

2 Ej.
2

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS



**CUANTIFICACION GENICA DE LAS ESPECIES
MAYORES DE RNA RIBOSOMAL EN
EPIMASTIGOTES DE Trypanosoma cruzi**

ROBERTO JOSE RAFAEL HERNANDEZ FERNANDEZ

1 9 8 0



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

CONTENIDO

| | |
|--------------------|---------|
| INTRODUCCION | pag. 1 |
| MATERIAL Y METODOS | pag. 6 |
| RESULTADOS | pag. 12 |
| DISCUSION | pag. 30 |
| BIBLIOGRAFIA | pag. 37 |

I INTRODUCCION

Trypanosoma cruzi es un protozooario hemoflagelado agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Este padoci_miento se presenta con una elevada frecuencia en Centro y Suramérica (1). Por lo que constituye, en esta región, un serio problema de salud pública. La situación en México - está apenas siendo examinada, pero cabe enfatizar que el insecto vector se encuentra distribuído en Sonora, Zacatecas, Jalisco, Nayarit, Michoacán, Morelos, Estado de Méxi-co, Veracruz, Oaxaca, Hidalgo, Yucatán, Puebla, Guerrero, Guanajuato y Chiapas; además, en dos localidades escogidas al azar dentro de este último estado se encontró de - un 18-15% de la población con serología positiva (2).

Las características de patogenicidad y de respues_ ta a tripanomaticidas del parásito varían dependiendo de su localización geográfica dentro del Continente America-no. La respuesta inmune del hospedero aunque mantiene la enfermedad en estado crónico no es suficiente para evitar los daños celulares, principalmente celulas nerviosas del corazón y del tubo digestivo, responsables de la morbole-

talidad. Por último, y aumentando la complejidad del problema de manejo, el control del vector en las zonas rurales tropicales es en la actualidad prácticamente imposible (1).

Para enfatizar algunos aspectos biológicos, sin duda interesantes, del parásito; se mencionan los siguientes puntos:

- 1.- Trypanosoma cruzi presenta en el hombre y en insecto vector un ciclo de vida complejo con transformaciones morfológicas. (1).

La forma sanguínea ó tripomastigote es el único estadio en que el parásito puede infectar exitosamente alguna célula del hospedero. Sin embargo el tripomastigote no es capaz de dividirse, y por ende, tampoco de cultivarse. Se requiere que éste infecte a una célula y en el interior de la misma, adoptar consecutivamente las formas replicativas de amastigote y epimastigote. La diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes, trae consigo la lisis de la célula, con la subsecuente liberación de nuevas formas infectantes al torren-

te sanguíneo.

La transmisión de la enfermedad se realiza a través de un triatoma, que al picar a una persona infectada aspira tripomastigotes de su sangre. El parásito residente, ahora en el vector, completa un ciclo de diferenciación que da origen a los llamados "tripomastigotes metacíclicos". Estos son excretados con las heces del vector, cuando el triatoma defeca en consecuencia de una nueva ingestión sanguínea. El individuo al rascar el sitio del piquete y tallarse conjuntivas o mucosas, se hace responsable de la penetración del parásito.

- 2.- Este protozoario tiene una gran cantidad de DNA extra nuclear (20%) (13) cuya función, es actualmente desconocida.
- 3.- En la división celular el reparto de DNA a los hijos se realiza amitóticamente por fisión binaria, que es un mecanismo pobremente entendido en la actualidad.(12).
- 4.- Por otra parte, el llamado grupo de los protozoarios

parece ser más un conglomerado de sistemas de vida - con aspectos de organización y de evolución diferentes entre sí y con metazoarios, por lo que resultan académicamente atractivos y quizá sus comportamientos calificados ahora como bizarros, puedan entenderse - con el avance en el conocimiento de su fisiología.

Dadas estas características parece adecuado iniciar - el estudio de la organización y expresión de su genoma. Como un paso inicial, seleccioné el gen de DNA ri bosomal en epimastigotes por lo siguiente:

- 1.- La abundancia del transcrito y la repetitividad génica encontrada en diversas especies celulares - (3,4) lo hacen un sistema experimental de fácil - acceso, y
- 2.- El estar directamente involucrado en el crecimiento celular le confiere interés funcional y de regulación.
- 3.- Los epimastigotes son cultivables axénicamente en el laboratorio.

O B J E T I V O

En forma análoga a la clásica situación en bioquímica donde para estudiar una enzima se debe demostrar tanto su presencia como cuantificar su actividad; decidí que la primera etapa en el estudio de este sistema génico, debería consistir en establecer, en el laboratorio, las condiciones metodológicas de hibridación y de cuantificación del número de genes.

En este trabajo se describen: los procedimientos para la purificación de DNA y de marcaje de RNA; las condiciones que hicieron posible la hibridación; y número de genes que, en epimastigotes de T. cruzi, codifican para las especies mayores de RNA ribosomal.

II MATERIAL Y METODOS

La cepa utilizada fue aislada en la Cruz, Jalisco por el Dr. Jorge Tay, Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, U.N.A.M.

Los cultivos se realizaron en medio de infusión de hígado y triptosa (5), suplementado con suero bovino fetal al 10%; y se mantuvieron en agitación a 28°C.

Purificación de DNA

Los cultivos celulares fueron cosechados, en fase media de crecimiento logarítmico, por centrifugación a 10 000 g. Lavados dos veces con Buffer N (Tris 30mM pH 7.8, KCl 100mM, CaCl₂ 2mM, Ac₂Mg 5mM), y guardados como precipitado a -70°C.

El día de la extracción, se descongeló este material a 4°C, para resuspenderse en Buffer N a una densidad máxima de 10⁹ células/ml. Las células fueron lisadas con NP40 al 1%, y rápidamente centrifugadas a 15 000 g durante 20 minutos a 4°C. El precipitado fue resuspendido en un vo

lúmen de SSC 1X (Na Cl 150 mM, Citrato de Na 15 mM), EDTA 10 mM. Posteriormente se adicionó Sarkosyl a una concentración final de 1% y se incubó a 37°C 15 min. La incubación fue continuada por dos horas más con pronasa (preincubada 1 hora a 37°C) a una concentración de 1 mg/ml. Después de adicionar perclorato de sodio a 1M, los nucleicos se extrajeron dos veces con una mezcla de cloroformo alcohol isoamílico (24:1), y se dejaron dializando durante la noche contra 100 volúmenes y 3 cambios de SSC 1X. La purificación continuó mediante un tratamiento con ribonucleasa 1 (precalentada 10 min a 85°C) 100 µg/ml 30 minutos a 37°C; re-extracción con cloroformo: isoamílico y diálisis exhaustiva contra SSC 0.1X. La preparación de DNA así obtenida se leyó en el espectrofotómetro a 230, 260 y 280 nm; y fue guardada hasta su uso sobre cloroformo a 4°C.

Purificación de RNA ribosomal-³²P.

Las células fueron crecidas durante 72 horas en un medio deprivado de NaH_2PO_4 , suplementado con 100 µCi/ml de ácido ortofosfórico ³²P. La purificación de las especies ribosomales mayores, así marcadas, se llevó a cabo

de acuerdo con la técnica de Castro (6).

La cosecha del cultivo se realizó por centrifugación a 10 000 g durante 10 min a 4°C (temperatura mantenida a lo largo de toda la purificación). Posteriormente las células fueron lavadas en: Tris 30 mM pH 7.0, Mg Ac₂ 5mM, KCl 100 mM, CaCl₂ 3mM, heparina 1 mg/ml y guardadas como precipitado 12 horas a -70°C. El paquete celular fue resuspendido, en relación 1g/ml (peso húmedo) en la misma solución de lavado, pero enriquecido con heparina 4mg/ml. La lisis se llevó a cabo mediante la adición de NP40 al 0.3%. Este material se centrifugó a 10 000 g 10 min primero, 20 000g 10 min después, y por último dos horas a - - 10 000g.

