcanzada en el primer minuto (Fig. 8). La máxima incorporación alcanzada en este análisis fue de 2 300 ± 480 dpm. Seis veces menor que la RNA polimerasa de E. coli detectada en la misma mezcla.

8.1.8. Incremento de la actividad de RNA polimerasa amibiana con respecto a la cantidad de [^3H]-UTP y UTP.

Al aumentar la concentración de UTP frío, a una concentración equimolar con los otros nucleótidos (0.525 mM) y la de [^3H]-UTP, en las mezclas de ensayo se incrementó cuatro veces la incorporación de [^3H]-UTP al material insoluble en TCA en una forma proporcional a la cantidad disponible de radiactividad. Con $4 \mu\text{Ci}$ por $100 \mu\text{l}$ la incorporación de [^3H]-UTP fue de $4\,200 \text{ dpm}$: con respecto al experimento de la Fig. 7 la actividad de RNA polimerasa se incrementó al doble al aumentar la concentración de UTP frío y cinco veces al sumar a la modificación anterior un incremento de $3 \mu\text{Ci}$ de [^3H]-UTP (Fig. 9).

8.1.9. Relación entre la temperatura y la síntesis in vitro de RNA amibiano.

Bajo las condiciones encontradas en los anteriores ensayos se incubaron las mezclas de ensayo a temperaturas variables y se encontró que la actividad de RNA polimerasa amibiana depende claramente de la temperatura. Se observó su máxima actividad a 25°C con una incorporación de [^3H]-UTP a material insoluble en TCA de casi $5\,000 \text{ dpm}$. La variación de $\pm 2^\circ\text{C}$ resultó en una disminución de la incorporación equivalente al 60% con respecto a la incorporación máxima. A 20°C la actividad fue 90% menor que a 25°C y a 30°C correspondió el 70% con respecto a la observada a 25°C .

La máxima actividad de RNA polimerasa ($4\,764 \pm 734 \text{ dpm}$) ocurrió a 25°C con $65 \mu\text{g}$ de proteínas nucleares totales y 10 min de incubación (Fig. 10).

8.1.10 Relación temporal de la actividad de RNA polimerasa

La incorporación de ^3H -UTP a material insoluble en TCA mostró una tendencia lineal con respecto al tiempo entre 0 y 10 min de incubación a 25°C con $67.5 \mu\text{g}$ de proteínas nucleares totales (Fig. 11). La máxima incorporación fue de 4 000 dpm.

8.2 ESPECIFICIDAD

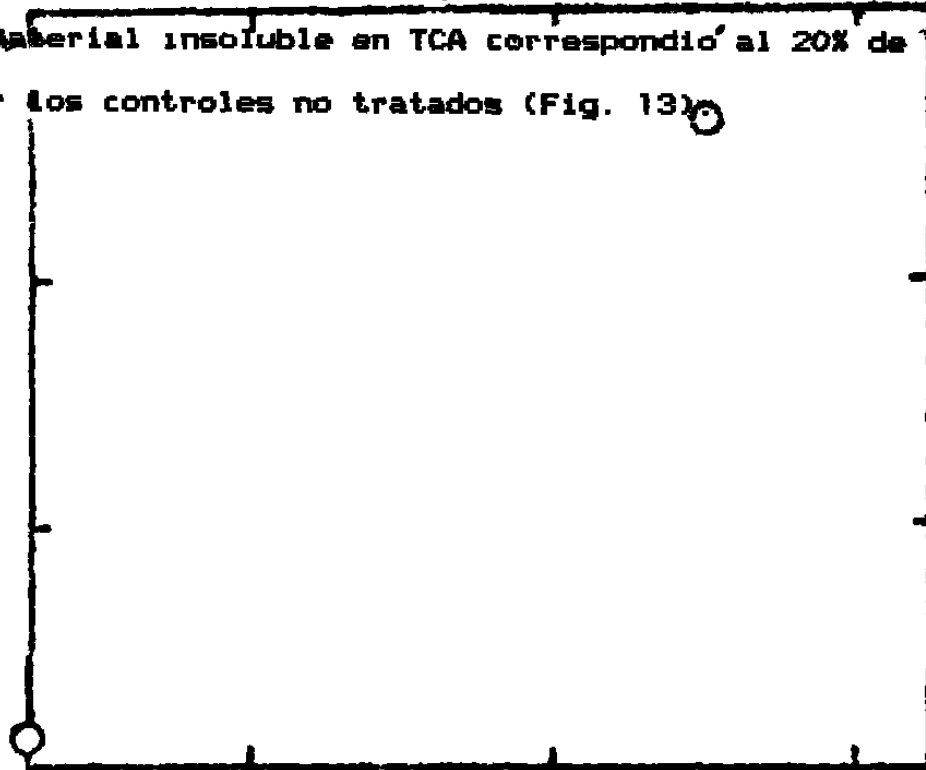
Para determinar si el material asociado a la radiactividad y retenido en los filtros de fibra de vidrio era realmente RNA sintetizado de novo se analizó: a) el efecto de la ribonucleasa pancreática bovina sobre la cantidad de dpm asociadas al material insoluble en TCA, una vez terminada la incorporación para la hipotética síntesis de RNA y b) el efecto de dosis variables de Actinomicina D. - un inhibidor de la RNA polimerasa - sobre la cantidad de dpm asociadas a material insoluble en TCA, cuando el antibiótico se incubó junto con las mezclas de ensayo.

8.2.1. Efecto de la ribonucleasa pancreática bovina sobre la radiactividad asociada a material insoluble en TCA.

Al incubar las mezclas de ensayo para RNA polimerasa ambiente bajo las condiciones previamente establecidas y reincubarlas en presencia de cantidades variables de ribonucleasa pancreática bovina se observó una disminución lineal de la radiactividad precipitada con TCA con respecto a la cantidad de la hidrolasa añadida. Con $90 \mu\text{g}$ de esta enzima la radiactividad disminuyó un 80% con respecto a los controles no tratados (Fig. 12).

8.2.2 Efecto de la Actinomicina D sobre la síntesis de RNA ambiente.

Al incubar las mezclas de ensayo, en presencia de cantidades variables de Actinomicina D se encontró una disminución asintótica de la radiactividad asociada a material insoluble en TCA. El efecto inhibitorio más notable ocurrió con 2 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ (40%). Dosis mayores resultaron en inhibiciones menos aparentes. La inhibición máxima ocurrió con 20 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ (80%) y la radiactividad incorporada a material insoluble en TCA correspondió al 20% de la incorporada por los controles no tratados (Fig. 13).



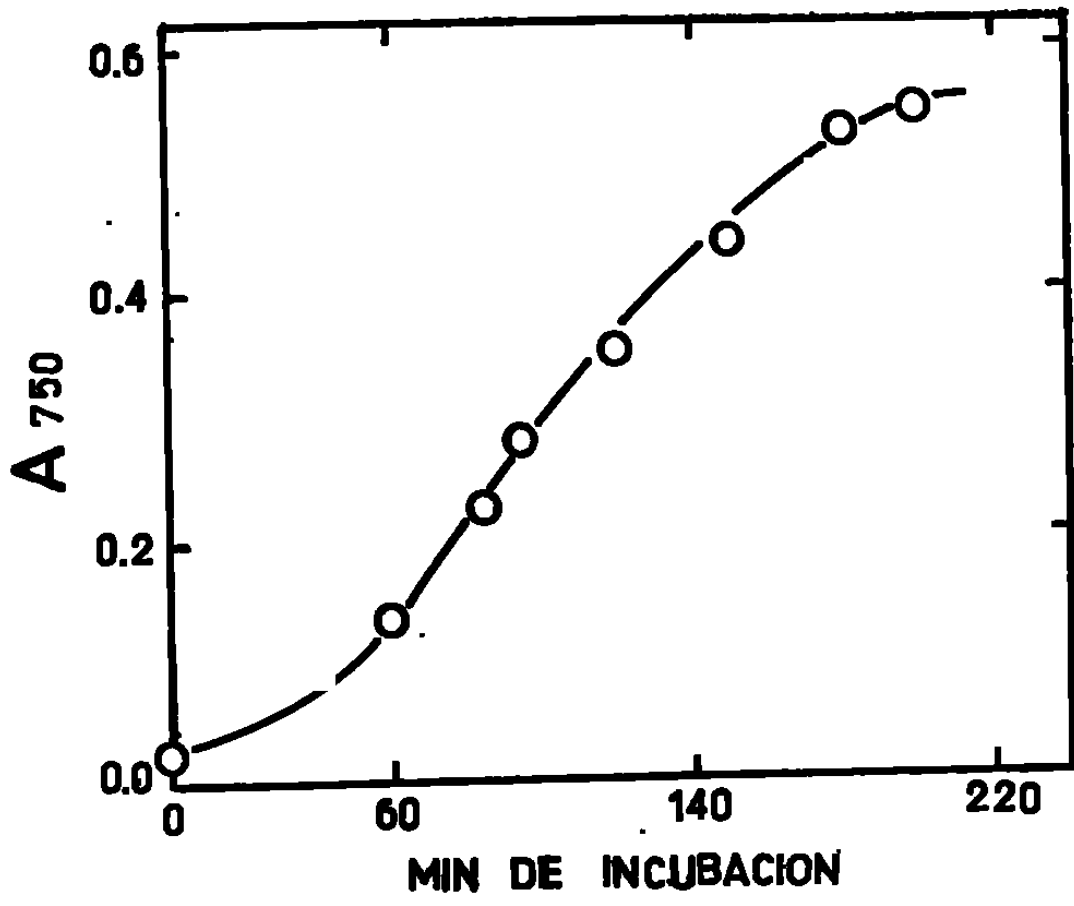


Figura 1. Relación temporal de crecimiento de Escherichia coli, cepa MX-384 a 31°C. Cada punto representa el promedio de tres experimentos independientes.

