

224
23



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Análisis de secuencias de ADN genómico de aislados de Trypanosoma cruzi con variación fenotípica.



T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G A

P r e s e n t a :

María del Pilar Beltrán Nadal



México, D. F.

1986



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
a) Antecedentes	2
b) Caracterización de diferentes poblaciones de <u>T. cruzi</u>	5
c) Reasociación de ADN	9
d) Organización del genoma de <u>T. cruzi</u>	15
e) Objetivo	15
MATERIALES Y METODOS	
a) Aislados	17
b) Cultivo	17
c) Cosecha	18
d) Aislamiento del ADN	18
e) Rompimiento del ADN	19
f) Determinación del tamaño de los fragmentos de ADN	20
g) Separación de secuencias únicas y repetidas	20
h) Curvas de Reasociación	22
i) Determinación de los puntos de fusión (T _m)	23
RESULTADOS	25
DISCUSION	43
BIBLIOGRAFIA	48

RESUMEN

En este trabajo se estudia el grado de homología entre las secuencias nucleotídicas de tres aislados de T. cruzi de diferente origen geográfico (México, Venezuela y Argentina), se determina el porcentaje de secuencias que comparten y su divergencia.

Para determinar esta homología se utilizó la técnica de reasociación del ADN y cromatografía térmica de las secuencias compartidas, aplicada a las secuencias nucleotídicas únicas y repetidas por separado.

Los resultados indican que el material genético del aislado argentino está representado prácticamente en su totalidad y sin divergencia en sus secuencias únicas en el genoma del aislado venezolano. Y el aislado mexicano carece de aproximadamente 7% de las secuencias tanto repetidas como únicas que presenta el aislado argentino y las secuencias que sí comparte muestran una ligera divergencia de 1.45 y 2.2% en repetidas y únicas respectivamente.

INTRODUCCION

a) Antecedentes

Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi es un protoctista flagelado descubierto en 1908 por Carlos Chagas en Brasil. Es el causante de la enfermedad de Chagas y es transmitido por vectores hematófagos. T. cruzi pertenece:

Phylum Protozoa

Subphylum Sarcomastigophora

Superclase Mastigophora

Clase Zoomastigophora

Orden Kinetoplastida

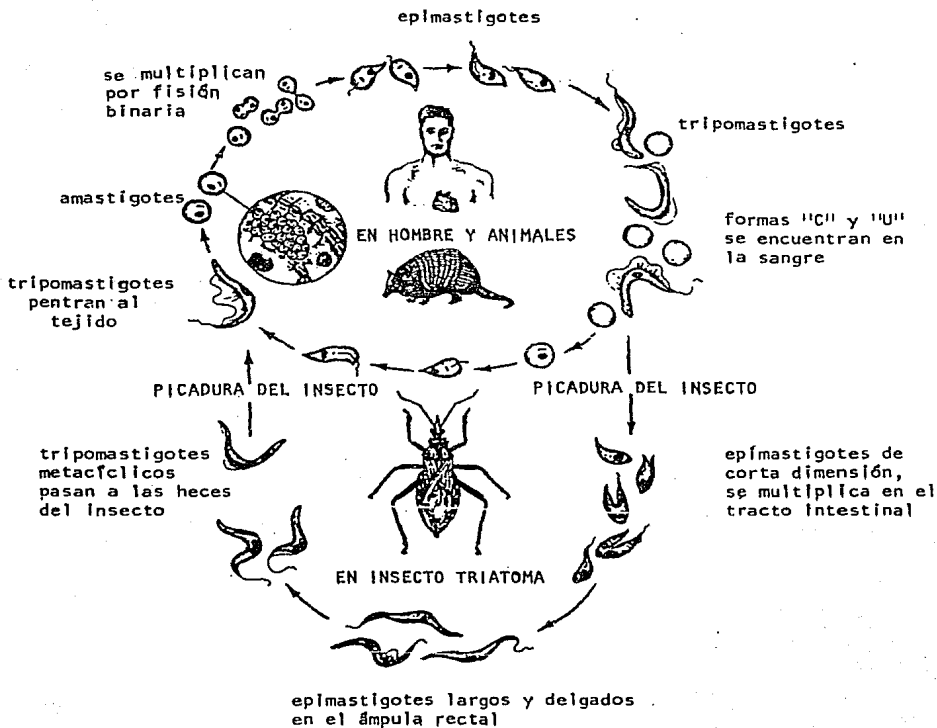
Familia Trypanosomatidae (46)

Puede encontrarse en tres formas morfológicas diferentes: la amastigota, la epimastigota y la tripomastigota. La forma amastigota presenta un flagelo muy pequeño, es esférica u ovalada, de 2 μm de diámetro y es la forma reproductiva intracelular en el mamífero hospedero; la epimastigota tiene el cinetoplasto anterior al núcleo, presenta flagelo, tiene 20 μm de largo, es la forma reproductiva en el tracto digestivo del vector y el componente principal en cultivos axénicos; la forma tripomastigota tiene el cinetoplasto posterior al núcleo, mide 20 μm de largo, es la forma infectiva, pero no reproductiva, y se encuentra en el recto del vector. Los tripomastigotes en el mamífero hospedero llevan la infección de una célula a otra y también pueden iniciar la infección en el vector hematófago cuando éste los ingiere.

La diferenciación del organismo se realiza como sigue: los vectores hematófagos (insectos triatomas) se infectan con los tripomastigotes presentes en la sangre periférica de hospederos reservados (vertebrados). Los tripomastigotes se transforman y se reproducen como epimastigotes, en el intestino del vector; en el transcurso de 2 a 4 semanas se desarrollan como tripomastigotes metacíclicos, en el ampulla rectal del vector. Esta forma infectiva es excretada en las heces y puede infectar al mamífero hospedero, a través del contacto de las heces con mucosas o pequeñas heridas en la piel. Ya en el hospedero, al cabo de 1 a 2 semanas, el parásito migra probablemente del sistema reticuloendotelial al torrente sanguíneo, en donde permanece por tiempo indeterminado, hasta que invade las células de algunos tejidos, en músculo y células neuronales es donde se observan mayores lesiones. Al encontrarse en las células, el tripanosoma se transforma en la forma amastigota, la cual se multiplica y produce pseudoquistes. Transcurridos 5 días, los amastigotes se transforman en tripomastigotes y rompen el pseudoquiste, entran al torrente sanguíneo y continúan la infección al invadir nuevos tejidos.

Lo anterior se ilustra en la figura del ciclo de vida de T. cruzi que se presenta a continuación.

CICLO DE VIDA DE TRYPANOSOMA CRUZI



La distribución del parásito está ampliamente extendida en América desde la frontera entre Canadá y Estado Unidos hasta Argentina. En México se han reportado 119 casos de infección en humanos por T. cruzi en 15 estados de la República Mexicana (1).

La enfermedad de Chagas puede presentarse en diversas fases: una aguda caracterizada por miocarditis e invasión de músculo liso, esquelético, células gliales y del sistema reticuloendotelial; una fase crónica, con megaesófago, megacolon, y algunas veces, megatráquea; y, una fase latente asintomática.

b) Caracterización de diferentes poblaciones de T. cruzi

Se han realizado diversos estudios respecto de la heterogeneidad de los aislados de T. cruzi, a nivel fenotípico. Entre ellos pueden señalarse los grados de infectividad en hospederos animales y humanos (2); los tamaños: el desarrollo de aislados sudamericanos en vectores de norteamérica muestra que la forma metacíclica del parásito es mucho menor, y viceversa (3); la relación parásito-vector se ha hecho con vectores de Panamá y Argentina; los primeros no son infectados cuando el vector se alimenta de sangre de pacientes con enfermedad de Chagas de Argentina, y viceversa (4).

Existe una gran cantidad de evidencias que muestran que diferentes poblaciones de T. cruzi invaden selectivamente órganos y tejidos; los más frecuentes son: el páncreas, la vejiga, el te-

jido adiposo, el músculo liso, esquelético y cardiaco y el sistema nervioso central. Los estudios realizados por Melo y Brenner (5) muestran que dos aislados como el Y, obtenido de un paciente en fase aguda, y Berenice, de un caso crónico asintomático, tienen gran afinidad por el bazo, el hígado y la médula ósea, mientras que otro aislado denominado Cl, de un Triatoma infestans prácticamente no parasitó a ninguno de estos órganos. Por otra parte, Berenice y ABC, aislado de un caso crónico con megacolon y miocarditis, afectan el músculo liso de estos órganos más severamente de lo que lo hacen Y y Cl.

También, se han observado diferencias geográficas de los síndromes de Chagas: En Paraguay, Argentina, Chile y Bolivia existen numerosos casos con megacolon y pocos con megaesófago, en Brasil hay miles con megaesófago y megacolon; en Venezuela hay pocos casos con megaesófago o megacolon, y lo más frecuente es la cardiomiopatía crónica (6).

La caracterización con isoenzimas (7,8) muestra cierta correlación entre el patrón isoenzimático y la patología, así, la enfermedad de Chagas, sin megacardia, megaesófago ni megacolon, endémica en Venezuela, es causada predominantemente por organismos con un determinado patrón isoenzimático; cuando se agrupa por patrones isoenzimáticos a una población se le denomina zimodema. Otro zimodema diferente se encontró al oeste y centro del Brasil, donde la enfermedad de Chagas está caracterizada por síndromes "mega", y se identificó un último zimodema, que se encontró tan-

to en Venezuela como en el Valle del Amazonas, donde T. cruzi es silvestre y las infecciones en humanos son raras.