El material polisomal, recogido del último precipitado, fue desproteinado con dos ml de: LiCl 2M, Urea 4M, Tris 20mM pH 7.0, y heparina 4mg/ml. Después de centrifugado a 20 000g 20 min, el precipitado se resuspendió en aproximadamente 1 ml de agua tratada con dietilpicrocarbonato. Y leído, al igual que el DNA, en el espectrofotómetro.

Las especies ribosomales mayores fueron separadas de las moléculas pequeñas (4S y 5S) por centrifugación preparativa en gradientes de sacarosa (5-20%). Estos gradientes fueron preparados con 10 ml de sacarosa al 20% en el recipiente de mezclado y 36 ml al 5% en el recipiente de reserva. La sacarosa fue disuelta en Tris 10mM pH 7.0, EDTA 1 mM, LiCl 50mM, y Sarkosyl al 0.1%; y los gradientes construidos en tubos de polialómero para el rotor SW 27 Beckman. Después de centrifugarlos a 86 000g 13 hrs los gradientes se fraccionaron manualmente, por medio de un orificio practicado en la parte inferior del tubo -- realizado con una aguja hipodérmica del número 25. Fracciones de 30 gotas fueron analizadas a través de alícuotas de 10 μ l, secadas sobre papel Whataman 1; y colocadas en Tolueno, PPO 0.4%, POPOP 0.0125% para ser analizadas en un contador de centelleo líquido. El RNA obtenido en los picos de interés fue primero precipitado en acetato de potasio 0.2 M pH 5.0 con dos volúmenes de Etanol, y después resuspendido en 1.0 ml de agua tratada con dietilpirocarbonato.

Hibridación

El DNA total se desnaturalizó (7), mediante la adición de NaOH 0.5N, se neutralizó con Fosfato monobásico de Sodio, y la concentración de sal se elevó 6 veces sobre la del SSC 1X. De este material se tomaron alícuotas de 3ml (10-20 µg de DNA), para ser filtradas a través de filtros Millipore (tipo HA, diámetro 25mm), prehidratados en SSC 6X. Los filtros fueron lavados con 45 ml de SSC 6X, secados durante la noche a temperatura ambiente, y horneados con vacío a 65°C durante 4 horas.

La hibridación se llevó a cabo con cantidades crecientes de RNAr-³²P en 2 ml de: SSC 1X, Buffer Fosfatos pH 7.0, SDS 0.2%, EDTA 10 mM, y formamida al 33%, durante 24 horas a 37°C.

A continuación los filtros fueron lavados con - - aproximadamente 90 ml de SSC 2X, sumergidos en 5 ml de RNasa 20 µg/ml durante una hora a temperatura ambiente; y relavados exhaustivamente con SSC 2X.

La cantidad de RNA hibridada fue estimada a tra-

vés de la radioactividad que mostraron los filtros al con
tarse en mi sistema de centelleo líquido en Tolueno, PPO,
POPOP. Normalizada a μg de RNA por la actividad específica
del RNA radioactivo.

Cuantificación de DNA.

La cantidad de DNA en solución ó fijada en los -
filtros fue determinada con el método de Burton (8) con
el reactivo de difenilamina.

Se utilizó DNA de timo de ternera, pesado y leído
a 260 nm, como standard en la elaboración de la curva pa-
trón.

III RESULTADOS

1.- PURIFICACION DEL DNA Y PREPARACION DE FILTROS PARA HIBRIDACION.

El primer método a establecer en los experimentos de hibridación fué la preparación de filtros con DNA. Con intenciones de conocer el sistema de retención, se filtraron según Gillespie (7) cantidades crecientes (0-70 μ g) de DNA radioactivo (32 P). Cabe mencionar que lo esperado era por un lado, obtener una curva lineal (dentro de un rango), y por otro, conseguir una buena eficiencia (alrededor de 90%) de retención. La Figura 1 muestra el comportamiento lineal esperado, pero la cantidad retenida a lo largo de los puntos experimentales corresponde apenas al 1-2% del material filtrado. El DNA purificado en estos primeros experimentos había sido extraído de células completas, y aunque tratado con RNasa el RNA de tipo ribosomal presenta un núcleo resistente (9). Por otro lado, se sabe que el RNA no se fija al filtro en estas condiciones (10). Así pues que una contaminación importante de la preparación de DNA 32 P con oligonucleótidos de RNA 32 P explicaría el bajo porcentaje de radioactividad retenido en la fijación al filtro.

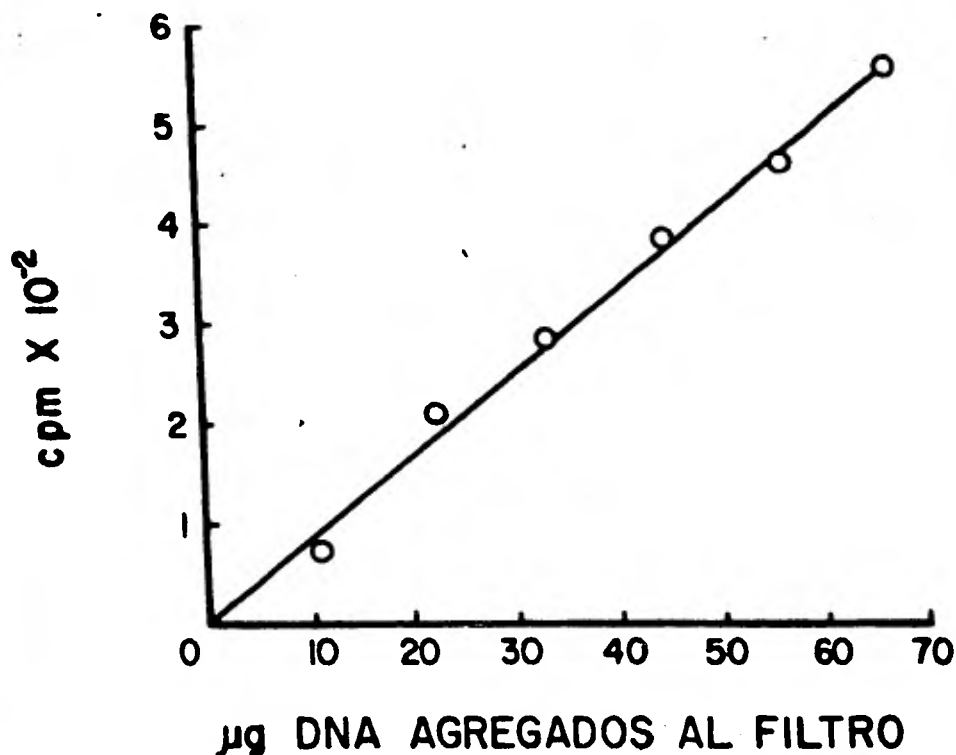


FIGURA 1. Retención de DNA- ^{32}P en filtros de nitrocelulosa. El DNA radioactivo fue extraído del lisado total y fijado (Material y Métodos) en cantidades crecientes en los filtros. La radioactividad retenida, corresponde al 1-2% del total pasado por el filtro.