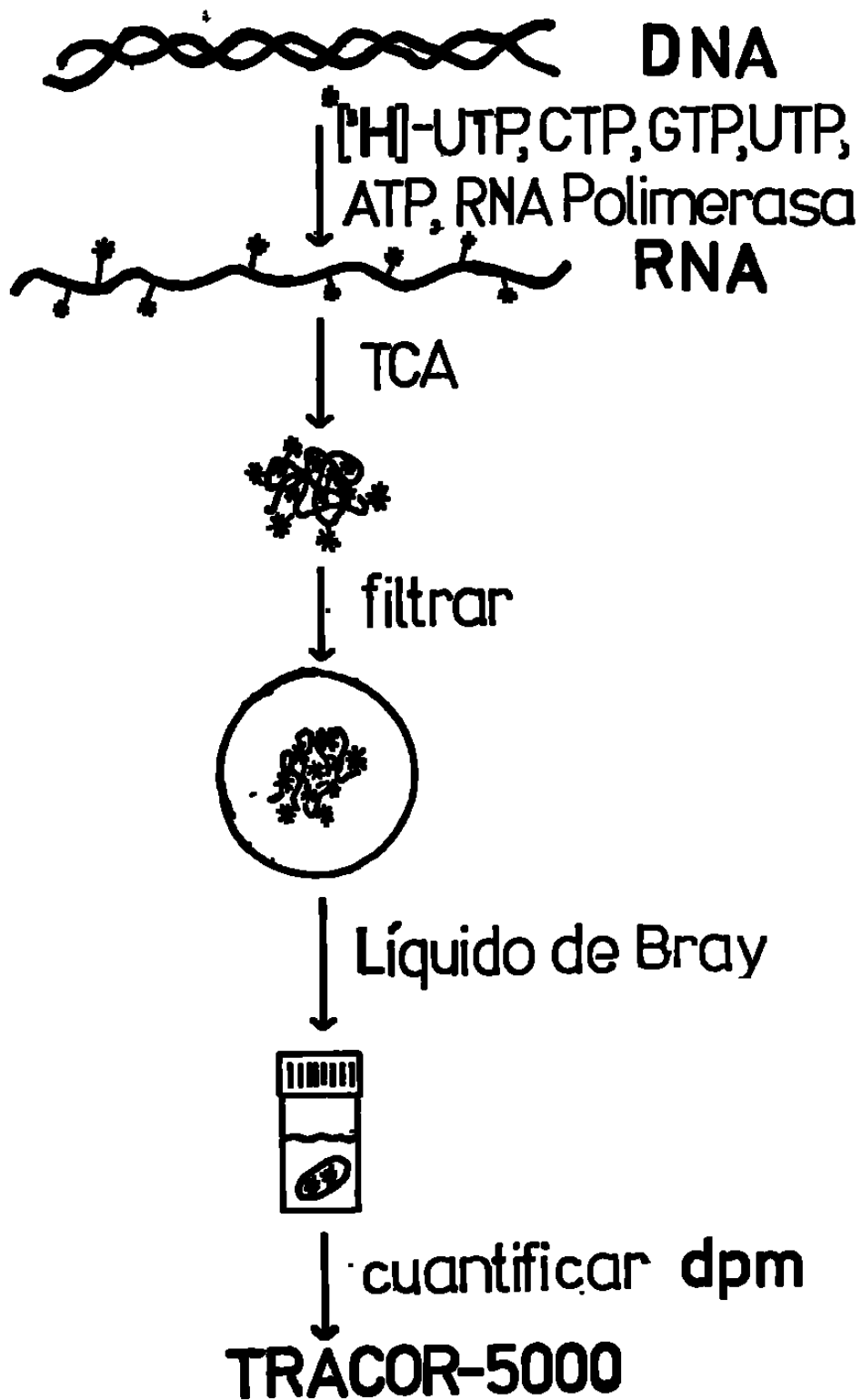


Figura 2. Diagrama de flujo para la cuantificación de la síntesis de RNA in vitro.

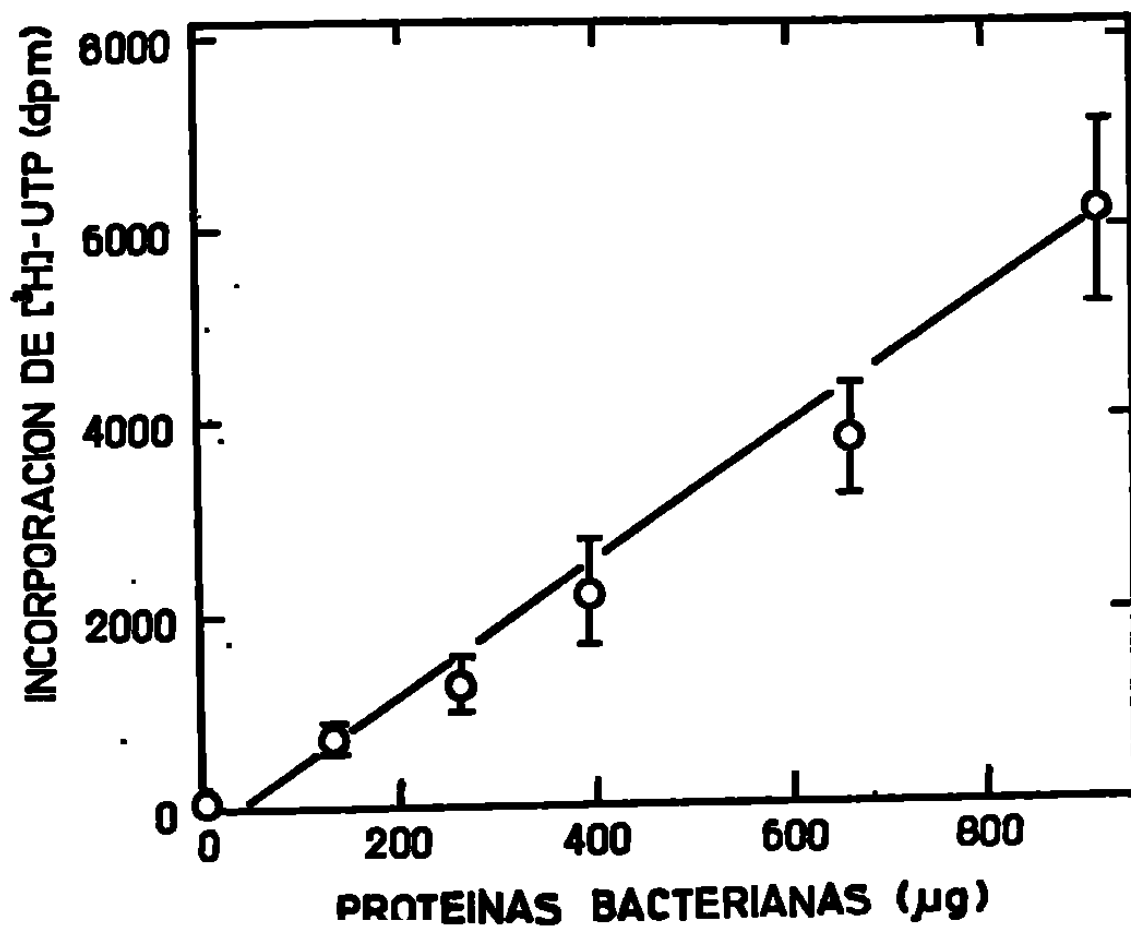


Figura 3. Relación lineal entre actividad de RNA polimerasa y la cantidad de extractos totales de Escherichia coli, cepa MX-384 a 37°C. Cada punto representa el promedio de tres experimentos independientes.

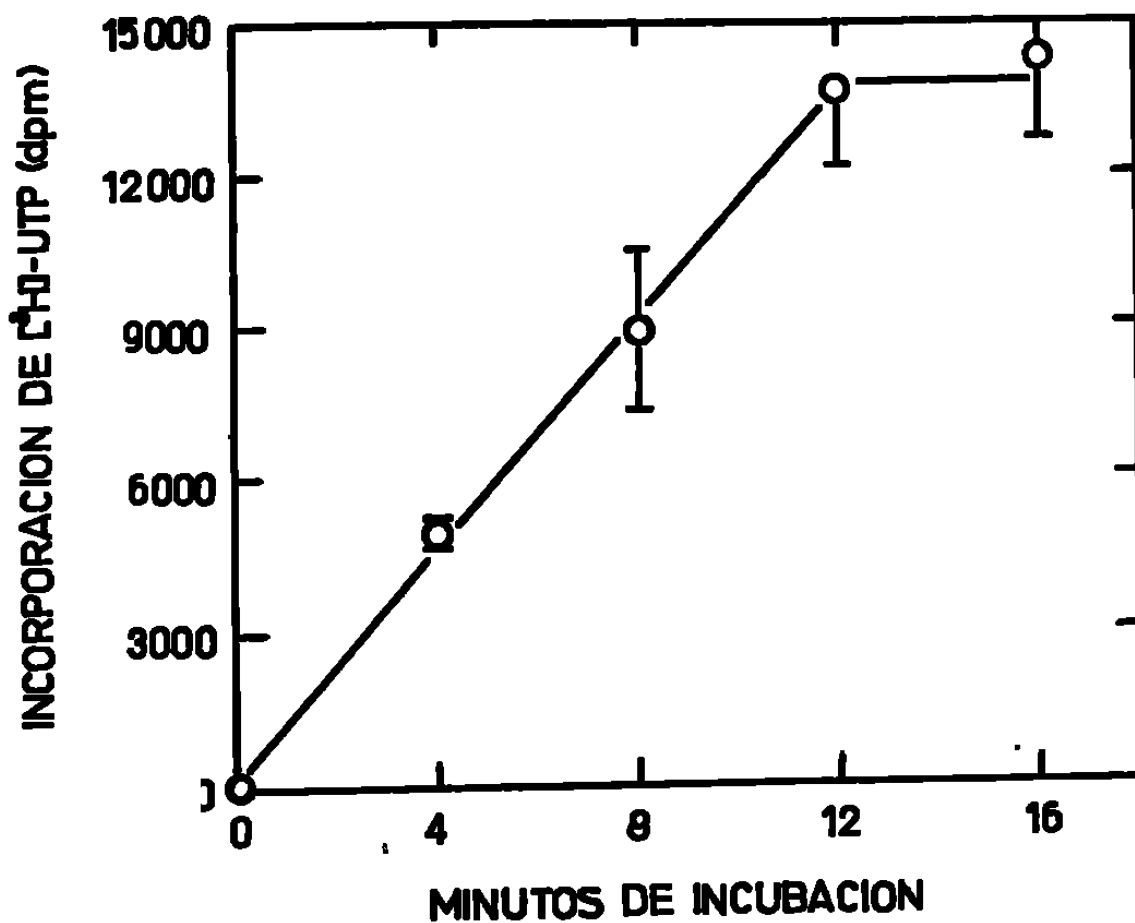


Figura 4. Relación temporal entre la actividad de RNA polimerasa de extractos totales de Escherichia coli, cepa MX-384 a 37°C . Cada punto representa el promedio de tres experimentos independientes.