Galván et al (9) con estudios de isoenzimas en T. cruzi de Costa Rica, México, Venezuela y Argentina, reportan que la población de Argentina presenta una variación génica más alta, que se manifiesta como valores mayores de polimorfismo enzimático y heterocigocidad y que la divergencia evolutiva, calculada a partir de los valores de distancias génicas, es de 0.362×10^6 años respecto de las poblaciones de Costa Rica, México y Venezuela.

También se han encontrado diferencias inmunológicas en distintos aislados de T. cruzi, como por ejemplo la susceptibilidad de lisis por complemento con suero de humano normal (10), así como la respuesta inmune celular (11). Otras diferencias observadas con distintos aislados de T. cruzi son la susceptibilidad a drogas (12, 13) y la incidencia de parasitismo de placenta (14). A nivel genotípico se ha estudiado el ADN de cinetoplasto de varios aislados de T. cruzi con enzimas de restricción, obteniéndose patrones de digestión diferentes, a cuyos grupos se les denomina esquizodemas (15, 16).

En este contexto, es de esperarse que también exista una variabilidad genómica considerable intraespecífica. Los estudios de reasociación del ADN y el análisis de fusión de los híbridos, en erizo de mar (37), de distintas especies y localizaciones geográficas, pusieron de manifiesto la utilidad de estas técnicas en el análisis de dicha variabilidad.

A la fecha, se tiene un marco general de organización genómica que puede servir como criterio de referencia en en análisis de genomas particulares.

c) Reasociación de ADN

La mayoría de los organismos vivos mantienen su información genética en las secuencias de ácido desoxirribonucleico. En el genoma de procariotes la mayoría de las secuencias se encuentran representadas una sola vez, únicamente algunos genes como los que codifican para ARNt, ARNr y secuencias de inserción se han encontrado en copia múltiple. Sin embargo, los organismos eucariotes que tienen genomas mayores poseen secuencias nucleotídicas en diferentes niveles de multiplicidad y algunas que sólo se encuentran una vez en el genoma haploide (17). La cantidad de ADN copia múltiple varía en los diferentes grupos, por ejemplo: el genoma de la mayor parte de los hongos primitivos (18, 19) y de algunas algas (20) está formado básicamente de secuencias únicas y sólo del 2 al 18% está formado de secuencias repetidas. En el ADN nuclear de organismos de un orden taxonómico más alto, ya sea en plantas o en animales, el porcentaje de ADN repetido es mayor, por ejemplo en las angiospermas es de 40 al 85% y en vertebrados e invertebrados superiores del 25 al 60% (21a24). Se considera que los genomas de eucariotes tienen mucho más ADN del que necesitan para codificar a todos los genes expresados durante su ciclo de vida (25, 26)

Britten y Kohne en 1968 (17) reportaron que algunas secuencias nucleotídicas se encontraban repetidas en el genoma. Así definieron 3 componentes generales del genoma de eucariotes. Estos componentes se pueden clasificar como únicos, moderadamente repetidos, con 10 a 10^4 copias por genoma (haploide) y altamente repetidos, con

10⁵ o más copias. Las secuencias únicas contienen, aunque no exclusivamente, los códigos para proteínas; las secuencias altamente repetidas consisten en secuencias cortas repetidas en tandem, parecen no estar interdispersas con otro tipo de secuencias, se han asociado con componentes estructurales de los cromosomas, principalmente con las posiciones centroméricas y teloméricas (27, 28), pero su función aún no se conoce; y las secuencias moderadamente repetidas, que se pueden dividir en cortas y largas, se encuentran interdispersas con secuencias únicas e incluyen los genes de histonas y de ARN ribosomal (29).

El arreglo de las secuencias moderadamente repetidas puede ser básicamente de 2 tipos: Xenopus, con ADN repetido de longitudes entre 200 y 400 nucleótidos, interdisperso entre secuencias únicas de longitudes de 1,000 a 2,000 nucleótidos (30). Este arreglo se ha encontrado en la mayoría de los genomas de eucariontes y se le denomina "Período Corto de Interdispersión" y el segundo tipo, Drosophila (31) donde las secuencias únicas y las repetidas son muy largas (de muchos miles de nucleótidos) y se les denomina "Período Largo de Interdispersión". El período largo de interdispersión se ha demostrado en algunos insectos como la mosca del vinagre (31), en un quironómido (32), en la abeja (33), en un nemátodo (34), en un hongo de agua (19), y en el hámster sirio (35).

Un hallazgo importante es que las secuencias repetidas parecen ser más estables evolutivamente, que las secuencias únicas, pues en éstas últimas se ha manifestado una mayor variabilidad inter-específica (36, 37, 38).

Los estudios de repetición y arreglo de secuencias nucleotídicas se basan en las técnicas de reasociación y determinación de puntos de fusión de los híbridos, por lo que es pertinente discutirlos con mayor amplitud. Los parámetros que controlan la reasociación de las secuencias complementarias del ADN son la concentración de las moléculas y el tiempo de incubación. El producto de la concentración inicial del ADN (C_0 en moles de nucleótidos/litro) en función del tiempo de incubación (t , segundos) se abrevia $C_0 t$. La reasociación del ADN se puede ver a través de una gráfica del porcentaje del ADN que se reasoció, en función del logaritmo del $C_0 t$. La reacción se monitorea usando isótopos radioactivos (39).

La reasociación del ADN es bimolecular y se acerca a una cinética de 2o orden. La velocidad de reasociación por lo tanto se describe con la siguiente ecuación:

$$\frac{dC}{dt} = - kC^2$$

donde C es la concentración de las secuencias en hélice sencilla en el tiempo t y k es la constante de velocidad de reasociación. Integrando esta ecuación entre los límites de la concentración inicial de ADN, C_0 , en el tiempo $t=0$, y la concentración C que permanece en hélice sencilla después de un tiempo t , se tiene:

$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{1 + kC_0 t}$$

Cuando la mitad de la reacción se ha llevado a cabo:

$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{2} = \frac{1}{1 + kC_0 t_{1/2}}$$

Por lo tanto, al despejar:

$$C_0 t_{1/2} = \frac{1}{k}$$

Así, la reasociación de un ADN se puede describir por la constante de velocidad, k , dada en litros x molas de nucleótido⁻¹ x segundos⁻¹, o bien en términos de su recíproco, el $C_0 t_{1/2}$ dado en molas de nucleótidos x segundos x litro⁻¹.

Las curvas de reasociación que se obtienen con diferentes genomas, dependen del tamaño de éstos, es decir, para una C_0 fija, mientras más complejo sea un genoma (longitud total de secuencias diferentes), requerirá de mayor tiempo para que, por choques al azar, encuentre una secuencia complementaria; por otra parte, la probabilidad de reasociación se incrementa en función del número de repeticiones en que se encuentra una secuencia y, por lo tanto, el tiempo para que esto se realice es menor.

Britten y Kohne (17) al trabajar con secuencias nucleotídicas sintéticas de poli U + poli A y ADN de E. coli (4.2×10^6 pares de bases), encontraron que el $C_0 t_{1/2}$ en que se lleva a cabo la reasociación de ADN depende del tamaño del genoma y que la reacción de reasociación de cada grupo de secuencias representan un componente cinético que requiere de 2 órdenes de magnitud del $C_0 t$ para realizarse. Por lo tanto, al obtener curvas de reasociación que se desarrollan en más de 2 órdenes de magnitud del $C_0 t$, se interpreta que poseen más de un componente cinético.

Tomando como parámetro el tamaño del genoma de E. coli se puede establecer la relación entre el $C_0t_{1/2}$ de la reacción y el número de pares de nucleótidos que posea otro genoma, siempre y cuando no existan secuencias repetidas, ya que al tomar en cuenta la cantidad de ADN del total del genoma que está siendo representada en ese componente cinético (de secuencias repetidas) sería excesivo para el tamaño y cantidad obtenidas en su cinética de reasociación, lo cual se explica por el número de repeticiones en las que se encuentran las mencionadas secuencias (17).

Las curvas de reasociación están influidas por las siguientes condiciones experimentales:

- El criterio. La diferencia entre la temperatura media de fusión, T_m , del ADN y la temperatura de incubación se denomina criterio. La temperatura controla la restricción de la reacción de reasociación. A temperaturas altas los pares de bases que reasocian están mejor hechos. Conforme la temperatura de incubación baja, los pares de bases se forman con grados más altos de mal apareamiento. Para secuencias únicas, la tasa de reasociación tiene un óptimo en el intervalo de 15 a 30°C abajo de la temperatura media de fusión (40).
- La longitud de las moléculas de ADN. La tasa de reasociación es proporcional a la raíz cuadrada de la longitud de las moléculas de ADN (29).
- La concentración de sales. En una reacción de reasociación el $C_0t_{1/2}$ observado se multiplica por un factor de corrección empírico γ por concentración de sales. Conforme la concentración

de sales aumenta, la reasociación se realiza más rápidamente, por ejemplo, con buffer fosfatos neutro (BFN) 0.41 M se tiene un valor de γ de 5, es decir, el C_{0t} se multiplica en 5 veces, mientras que con BFN 0.12 M el valor de γ es 1 (29).