La Figura 2 muestra la gran cantidad de material con densidad mayor a la de DNA (1.7) que aparece en un gradiente isopícnico de CsCl. Esto confirmaba la predicción de una alta contaminación del DNA con RNA ^{32}P , y consecuentemente explicaba los bajos rendimientos de fijación obtenidos inicialmente.

Los siguientes experimentos estuvieron enfocados a la obtención de núcleos libres de ribosomas citoplasmáticos; para contar, desde un principio, con un material enriquecido en DNA. Después de algunos experimentos en los que se ajustaron: densidad celular en la lisis; concentración y tipo de detergente (Material y Métodos), se obtuvieron preparaciones nucleares cuya extracción de ácidos nucleicos constituye fundamentalmente un material con densidad de 1.7 (Figura 3). La relación 260/280nm y 260/230 nm de éstas preparaciones fue de 1.8 y 1.87 respectivamente.

Con este material nuclear, el rendimiento de la fijación de DNA a los filtros, aumentó notoriamente a un 45%. Cifra que ya permite realizar experimentos de hibridación.

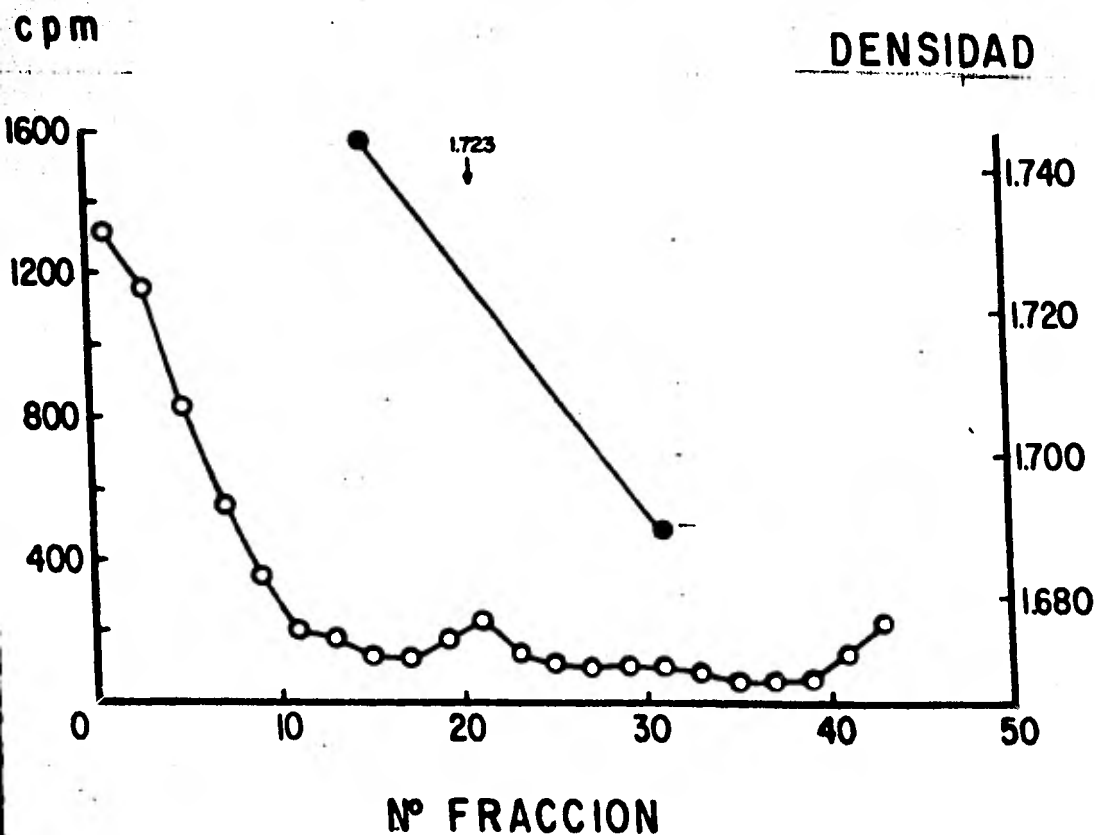


FIGURA 2. Gradiente isopícnico de CsCl. Perfil de densidad del DNA-³²P, obtenido de la preparación de células completas (Fig. 1). Densidad inicial 1.7 gr/cc; rotor 50 Ti Beckman, 40 Krpm, 43 horas, 20°C. El índice de refracción se determinó por medio de un refractómetro Baush and Lomb y la transformación a densidad por medio de $\rho_{25^\circ\text{C}} = (10.8601 \times \text{I.R.}) - 13.4974$ (11).

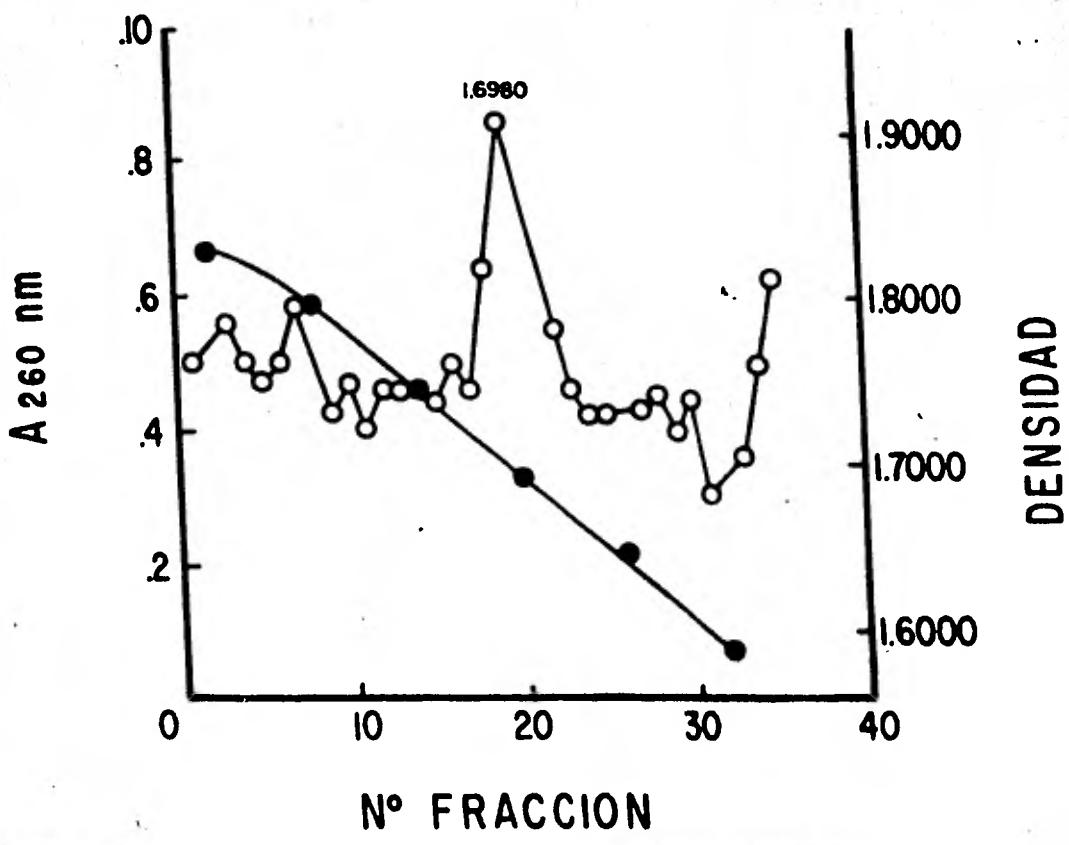


FIGURA 3. Gradiente isopícnico de CsCl. Perfil de densidad de preparaciones de DNA obtenidas a partir de un precipitado nuclear libre de ribosomas (Material y Métodos). Los detalles técnicos son iguales a los de la figura 2.