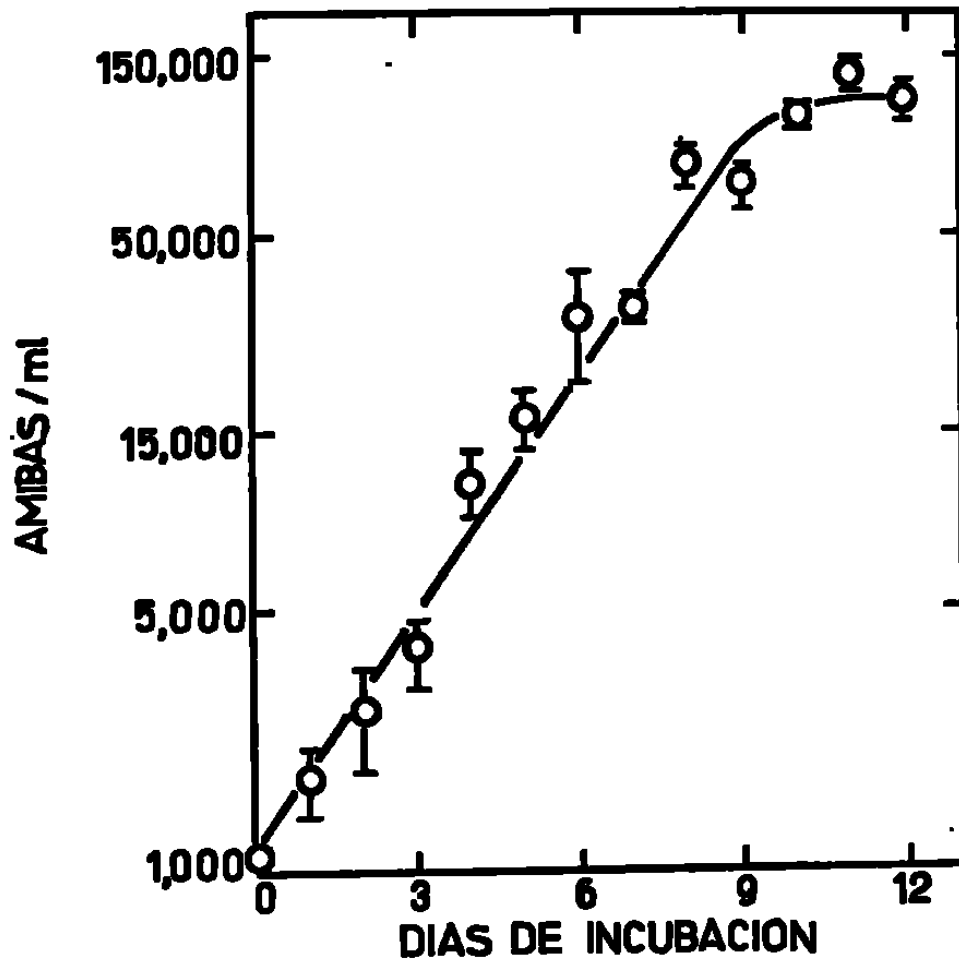


Figura 5. Relación temporal del crecimiento de la cepa P7 de Entamoeba invadens en medio TPS-1. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones independientes.

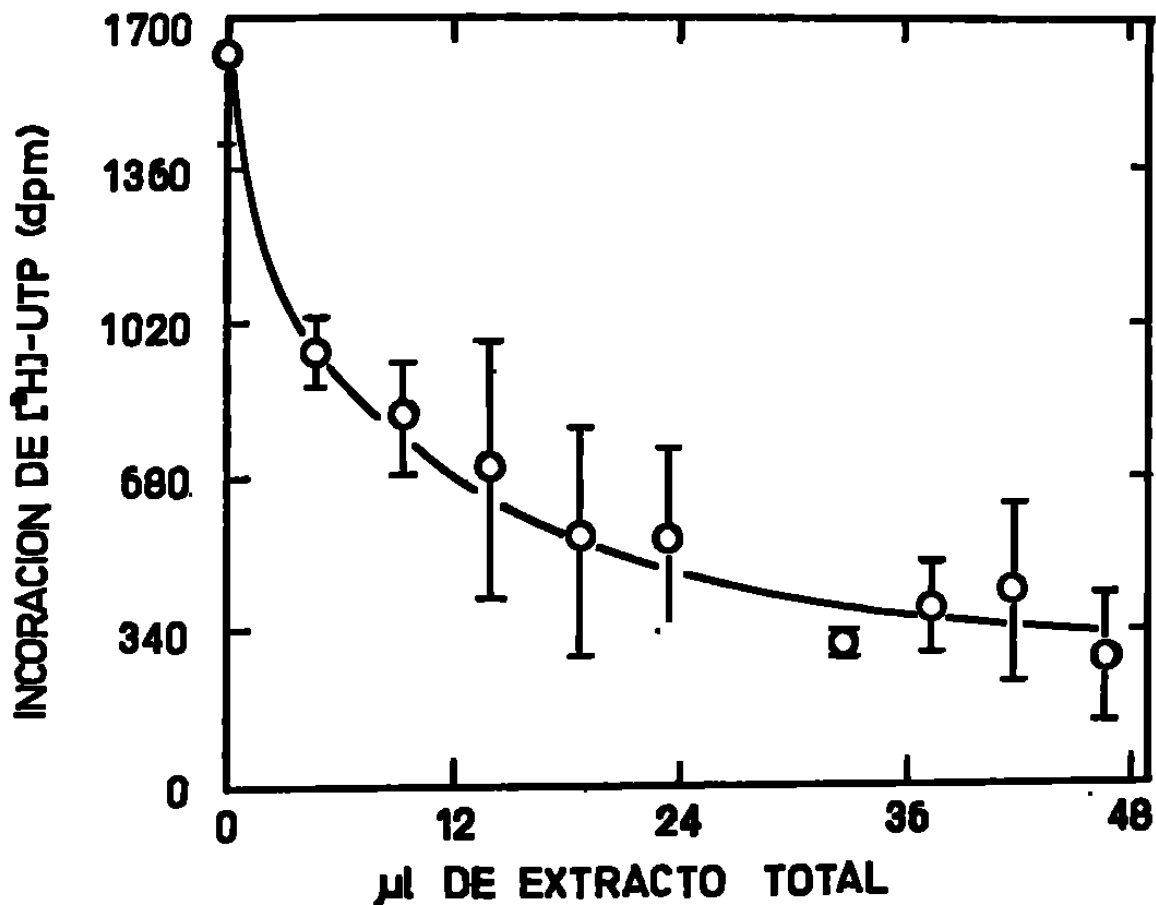


Figura 6. Relación entre la radiactividad asociada a material insoluble en ácido tricloroacético y la cantidad de extractos totales de trofozoítos de Entamoeba invadens, cepa PZ. experimentos preliminares. Cada punto representa el promedio de tres experimentos independientes.

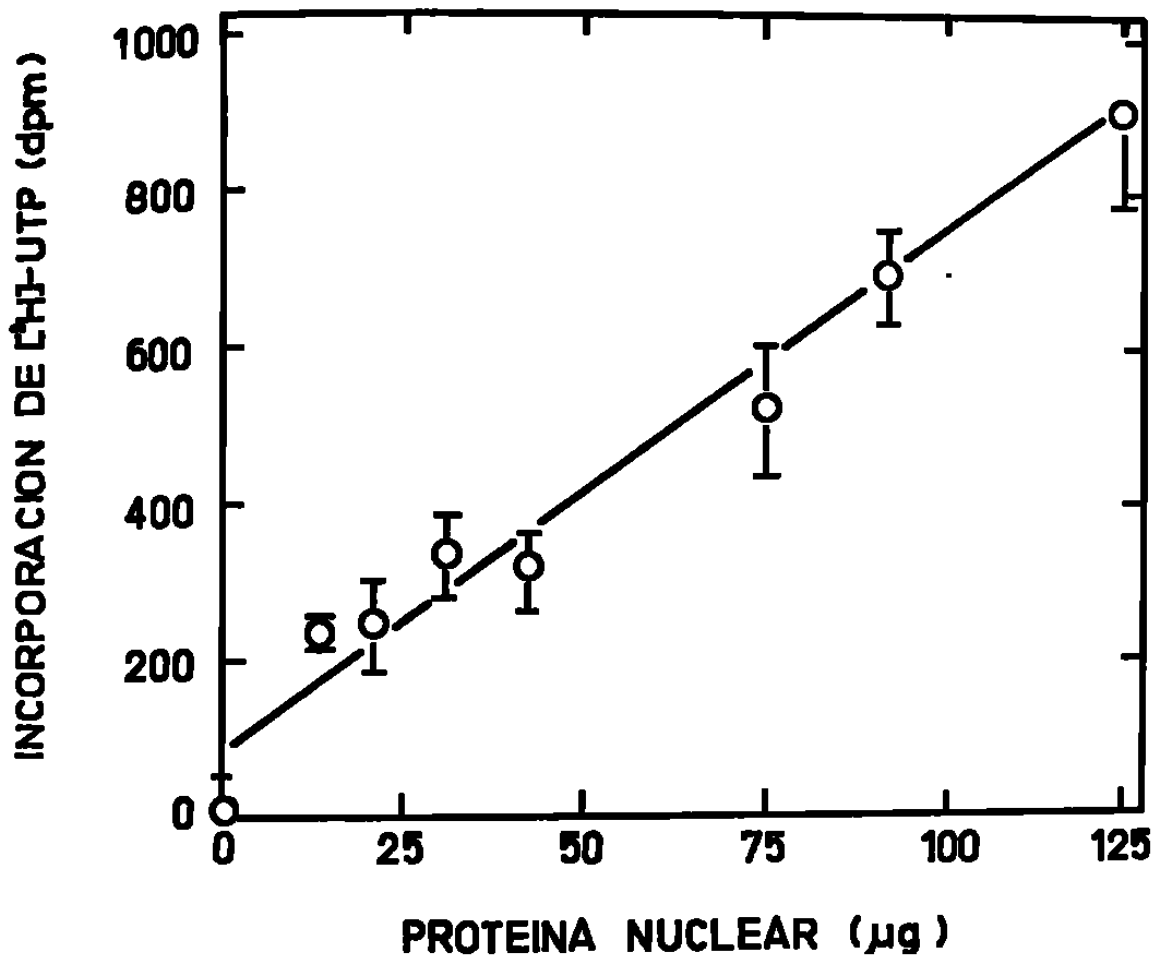


Figura 7. Relación entre la cantidad de proteínas totales de una fracción nuclear subcelular amibiana enriquecida con núcleos y la incorporación de $[^3\text{H}]\text{-UTP}$ a material insoluble en ácido tricloroacético. Cada punto representa el promedio de tres experimentos independientes.