- La viscosidad. Disminuye la temperatura de fusión.

La determinación de los puntos de fusión de los valores terminales en las curvas de reasociación representa una estimación del apareamiento defectuoso (mismatching) entre los híbridos. Utilizando polímeros artificiales de ADN se encontró que cuando el 1% de las bases no son complementarias, la temperatura media de fusión, T_m , disminuye en 1°C (17).

La temperatura media de fusión se ha utilizado para estudiar el grado de divergencia entre los genomas de diferentes especies. Se ha encontrado que la divergencia entre ADN secuencia única de especies diferentes concuerda con la separación evolutiva ya conocida (41).

d) Organización del genoma de T. cruzi

Hasta ahora el ADN total de T. cruzi analizado mediante cinética de reasociación muestra que el genoma comprende 9% de secuencias altamente repetidas con 25,000 copias por genoma haploide, un 35% de secuencias moderadamente repetidas con reiteración de frecuencia de 26 copias por genoma haploide y 49% de secuencias únicas. Las secuencias repetidas, alrededor de 6,900, presentan el patrón largo de interdispersión, con una longitud modal de 7,800 pares de bases. La complejidad cinética del ADN total es compatible con un genoma por lo menos diploide (42).

e) Objetivo

Dado que existe una gran cantidad de evidencias fenotípicas que caracterizan a diferentes aislados de T. cruzi como: grados de infectividad en hospederos animales y humanos (2); relación parásito-vector (4); invasión selectiva de órganos y tejidos (5); diferencias geográficas de los síndromes de Chagas (6); diferentes patrones isoenzimáticos (7, 8); entre otros, es de esperarse que también exista una variabilidad genómica intraespecífica.

Para determinar el grado de homología entre las secuencias nucleotídicas de tres aislados de T. cruzi de diferente origen geográfico (México, Venezuela y Argentina), se utilizó la técnica de reasociación del ADN aplicada a las secuencias únicas y repetidas por separado. Se utilizó un criterio muy restringido para comparar sólo las secuencias que sean muy parecidas entre sí, identificando el porcentaje de secuencias que se comparten y su divergencia.

El grado de divergencia entre las secuencias que comparten los genomas de los aislados de T. cruzi mencionados se determinó por la diferencia del punto medio de fusión del duplex homólogo con los obtenidos para los duplex heterólogos, el cual indica el porcentaje de nucleótidos diferentes.

MATERIALES Y METODOS

a) Aislados

Se utilizaron tres aislados, uno proveniente de Triatoma barberi, en La Cruz, Jal., México, denominado 4; el OPS proveniente de Rhodnius prolixus, en Belén, Miranda, Venezuela; y el RA, aislado a partir de un huésped humano, en La Pampa, Argentina.

b) Cultivo

El crecimiento de los aislados de T. cruzi se llevó a cabo en medio de cultivo LIT, en botellas con agitación, a 28°C. La composición del medio LIT es la siguiente: caldo de Schaedler (infusión de hígado) 20 g; triptosa, 5 g; fosfato dibásico de sodio 5 g; cloruro de sodio 4 g; cloruro de potasio 0.4 g y dextrosa 2 g por 1,000 ml de agua. El pH de la solución se ajustó a 7.4 con ácido clorhídrico concentrado y se esterilizó en autoclave a 20 lb/pul² durante 15 minutos. Se agregó 5% de suero fetal bovino, inactivado 30 minutos a 56°C, y 0.4% de hemina (5 mg/ml, disuelta en trietanolamina al 50%).

Todos los cultivos se hicieron con una concentración inicial de 5 a 10 x 10⁶ células/ml, provenientes de cultivos mantenidos en fase logarítmica de crecimiento (40 a 60 x 10⁶ células/ml). El número de tripanosomas se determinó con un contador de células (Coulter Counter modelo F) usando una solución de cloruro de sodio al 0.85% y formaldehído al 0.07%.

El marcaje radioactivo de los tripanosomas se realizó in vivo en un cultivo de 120 ml con 1.5 mCi de timidina metil-³H. La actividad específica del ADN aislado fue de 67,000 cpm/ μ g.

c) Cosecha

Los cultivos se cosecharon en fase logarítmica centrifugando a 13,000 x g durante 10 minutos a 4°C; lavando dos veces con solución salina citrato (SSC) 1X (citrato de sodio 0.015 M, cloruro de sodio 0.15 M, pH=7) con 5 mM de EDTA.

d) Aislamiento del ADN

Los tripanosomas cosechados (1×10^6 células/ml) se resuspendieron en SSC 1X, 5mM EDTA. Se agregó sarcosil en solución (1% concentración final), agitando suavemente durante 15 minutos; se agregó pronasa preincubada 2 horas a 37°C (1 mg/ml) y se dejó incubar a 37°C durante un mínimo de 12 horas. Posteriormente se agregó NaClO₄ (1M final) y se agitó. Se realizaron 2 extracciones con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:24:1), 2 volúmenes, emulsiificando, a mano, durante 20 minutos, a 4°C. La fase acuosa se separó mediante una centrifugación a 6,800 x g, a 4°C, durante 15 minutos. La fase acuosa se dializó a 4°C contra SSC 1X (tres cambios).

La muestra obtenida se incubó con ribonucleasa A, preincubada 2 minutos a 100°C (0.1 mg/ml), durante 30 minutos, a 37°C. Se hicieron 2 extracciones más utilizando 2 volúmenes de cloroformo-

alcohol isoamílico (24:1). Los 3 cambios de diálisis se hicieron contra SSC 0.1X a 4°C,

La pureza de las muestras de ADN se determinó por absorbencia, a 280 nm para detectar aromáticos, 260 nm para ácidos nucleicos y 230 nm para enlaces peptídicos, en un espectrofotómetro (Carl Zeiss).

De la preparación de ADN ^3H del aislado argentino se tomó una alícuota para determinar las cpm/ μg de ADN, utilizando Scintiverse (Fisher Scientific Co.) como líquido de centelleo, y un espectrómetro de centelleo líquido (Packard, modelo 3390).

e) Rompimiento del ADN

Las preparaciones de ADN se rompieron utilizando un homogenizador Virtis 60K, en un baño de hielo y agua a 4,500 rpm durante 20 minutos en buffer fosfatos neutro (BFN) 0.12 M. Una segunda ruptura de la muestra de ADN se realizó en BFN 0.12 M, glicerol 66%, acetato de sodio 0.01 M, con 50,000 rpm 20 minutos en un baño de hielo seco y etanol.

Después de la primera ruptura del ADN, se purificó de nuevo con una solución de MUP (urea 8 M; BFN 0.12 M; NaClO_4 1 M; EDTA 0.01 M; SDS 1%), de la siguiente manera: se aplicó la preparación de ADN en hidroxapatita (HAP) con BFN 0.12 M (1 g HAP/100 μg ADN), en una columna de vidrio con refrigeración, calibrada a 40°C; en estas condiciones el ARN de hélice sencilla se eluye de la columna.

Se agregó 1 volumen de MUP poco a poco y posteriormente se lavó con 5 volúmenes de BFN 0.12 M. La elución del ADN de la columna se hizo aumentando la temperatura del baño María a 60°C y con BFN 0.41 M. El paso del material por la columna se siguió con un monitor de absorbencia de flujo continuo (ISCO modelo UA-5). Para quitar el exceso de urea se centrifugó la muestra a 10,000 x g. La preparación de ADN se dializó contra EDTA 0.01 M a temperatura ambiente con dos cambios de una hora cada uno; contra dos cambios de EDTA 0.01 M a 4°C y contra tres cambios de EDTA 0.001 M a 4°C.

f) Determinación del tamaño de los fragmentos de ADN

Se hizo mediante electroforesis en placa de agarosa al 0.8% en una solución de tris-borato-EDTA (Tris base 90 mM; EDTA 2.5 mM; H_3BO_3 90 mM, pH=8.2), utilizando el fago λ , digerido con la enzima de restricción Hind III, como marcador de tamaños. La electroforesis se corrió con voltaje constante, 40 V, a temperatura ambiente. Se tiñeron las bandas de ADN con una solución de bromuro de etidio (3 μ g/ml) durante 15 minutos y se observaron bajo luz ultravioleta.

g) Separación de secuencias únicas y repetidas

Con base en la cinética de reasociación de T. cruzi realizada por Castro et al (42), con ADN del aislado mexicano cortado en fragmentos de 380 pares de bases, se mostró que las secuencias que reasocian a C_0t 2 corresponden a una fracción enriquecida de secuencias repetidas y las secuencias que reasocian a C_0t 8, in-

cluyen la totalidad de las secuencias repetidas con una pequeña contaminación de secuencias únicas. Por lo tanto como paso inicial se calculó el C_0t mediante la siguiente relación:

$$C_0t \sim \frac{\text{Absorbencia}_{260} \times \text{coeficiente de velocidad} \times \text{tiempo (horas)}}{2}$$

El coeficiente de velocidad se refiere al ajuste por la concentración de sales utilizada en la reacción.

La preparación de ADN del aislado argentino, marcado con 3H , se desnaturalizó en ebullición durante 10 minutos; inmediatamente después se puso a incubar a $64^\circ C$, durante el tiempo necesario para obtener el C_0t 2. La muestra se enfrió con un baño de hielo y alcohol de 96° para parar la reacción de reasociación.