2.- CUANTIFICACION DE DNA FIJADO

En la hibridación cuantitativa, como su nombre lo indica es requisito indispensable la cuantificación de los reactivos comprometidos. Frente a la carencia actual de un medio definido de crecimiento que permita, in vivo, la incorporación eficiente de ribonucleótidos radioactivos; se decidió por un lado trabajar con el RNA ribosomal marcado in vivo con ^{32}P (ver Material y Métodos), y por otro, cuantificar colorimétricamente (reactivo de difenilamina) el DNA del filtro. La Figura 4 muestra la curva patrón del método. Se usó como estándar DNA de timo de ternera, y la concentración de la solución stock se determinó gravimétricamente, y por su absorbencia a 260nm. De la curva patrón es evidente que no hay dificultad alguna, por sensibilidad, para detectar entre 10 y 20 μg . Cantidades de DNA usadas en la hibridación.

Esta curva se elaboró con DNA en solución. Y para poder referirme a ella en la cuantificación del DNA presente en los filtros, hubo que satisfacer dos exigencias metodológicas:

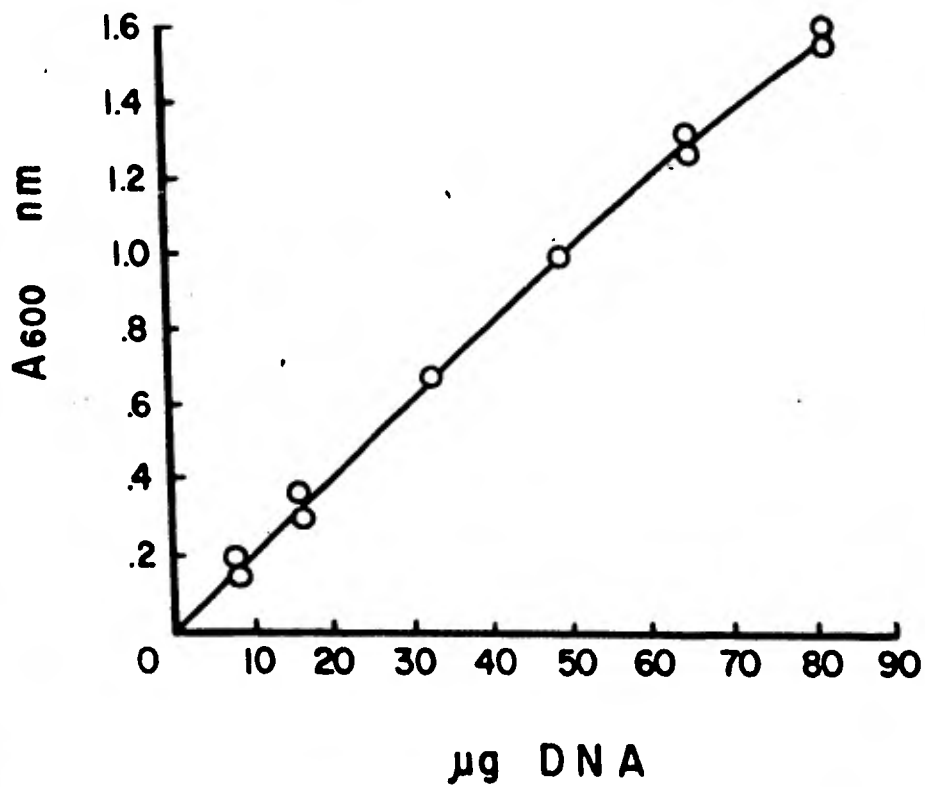


FIGURA 4. Curva patrón de DNA de timo de ternera estimado con el reactivo de difenilamina.

- 1.- La presencia de un filtro de nitrocelulosa en la reacción, no modifica la absorbencia de color a 600 nm, longitud de onda usada en la determinación (Figura 5A-B).

- 2.- En el hidrolizado ácido de filtros con DNA, se midió la totalidad de material (10µg) que en un volúmen de 100 µl fueron secados sobre su superficie antes de la determinación. Con esto quiero decir que el método - permite medir íntegramente el DNA de un filtro.

De esta manera se cuantificó, en los experimentos posteriores de hibridación, la cantidad de DNA que; antes de incubar con RNA y después de los lavados, se encontraba en los filtros de nitrocelulosa.

3.- PURIFICACION DE RNA -³²P.

La purificación de las especies mayores se llevó a cabo a partir de precipitados polisomales; que después de - desproteinizarse (A260/280 = 1.9 y A 260/230 = 2.1) se corrieron en gradientes de sacarosa 5-20%.

(5A)

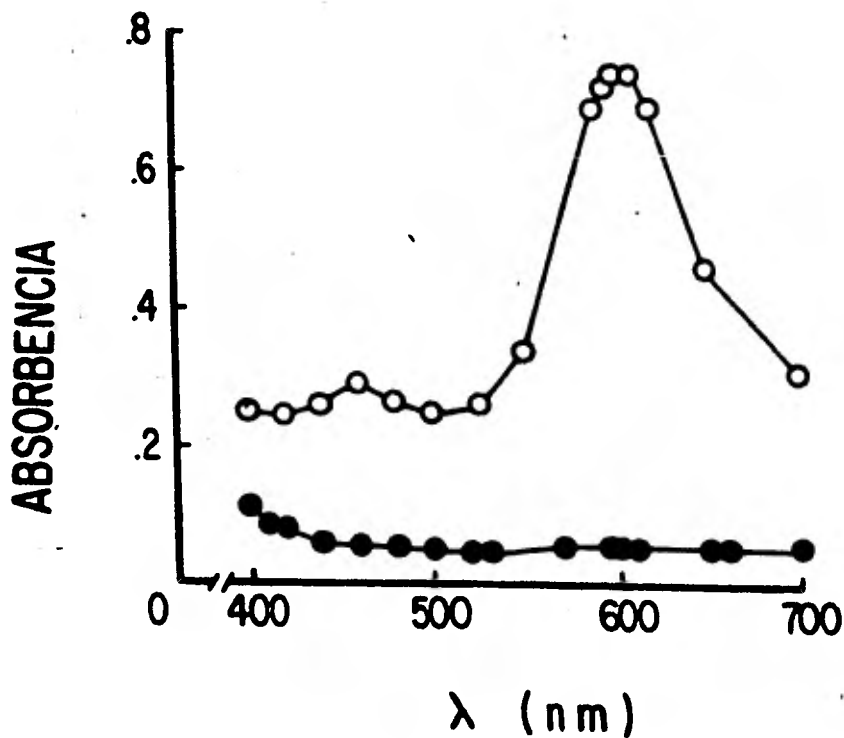
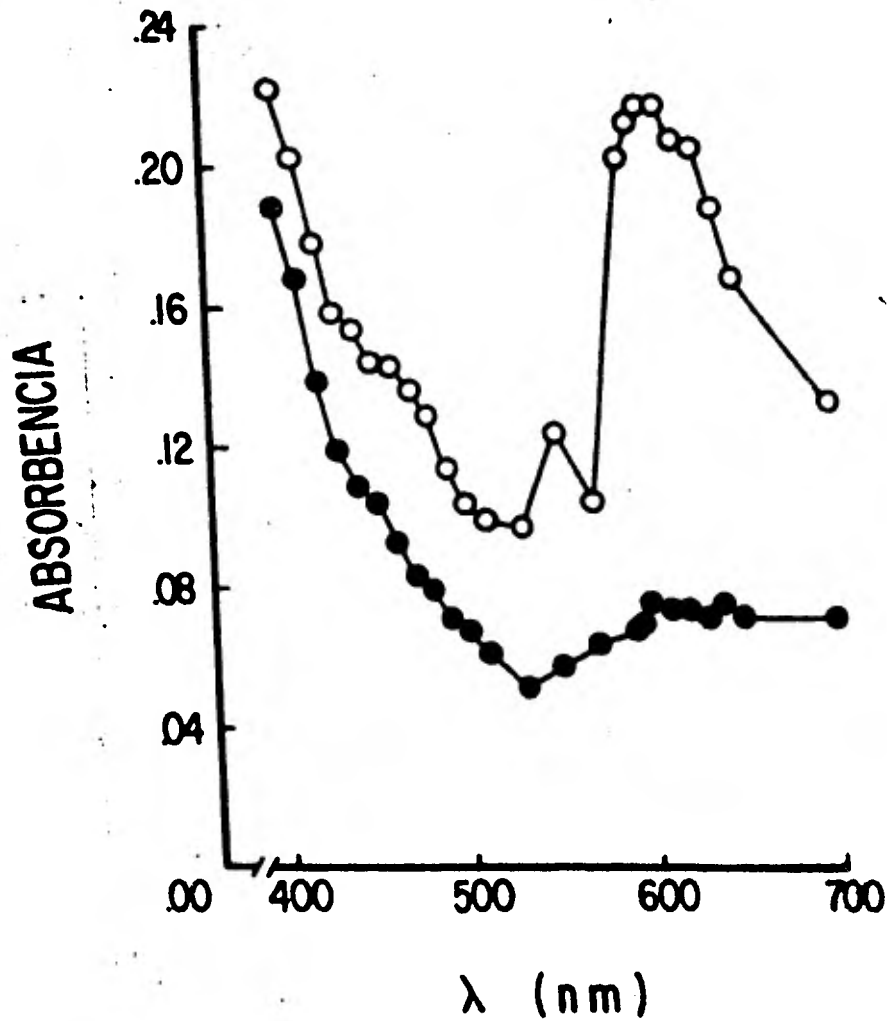