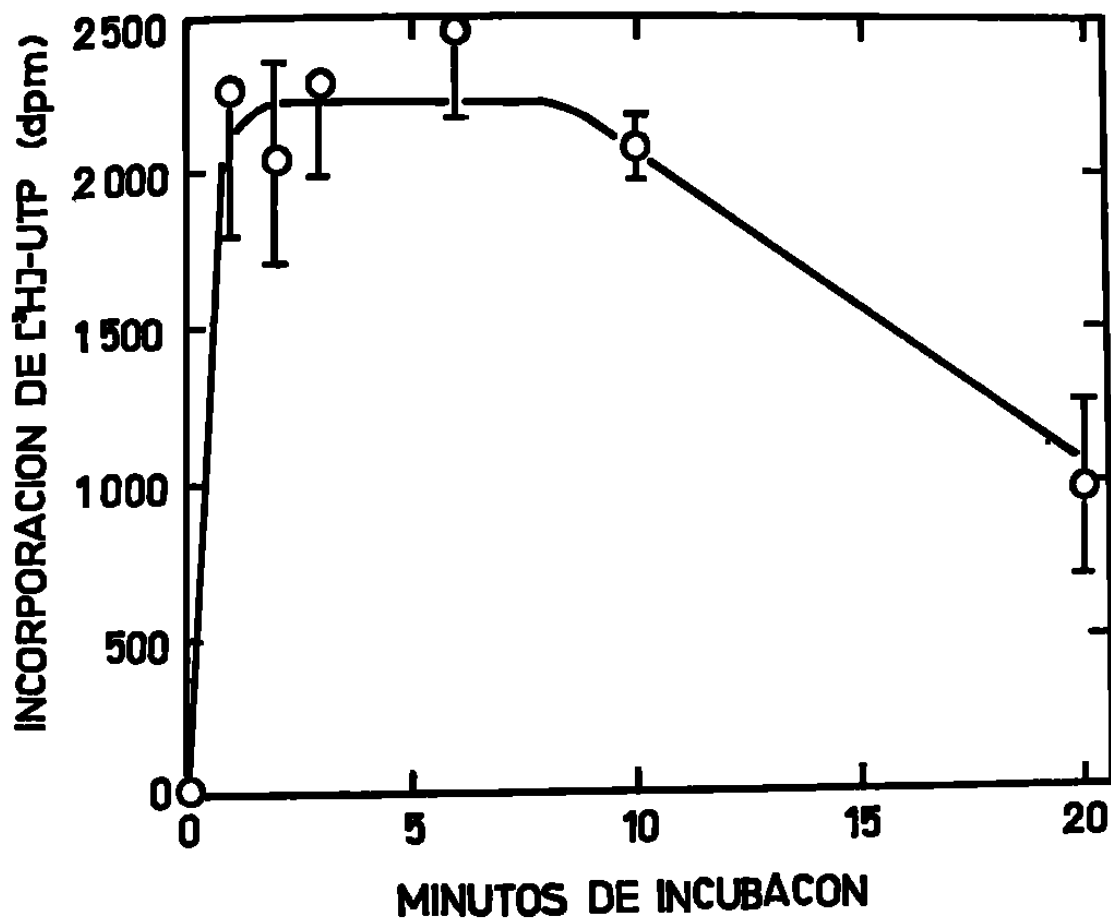


Figura 8. Relación temporal de la actividad de RNA polimerasa de Entamoeba invadens, cepa PZ, agrupación de tres experimentos independientes. A 30°C

JM81/1016; JM81/1028; JM81/1016-1028

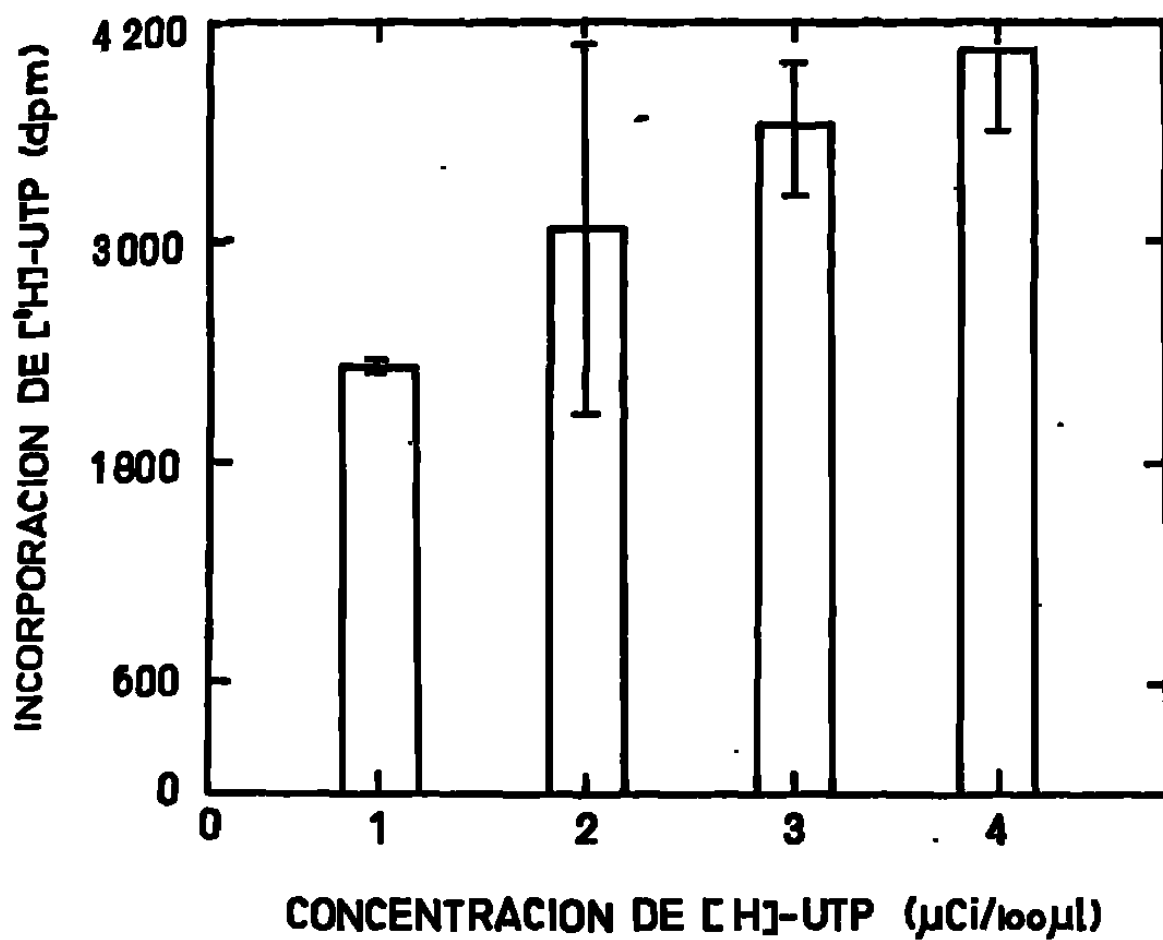


Figura 9. Relación de la concentración de UTP y $[^3\text{H}]\text{-UTP}$, sobre la actividad de RNA polimerasa ambiental a 25°C . Promedio de tres experimentos.

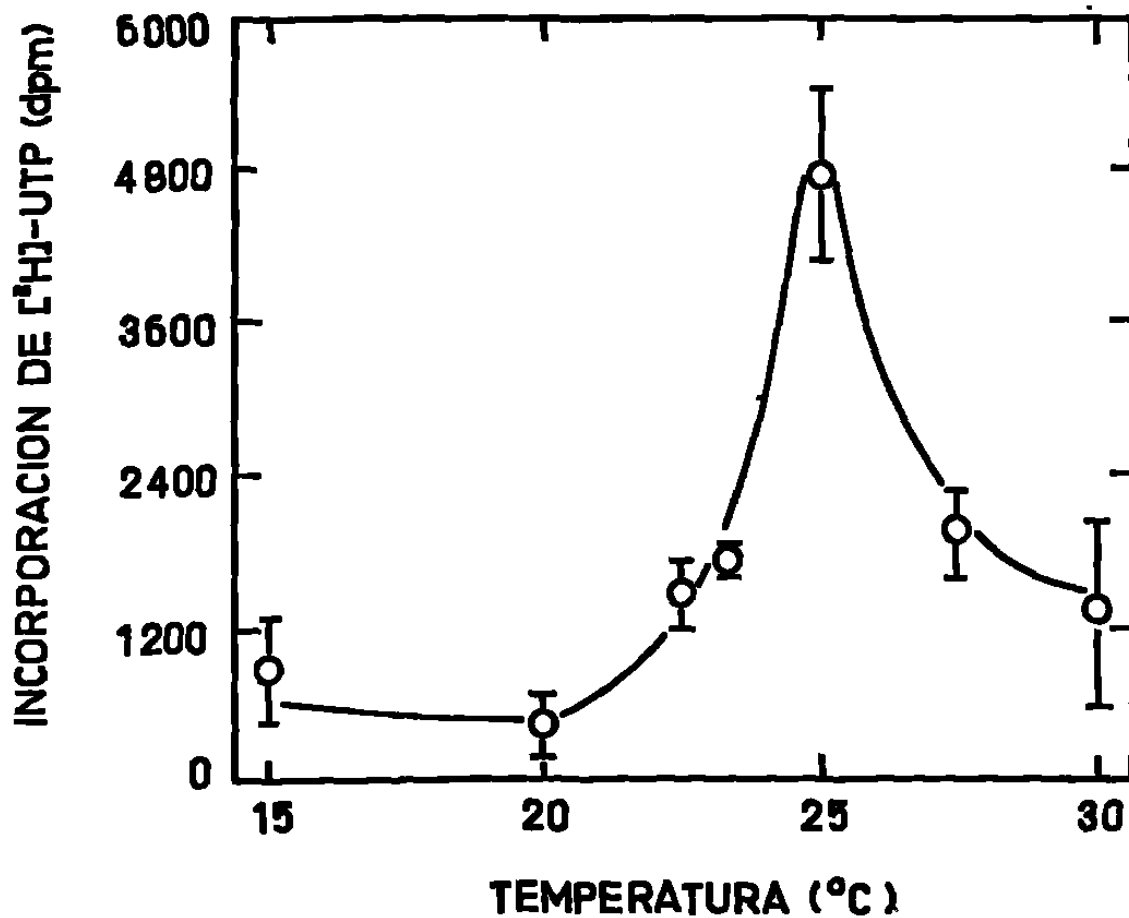


Figura 10. Relación entre la temperatura y la incorporación de [³H]-UTP a material insoluble en ácido tricloroacético por una fracción nuclear subcelular de Entamoeba invadens, cepa PZ enriquecida con núcleos. Cada punto representa el promedio de tres experimentos independientes.