Para separar la fracción renaturalizada que contiene la fracción enriquecida en secuencias repetidas, la muestra se pasó por una columna de HAP en BFN 0.12 M, calibrada a $64^\circ C$ utilizando un termomix (Colora Modelo ET 5). Se colectó el material que no se renaturalizó eluyendo con BFN 0.12 M. Para despegar la fracción que sí renaturalizó se eluyó con BFN 0.41 M y se tomó una alícuota para determinar la concentración del ADN usando como indicador las cpm.

Para separar las secuencias únicas, la preparación de ADN 3H se incubó en condiciones para C_0t 8, siguiendo el procedimiento arriba descrito; en este caso, la fracción que no renaturalizó corresponde a la porción enriquecida con secuencias únicas.

h) Curvas de Reasociación

Los experimentos de reasociación se hicieron a un criterio muy restringido de 22.4°C abajo del punto de fusión del ADN total. El ADN marcado radioactivamente, denominado el marcador, se pone a reasociar con un exceso de ADN sin marca, denominado el gufa de la reacción, en una relación de 1:500. Las mezclas de ADN se ajustaron a las concentraciones de sales que permitieran que la reasociación ocurriera en un lapso razonable de tiempo, siendo BFN 0.12 M para secuencias repetidas y 0.41 M para secuencias únicas.

Las mezclas de ADN se agitaron y se separaron en fracciones colocándolas en capilares de vidrio sellados a la flama por ambos extremos. Las mezclas de ADN en los capilares se desnaturalizaron en ebullición durante 10 minutos e inmediatamente se pusieron en el baño de incubación. Para detener la reacción, se pasaron a un baño de hielo y alcohol de 96°, a los diferentes tiempos previstos.

Para secuencias repetidas los valores de C_0t analizados fueron de 10^{-2} a 10^2 y para las secuencias únicas fueron de 10^{-1} a $10^{3.1}$. Con ello se da tiempo en exceso para que las secuencias correspondientes se reasocien.

Una vez terminada la reacción, las muestras se revisaron por cromatografía en HAP, diluyendo cada punto 20 veces (0.5 ml), en BFN 0.12 M frío, para evitar que la reasociación continúe, el capilar se enjuagó varias veces y se aplicó la muestra diluida a la columna de HAP, previamente calibrada a 64°C.

La hélice sencilla se eluyó con 0.12 M y la hélice doble con 0.41 M de BFN; a estas fracciones se les agregaron 12 ml de Scinti-Verse y se agitó hasta que se formó un gel. Antes de medir la radioactividad de las muestras, se dejaron un mínimo de 10 minutos en la oscuridad a 12°C, para evitar la alteración de las lecturas por el efecto de la temperatura y la luz.

1) Determinación de los puntos de fusión (T_m)

Para determinar los puntos de fusión de las diferentes mezclas se utilizaron los capilares con las fracciones reasociadas en el último C_{ot} , es decir, $C_{ot} = 10^2$ en secuencias repetidas y $C_{ot} = 10^{3.1}$ en secuencias únicas.

La mezcla de reacción de cada capilar se diluyó 20 veces en BFN 0.12 M frío, enjuagando varias veces el capilar, y se aplicó a una columna de HAP en BFN 0.12 a 64°C. El material se eluyó con el mismo buffer hasta completar 6 ml volumen necesario para eluir todo el ADN de hélice sencilla. Se colectó esta fracción y se agregaron 6 ml del buffer, esperando 2.5 minutos para que se alcanzara la temperatura anterior, enseguida se incrementó la temperatura del baño María en 3°C. Transcurrido un minuto de que se alcanza la nueva temperatura, el material fusionado se eluyó por presión. Esta operación se realizó en intervalos de 3°C, desde 64°C hasta 94°C. Después de eluir el material a 94°C, el ADN que queda se eluye con BFN 0.41 M.

Al material obtenido en cada temperatura, se le agregaron 9 ml de Scinti-Verse, se agitó hasta que se formó un gel y se determinaron las cpm.

RESULTADOS

El ADN utilizado de los aislados latinoamericanos se obtuvo con una pureza adecuada, como se indica en el Cuadro 1. El tamaño de los fragmentos del ADN en promedio fue de 350 pares de bases como se puede apreciar en las Figuras 1 y 2.

En las Figuras 3 y 4 se presentan las curvas de cinética de reasociación de las secuencias repetidas y únicas de los aislados mexicano y venezolano, usando al argentino como marcador. Se observa que los puntos obtenidos en ambas curvas son muy similares. La reasociación de las secuencias repetidas tuvo que ser ajustada en el híbrido RA*-OPS ya que el tamaño de los fragmentos de OPS era de 5,800 pares de bases, en lugar de 350 pb como el resto de los aislados. Hecho el ajuste de este duplex, los tres híbridos tienen un $C_0^{+1/2}$ prácticamente igual.

Las secuencias repetidas de ADN del aislado argentino se reasociaron con sus homólogos en un 93.2% y en un 73.4% en las secuencias únicas. Revisando los porcentajes de hélice sencilla y de hélice doble en el último punto de cada curva de reasociación, se obtuvo el porcentaje de reasociación de los diferente híbridos, cuyo resultado se indica en el Cuadro 2. Se observa que el aislado venezolano (OPS) comparte prácticamente todas las secuencias repetidas con el aislado argentino (RA) así como la mayoría de las secuencias únicas. Por otra parte, el aislado mexicano (4) no tiene presentes alrededor de 7% de las secuencias únicas y repetidas de la RA.

Para obtener el punto de fusión de los híbridos obtenidos se hicieron cromatografías térmicas utilizando los últimos puntos de cada curva de reasociación, es decir, $C_{ot} = 10^2$ para secuencias repetidas y $C_{ot} = 10^{3.1}$ para secuencias únicas. Las curvas obtenidas se muestran en las Figuras 5 a 10 y el resumen de las curvas mencionadas aparece en los Cuadros 3 y 4. El punto de fusión, como ya se indicó, sirve para cuantificar el porcentaje de bases mal apareadas, donde la depresión del punto de fusión en 1°C corresponde a 1% de bases mal apareadas. En las secuencias repetidas la depresión del punto de fusión del híbrido RA*-4 en relación al homólogo RA*-RA es de 1.46°C ; sin embargo el híbrido RA*-OPS muestra un incremento en 1.53°C . En las secuencias únicas se observa una clara depresión en 2.2°C en el híbrido RA*-4 y el híbrido RA*-OPS muestra una temperatura de fusión prácticamente igual al homólogo, ya que la diferencia de 0.1°C puede incluirse en la incertidumbre inherente al termómetro utilizado.

Las gráficas para determinar el punto medio de fusión comienzan en cero ya que al colocar las mezclas del ADN se eliminan de la columna las secuencias que no reasociaron durante la incubación, cuya determinación sirve para saber el porcentaje que no es compartido con el marcador de la reacción (ADN argentino), los cuales se observan en el Cuadro 2.

Con objeto de afinar la determinación de los puntos medios de fusión se hizo un ajuste matemático de regresión polinomial de los

datos obtenidos, utilizando un programa de computación adecuado del Departamento de Matemáticas de la UAM Unidad Xochimilco. Los datos obtenidos, Cuadro 5, fueron muy similares a los obtenidos en el ajuste hecho gráficamente, simplemente se marca más el efecto pero sigue habiendo una diferencia con RA*-4 y mayor homogeneidad con RA*-OPS.

CUADRO 1
Pureza del ADN

Aislado	Relación 260/280 nm	Relación 260/230 nm
RA*	1.80	1.99
RA	1.70	1.76
OPS	1.78	2.30
4	1.63	2.30

RA* argentino marcado con ^3H

RA argentino

OPS venezolano

4 mexicano

CUADRO 2
Porcentaje de Reasociación

Secuencias repetidas	Reasociación
RA*-RA	93.2% = 100.0%
RA*-OPS	99.6%
RA*-4	93.2%
 Secuencias únicas	
RA*-RA	73.4% = 100.0%
RA*-OPS	98.3%
RA*-4	92.2%

CUADRO 3
Temperaturas de Puntos de Fusión

Secuencias repetidas	Tm °C	\bar{X}	s
RA*-RA	84.7 84.0 84.7	84.46	0.40
RA*-OPS	86.0 86.0 85.8	85.93	0.11
RA*-4	83.3 83.6 83.0	83.3	0.3

