

211
204



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**SECUENCIAS REPETIDAS EN EL ADN DE
Taenia solium Y *Taenia saginata***

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
VERONICA VALLEJO RUIZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

El presente trabajo forma parte de un proyecto cuya finalidad es la de desarrollar un método diagnóstico para diferenciar los huevos de *Taenia solium* de los de *Taenia saginata*. Para ello se decidió buscar en el DNA de ambas especies una secuencia repetida que se encontrara presente solo en una de ellas y pudiera así servir como sonda para desarrollar un método diagnóstico.

En este trabajo se analizó el DNA de *T. solium* y *T. saginata* con el objeto de encontrar secuencias repetidas y posteriormente determinar si éstas eran genes ribosomales.

Se realizaron digestiones del DNA total de ambas especies con diferentes enzimas de restricción y se llevaron a cabo electroforesis en geles de agarosa con el DNA digerido, observándose bandas de DNA repetido tanto en *T. solium* como en *T. saginata*.

Las bandas encontradas en ambas especies variaron mucho de tamaño dependiendo de la enzima con que fueron digeridas, desde aproximadamente 1600 hasta 15500 pares de bases (pb).

Con el objeto de determinar si las secuencias repetidas encontradas correspondían a genes ribosomales se realizaron experimentos en los que se digirió DNA de ambas especies, se transfirió a membranas de nitrocelulosa (MNC) y se hibridó con genes ribosomales de *Trypanosoma cruzi*.

La posición de las bandas de hibridación no correspondió a la posición de las bandas de DNA repetido observadas, y se

descartó la posibilidad de que estas secuencias repetidas fueran genes ribosomales.

En las bandas de secuencias repetidas observadas había algunas cuyo tamaño era compartido por ambas especies, como en el caso de la digestión con la enzima Xba I en la que el DNA de ambas especies presentó dos bandas, una de 5000 pb y la otra de 4000 pb aproximadamente; en la digestión con la enzima Hind III el DNA de ambas especies presentó una banda de 5400 pb. Con el resto de las enzimas el patrón de digestión fué diferente entre ambas especies.

Estos resultados sugieren que aunque ambas especies de tenia tienen algunas secuencias repetidas en común, otras son específicas, estas últimas deberían ser analizadas posteriormente para ser usadas como sonda en la diferenciación de huevos de *Taenia solium* y *Taenia saginata*.

INDICE

Página

I.	INTRODUCCION	1
II.	OBJETIVOS	21
III.	MATERIAL Y METODOS	22
	1. EXTRACCION DE ADN	22
	2. CUANTIFICACION Y DETERMINACION ESPECTROFOTO- METRICA DE LA PUREZA DEL DNA	23
	3. DETERMINACION SEMICUANTITATIVA DEL DNA EN GELES DE AGAROSA	24
	4. PREPARACION DE GELES DE AGAROSA	24
	5. DIGESTION DE DNA	25
	6. MARCAJE RADIOACTIVO DE DNA DE GENES RIBOSOMA- LES POR EL METODO DE NICK TRANSLATION.....	27
	7. ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE POLIACRIL- AMIDA AL 5%	30
	8. AISLAMIENTO DE FRAGMENTOS DE DNA DE GELES POLIACRILAMIDA	30
	9. TRANSFERENCIA DE DNA A MEMBRANA DE NITROCE- LULOSA POR EL METODO DE SOUTHERN	33
	10. HIBRIDACION DE DNA A MEMBRANAS DE NITROCE- LULOSA	36
IV.	RESULTADOS	38
V.	DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	52
VI.	BIBLIOGRAFIA	57
VII.	ANEXOS	51

I. INTRODUCCION

El impacto de las enfermedades parasitarias en el mundo es enorme. Aunque la distribución de algunas especies es cosmopolita, los protistas y helmintos parásitos prevalecen principalmente en las regiones tropicales. Aún con los avances del siglo XX, el diagnóstico de muchas de estas enfermedades es complejo y difícil, además de que el tratamiento no es el adecuado (Warren y Schmid 1989).

Los helmintos *Taenia solium* y *Taenia saginata* pertenecen al phylum Platyhelminthes, a la clase Cestoda, al orden Cyclophyllidea y a la familia Taeniidae (Cheng, 1976).