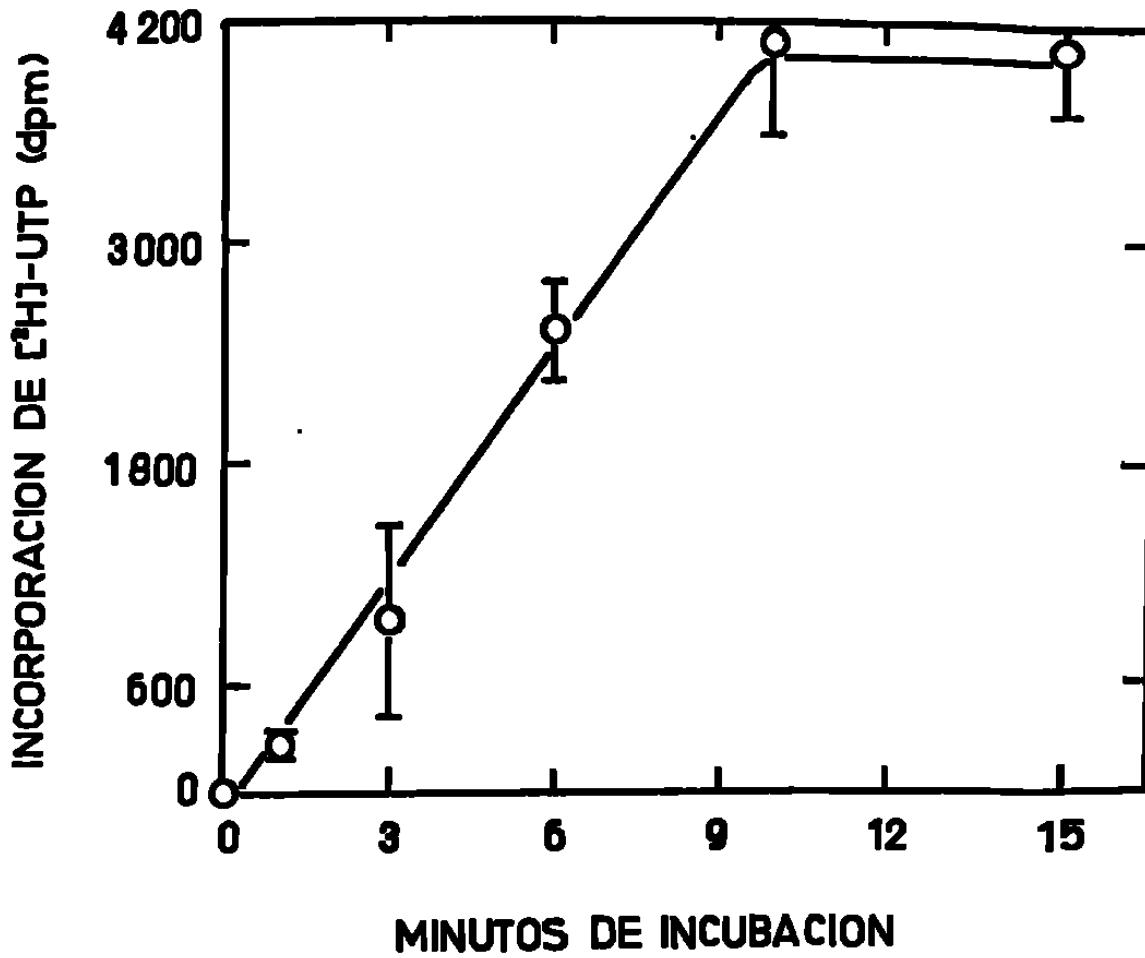


Figura 11. Relación temporal sobre la actividad de RNA polimerasa de Entamoeba invadens, cepa P7. a 25°C. Cada punto representa el promedio de tres experimentos independientes.

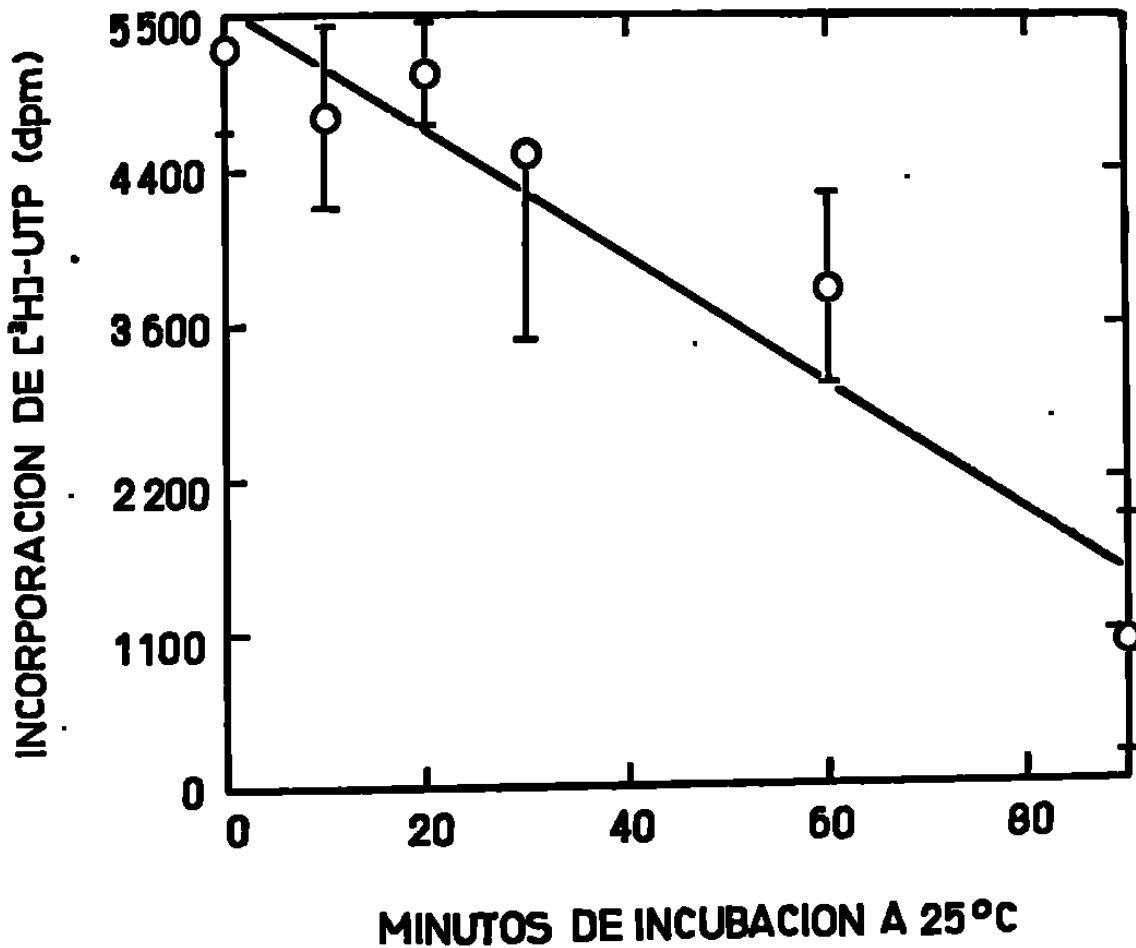


Figura 12. Disminución de la radiactividad en el material insoluble en ácido tricloroacético, por efecto de la ribonucleasa pancreática bovina. Cada punto representa el promedio de cuatro experimentos independientes.

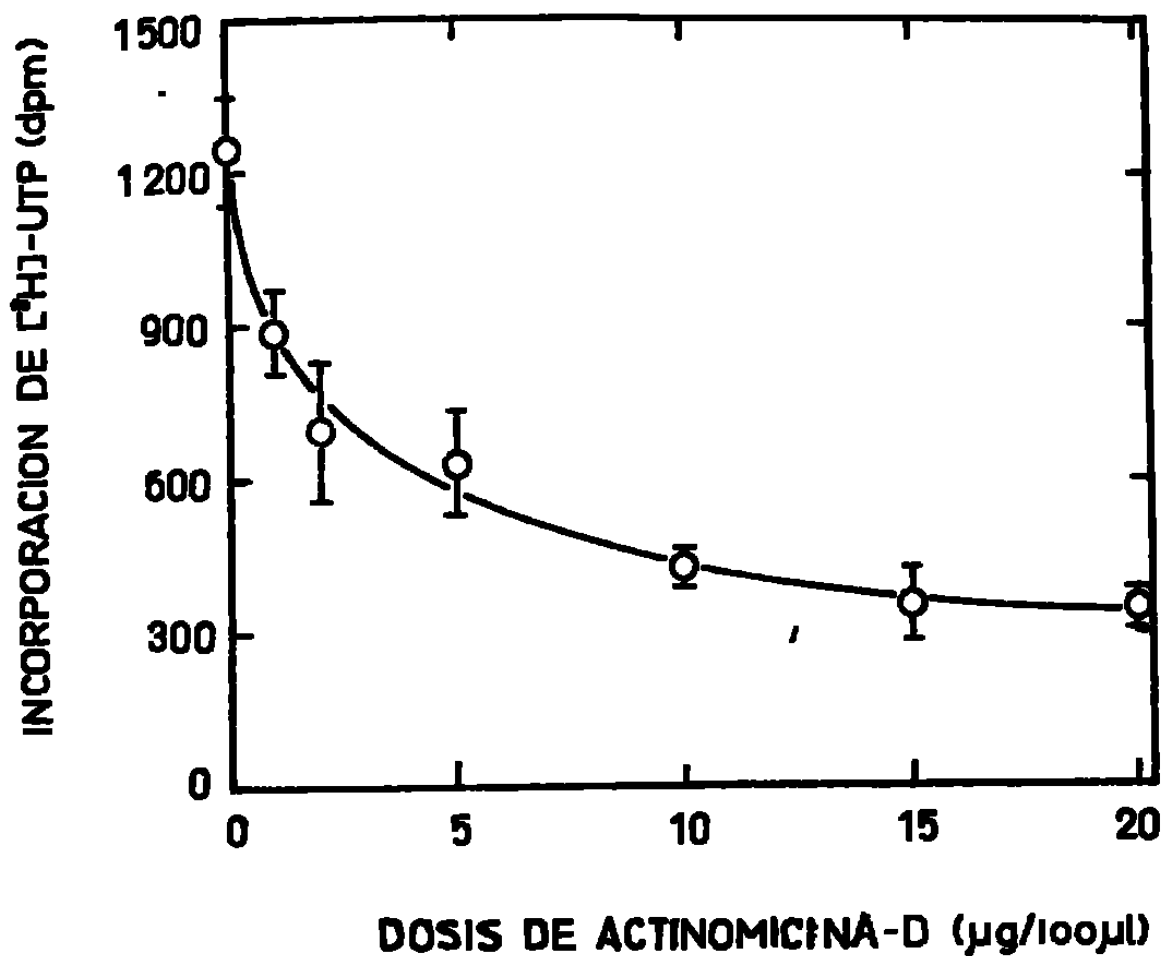


Figura 13. Relación entre la radiactividad asociada a material insoluble en ácido tricloroacético y la cantidad de actinomicina D. Cada punto representa el promedio de dos experimentos independientes.