* marcado con ³H

Tm °C temperatura media de fusión a °C

CUADRO 4
Temperaturas de Puntos de Fusión

Secuencias únicas	Tm °C
RA*-RA	81.4
RA*-OPS	81.5
RA*-4	79.2

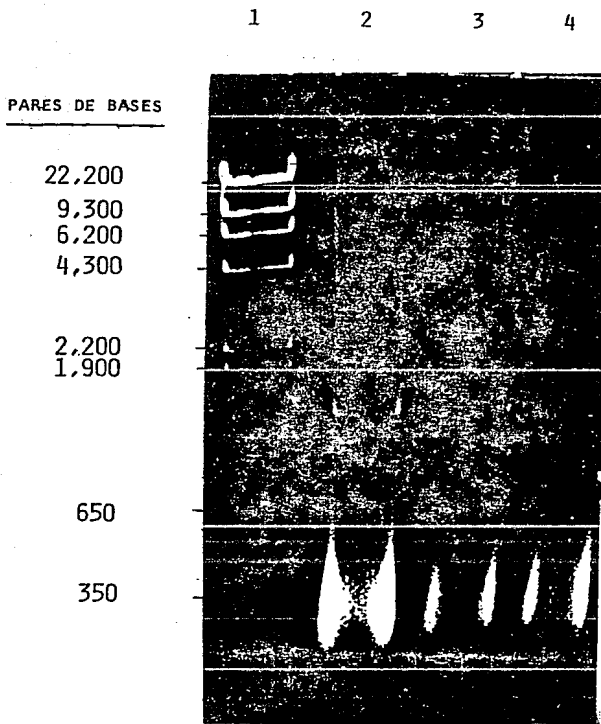
CUADRO 5

Temperaturas de Puntos de Fusión
obtenidas con Ajuste de Regresión Polinomial

<u>Secuencias repetidas</u>	<u>Tm °C</u>
RA*-RA	84.83
RA*-OPS	86.67
RA*-4	83.11
<u>Secuencias Únicas</u>	
RA*-RA	81.21
RA*-OPS	81.77
RA*-4	79.14

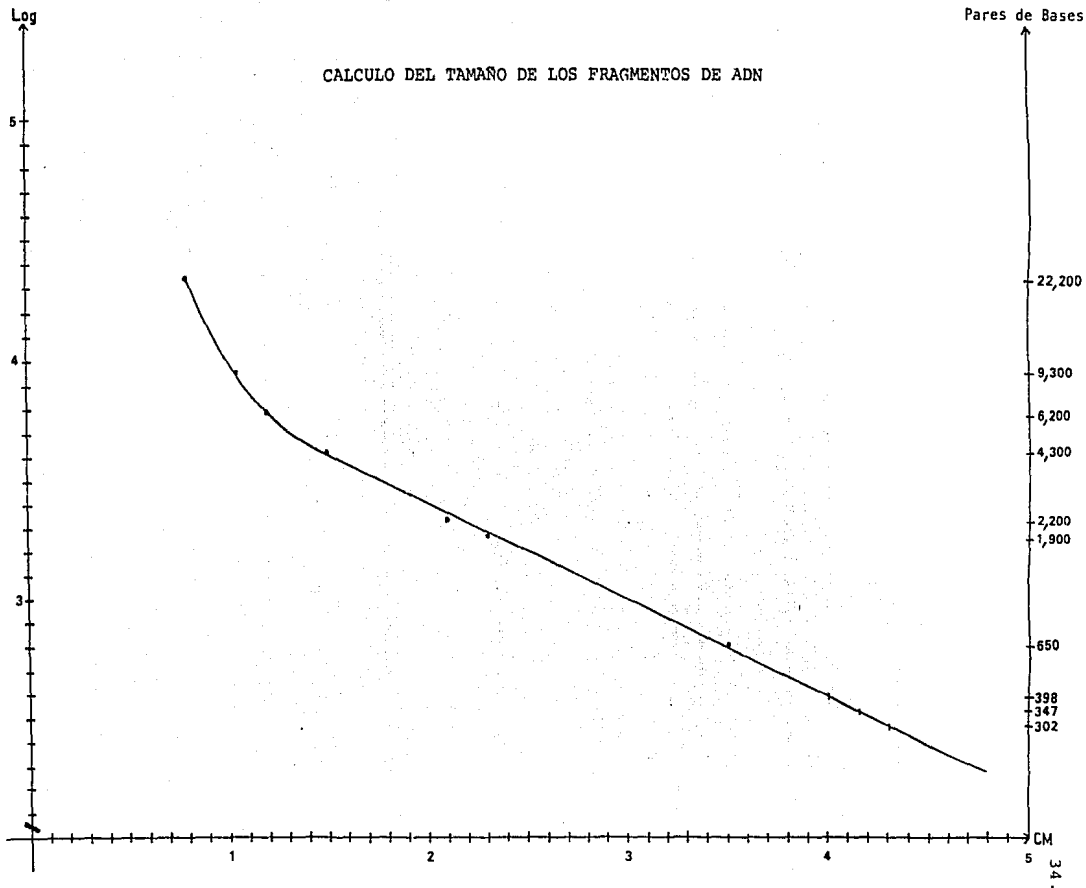
Simplemente se marca más el efecto pero sigue habiendo una diferencia con RA*-4 y mayor homogeneidad con RA*-OPS.

DETERMINACION DEL TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS DE ADN



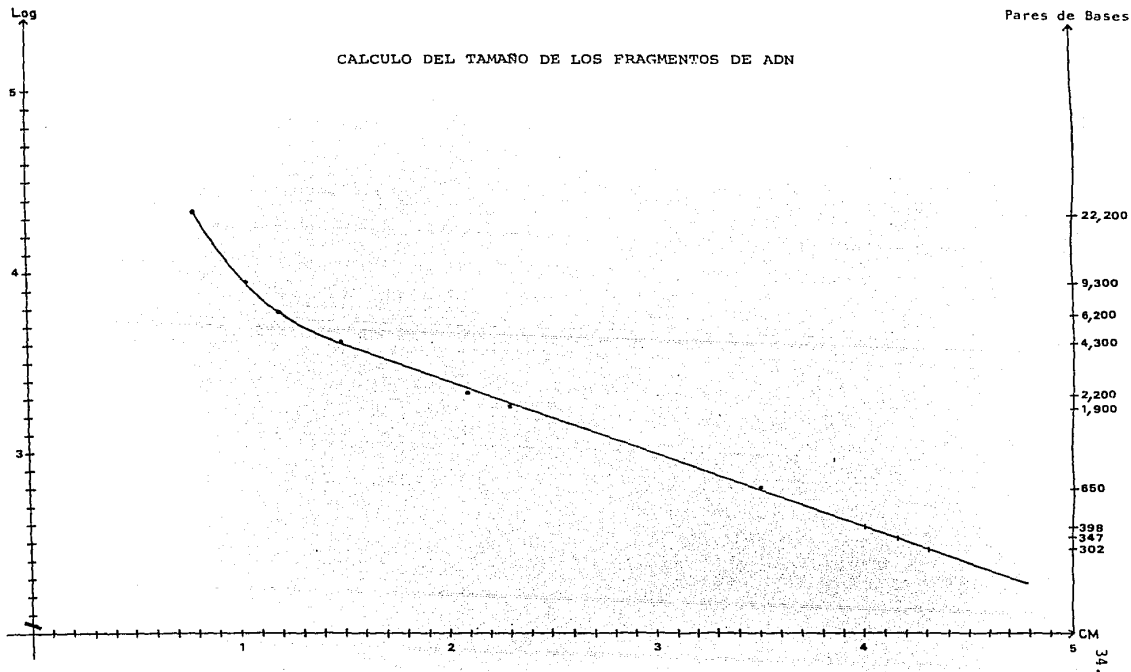
Determinación en placa de agarosa del tamaño de los fragmentos de ADN de aislados de *T. cruzi* de Argentina, Venezuela y México. Carril Núm. 1, fago λ digerido con la enzima Hind III; carril Núm. 2, aislado mexicano (4); carril Núm. 3, aislado venezolano (OPS); carril Núm. 4, aislado argentino (RA).

FIGURA 2

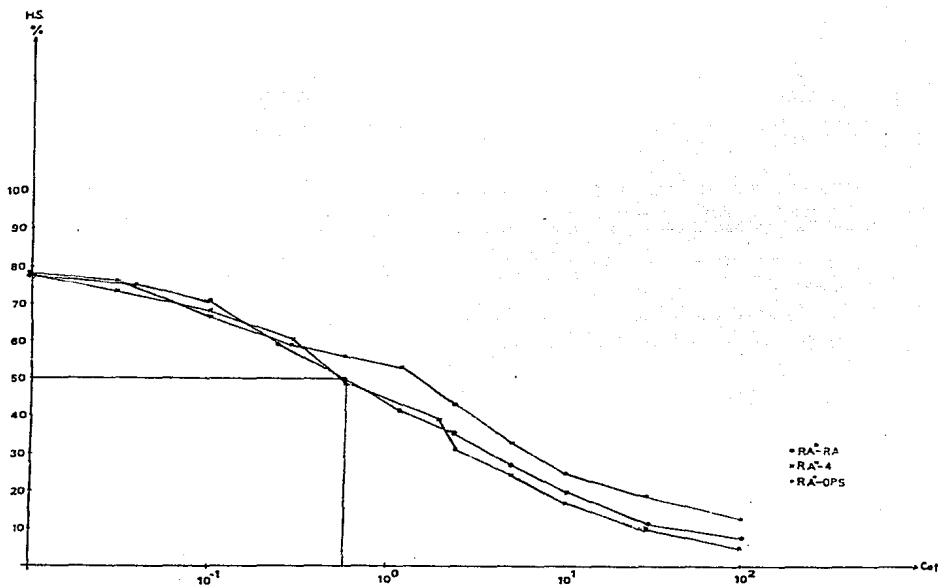


La curva se traza sobre los puntos obtenidos por los segmentos de λ digerido con Hind III (*).
 Los extremos y la parte media del de T. cruzi obtenidos por rompimiento mecánico (i) se ajustan sobre la curva.