En el estado adulto *T. solium* y *T. saginata* son gusanos de cuerpo aplanado y alargado con una longitud promedio de 2 a 7 m, aunque *T. solium* llega a medir hasta 8 m y *T. saginata* hasta 12 m (Aluja y col. 1987). Su cuerpo está dividido en tres regiones: el escólex, la región del cuello y el estróbilo constituido por un gran número de segmentos llamados proglótidos (Cheng, 1976). El escólex mide entre 1 y 2 mm, porta cuatro ventosas musculares como órganos de fijación (Noble y Noble, 1976) que les permiten sobrevivir en lo que podría llamarse un medio ambiente hostil, en el cual los movimientos peristálticos del intestino y el paso directo de la comida digerida, hacen un requisito indispensable el poseer una forma eficiente de anclaje (Smyth y McManus, 1989).

El escólex de *T. solium*, presenta un roseto con doble hilera de ganchos, que pueden variar en número de 22 a 32, mientras que el de *T. saginata* carece de ellos. El escólex se continúa con el cuello, que es la porción germinal que da origen a los proglótidos. Esta última región está formada por 800-1000 proglótidos en *T. solium* y hasta 2000 proglótidos en *T. saginata*, cada uno de los cuales constituye una unidad de reproducción. Se pueden distinguir proglótidos inmaduros, que son los más cercanos al cuello y que no presentan órganos sexuales diferenciados, proglótidos maduros de la región media del gusano que exhiben órganos sexuales masculinos y femeninos y por último, proglótidos grávidos que sólo muestran un útero ramificado, lleno de huevos (Cheng, 1976 y Noble y Noble, 1976).

Se ha encontrado en *T. solium* que cada proglótido grávido contiene alrededor de 50000 huevos en distintos grados de madurez, alrededor de los cuales el 50% contiene embriones totalmente desarrollados (Aluja y col., 1987). En *T. saginata* se ha encontrado que cada proglótido contiene alrededor de 80000 huevos de los cuales, al igual que en *T. solium* el 50% son maduros o viables (Hall y col., 1981).

El ciclo de vida de los céstodos *T. solium* y *T. saginata* incluye a: el gusano adulto que parasita únicamente al hombre como hospedero definitivo, el cisticerco (metacéstodo) de *T. solium* que parasita al cerdo y al hombre y el de *T. saginata* que parasita a los bovinos como hospederos intermediarios, y

por último el huevo que se encuentra en el medio ambiente (Gemell y col., 1983).

Estos gusanos de color blanco lechoso se localizan adheridos a la mucosa del intestino delgado por medio de sus ventosas y para el caso de *T. solium* también por ganchos. Su alimento lo constituye el contenido intestinal del huésped. La captación y digestión del alimento se lleva a cabo en el sincicio celular del tegumento, a través del cual se absorbe por difusión o transporte activo de moléculas orgánicas de bajo peso molecular y probablemente también por endocitosis (Noble y Noble, 1976).

El huevo es la única etapa del ciclo de vida que está expuesta al medio ambiente. Algunas adaptaciones morfológicas le permiten sobrevivir en un ambiente difícil y al mismo tiempo responder de una manera sensible a aquellos estímulos que hacen posible que se establezcan en el lugar y huésped adecuados (Laclette y col., 1982).

Si bien la desecación y las altas temperaturas son factores limitantes para su sobrevivencia, estudios realizados en Kenya han demostrado que los huevos de *T. saginata* pueden sobrevivir y permanecer viables por un año al estar expuestos a los cambios climáticos en pastizales (Hall y col., 1981 y Pawlowsky, 1982). Se ha visto también que los huevos de *T. solium* pueden permanecer viables e infectantes en aguas negras, ríos, pastos, etc. por semanas o meses (Aluja y col., 1987).