FIGURA 5. Espectro de absorción del color generado por el DNA al reaccionar con el reactivo de difenilamina.
(A) DNA —○— y blanco —●— en solución
(B) DNA —○— y blanco —●— en hidrolizados ácidos de filtros de nitrocelulosa.

(5B)



La Figura 6 muestra el perfil obtenido en uno de estos gradientes, indicando con corchetes horizontales el material precipitado con etanol. De cada gradiente se recuperaron aproximadamente 250 μg de RNA con una radioactividad específica de $5-8 \times 10^4$ cpm/ μg .

4.- HIBRIDACION Y NUMERO DE GENES

Los experimentos donde se investiga el número de genes a través de hibridación a saturación, consisten en estimar la cantidad máxima de RNA capaz de retenerse por hibridación, a un filtro con DNA. Dado que el DNA no se encuentra enriquecido por criterio alguno, el porcentaje máximo ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) que se logre hibridar será un estimado del porcentaje del genoma total que codifica para el ribonucleico en cuestión.

La Figura 7 muestra el resultado de uno de éstos experimentos en el que se incubaron, por separado, filtros con iguales cantidades de DNA y filtros blanco control con cantidades crecientes de RNA ^{32}P . Se grafica la radioactividad retenida después del lavado (ver Material y Métodos) en función del RNA incubado en la reacción.

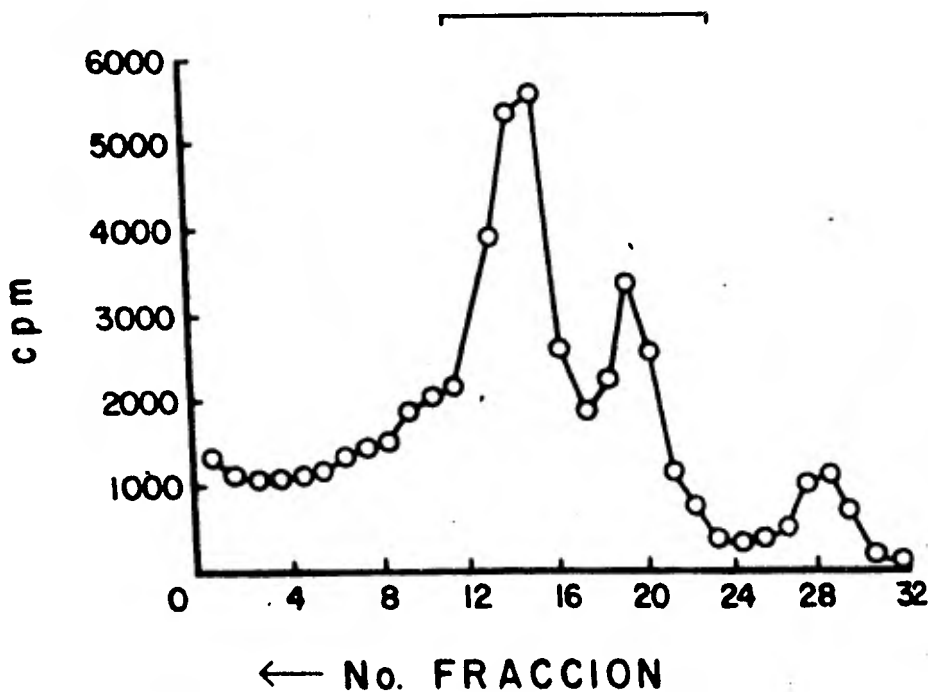


FIGURA 6. Gradiente preparativo de sacarosa. El RNA-³²P polisomal centrifugado a través de sacarosa 5-20% (Material y Métodos). La flecha indica la dirección de la sedimentación; el corchete horizontal, el material usado para la hibridación.

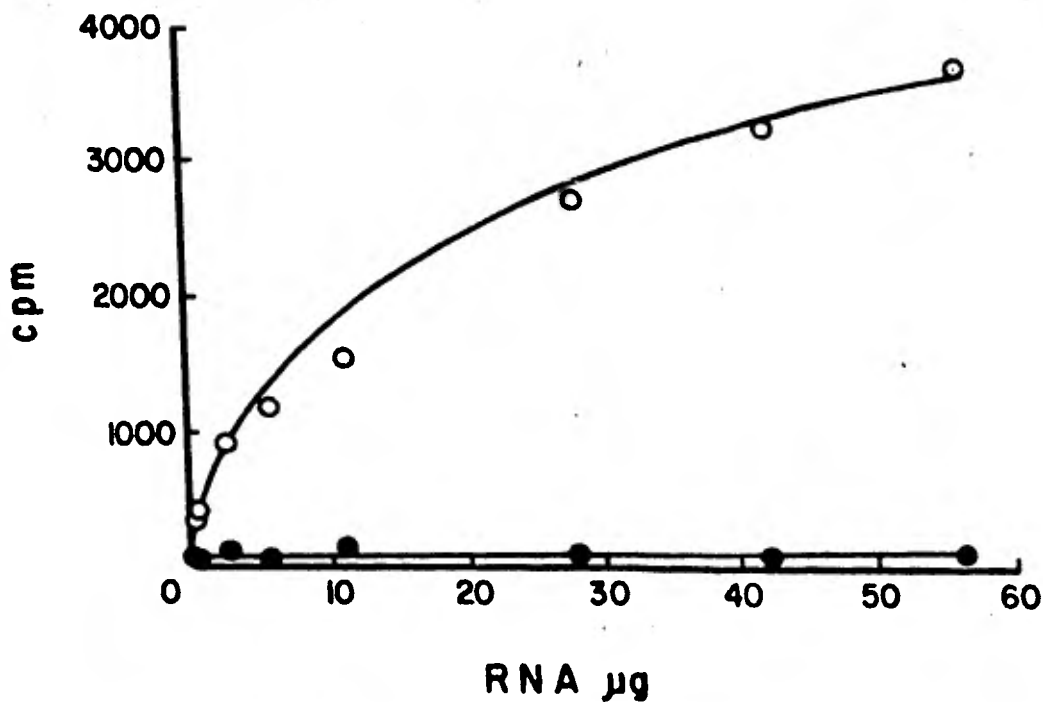


FIGURA 7. Radioactividad retenida en la hibridación de filtros con 20 µg de DNA —○— y filtros blanco —●— con cantidades crecientes de RNAr-³²P en 2.0 ml de solución de hibridación (Material y Métodos).