9. DISCUSION

Entamoeba invadens es un protozoario parásito del intestino de reptiles. Constituye un buen modelo para estudiar diversos aspectos relacionados con la biología molecular de la diferenciación celular, porque esta especie es unicelular, su ciclo biológico consta de sólo dos fases: trofozoítos y quistes y porque pueda cultivarse axénicamente (95) e inducirse su enquistamiento in vitro (97,98) bajo condiciones bien controladas. Durante la diferenciación de trofozoíto a quiste hay síntesis preferencial de ciertas moléculas, lo que facilita el estudio del control de la expresión génica para la implementación de un notable y único evento: La morfogénesis de la pared quística y específicamente la síntesis de quitina, que constituye la mayor parte de dicha estructura.

El modelo experimental que se desarrolló en éste trabajo se basó en el descrito por Spindler et al. (27). Consistió en la detección y caracterización de la actividad de RNA polimerasa en extractos libres de trofozoítos de cepa PZ de E. invadens, estimada como incorporación de radiactividad a material precipitable en TCA al 5% y retenida en filtros de fibra de vidrio, después de incubar el material biosintético en presencia [³H]-UTP. Para evitar el efecto indeseable de ribonucleasas y proteasas (106,107), se utilizó exclusivamente la fracción nuclear para los ensayos.

Debido a que la actividad de RNA polimerasa de E. invadens no se había descrito hasta ahora, no se conocían las condiciones de ensayo para la transcripción in vitro. Por ello fue necesario diseñar una mezcla de ensayo, partiendo de una ya descrita para

detectar la transcripción in vitro de preparaciones obtenidas de organismos cercanos a E. invadens. Se eligió la utilizada para detectar la actividad de RNA polimerasa de Acanthamoeba castellanii (27.42.100). Fue necesario además resolver otra dificultad: En la época en la que se inició este trabajo no fue posible obtener una cepa de A. castellanii y era indispensable contar con un modelo bien caracterizado para utilizarlo como control interno en cada uno de los experimentos que luego se realizarían en E. invadens. Como afortunadamente las mezclas de transcripción son muy parecidas en todos los sistemas biológicos utilizados hasta ahora se eligió la descrita para la actividad de RNA polimerasa de Escherichia coli cuya actividad es universalmente conocida. Se encontró que en la mezcla de ensayo de A. castellanii sí era posible detectar incorporación de radiactividad a material precipitable en TCA al 5% en extractos totales de E. coli y que la incorporación de [³H]-UTP en éste modelo dependía del tiempo y de la dosis, lo que indicaba su especificidad y confiabilidad. Una vez que se observó actividad de RNA polimerasa en la mezcla de ensayo de A. castellanii, se decidió intentar la detección de actividad de RNA polimerasa en los extractos totales de E. invadens con esa misma mezcla. Para asegurar la calidad del material biológico y la confiabilidad de los resultados, las amebas se cosecharon en fase exponencial tardía y se observaron en fresco con un microscopio estándar, para descartar contaminaciones con otros microorganismos. Los cultivos amebianos no presentaron fase de adaptación (Lag) durante su crecimiento axénico, lo cual indicó que las células se encontraban en óptimas condiciones de

s:ológicas

En los primeros intentos para detectar la actividad de RNA polimerasa con extractos totales amibianos en la mezcla de ensayo de A. castellanii sorprendentemente se observó una disminución asintótica de la radiactividad retenida en los filtros, en función de la cantidad de extractos totales amibianos, en vez de aumentar como se esperaba. Estos resultados podrían explicarse por el efecto de una actividad que degradase el [³H]-UTP o que intercambie el [³H] por hidrógeno no radiactivo y que superase los efectos de la RNA polimerasa que se esperaba detectar, evitando la detección de su incorporación al RNA ó por un enmascaramiento de la radiactividad por exceso de proteínas. Para evitar este problema se decidió eliminar la mayor parte de proteínas inespecíficas y actividades indeseables trabajando exclusivamente con la fracción nuclear. Con esta medida sí se logró obtener incorporación de radiactividad a material insoluble en TCA al 5%. Este efecto fue dependiente del tiempo de incubación y de la cantidad de muestra amibiana. Ello permitió pensar que dicha incorporación era el producto de la actividad de RNA polimerasa esperada. Sin embargo la máxima incorporación de [³H]-UTP se alcanzó rápidamente (en el primer minuto de incubación) y la incorporación de radiactividad a material insoluble en TCA fue más baja de lo deseable (dos veces mayor que la basal). Como ello podría deberse a que la mezcla de ensayo no contenía la cantidad suficiente de UTP, tanto frío como marcado con tritio, se decidió probar el efecto de la concentración de ambos reactivos. Se observó que al aumentar la concentración de UTP frío de 0.048 mM a

0.0625 μM y de [^3H]-UTP de 8.3 nCi/ μl a 40 nCi/ μl se incrementaron cinco veces las dpm incorporadas, del material al RNA neo-sintetizado. Una vez que se logró aumentar la eficiencia del modelo y de que se comprobó la confiabilidad del modelo de ensayo, se analizó el efecto de la temperatura de incubación sobre la síntesis de RNA. Se encontró que la RNA polimerasa de E. invadens tiene una clara dependencia por la temperatura, con un margen muy estrecho de variación (0.5°C); se observó su máxima actividad a 25°C, lo cual incidentalmente coincidió con la temperatura óptima de crecimiento de esta especie ambiana (88,89). Por otro lado, la RNA polimerasa de E. invadens mostró una dependencia lineal con respecto al tiempo de incubación, entre 0 y 10 min.

Para determinar si la radiactividad asociada al material insoluble en TCA al 5% era realmente RNA neo-sintetizado, se analizó el efecto de la ribonucleasa pancreática bovina sobre la radiactividad incorporada a material insoluble en TCA y de la Actinomicina D (un inhibidor de la RNA polimerasa), añadida a las mezclas de ensayo antes de la incubación. En el primer caso se encontró una disminución lineal de la radiactividad atrapada en los filtros (27,32,59) y en el segundo caso se observó una disminución asintótica de la radiactividad asociada a material insoluble en TCA con respecto a la concentración de antibiótico (43 77%). La inhibición parcial de la síntesis de RNA in vitro por la Actinomicina D, no es sorprendente porque en otros muchos organismos este antibiótico no inhibe totalmente la transcripción in vitro (36,37,76). Las observaciones anteriores pueden interpretarse como sigue: La ribonucleasa hidrolizó el RNA neo-sinte-

tizado y la Actinomicina D inhibió la actividad de RNA polimerasa ambiana en las mezclas de ensayo

Las diferencias fundamentales entre la mezcla de ensayo descrita por Spindler et al. (27) y la utilizada en éste trabajo fueron tres: i) el uso de una fracción subcelular nuclear cruda en lugar de RNA polimerasa purificada, ii) el incremento de la concentración de UTP de 0.048 mM a 0.625 mM (13 veces) y iii) el uso de radiactividad cinco veces mayor en los ensayos de éste trabajo que en los descritos por Spindler et al. (27)

Considerando la radiactividad incorporada a material insoluble en TCA, estimada como dpm, la eficiencia del modelo de estudio desarrollado en este trabajo fue 1.85 mayor que la de Detke y Paule en 1975, adaptado para RNA polimerasa purificada de A. castellanii (83), 3.5 veces superior a la de Nishiura (31), para analizar la RNA polimerasa II purificada de D. melanogaster y practicamente igual al modelo usado para RNA polimerasa I y II purificadas de núcleos de hígado de rata (23).

La dependencia por la dosis y el tiempo de incubación de la RNA polimerasa ambiana también se ha descrito en RNA polimerasas de muchos otros organismos (cf. 10,23,28,31-33,108,109).

La temperatura de actividad máxima de RNA polimerasa es muy variable en la naturaleza y específica de especie, los siguientes ejemplos ilustran lo anterior: Drosophila melanogaster 25°C (31), placenta humana 37°C (36), A. castellanii 30°C (27), B. subtilis 35°C (108), E. coli 37°C (109), núcleos de hígado de rata 37°C (23), células embrionarias de Xenopus laevis 30°C (28,104) y E. invadens 25°C (este trabajo).

10 CONCLUSIONES

se desarrolló un modelo experimental in vitro para analizar de una manera confiable la síntesis enzimática de RNA de la cepa PZ de E. invadens, el cual no se había descrito hasta la fecha.

La RNA polimerasa de la cepa PZ de E. invadens tiene las siguientes características: 1) es dependiente de la dosis de proteínas totales de la fracción nuclear. 2) del tiempo y 3) de la temperatura de incubación, 4) es sensible al efecto de la Actinomicina D y 5) es triestable. puesto que en el desarrollo de éste trabajo se congelaron a -70°C las preparaciones nucleares hasta su uso.

Las condiciones de ensayo definidas en éste trabajo para la RNA polimerasa de E. invadens, cepa PZ fueron las siguientes: 1) temperatura de incubación 25°C , 2) tiempo de incubación máximo 10 min, 3) concentración de UTP no marcado 0.625 mM , 4) concentración de radiactividad ($[^3\text{H}]\text{-UTP}$ 20.3 Ci/mmol) $4\ \mu\text{Ci}/100\ \mu\text{l}$ y 5) dosis (equivalente a cantidad total de proteínas de la fracción nuclear) $67.5\ \mu\text{g}$.

11 CONTRIBUCIONES Y PERSPECTIVAS.

El uso de la fracción subcelular nuclear de E. invadens permitió detectar actividad de RNA polimerasa in vitro que hasta la fecha no se había logrado.

Como el enquistamiento de E. invadens puede inducirse in vitro bajo condiciones bien controladas, y muchos aspectos morfológicos y fisiológicos de los trofozoítos se diferencian claramente de los quistes, fundamentalmente la pared quística

constituida de quitina que no existe en los trofozoítos; esta especie constituye un buen modelo para el estudio de la regulación transcripcional de un grupo muy específico de genes. Los que modifican para la quitina sintetasa.