Los huevos de tenia miden de 30 a 40 nm de diámetro y están constituidos por una serie de cubiertas: la cápsula, que corresponde a la capa más externa y que usualmente se pierde en las heces fecales; el embrióforo, formado por pequeños bloques de queratina unidos entre sí por material cementante que da a los huevos su apariencia característicamente radiada, finalmente la membrana oncosférica que rodea directamente a la oncosfera o embrión hexacanto (Laclette y col., 1982). La estructura de la oncosfera no varía entre una y otra especie y está compuesta esencialmente por un epitelio que presenta extensiones hacia el citoplasma, un complejo sistema de músculos que opera los tres pares de ganchos, un par de glándulas que le ayudan a penetrar dentro del huésped, células germinativas a partir de las cuales se desarrolla y un sistema nervioso primitivo (Smyth y McManus, 1989).

El cisticerco es una vesícula ovalada translúcida llena de líquido que mide alrededor de 6 a 18 mm de longitud, con un pequeño escólex invaginado que en *T. solium* presenta un roseto con doble corona de ganchos que en número varía de 22 a 32, además de cuatro ventosas. Estas últimas también se presentan en *T. saginata*, donde está ausente la doble corona de ganchos (Aluja y col., 1987). En ambas especies el cisticerco pierde los tres pares de ganchos que se observan en la etapa de huevo (Cheng, 1976).

El hombre adquiere la teniasis cuando come carne

infectada de cerdo o de bovino mal cocida o cruda (Noble y Noble, 1976). Tanto las enzimas intestinales como las sales biliares activan el escólex, que evagina y posteriormente se fija a la pared intestinal. Allí crece y se diferencia hasta convertirse en una tenia adulta productora de proglótidos grávidos. Los huevos son eliminados al exterior contenidos en los proglótidos que se desprenden del gusano adulto cuando están grávidos (Aluja y col., 1987).

La cisticercosis se adquiere al ingerir alimentos o líquidos contaminados con huevos. La dispersión de los huevos de tenia en el medio ambiente es facilitada por el viento, el agua y por el transporte pasivo en vertebrados e invertebrados. Una vez que el huevo es ingerido y alcanza el tubo digestivo del huésped intermediario, las enzimas proteolíticas y las sales biliares proporcionan la señal para la activación de la oncosfera (Aluja y col., 1987). El proceso de activación se establece cuando la substancia cementante que une a los bloques del embrióforo es digerida por las enzimas del tracto intestinal y ocasiona la disgregación del embrióforo restableciendo de esta manera la comunicación de la oncosfera con el medio exterior, recibiendo así, señales del mismo (Laclette y col., 1982; Pawlowsky, 1982).

Una vez activada, la oncosfera penetra la pared intestinal del huésped hasta alcanzar capilares linfáticos y sanguíneos a través de los cuales puede ser transportada a

una gran variedad de órganos y tejidos. La oncosfera requiere de cuando menos 10 semanas para convertirse en un cisticerco (Aluja y col., 1987).

La localización más común de los cisticercos en el ser humano es el sistema nervioso central, aunque también pueden hallarse en ojo y músculo esquelético. En cerdos se localizan principalmente en músculo esquelético y sistema nervioso central (Malagón, 1989). La localización de los cisticercos en bovinos se da principalmente en músculo cardiaco y estriado (Hammerberg y col., 1978); sin embargo, otros estudios han demostrado que se encuentran dispersos a través de la musculatura y pueden encontrarse en casi cualquier órgano (Gemell y col., 1983).

El ciclo se cierra cuando el ser humano ingiere la carne cruda o insuficientemente cocida proveniente del cerdo o bovino cisticercoso y desarrolla la tenia (Aluja y col., 1987).

La teniasis/cisticercosis prevalece en sitios donde existen malas condiciones de vivienda e higiene, fecalismo al aire libre y otras condiciones ambientales y socioeconómicas que favorecen la infección. La parasitosis causada por *T. solium* se localiza principalmente en Africa, Asia y América Latina, siendo México y Brasil los países más afectados del continente americano (Sarti, 1989). Como resultado de condiciones sanitarias y educacionales adecuadas, en Europa Occidental, Canadá, Estados Unidos y Japón, la infección

humana por *T. solium* y la cisticercosis en cerdos son casi inexistentes y por lo tanto, la cisticercosis humana ha desaparecido prácticamente (Schenone y col., 1982 y Mahajan, 1982).