FIGURA 2



La curva se traza sobre los puntos obtenidos por los segmentos de λ digerido con Hind III (*).
 Los extremos y la parte media del de I. cruzi obtenidos por rompimiento mecánico (i) se ajustan sobre la curva.



Cinética de reasociación de las secuencias repetidas de ADN de T. cruzi cortado en fragmentos de 350 pares de bases. El guía (ADN argentino) - se encuentra en proporción 1:500 con el marcador (ADN argentino, vengozano y mexicano). El porcentaje del material que no reasocia (hélice sencilla H S) se calcula por las cpm eluidas tanto de hélice sencilla - como de hélice doble, sacando el porcentaje de sencillas a partir del - total de cuentas.

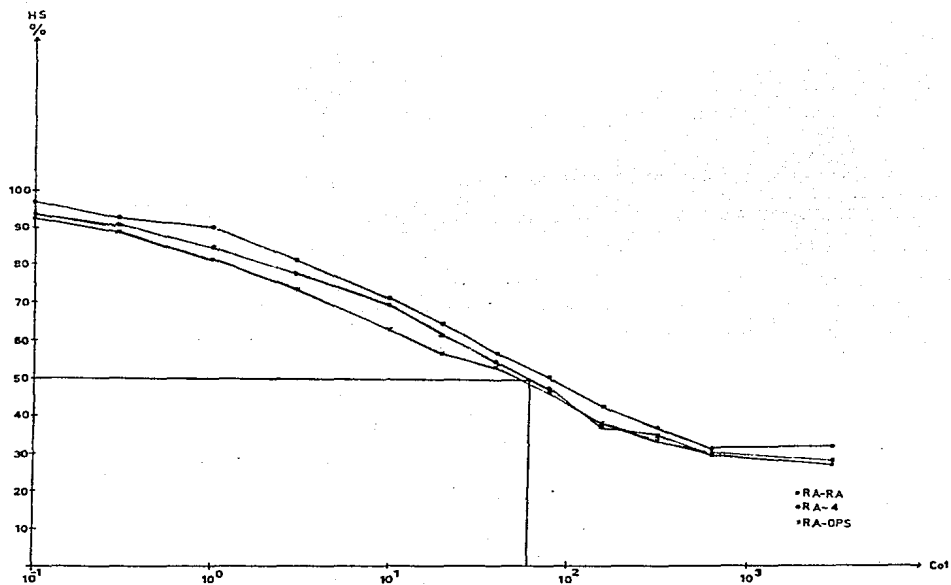
La reasociación RA*-OPS se realizó con los fragmentos de OPS con una longitud de 5,800 pares de bases. Mediante la ecuación:

$$C_0^{t \text{ mismo}} = \frac{C_0^{t \text{ guía}}}{\frac{\text{longitud marcador}}{\text{longitud guía}}}$$

donde $C_0^{t \text{ mismo}} = C_0^{t 1/2}$ que el guía tendría cuando los fragmentos del marcador son del mismo tamaño (23).

Aplicando la ecuación descrita se obtiene que el $C_0^{t 1/2}$ de RA*-OPS es igual al de RA*-RA y RA*-4. Es decir, la cinética de reasociación de los tres aislados es igual.

CINETICA DE REASOCIACION
Secuencias Unicas

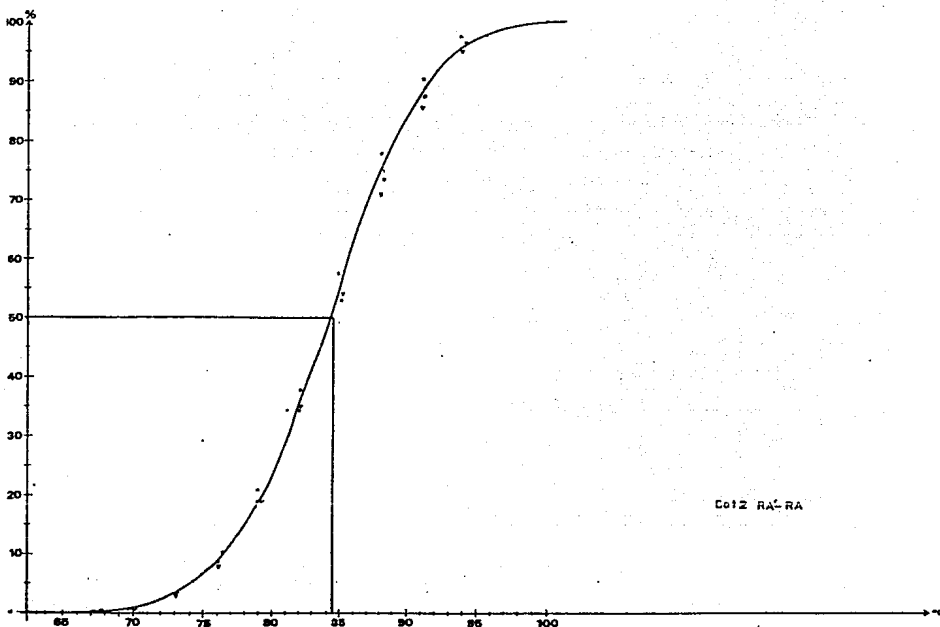


Cinética de reasociación de las secuencias únicas de ADN de T. cruzi

FIGURA 5

PUNTO DE FUSION
RA*-RA
Secuencias Repetidas

37.



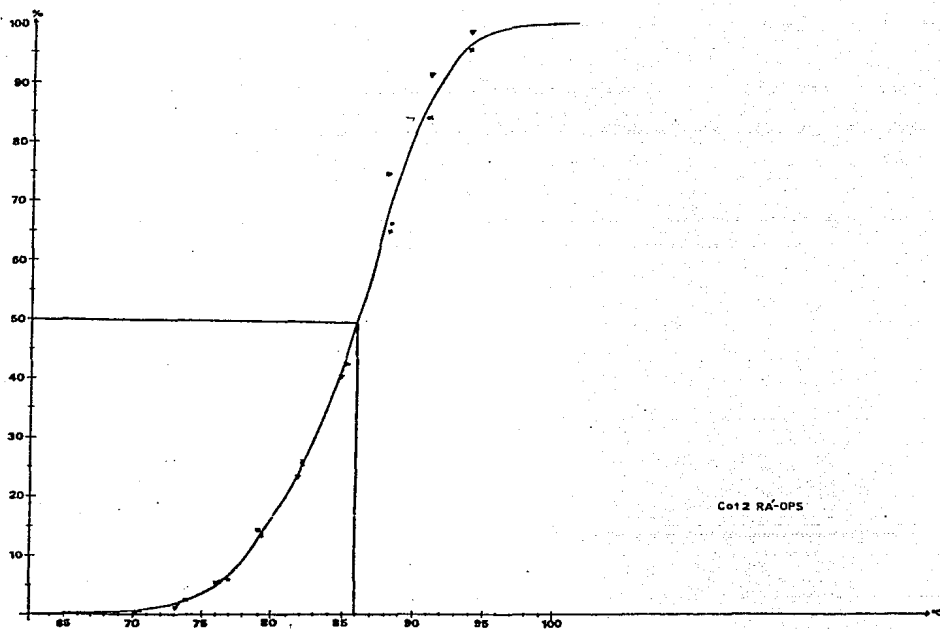
Punto de fusión de secuencias repetidas RA*-RA.

El punto medio de fusión (T_m) obtenido fue de 84,46°C.

FIGURA 6

PUNTO DE FUSION
RA*-OPS
Secuencias Repetidas

38.



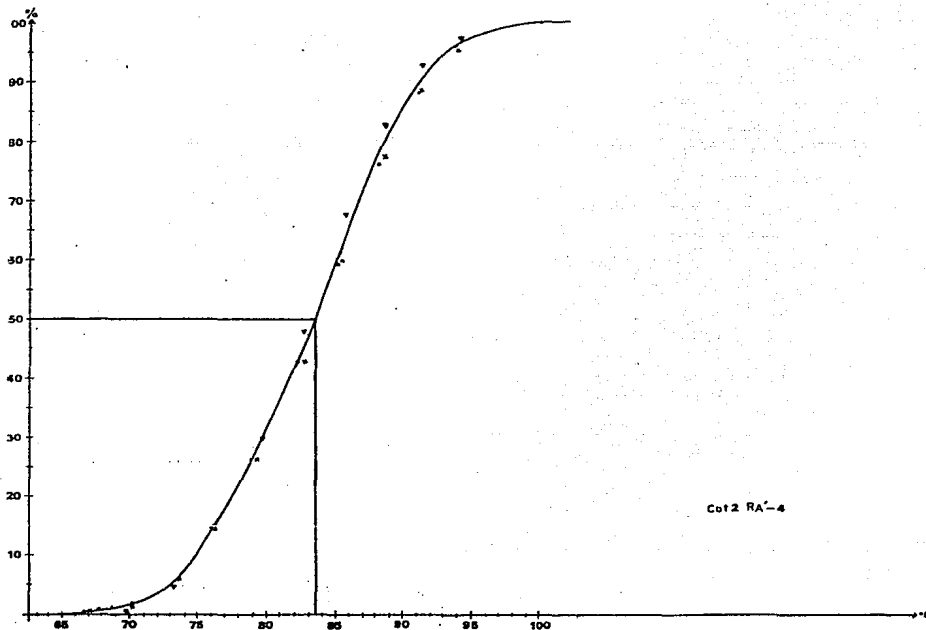
Punto de fusión de secuencias repetidas RA*-OPS.