El modelo in vitro desarrollado en éste trabajo permitirá determinar con precisión y reproducibilidad la actividad de la RNA polimerasa de E. invadens, cepa PZ, en cualquier estudio relacionado con la actividad enzimática, transcripción y la regulación de la expresión génica. Aún cuando ha sido ampliamente estudiada, no se conoce cabalmente el mecanismo de control de ésta. El modelo experimental aquí descrito podría usarse para incrementar el conocimiento sobre los factores que regulan la expresión génica durante la diferenciación de E. invadens: Durante el enquistamiento, aparecen macromoléculas que no se encuentran en los trofozoítos, como la quitina, específica de pared (93,98). Ello implica, cuando menos, la biosíntesis y la activación de quitina sintetasa y de los RNA mensajeros correspondientes, como ya se ha definido para la síntesis de celulosa, durante la biogénesis de pared en la diferenciación de A. castellanii (92). Como el enquistamiento de E. invadens puede inducirse in vitro, en condiciones axénicas; el modelo de transcripción aquí descrito permitiría analizar con detalle el mecanismo de control de la expresión génica involucrado en la síntesis de pared. Lo cual a su vez, constituye un modelo de estudio de diferenciación celular relativamente simple. Con la experiencia ganada con E. invadens, podría estudiarse la transcripción de Entamoeba histolytica; la cual presenta muchas similitudes con E. invadens, incluyendo el

enquistamiento como una de las dos fases de su ciclo biológico. E histolytica es el agente etiológico de la amibiasis, que constituye uno de los principales problemas de salud pública en México. Los quistes de Entamoeba histolytica son las formas infecciosas de este parásito. Hasta hace muy poco tiempo era prácticamente imposible estudiar aspectos relacionados con la diferenciación de éste protozoario parásito del hombre. Sin embargo actualmente ya se cuenta con un modelo de síntesis de pared de E histolytica, en condiciones axénicas, desarrollado por Mata-Cardenas y Said-Fernández (99). La síntesis de pared celular es por definición la principal característica del enquistamiento. Si se conociera el mecanismo íntimo de control de la síntesis del polisacárido, constituyente de la pared, se podría encontrar un método para bloquearla. Lo cual eventualmente podría ayudar a interrumpir el ciclo biológico de este protozoario patógeno. Podría contarse entonces con un método de control de la amibiasis, propuesto hasta ahora como una remota posibilidad.

Modelos como el aquí desarrollado pueden contribuir eficazmente para mejorar e incrementar el conocimiento de la biología molecular de los protozoarios parásitos y de algunos aspectos comunes a todas las células en general.

BIBLIOGRAFIA.

1. Grunberg-Manago M. y S. Ochoa (1955) Enzymatic synthesis and breakdown of polynucleotides: Polynucleotide phosphorylase. *J. Amer. Chem. Soc.* 77; 3165.
2. Ochoa S (1980) The Pursuit of a Hobby. *Ann. Rev. Biochem.* 49; 1
3. Kimhi Y. y U.Z. Littauer (1968) Purification and properties of polynucleotide phosphorylase from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 243 (2); 231
4. Lehninger A.L. (1972) Replica y Transcripción del DNA, pp 89] En ediciones Omega S.A. Bioquímica 5 Ed.
5. Borek E. (1979) La clave de la vida, pp 181 En Editorial Limusa S.A. Mex.. La Celula.. Clave de la vida 2. reimpresión,
6. Weiss S.B. y L. Gladstone (1959) A mammalian system for the incorporation of cytidine triphosphate into ribonucleic acid. *J. Amer. Chem. Soc.* 81; 4118
7. Weiss S.B. (1960) Enzymatic incorporation of ribonucleoside triphosphates into the interpolynucleotide linkages of ribonucleic acid. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 46; 1020
8. Hurwitz J., A. Bresler y R. Diringier (1960) The enzymatic incorporation of ribonucleotides into polyribonucleotides and the effect of DNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 3; 15
9. Jacob S.T. y K.M. Rose (1980) Basic enzymology of transcription in prokariotes and eukaryotes, pp 113 En L. Goldstein y D.M. Prescott (eds.) *Cell biology a comprehensive treatise*, Vol 3, Gene Expression: the production of RNA's. Academic Press. E.U.A.

10. Lewis M.K. y R.R. Burgess (1982) Eukaryotic RNA Polymerases, pp 109 En Bover P.D. (ed.) The Enzymes vol 15 B Academic Press 3 Ed.

11. Hurwitz J.; J.J. Furth, M. Anders, P.J. Ortiz y J.T. August (1961) The enzymatic incorporation of ribonucleotides into RNA and the role of DNA. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26;91

12. Burgess R.R. (1971) RNA Polymerase. Ann. Rev. Biochem. 40; 711

13. Shaw P.A., M.V. Marshall y G.F. Saunders (1980) Dinucleoside priming of RNA synthesis. Cytogenet. Cell Genet. 26; 211

14. Chamberlin M.J. (1976) Interaction of RNA Polymerase with the DNA Template, pp 159 En R. Losick y M. Chamberlin (eds.) RNA Polymerase C.S.H. E.U.A.

15. Chambon P., A. Dierich, M-P. Gabu, S. Jakowlev, J. Jongstra, A Krust, J.P. LePennec, P. Oudet and T. Reudelfuber (1984) Promoter Elements of Genes coding for proteins and Modulation of Transcription by Esterogens and Progesterone En Recent Progress in hormone research 40; 1-42 Academic Press Inc.

16. Chamberlin M.J. (1976) RNA polymerase an Overview pp 17-67 En R. Losick y M. Chamberlin (eds.) RNA polymerase CSH. E.U.A.

17. Miller J.S. y R.R. Burgess (1978a) Selectivity of RNA chain Initiation in vitro. 1.- Analysis of RNA initiations by Two-Dimensional Thin-Layer Chromatography of 5'- Triphosphate-Labeled Oligonucleotides, Biochemistry 17; 2054

18. Miller J.S. y R.R. Burgess (1978b) Selectivity of RNA

chain initiation *in vitro*, 3. Variables Affecting Initiation of Transcription. *Biochemistry* 17; 2064

19. Adhya S y M Gottesman (1978) Control of Transcription Termination. *Ann. Rev. Biochem.* 47: 967

20. Roberts J W (1969) Termination Factor from RNA Synthesis. *Nature* 224 (5225): 1168

21. Oda T. y M Takarami (1972) Observations of the structure of the termination factor Rho and its attachment to DNA. *J. Mol. Biol.* 71; 799

22. Yang H-L y G. Zubay (1974) A possible Termination Factor For Transcription in Escherichia coli. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 56 (3), 725

23. Roeder R.G. y W J Rutter (1970) Multiple ribonucleic acid polymerases and ribonucleic acid synthesis during Sea Urchin development. *Biochemistry* 9; 2545

24. Roeder R.G. (1976) Eukaryotic nuclear RNA polymerase, pp 285 En R Losick y M. Chamberlin (eds) RNA polymerase Cold Spring Harbor, E.U.A

25. Chambon P. (1975) Eukaryotic nuclear RNA polymerases. *Ann. Rev. Biochem.* 44: 613

26. Buhler J.M., M.A. Sentenac y P. Fromageot (1974) Isolation, Structure and general properties of yeast ribonucleic acid polymerase A (or 1). *J. Biol. Chem.* 249; 5963

27. Spindler S.R , G L. Duester, J.M D'Alessio y M.R. Paule (1978a) A rapid and facile procedure for the preparation of RNA Polymerase I from Acanthamoeba castellanii. Purification and subunit structure. *J. Biol. Chem.* 253; 4669

28. Roeder R.G. (1974a) Multiple forms of deoxyribonucleic acid dependent ribonucleic acid polymerase in Xenopus laevis.

Isolation and partial characterization. J. Biol. Chem. 249; 241.

29. Kendiger C. M., J. L. Gniazdowski, Jr Mandel, F.

Gissinger y P. Chambon (1970) -Amanitin: A specific inhibitor of one of two DNA-dependent RNA polymerase activites from calf thymus. Biochem. Biophys. Res. Comm. 38; 165.

30. Jendrisak J. y T. J. Gulfoyle (1978) Eukaryotic RNA polymerase: Comparative subunit structures, immunological properties and -Amanitin sensitivities of the class II enzymes from higher plants. Biochemistry 17; 1322.

31. Nishiura J. T. (1981) DNA-Dependent RNA polymerase from Drosophila melanogaster Adults: Isolation and partial characterization. Biochemical Genetics 19 (1,2); 15.

32. Detke S. y M. R. Paula (1979) DNA-dependent RNA polymerase III from Acanthamoeba castellanii: Comparision of the catalytic properties of the Trophozoite and Cyst enzymes. J. Protozool. 26; 319.

33. Detke S. y M. R. Paula (1978) DNA-dependent RNA polymerase II from Acanthamoeba castellanii: Comparision of the catalytic properties and subunit architecture of the Trophozoite and Cyst enzymes. Biochim. Biophys. Acta 520; 376.

34. Krakow J. S., G. Rhodes y T. M. Jovin (1976) RNA Polymerase: Catalytic Mechanisms and inhibitors, pp 127 En R. Losick y M. Chamberlin (eds.) RNA Polymerase CSH, E.U.A.

35. Manley J. L. y P. A. Sharp y M. L. Gelfer (1979) RNA

Synthesis in isolated nucleic: In vitro initiation of Adenovirus 2 major late mRNA precursor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76 (1); 160.

36. Voight H. P., R. Kaufmann y H. Matthaei (1970) Solubilized DNA-Dependent RNA polymerase from human placenta: A Mg ++ dependent enzyme. FEBS Letters 10 (4); 257.

37. Reich E., R. M. Franklin, A. J. Shatkin y E. L. Tatum (1961) Effect of Actinomycin D on Cellular Nucleic acid Synthesis and virus production. Science 134 (3478); 556.

38. Blumenthal T. y T. Landers (1973) The inhibition of nucleic acid binding proteins by Aurin Tricarboxylic acid. Biochem. Biophys. Res. Comm. 55; 680.

39. Burgess R. R. (1969) A New method for large scale purification of Escherichia coli deoxyribonucleic acid dependent ribonucleic acid polymerase. J. Biol. Chem. 244; 6160.