La *T. saginata* está distribuida por todo el mundo y su incidencia en muchos lugares es mayor que la de *T. solium*; sin embargo, su infección es particularmente importante en Africa y América Latina así como en los países del Mediterráneo (Gemell y col., 1983; Mahajan, 1982, Pawlowsky y Schultz, 1972).

La incidencia de teniasis ha sido reportada por varios autores. En 1947, Stoll estimó que en el mundo existen cerca de 39 millones de personas infectadas con *T. saginata* y 2.5 millones con *T. solium*, pero hay una clara carencia de información acerca de la prevalencia de esta parasitosis (Mahajan, 1982).

La incidencia de teniasis en la población de México se ha considerado que se encuentra entre el 0.1 al 1.0%. Sin embargo, en un grupo de 30 pacientes con cisticercosis ocular se encontró que dos de ellos eran portadores de *T. solium*, lo que representa el 6.6% del total de pacientes (Cárdenas y col., 1989). En otro estudio de pacientes con cisticercosis comprobada se encontró que en el 20% de ellos había antecedentes de teniasis (González-Barranco, 1978). Por otro lado en estudios realizados también en México se encontró que la presencia de *T. solium* ha variado del 0.5 al 6.0% durante

el último lustro (Sarti, 1989).

La variabilidad encontrada en los datos sobre la prevalencia de teniasis se debe entre otras causas a que los métodos coproparasitológicos utilizados para diagnóstico no son muy sensibles ni específicos, y a que el curso clínico de la enfermedad es generalmente muy benigno y en ocasiones es asintomático pudiendo pasar desapercibida (Mahajan, 1982). Cuando se presentan síntomas éstos son: dolor abdominal, náusea, debilidad, pérdida de peso, incremento del apetito, dolor de cabeza, constipación, diarrea y prurito anal (Gemmell y col., 1983 y Pawlowsky y Schultz, 1972).

El diagnóstico se hace habitualmente por la observación de los proglótidos o de huevos en tamizados de heces (Sarti, 1989). En ocasiones se utiliza un raspado perianal para remover los huevecillos de la tenia (Hall y col., 1981). Sin embargo, la detección de huevecillos no permite un diagnóstico de especie para distinguir entre la infección por *T. saginata* o *T. solium* (Aluja y col., 1987).

El diagnóstico se dificulta cuando en el material disponible existen pocos proglótidos en estado de preservación pobre.

Es de gran importancia epidemiológica y clínica distinguir los pacientes infectados con una u otra especie, dada la infectividad de los huevos de *T. solium* en el hombre. Las especies pueden ser diferenciadas con certeza mediante la observación del escólex; en algunas ocasiones

por los proglótidos desarrollados preservados adecuadamente. Cuando se sospecha la presencia de estos parásitos en el paciente y es tratado por ejemplo, con praziquantel, los caracteres morfológicos tales como la estructura del ovario y el número de ramas uterinas es poco probable que puedan ser reconocidos (Proctor, 1972). El escolex es difícil de encontrar después del tratamiento con drogas tenicidas modernas, ya que éstas causan la desintegración de la pared proximal del estróbilo (Gemmell y col., 1983).

En el caso de *T. saginata* los proglótidos pueden ser expulsados en las heces o pueden salir del hospedero sin que haya defecación, ya que presentan movimiento y pueden migrar (Gemmell y col., 1983). Generalmente, la expulsión va acompañada por una sensación característica de movimiento crepitatorio en el recto y en la última parte de la región anal. (Sterba y Dykova, 1979). En la infección por *T. solium*, los proglótidos grávidos se desprenden espontáneamente del gusano adulto y son evacuados hacia el exterior en las heces fecales del huésped (Aluja y col., 1987), siendo la descarga siempre pasiva ya que los proglótidos no presentan movimiento (Gemmell y col., 1983).

Se pueden establecerse las diferencias entre especies mediante estudios bioquímicos. Por ejemplo, la electroforesis de proteínas y de enzimas del parásito, permite el reconocimiento de patrones electroforéticos característicos de cada especie. Bandas diferentes de proteínas específicas

han sido identificadas en electroforesis de geles de poliacrilamida en extractos de estróbilo de *T. solium* y *T. saginata*. Esta técnica no es práctica como método de diagnóstico rutinario debido a que el material del parásito debe ser procesado inmediatamente o sometido a temperaturas de congelación hasta su uso y a que los modelos electroforéticos son difíciles de interpretar (Gemell y col., 1983 y Rishi y McManus, 1987).