El punto medio de fusión obtenido fue de 85.93°C.

FIGURA 7

PUNTO DE FUSION
RA*-4
Secuencias Repetidas

39.



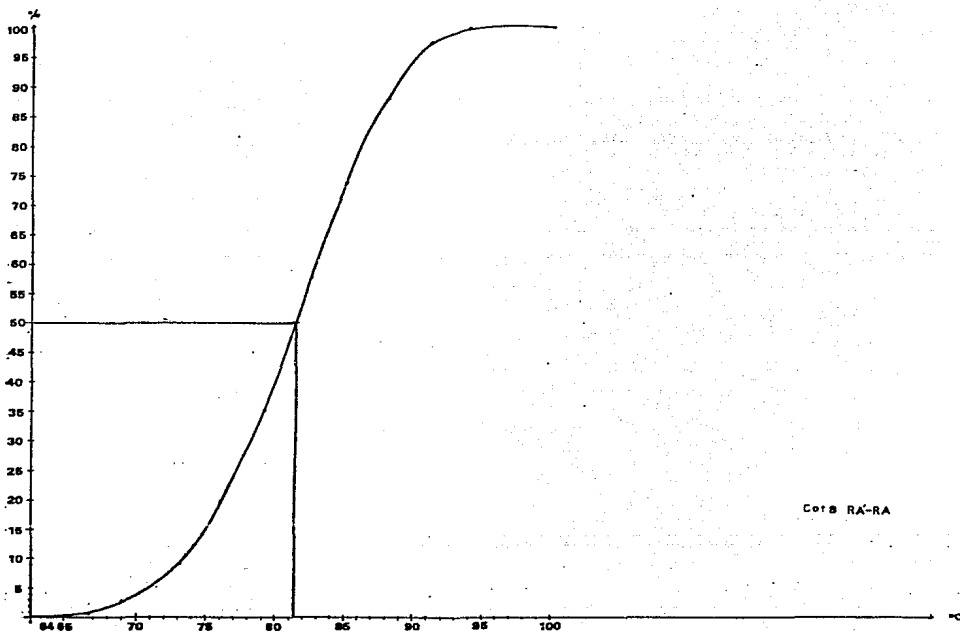
Punto de fusión de secuencias repetidas RA*-4.

El punto medio de fusión obtenido fue de 83.3°C.

FIGURA 8

PUNTO DE FUSION
RA*-RA
Secuencias Unicas

40.

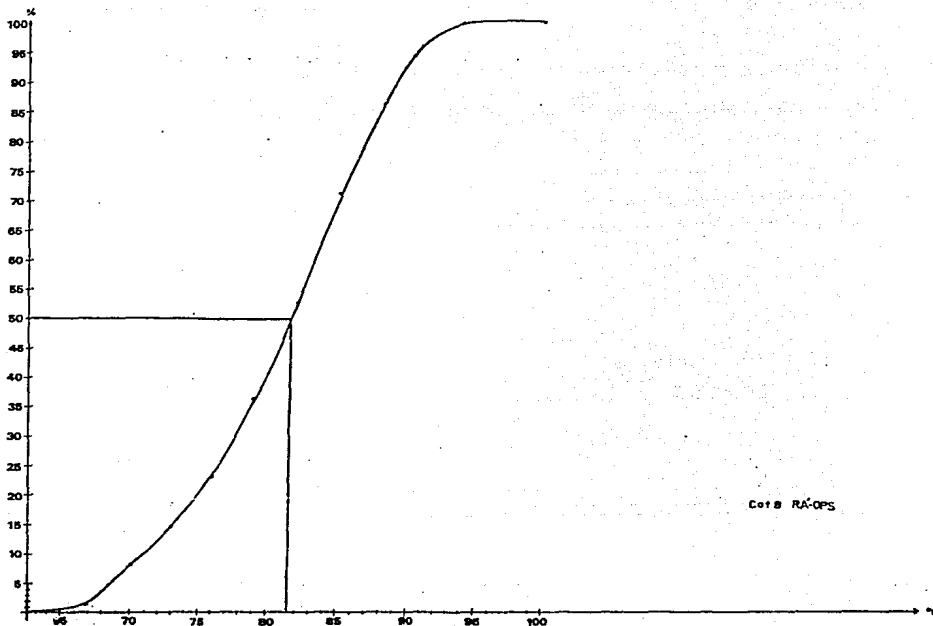


Punto de fusión de secuencias únicas RA*-RA,
El punto medio de fusión obtenido fue de 81.4°C.

FIGURA 9

PUNTO DE FUSION
RA*-OPS
Secuencias Unicas

41.



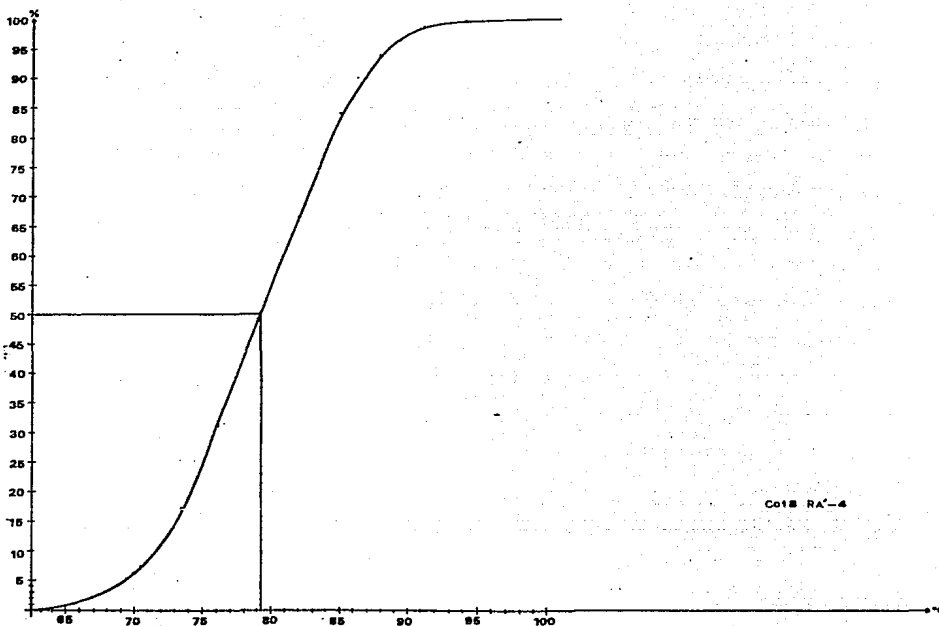
Punto de fusión de secuencias únicas RA*-OPS.

El punto medio de fusión obtenido fue de 81.4°C.

FIGURA 10

PUNTO DE FUSION
RA*-4
Secuencias Unicas

42.



Punto de fusión de secuencias únicas RA*-4.

El punto medio de fusión obtenido fue de 79.2°C.

DISCUSION

Se pueden enmarcar los resultados del trabajo en el contexto evolutivo, señalando inicialmente el papel que en la actualidad juega la información genética molecular en el establecimiento, corroboración o reestructuración de las relaciones filogenéticas entre los organismos, y concretamente en lo que se refiere a las secuencias nucleotídicas únicas y repetidas. De acuerdo con Harpol y Craig (43, 37), el grado de reasociación entre secuencias para distintas especies de erizos se correlaciona aceptablemente con los datos provenientes del registro fósil; además, Wilson, et al (44) propusieron estimar las distancias genéticas con base en experimentos sobre reasociación del ADN. Lo anterior induce a pensar que el grado de reasociación puede ser un indicador adecuado de la similitud o distancia entre grupos.

Para el caso de los organismos parásitos y concretamente para los flagelados, la situación se complica debido a: 1) la ausencia de registro fósil y por ende de un criterio de referencia, 2) la carencia de datos sobre un posible mecanismo de intercambio genético y 3) el aislamiento natural entre cepas, resultante del propio comportamiento parasitario. Por lo que se refiere a los trabajos realizados con T. cruzi, en este sentido, Miles, (8) distinguió tres zimodemas, en aislados de organismos provenientes de Brasil y Galván, (9) reportó que la divergencia evolutiva entre las poblaciones de Argentina y un grupo formado por las poblaciones de México, Venezuela y Costa Rica muestran un tiempo de divergencia

aproximado de 362,000 años. Ambos estudios se basaron en patrones isoenzimáticos.

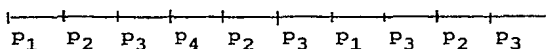
Los datos obtenidos mediante la técnica de reasociación del ADN, como se vió, muestran que definitivamente existe diferencia entre los aislados argentino y mexicano ya que el porcentaje de secuencias compartidas tanto repetidas como únicas, es de 93.2 y 92.2%, respectivamente. Es pertinente indicar que la reasociación efectuada bajo las condiciones utilizadas en estos experimentos fijan un criterio muy restringido, lo que permite un mínimo de apareamiento defectuoso; si hubiera resultado una gran cantidad de secuencias sin reasociar convendría limitar el grado de restricción y así obtener mayor cantidad de ADN reasociado, aunque el apareamiento defectuoso se reflejara en el análisis de los duplex; sin embargo y a pesar de estas condiciones, el porcentaje de secuencias que comparten los aislados fue alto.