40. Mangel W. (1974) Initial steps in the large scale purification of Escherichia coli deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase. Arch. Biochem. Biophys. 163; 172

41. Sternbach H., R. Englhardt y A.G. Lezius (1975) Rapid isolation of highly active RNA Polymerase from Escherichia coli and its subunits by matrix-bound heparin. Eur. J. Biochem. 60; 51

42. D'Alessio J.M., S.R. Spindler y M.R. Paule (1979) — DNA-dependent RNA polymerase II from Acanthamoeba castellanii. Large Scale Preparation and Subunit Composition. J. Biol. Chem. 254; 4085

43. Paule M.R. (1981) Comparative subunit composition of the eukaryotic nuclear RNA polymerase. TIBS—May 1981. pp 12f

Molecular Structures of Nuclear class I,II,III-Dependent RNA Polymerases. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72 (1); 384

45. Jacob F. y J. Monod (1961) Genetic regulatory mechanisms in the Synthesis of proteins. J. Mol. Biol. 3; 318

46. Serfling E.; M. Jasin y W. Schaffner (1985) Enhancers and eukaryotic gene transcription. Trends in Genetics 1 (8); 224

47. Hu S. y J.L. Monlay (1981) DNA Sequence required for initiation of transcription in vitro from the major late promoter of Adenovirus 2. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78 (2); 820

48. Sassone-Coris P., J.P. Dougherty, B. Wasylyk y P. Chambon (1984) Stimulation of in vitro Transcription from heterologous promoters by the simian virus 40 enhancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81; 308

49. Farnham P.J. y R.T. Schimke (1985) Transcriptional Regulation of mouse Dihydrofolate Reductase in the cell cycle. The Journal of Biological Chemistry 260 (12); 7675

50. Vigneron M., H.A. Barrera-Saldaña, D. Baty, R.E. Everett y P. Chambon (1984) Effect of the 21-bp repeat upstream element on in vitro Transcription from the early and late SV-40 promoters. The EMBO Journal 3 (10); 2373

51. Jongstra J., T.L. Reudelhuber, P. Oudet, C. Benoist, Ch. Chae, J.M. Jeltsch, D.J. Mathis y P. Chambon (1984) Induction of altered chromatin structures by simian virus 40 enhancer and promoter elements. Nature. 307; 708

52. Tsai S. Y., M. Tsai y B. W. D'Malley (1981a) Specific 5' flanking sequences are required for faithful initiation of

in vitro transcription of the ovalbumin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78 (2); 879

53. Davison B L., J.M. Egly, E.R. Mulvihill y P. Chambon (1983) Formation of stable preinitiation complexes between eukaryotic class B transcription factors and promoters sequences. Nature 301; 680

54. Banerij J., S. Rusconi y W. Schaffner (1981) Expression of a globin gene is enhanced by remote SV-40 DNA Sequences. Cell 27; 299

55. Moreau P., R. Hen, B. Wasylyk, R. Everet, M-P. Gaub y P. Chambon (1981) The SV-40 72 base pair repeat has a striking effect on gene expression both in SV-40 and other chimeric recombinants. Nucl. Acids Res. 9; 6047

56. Fromm M. y P. Berg (1983) Simian Virus 40 early-and late-region promoter functions are enhanced by the 72 base pair repeat inserted at distant locations and inverted orientations. Mol. Cell. Biol. 3; 991

57. Hen R., E. Borrelli, P. Sassone-Corsi y P. Chambon (1984) An enhancer element is located 340 base pairs upstream from the Adenovirus-2 E 1A' Capsite. Nucleic Acid Research. 11 (24); 8747

58. Tjian Robert (1981) T antigen binding and the control of SV-40 Gene Expression. Cell 26; 1

59. Tsai S.Y., M-J. Tsai, L.E. Kops, P.P. Minghetti y B.W. O'Malley (1981b) Transcription Factors from Oviduct and HeLa Cells are Similar. The Journal of Biological Chemistry. 256 (24); 13,055

polymerase. *Nature* 223 (5211); 1107

70. Travers A.A., R.I. Kamer y R.F. Schleif (1970) Factor Necessary for Ribosomal RNA Synthesis. *Nature* 228: 748

71. Travers A. (1976) RNA polymerase specificity and the control of growth. *Nature* 263; 641

72. Filner P., J.L. Wray y J.E. Varner (1969) Enzyme Induction in Higher Plants. Environmental or Developmental changes cause many enzyme activities of higher plants to rise or fall. *Science* 165; 358

73. Wangh L.J. y J. Knowland (1975) Synthesis of Vitellogenin in Cultures of Male and Female frog liver regulated by Estradiol Treatment in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 72(8); 3172

74. Jakowlew S.B., R. Breathnach, J.M. Jeltsch, P. Masiakowski y P. Chambon (1984) Sequence of the pS 2 mRNA induced by estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Nucleic Acids Research* 12 (6); 2861

75. Schwartz R.J., R.W. Kuhn, R.E. Buller, W.T. Schrader y B.W. D'Malley (1976) Progesterone-binding Components of Chick Oviduct. In vitro effects of purified hormone receptor complexes on the initiation of RNA synthesis in chromatin. *J. Biol. Chem.* 251(17); 5166

76. Tasi M-J., S.Y. Tsai, Ch.W. Chang y B.W. D'Malley (1978) Effect of estrogen on gene expression in the Chick Oviduct. In vitro Transcription of the Ovalbumin gene. *Biochim. Biophys. Acta* 521: 689

77. Pastan I. (1972) Cyclic AMP. This comparatively small

molecule is a "second messenger" between a hormone and its effects within the cell. It operates in cells as diverse as bacteria and cancerous animal cells

78 Curnam D M y R D Palmiter (1981) Transcriptional Regulation of the Mouse Metallothionein-I Gene by Heavy Metals. *J. Biol. Chem.* 256 (11): 5712

79 Leff T R Elkaim, C R Goding, P. Jainot, P. Sassone-Corsi, M. Perricaudet, C. Kedinger y P. Chambon (1984) Individual Products of the Adenovirus 12 S and 19 S E1a mRNAs Stimulate viral E1a and E1b expression at the transcriptional level *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 4381

80. Friedman D.I., A.T. Schauer, M R. Baumann, L.S. Baron y S.L. Adhya (1981) Evidence that ribosomal protein S-10 participates in control of transcription termination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78 (2): 1115

81. Burgess R.A., A. Travers, J.J. Dunn y E.K.F. Bautz (1969) Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature* 221: 43

82 Doi R. H , T. Kudo, C D Dickel, M. Sharpe-Heyes y Shing Chang (1982) Functions of Bacillus subtilis RNA polymerase core-associated polypeptides, pp 58 En D. Schlessinger (ed.) *Microbiology-1982 American Society for Microbiology, Washington, D C E U A.*

83 Detke S. y M R Paule (1975) DNA-Dependent RNA polymerases from Acanthamoeba castellanii: Properties and levels of Activity during Encystement. *Biochim. Biophys. Acta* 383: 67

84. Tyler A. y B.S. Tyler (1970) Informational Molecules and Differentiation, pp 42 En D.A. Schjeide y J. de Vellis (eds.) Cell Differentiation. Van Nostrand Reinhold Company, E.U.A.

85. De Robertis E.D.P., F.A. Saez y de Robertis Jr. (1975) Cell Biology, pp 441 W.P. Saunders Company, Toronto, Canada

86. Landfear S.M., P. Lefebvre, S. Chung y H.F. Lodish (1982) Transcriptional Control of Gene Expression During Development of Dictyostelium discoideum. Molecular and Cellular Biology 2 (11); 1417

87. Hahn W.E. y R. Church (1970) Transcriptional Patterns During Differentiation, pp 119. En D.A. Schjeide y J. de Vellis (eds.) Cell Differentiation. Van Nostrand Reinhold Company, E.U.A.

88. Kudo R.R. (1977) Protozoology. pp 518 Charles C. Thomas Publisher Springfield, Illinois. E.U.A.

89. Mc. Connachie E.W. (1955) Studies on Entamoeba invadens Rodhain 1934 in vitro and its relationship to some other species of Entamoeba. Parasit. 45; 452

90. Brown H. (1984) Protozoarios Parasitos, pp 17. Parasitologia Clinica. Editorial Interamericana S.A. Mexico. 7 reimpression

91. Stevens A.R. y P.F. Pachles (1973) RNA synthesis and Turnover during density inhibited Growth and Encystement of Acanthamoeba castellanii. The Journal of Cell Biology 57; 525

92. Neff R.J., S.A. Ray, W. Benton y M. Wilborn (1964) Induction of Synchronous Encystement (Differentiation) in Acanthamoeba sp. Methods in Cell Physiol.

93. Mc. Connachie E.W. (1969) The Morphology Formation and Development of cysts of *Entamoeba*. *Parasitology* 59; 41
94. Diamond L.S. y I.L. Bartgis (1970) *Entamoeba moshkovskii* axenic cultivation. *Experimental Parasitol.* 28; 171
95. Diamond L.S. (1968) Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *Entamoeba* like Amoeba. *J. Parasitol.* 54; 1047
96. Meerovitch E. (1958) Some biological requirements and host-parasite relation of *Entamoeba invadens*. *Can. Zoology* 36; 513
97. Rengpien S. y C.B. Bailey (1975) Differentiation of *Entamoeba*. A new medium and optimal conditions for axenic encystation of *Entamoeba invadens*. *J. of Parasitology* 61; 24
98. Balamuth W. (1961) Effects of some environmental factors upon growth and encystation of *Entamoeba invadens*. *Journal of Parasitology* 48; 101
99. Mata-Cardenas B.D. y S. Said-Fernández (1986) Síntesis de pared celular en cultivos axénicos de *Entamoeba histolytica* mantenidos en medio PEHPS. *Arch. Invest. Med.* (en prensa)
100. Spindler S.R., J.M. D'Alessio, G.L. Duester y M. R. Paule (1978b) DNA dependent RNA polymerase III from *Acanthamoeba castellanii*. A rapid procedure for the large scale preparation of homogeneous enzyme. *J. Biol. Chem.* 253; 6242
101. Rudick V.L. y R.A. Weisman (1973) DNA-dependent RNA-polymerase from Trophozoites and Cyst of *Acanthamoeba castellanii*. *Biochim. Biophys. Acta* 299; 91
102. Schinke R.T., R. Palacios, R.D. Palmer y R.E. Rhoads

(1973) Hormonal regulation of Ovalbumin Synthesis in Chick Oviduct, pp 123 En Kenney F.T., B.A. Hamkalo, G. Favelukes y A.J. Thomas (eds.) Gene Expression and its regulation. Plenum Press, New York. E.U.A.

103. Perretta M., A. Valenzuela y L. Valladares (1973) mRNA synthesis in erythropoiesis: Specific effect of erythropoietin on synthesis of DNA-like RNA, pp 137. En Kenney F.T., B.A. Hamkalo, G. Favelukes y A.J. Thomas (eds.) Gene Expression and its regulation. Plenum Press. New York. E.U.A.

104. Roeder R.G. (1974) Multiple forms of deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase in Xenopus leavis. Levels of activity during oocyte and embryonic development. J. Biol. Chem. 249; 29

105. Lau A.S., S. Baliga, R.K. Roy, S. Sakar y H. N. Munro (1980) Synthesis and Processing of RNA by isolated human placental nuclei. Placenta 1; 169

106. Weller D.L., A. Richman y Ch. Specht (1981a) Ribonucleasa of Entamoeba invadens. Molecular and Biochemical Parasitology 4;

107. Weller D.L. y A. Richman (1981b) A simple procedure for partial purification of an RNAase of Entamoeba invadens. Can. J. Microbiol. 27; 856

108. Ikeda J. y H. Saito (1976) RNA polymerase in Vegetative Cells of Bacillus subtilis I Purification and Properties of RNA Polymerase L and L . J. Biochem. 80; 743

109. Gross C., F. Engbaek, T. Flammang y R. Burgess (1976) Rapid Micromethod for the Purification of Escherichia coli