En el suero de personas portadoras de la tenia adulta se ha encontrado un incremento significativo en los niveles de IgG e IgA que retornan a valores normales cuando la tenia es eliminada. Sin embargo, hasta la fecha no se ha podido asociar ningún anticuerpo específico con el incremento de los niveles de inmunoglobulinas. Actualmente, las pruebas inmunológicas tienen poco que ofrecer en el diagnóstico de la teniasis humana (Gemell y col., 1983).

Los métodos de diagnóstico por lo general emplean macromoléculas del parásito o del hospedero que se encuentran sujetas a variaciones que pueden ser debidas a cambios en el medio ambiente, a diferencias entre un individuo y otro y la etapa del ciclo de vida del parásito. En cambio, el ácido desoxirribonucleico (DNA) de un organismo no varía durante todo su ciclo de vida. La secuencia de DNA en la etapa de huevo es la misma que la de la larva y adulto de la misma especie (Barker, 1987). Por lo tanto, el uso de sondas de DNA con fines diagnósticos, resuelve problemas asociados con la

etapa de ciclo de vida o variaciones causadas por el medio ambiente. Se tiene la ventaja adicional de que un extracto de DNA genómico es químicamente estable y puede ser almacenado por largos periodos de tiempo (Murray y col., 1988).

El conocimiento actual de los ácidos nucleicos en cóstodos es muy limitado cuando se compara con el de otros organismos. Sin embargo, los recientes avances en biología molecular están proporcionando métodos altamente específicos que permiten identificar cóstodos y estudiar sus relaciones filogenéticas (Smyth y McManus, 1989).

Existen dos tipos de ácidos nucleicos, el ácido ribonucleico (RNA) y el ácido desoxirribonucleico (DNA). Estos ácidos están constituidos por cuatro bases: la adenina y la guanina (purinas) y la citosina y timina (pirimidinas), ésta última es reemplazada en el RNA por uracilo (Freeland, 1981). La unidad de azúcar del DNA carece de un átomo de oxígeno por lo que se le denomina desoxirribosa, mientras que la unidad de azúcar del RNA es la ribosa (Sornberg, 1978). Cada molécula de DNA contiene dos cadenas complementarias de desoxirribonucleótidos mientras que la de RNA suele tener una sola cadena compuesta de una secuencia lineal de ribonucleótidos (Smyth y McManus, 1989).

Una de las características más notables de la hélice de DNA y que además es crucial para sus funciones durante la replicación y transcripción, es la facilidad con que sus cadenas componentes pueden separarse y volver a juntarse. La

doble cadena del DNA se separa cuando se rompen los enlaces de hidrógeno existentes entre las bases. Esta característica de la estructura secundaria puede llevarse a cabo en solución aumentando la temperatura o bien, por titulación con ácidos o álcalis. La desnaturalización es reversible incluso después de que las dos cadenas han sido totalmente separadas. Cuando se incuban cadenas complementarias a 25°C por debajo de la temperatura de desnaturalización, empiezan a reasociarse y llega un momento en que se vuelve a formar la doble hélice original (Sornberg, 1978).

El DNA eucarionte puede ser dividido en tres clases de secuencias: únicas, que se encuentran una o muy pocas veces repetidas en el genoma haploide; las moderadamente repetidas, de las que se encuentran hasta 10^5 copias por genoma haploide y las altamente repetidas con 10^6 o más copias por genoma haploide (Robertis y col., 1977).

Se sabe que la presencia de secuencias repetidas en el DNA es una característica constante de todas las células eucariontes. Esto se demostró utilizando las propiedades de reconocerse y reasociarse que poseen dos cadenas de DNA complementarias cuando están separadas, las técnicas de desnaturalización y renaturalización se basan esencialmente en el hecho de que la reasociación de las cadenas de DNA es más rápida entre mayor sea el número de secuencias repetidas en sus moléculas (Robertis y col., 1977 y Darnell y col.,

1986).