Es evidente que el comportamiento parabólico observado es dependiente de la presencia de DNA en el filtro. El punto de saturación en el sistema se calculó mediante el manejo algebraico de los datos, graficando la recíproca simple RNA/Hibridación = f (RNA). La pendiente de la recta así obtenida (Figura 8) corresponde al inverso de la hibridación en saturación ($m = 1/H_s$). La tabla 1 resume los resultados de 3 experimentos diferentes.

Cálculo del número de genes.

En base a los datos de saturación se calculó que el porcentaje del DNA total que codifica para las especies mayores de RNAr es de 0.4077%. Sin embargo para conocer el porcentaje del DNA nuclear es necesario conocer, en esa cepa, la proporción del genoma total que corresponde a DNA de cinetoplasto.

Debido a que el DNA de cinetoplasto no se resuelve en el fraccionamiento de gradientes al equilibrio de tipo preparativo de CsCl, se resolvió en gradientes analíticos. La Figura 9 muestra el perfil analítico de densidad del DNA total de esa cepa. Se calcula que el 15% flota con -

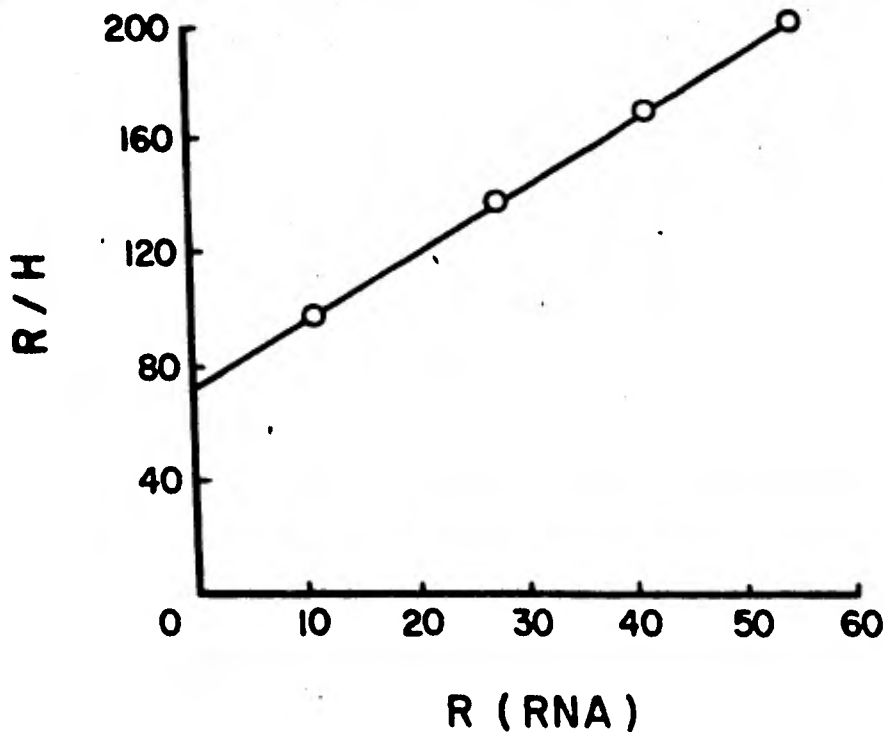


FIGURA 8. Recíproca simple de la Figura 7:

$$R/H = f(R)$$

donde R = RNAr (μ g) adicionados al sistema,

H = cpm en el híbrido

Hs = cpm en el híbrido a saturación

DNA/filtro = 20.05 μ g

Radioactividad específica = 69427 cpm/Mg RNA

TABLA I

HIBRIDACION A SATURACION DEL DNA TOTAL CON LAS ESPECIES MAYORES DE
RNAr

| DNA total pasado por el filtro (μg) | Porcentaje de fijación (DNA) | Porcentaje de permanencia (DNA) | Hibridación en saturación (μg) | Porcentaje DNA hibridado* |
|--------------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------|
| 24.1 | 85 | 100 | 0.079 | 0.3940 |
| 18.5 | 89 | 95 | 0.065 | 0.4153 |
| 18.1 | 80 | 100 | 0.059 | 0.4138 |

* El porcentaje del DNA hibridado en saturación fue calculado del inverso de la pendiente en la gráfica de recíproca sancilla $\bar{x} = 0.4077 \pm 0.011$.

TABLA I

HIBRIDACION A SATURACION DEL DNA TOTAL CON LAS ESPECIES MAYORES DE
RNAr

| DNA total pasado por el filtro (μ g) | Porcentaje de fijación (DNA) | Porcentaje de permanencia (DNA) | Hibridación en saturación (μ g) | Porcentaje DNA hibridado* |
|-------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------|
| 24.1 | 85 | 100 | 0.079 | 0.3940 |
| 18.5 | 89 | 95 | 0.065 | 0.4153 |
| 18.1 | 80 | 100 | 0.059 | 0.4138 |

* El porcentaje del DNA hibridado en saturación fue calculado del inverso de la pendiente en la gráfica de recíproca sancilla $\bar{x} = 0.4077 \pm 0.011$.

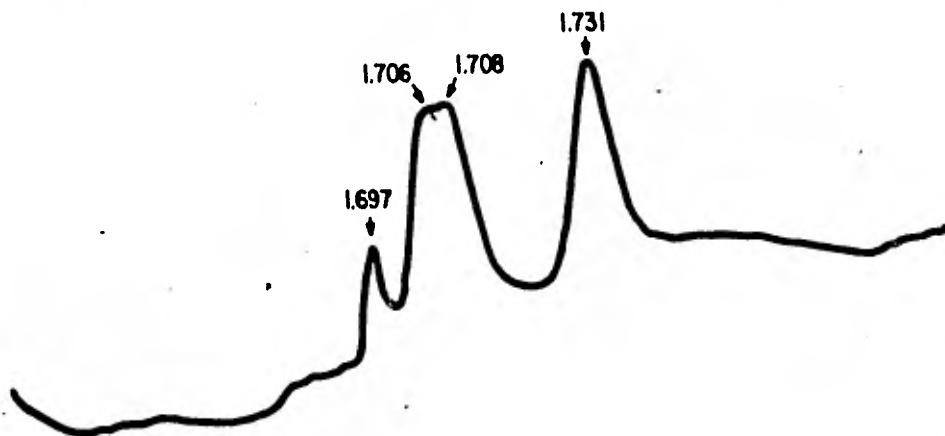


FIGURA 9. Perfil de densidad analítico del DNA. Densidad inicial = 1.7, volúmen total 0.720 ml, DNA de T. cruzi 5 ug, centrifugación a 44 Krpm, 18 horas. En la corrida se incluyeron 2 ug de DNA de Micrococcus lysodeikticus (densidad = 1.713). El pico ligero (densidad 2.697) corresponde a DNA de cinetoplasto y el pico ancho intermedio a DNA nuclear.

densidad de DNA de cinetoplasto; y ahora sí, con esto se infiere que el porcentaje del DNA nuclear que codifica para los transcritos en cuestión corresponde a 0.4796%.