La información que aportan los puntos de fusión se refiere a qué tan bien apareados están los duplex, de forma tal que la mayor temperatura implica una necesidad mayor de energía para separar las hélices. En los Cuadros 4 y 5 puede verse que la depresión de los puntos de fusión de los heteroduplex es mínima, lo que concuerda con el hecho de que al usar un criterio alto los duplex se forman bien; cabe señalar que la mayor depresión se observa entre los aislados 4 y RA en las secuencias únicas, lo que refuerza que estos aislados difieren entre sí en mayor medida, que con el aislado venezolano.

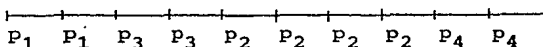
Llaman la atención los datos obtenidos entre los aislados argentino y venezolano ya que estos comparten casi la totalidad de las secuencias repetidas y únicas: 99,6 y 98,3% respectivamente. La diferencia en los puntos de fusión de los duplex RA*-RA y RA*-OPS de las secuencias repetidas, tal vez podría ser explicada si se considera que se cumplen tres condiciones:

1. Una gran similitud de las secuencias repetidas en ambos aislados;
2. La existencia de diferentes proporciones de secuencias relativamente más largas respecto de otras;
3. Mayor heterogeneidad intrínseca en la distribución de secuencias parciales en sí muy cortas (e.g. <350 pares de bases) y que componen las secuencias relativamente más largas.

Para aclarar esto, considérense únicamente las secuencias más largas y supóngase que para RA son como sigue:



y para OPS:



Las proporciones de cada una, en los dos aislados podrían ser:

	<u>RA</u>	<u>OPS</u>
Largas	30%	50%
Otras	70%	50%

y la heterogeneidad unida a la baja proporción de las secuencias largas en RA generaría la presencia de fragmentos (350 pb) - -

con secuencias muy cortas, disponibles para reasociarse con los fragmentos de RA* lo que daría por resultado apareamientos menos estables que disminuirían los puntos de fusión. A su vez, la gran proporción de secuencias largas y la mayor homogeneidad de los fragmentos resultantes en OPS, harían que se formaran, con mayor probabilidad, duplex más estables aún que RA*-RA.

Por supuesto que esto deberá corroborarse experimentalmente y para ello se propone realizar los mismos experimentos, pero tomando como referencia los fragmentos marcados de las secuencias repetidas de OPS. En el caso de que los puntos de fusión de los duplex OPS*-OPS resultaran sensiblemente más altos que los puntos de fusión de los duplex OPS*-RA, esto constituiría mayor evidencia para la hipótesis planteada.

Chaudhari y Craig (45) encontraron que la organización interna de las secuencias repetidas largas de ADN en erizo de mar son termoeestables, indicando la ausencia de divergencia evolutiva en las familias de secuencias repetidas que las forman; además, partiendo de secuencias repetidas de diferente longitud y cortándolas en fragmentos de 350 pb encontraron que el mal apareamiento en estos duplex variaba inversamente con la longitud inicial de la secuencia repetida, sugiriendo arreglos específicos de las familias de secuencias repetidas (secuencias parciales) que forman las secuencias repetidas largas que se encuentran en ADN de erizo de mar. La hipótesis propuesta en este trabajo se podría interpretar como un arreglo particular de las familias de secuencias re-

petidas muy conservadas en la evolución que forman las secuencias repetidas del ADN de los aislados de T. cruzi estudiados.

Esta información junto con los datos no publicados obtenidos por este laboratorio (Clementina Castro, comunicación personal) sobre la similitud entre el aislado mexicano usado como marcador, con relación a los aislados venezolano y argentino, reafirma la mayor distancia entre el aislado mexicano y el argentino, ya que sólo comparten el 92 y 82% de secuencias únicas y repetidas; además, la similitud entre las secuencias muestra un abatimiento del punto de fusión de 2,7 y 2,4°C, respectivamente; el aislado mexicano y el venezolano a su vez comparten 99 y 92% de sus secuencias únicas y repetidas y las secuencias compartidas tienen un alto grado de similitud, ya que sus temperaturas medias de fusión son iguales en las secuencias repetidas y sólo existe un abatimiento de 0,7°C en las secuencias únicas.

En su conjunto, los datos sugieren que el aislado venezolano se encuentra intermedio entre los aislados mexicano y argentino, no sólo geográficamente, sino también en el contenido de información genética.

BIBLIOGRAFIA

1. Enfermedad de Chagas en México, Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste No. 1 Serie de documentos San Cristóbal Las Casas, Chis. Mex. 1978.
2. González Cappa, S.M. y Kagan, I.G. (1969) Exp. Parasit. 25;50
3. Lambrecht, F.L. (1965) Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo 7(6):346-352.
4. Parasitic Protozoa Volume 1 Taxonomy, Kinetoplastids and Flagellates of Fish, Edited by Julius P. Kreier, Academic Press Inc. USA 1977.
5. Melo, R.C. y Brenner, Z. (1978) J. Parasitol. 64(3):475-482.
6. Koeberle, F. 1974. in Ciba Foundation Symposium 20 Trypanosomiasis and Leishmaniasis, Associated Scientific Publishers, Amsterdam and American Elsevier, USA pp 137-158.
7. Miles, M.A. (1981) Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 75(5):667-674.
8. Miles, M.A. (1980) Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 74(2):221-237.
9. Galván, S. (1983) Comp. Biochem. Physiol. 74B(3):573-578.
10. Krettli, A. (1979) Clin. exp. Immunol. 37:416-423.
11. Vattuone, N.H., González Cappa, S.M. (1974) Tropenmed. Parasit. 25:267-272.
12. Beveridge, E. (1977) Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 71(5):378-379.
13. Cover, B. y Gutteridge, W.E. (1981) Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 75(2):274-282.
14. Andrade, S. (1982) Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 6(1):123-128.
15. Mattei, M. (1977) FEBS Lett 74:264-268.
16. Morel, C. (1980) Proc. Natl. Acad. Scie. USA 77(1):6810-6814.
17. Britten, R.J. y Kohne, D.E. (1968) Science 161:529-540.
18. Timberlake, W.E. (1978) Science 202:973-975.
19. Hudspeth, M.E.S., Timberlake, W.E. y Goldberg. R.B. (1977) Proc. Natl. Acad. Scie. USA 74:4332-4336.
20. Roberts, T.M., Klotz, L.C. y Loeblich, A.R. (1977) J. Mol. Biol. 110:341-361.

21. Goldberg, R.B. (1978) *Biochem. Gen.* 16:45-68.
22. Zimmerman, L. y Goldberg, R.B. (1977) *Chromosoma* 59:227-252.
23. Murray, M.G., Cuellar, R.E. y Thompson, W.F. (1978) *Biochemistry* 17:5781-5790.
24. Davidson, E.H., Galau, G.A., Angerer, R.C. y Britten, R.J. (1975) *Chromosoma (Berl.)* 51:253-259.
25. Thomas, C. (1971) *Annu. Rev. Genet.* 5:237-256.
26. Crick, F.H.C. (1979) *Science* 204:264-271.
27. Schachat, F.H. y Hogness, D.S. (1974) *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 38:371-381.
28. Kurnitt, D.M. y Maio, J.J. (1975) *Chromosoma (Berl.)* 42:23-36.
29. Lewin, B. 1980. *Gene Expression, Volume 2 Eucaryotic Chromosomes*, 2nd. Ed., Wiley-Interscience Publication, USA.
30. Manuelidis, L. (1978) *Chromosoma (Berl)* 66:23-32.
31. Manning, J.E., Schmid, C.W. y Davidson, N. (1975) *Cell* 4:141-155.
32. Wells, R., Royer, H.D. y Hollenberg, C.P. (1976) *Molec. Gen. Genet.* 147:45-51.
33. Crain, W.R., Davidson, E.H. y Britten, R.J. (1976) *Chromosoma (Berl.)* 59:1-12.
34. Beauchamp, R., Pasternak, J. and Strauss, N.A. (1979) *Biochem.* 18:245-251.
35. Moizis, T., Bonnet, R.A. y Ts'o (1977) *J. Cell Biol.* 75:130a.
36. Chaudhari, N. y Craig, S. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 562:438-452.
37. Harpold, M. y Craig, S. (1978) *Differentiation* 10:7-11.
38. Gillespie, D. (1977) *Nature* 196:889-891.
39. Britten, R.J., Graham, D.E. y Neufeld, B.R. (1974) In *Methods in Enzymology* (L. Grossman and K. Moldave, eds.), Vol. 29, Part 3, pp. 363-418.
40. Wetmur, J. y Davidson, N. (1968) *J. Mol. Biol.* 31:349-370.
41. Kohne, D.E. (1970) *Quart. Rev. Biophys.* 3:327-375.

42. Castro, C., Craig, S., Castañeda, M. (1981) Mol. Biochem. Parasitol. 4:273-282.
43. Harpold, M. y Craig, S. (1977) NAR 4(12):4425-4437.
44. Wilson, A.C., Maxson, L.R., Sarich, V.M. (1974) Proc. Nat. Acad. Scie. USA 71(7):2843-2847.
45. Chaudhari, N. y Craig, S. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76(12):6101-6105.
46. McGhee, B. y Cosgrove, W.B. (1980) Microbiol. Rev. 44(1):140-173.