Cuando se analiza de esta forma el DNA de un mamífero, se observa que aproximadamente el 70% de las cadenas de DNA se reagrupan tan lentamente como cabría esperar de un gran grupo de secuencias únicas, necesiándose días para que se complete el proceso. El DNA restante se une con mayor rapidez debido a que contiene secuencias que están repetidas en el genoma y por ello colisionan con una pareja complementaria relativamente pronto. Del 30% de DNA restante, el 20% representa a las secuencias moderadamente repetidas. El 10% restante corresponde a las secuencias llamadas altamente repetidas (Alberts y col., 1983).

Se sabe que los helmintos parásitos tienen genomas moderadamente largos cuyo tamaño se estima entre 8×10^7 pb y 2.7×10^8 pb, que contienen secuencias altamente repetidas, moderadamente repetidas y únicas (Barker, 1989). Una gran parte del DNA se ha agrupado en familias de secuencias repetidas en las que la similitud puede ser atribuida a un origen común (Britten y Kohne, 1968).

En general, las secuencias únicas contienen, aunque no exclusivamente, genes que codifican proteínas (Alberts y col., 1983).

Las secuencias moderadamente repetidas comprenden genes que codifican para RNA ribosomal, RNA de transferencia, histonas, actina, β -globina e inmunoglobulinas, pero la mayor

parte de éstas están constituidas de secuencias cuya función es desconocida (Lewin, 1982). Los genes ribosomales se encuentran muy conservados entre las especies debido a que la estructura del RNA ha sido seleccionada de tal manera que algún cambio en la misma no es fácilmente tolerado por el aparato de síntesis proteica (Alberts y col., 1983).

El hecho de que el RNA esté relativamente bien conservado a través de la evolución ha sido puesto en duda ya que en estudios recientes el mapeo por enzimas de restricción de estos genes ha revelado heterogeneidad en la estructura de las diferentes especies. Estas diferencias observadas se atribuyeron a las regiones espaciadoras no transcritas y se asumió que las regiones codificantes eran homogéneas sin embargo esto se ha descartado para algunas especies.

En *Xenopus laevis* se ha encontrado heterogeneidad en los tres espaciadores transcritos de genes ribosomales. Esta heterogeneidad incluyó cambios en las bases y variantes en la longitud. Los sitios de variación encontrados fueron amplios y no estuvieron distribuidos uniformemente (Stewart y col., 1983).

En estudios con *Drosophila melanogaster* el gen que codifica para el RNA ribosomal 18S en el organizador nucleolar del cromosoma X presenta diferencias con respecto al mismo gen en el organizador nucleolar del cromosoma Y. Aunque el presente estudio solo reveló un cambio de base en el gen que codifica para el RNA 18S podrían existir otras

diferencias entre los organizadores nucleolares que fueron detectadas por la técnica (Yagura y col., 1979).

Por otro lado, regiones no transcritas de genes ribosomales se han utilizado como sondas para diagnóstico como es el caso de *Schistosoma haematobium* en el que se utilizan estas secuencias como sondas para diferenciar dicha especie de otras del mismo género, demostrando que entre individuos de la misma especie no existe gran heterogeneidad.

Las secuencias altamente repetidas son generalmente componentes estructurales del genoma y la mayor parte se localiza en posiciones centroméricas y teloméricas. El DNA altamente repetido se denomina también DNA satélite porque con frecuencia puede segregarse del DNA restante por centrifugación en cloruro de cesio (Robertis y col., 1977 y Darnell y col., 1986).

Se ha encontrado que la mayor parte de DNA satélite no es transcrito a RNA (Lewin, 1982). Sin embargo, en experimentos realizados con el DNA de ratón, se encontró que secuencias altamente repetidas son activamente transcritas pero no se definió en este estudio la función de tales transcritos (Never-Nitsche y col., 1988).

Se han sugerido diferentes funciones para el DNA repetido (moderada y altamente repetido) como el estar involucrado en el apareamiento de cromosomas, el control de la expresión génica, en el procesamiento de los precursores del RNA

mensajero y en alguna participación durante la replicación del DNA (Lewin, 1982).