El tamaño del genoma por estimación química (19), corresponde a 0.19pg/célula; y a 0.16pg/núcleo (Fig. 8).

a) Pares de bases del DNA nuclear total:

$$\frac{1.6 \times 10^{-13} \text{ g} \times 6.023 \times 10^{23}}{660 \text{ (peso de un pb)}} = 1.4601 \times 10^8 \text{ pb.}$$

b) Pares de bases del DNA ribosomal:

$$\frac{1.4601 \times 10^8 \text{ pb} \times 0.4796\%}{100\%} = 700 \text{ Kpb.}$$

c) Número de genes:

$$\frac{700 \text{ Kpb}}{6.46 \text{ kb}^*} = 108.35 \text{ genes.}$$

(*) = PM de los transcritos maduros (6).

IV DISCUSION

Uno de los problemas que se detectan al analizar en la literatura, los reportes sobre el número de genes ribosomales en diversos organismos, constituye los diferentes valores que distintos investigadores reportan sobre un mismo organismo (3). Birnsteil y col. comenta en su revisión (3) que algunas de estas discrepancias quizá se expliquen por diferencias en los protocolos de hibridación, pero que es más probable que se deban a contaminación en las preparaciones de RNAr con RNA 5s y 4s, pues siendo es-
tdos dos últimos de gran abundancia (ver después), y de ba
ja complejidad, hibrida de forma muy eficiente (14).

En relación a este problema quisiera mencionar, que la manera como se purificaron las especies ribosomales mayores: precipitado polisomal secundario a un sobrenadante libre de núcleos, y un gradiente de sacarosa; suprime la po
sibilidad de una contaminación considerable con RNA 4S y 5S. Seguramente mis preparaciones de RNA (28S y 18S) están con-
taminadas con algo de RNA mensajero. Pero dado los caracte-
rísticas de; 1º baja concentración; 2º que están codifica-
dos por genes únicos, y 3º su elevada complejidad hacen que,

para fines de cuantificación de rDNA, ésta contaminación se considere despreciable. Para precisar, con números, esta afirmación supongamos hipotéticamente una contaminación con la totalidad de mensajeros de la célula. Por analogía a otras células:

$$\text{RNA total} = \text{RNAr } 80\% + \text{RNA } 4\text{S y } 5\text{S } 20\% + \text{RNAm } 1-2\%$$

En un precipitado polisomal el RNAr aumentaría ca si al 100% y con esta base el mensajero se enriquecería de un 2 a un 3%. Dado que el RNAm está codificado por secuencias únicas, la cuantificación de 100 genes ribosomales, estimada en esta situación, habría que corregirla por la cantidad despreciable de 3 genes mensajeros.

En lo que se refiere al tipo de híbrido formado, pese a que este no fue analizado, se tiene por un lado - que las condiciones de hibridación utilizadas dan menos - de 0.8% de reacción cruzada (15); y por otro, los filtros fueron sometidos a lavados exhaustivos (Material y Métodos y Figura 7). Es por esto que confío que el híbrido formado y retenido, haya sido bastante específico.

Más aún, el número de genes estimado (alrededor de 100) siendo ligeramente más bajo de lo esperado (ver más adelante Leshmania donovani), constituye un indicativo indirecto de que no debe haber problema alguno en cuanto a la especificidad de la interacción.

Otro factor que debe considerarse en la explicación a las discrepancias mencionadas, es la forma numérica como se manejan las curvas de hibridación a saturación. Resulta que cuando el DNA se incuba con un exceso de RNAr, la reacción se comporta asintóticamente al acercarse a valores aparentemente saturantes (16,17). Esto significa que el valor de saturación si bien se aproxima, nunca se alcanza. Para solucionar este problema, se recomienda graficar la función en términos recíprocos (16); pues la recta así obtenida permite calcular en forma precisa, el punto de saturación a concentración infinita. La saturación calculada de mis experimentos coincide si se manejan los datos como recíproca simple $R/H = f(R)$; ó como trazo de Scatchard $P/L = f(P)$, Figura 10.

Al comparar los 108 genes que yo infiero de T.cruzi con los 166 reportados para un tripanosomatídeo parásito

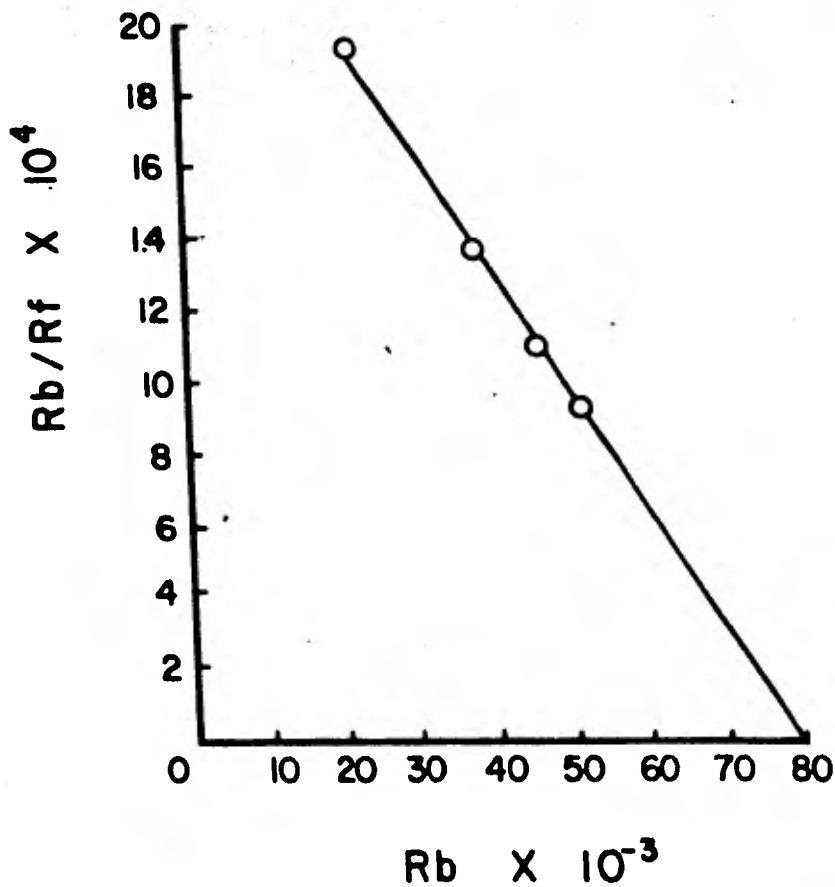


FIGURA 10. Gráfica de Scatchard del experimento de hibridación a saturación, obtenida con los datos de la Figura 7. Del intercecto con la abscisa se calculó un valor idéntico al calculado de la pendiente en la Fig. 8.

Leshmania donovani (18), cabe mencionar los siguientes puntos:

- 1.- El número de genes es aceptablemente similar.
- 2.- Aunque se reporta el tamaño del genoma por estimaciones químicas (difencilamina), el valor de 166 genes - en L. donovani fue calculado considerando un valor para el tamaño genómico basado en estudios cinéticos.
- 3.- Si recalculo la multiplicidad génica basado en el tamaño de genoma químico que reportan; resulta que L. donovani tiene alrededor de 112 genes ribosomales. Dato muy similar a los 108 que yo infiero en T. cruzi, usando un tamaño de genoma estimado químicamente (19).

Si la comparación se hace ahora en otros niveles de complejidad génica es impresionante que a lo largo de la escala evolutiva el número de cistrones ribosomales aumenta en forma "paralela" con el aumento en tamaño genómico (Figura 11). Con base a mis datos incluí a Trypanosoma cruzi +. Su posición siendo la esperada, constituye un control indirecto de la veracidad de mi determinación.

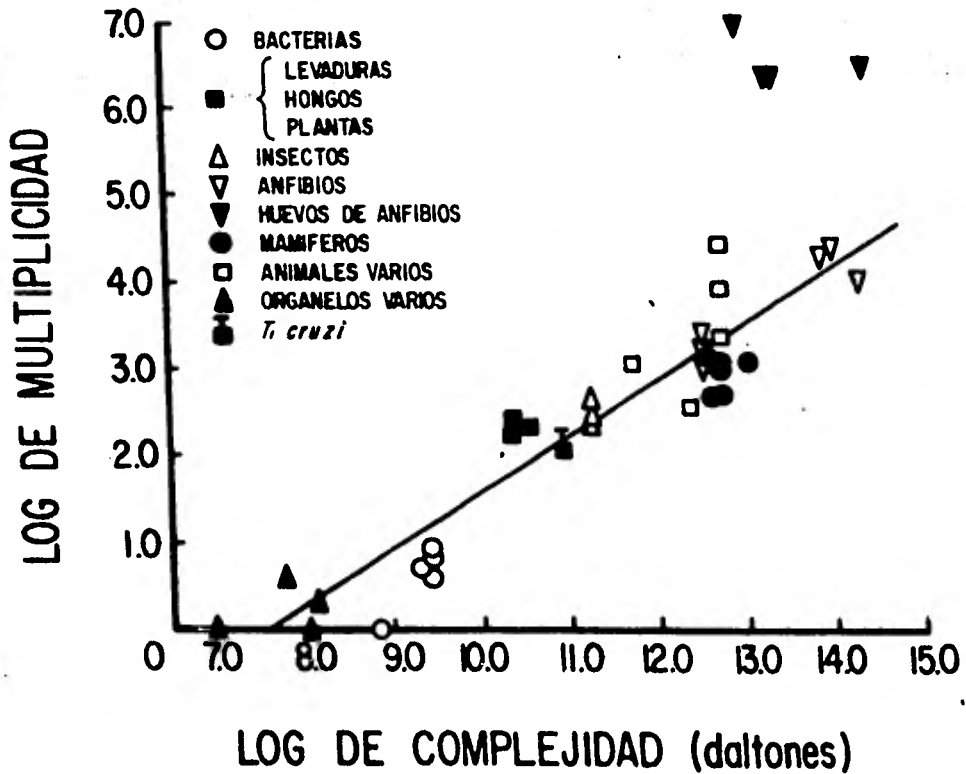


FIGURA 11. Gráfica de la redundancia de los cistrones ribosomales contra la complejidad génica en varios organismos, tomada de Birnsteil et al. (3). El valor obtenido en el presente trabajo para T. cruzi ha sido incluido dentro de ella.

Por último quiero enfatizar que las condiciones de hibridación cuantitativa, permitirán analizar distintos métodos preparativos de fraccionamiento de DNA; y de ésta manera purificar ó enriquecer el gene ribosomal para continuar su estudio tanto en forma bioquímica, como de microscopía electrónica.

V REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- American trypanosomiasis Research, Scientific Publication N° 318, Pan American Health Organization Brazil, marzo 1975.
- 2.- Enfermedad de Chagas en México, Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste, N° 1 serie documentos, San Cristóbal las Casas, Chis., México, 1978.
- 3.- Birnsteil M.L. Chipchase M y Speirs J. "The ribosomal RNA cistrons". en Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. 11:351-389, 1971.
Editors JN Davidson, Waldo E Cohn. Academic Press New York and London.
- 4.- Fedoroff N.V. "On spacers" Cell 10: 697-710, 1979.
- 5.- Camargo, E.P. "Grow and differentiation of Trypanosoma cruzi". Origin of Metacyclic trypanosomes in liquid medium. Revta. Inst. Met. Trot. S. Paulo; 6: 220-224, 1964.
- 6.- Castro H.C. Tesis profesional: Características de aislamiento y posible rompimiento oculto de la subunidad mayor de ARN ribosomal de epimastigotes de Trypanosoma cruzi. C.C.H. e I.I.B.M. de la U.N.A.M., 1980.

- 7.- Gillespie D y Spiegelman S. "A quantitative assay for DNA-RNA Hybrids with DNA immobilized on a Membrane". J. Mol. Biol. 12: 829-842, 1965.
- 8.- Burton K. "A study of the conditions and Mechanisms of the Diphenylamine Reaction for the Colorimetric Estimation of Deoxyribonucleic Acid". Biochem J. 62: 315-323, 1956.
- 9.- Procedures in Nucleic Acid Research. Cantoni y Davis Ed. pp 537. Harper and Row.
- 10.- Freifelder D. Physical Biochemistry. Applications to Biochemistry and Molecular Biology. pp 149. Freeman and Co. San Francisco, 1976.
- 11.- Voet and Vinograd. J. Phys Chem 65: 1138 (1961).
- 12.- McGhee R B, Cosgrove W B. "Biology and Physiology of the Lower Trypanosomatidae" Microbiological Reviews 44 (1): 140-173, 1980.
- 13.- Riou G F, Yot P. "Heterogeneity of the kinetoplast DNA molecules of Trypanosoma cruzi" Biochem 16 (11): 2390-2396 (1977).
- 14.- Purdom I., Williamson R., Birnstiel M.L. "Results and Problems of Cell Differentiation" Vol. 3 Springer Berlin citada en (3).

- 15.- Mc Conaughy B.L., Laird C.D. and Mc Carthy B.J.
"Nucleic Acid Reassociation in Formamide".
Biochemistry 8 (8): 3289-95, 1969.
- 16.- Bishop J.O. "The effect of Genetic Complexity on the
time Course of Ribonucleic Acid - Deoxyribonucleic
Acid Hybridization". Biochem J. 113: 805-811, 1969.
- 17.- Bishop J.O., Robertson F.W., Burns J., Melli M.
"Methods for the Analysis of Deoxyribonucleic Acid-
Ribonucleic Acid Hybridization Data".
Biochem J. 115: 361-370, 1969.
- 18.- Lion W., Fouts D.L. and Manning J. "Sequence
arrangement of the 16S and 23S rRNA genes in the
pathogenic haemoflagellate Leishmania donovani.
Nucl. Acid. Res. 5 (2): 491-504, 1978.
- 19.- Castro H.C., Hernández R. y Castañeda M. en prepara-
ción.

FE DE ERRATAS

La leyenda de la Figura 8 debe decir:

Análisis por regresión lineal de la recíproca simple $R/H = f(R)$ de la figura 7, en la cual la radioactividad específica del RNA fue de 69430 cpm/ μ g y la cantidad de DNA presente en los filtros de 20.05 μ g. $R = \mu$ g de RNA y $H =$ porcentaje de DNA en el híbrido. La línea que representa el ajuste de mínimos cuadrados fue $R/H = 2.521R + 76.296$ ($r = 0.9998$); el valor H s ó $1/m = 0.397\%$ de DNA.