Experimentos realizados con secuencias repetidas en el DNA de *Plasmodium berghei*, indican que ciertas variaciones en la organización del genoma inducen la amplificación de algunas porciones de éste, asociadas con la producción de gametocitos viables. Esta amplificación del DNA se ha observado cuando la infectividad es alta, ya que la cantidad de secuencias repetidas extraídas del DNA total en una población de eritrocitos infectados es del 16 al 18%. Cuando la infectividad es baja, preparaciones similares de la misma cepa contienen únicamente del 3 al 5% de DNA repetido (Dore, y col., 1983).

Las secuencias moderada y altamente repetidas son útiles para estudios de taxonomía (Murray y col., 1988), ya que se ha visto que existe una clara diferencia entre secuencias de DNA satélite entre especies diferentes sin importar que tan cercanas estén filogenéticamente entre sí (Lewin, 1982). Ello se debe a que dichas secuencias pueden aceptar mutaciones a una tasa relativamente alta (Meredith y col., 1989). El DNA que no codifica puede evolucionar rápidamente y mostrar diferencias entre especies sin ser afectadas. Como ejemplos podemos citar a los intrones, a los pseudogenes y DNA no conservado (Barker, 1989). Ello ha permitido que las secuencias altamente repetidas sean usadas exitosamente como sondas especie-específicas en el diagnóstico de muchas

parasitosis (Meredith y col., 1987).

La introducción de la tecnología del DNA recombinante ha tenido un doble impacto. Primero, permite a los investigadores preparar grandes cantidades de fragmentos de DNA específico que pueden ser empleados como sondas para el estudio de esas secuencias genéticas específicas; en segundo lugar, la tecnología de las sondas y la hibridación ha llegado a ser el punto central para la identificación y caracterización de los fragmentos de DNA clonados (Kinsbury, 1987). La importancia de la hibridación de ácidos nucleicos como herramienta para la detección e identificación de organismos infectivos, fué demostrada por primera vez a principios de la década de los 70's en el estudio de cultivo de células transformadas en tumores por virus (Kingsbury, 1987).

Se han reportado ensayos de hibridación para la detección de DNA de *Plasmodium falciparum* en la sangre de pacientes infectados con dicho parásito, usando como sonda una secuencia repetida de DNA del mismo (Fránzel y col., 1984).

También han sido reportados experimentos de clonación y caracterización de una secuencia de DNA altamente repetida presente en el genoma de *Onchocerca axillata*, que no presenta hibridación cruzada significativa con el DNA genómico de otras especies del mismo género, tales como: *O. volvulus*, *O. gutturosa*, *O. ochengi*, *O. gibsoni* y *O. lienalis* (Murray y col., 1989).

En contraste con esta información, se ha encontrado que en los cetáceos existen secuencias altamente repetidas que son compartidas por diferentes familias y aún por grupos con poca relación, tales como los odontocetos y misticetos, por lo que estas secuencias han sido de gran utilidad para proporcionar respuestas a preguntas de filogenia en mamíferos marinos debido a la evolución lenta que han tenido (Arnason, 1982). La similitud encontrada en el DNA de los cetáceos no coincide con lo encontrado para otras especies entre las que las secuencias altamente repetidas presentan una clara diferencia (Arnason y col., 1984).

Con la finalidad de establecer un método diagnóstico altamente específico y sensible en teniasis humana se estandarizó la hibridación de sondas de DNA total a huevecillos de *T. saginata* y *T. pisciformis* con excelentes resultados (Flisser y col. 1988).

Posteriormente, cuando se fijaron huevecillos de *T. solium* y *T. saginata* en diferentes cantidades (desde 1 hasta 500) a una membrana de nitrocelulosa y se hibridaron con DNA total de ambas especies, se obtuvo una mayor marca en la hibridación de DNA de *T. solium* contra huevecillos de *T. saginata* que contra huevecillos de la misma especie (Fig. 1). De ello se dedujo que los resultados obtenidos probablemente se debían a que *T. solium* y *T. saginata* comparten secuencias repetidas que son más abundantes en *T. saginata*, habiendo por lo tanto un mayor cantidad de estas secuencias en un

huevecillo de *T. saginata* que en uno de *T. solium*. En base en estos resultados y considerando que se trata de especies muy cercanas se podría explicar porque se obtuvo una mayor hibridación entre los DNA heterólogos que entre los homólogos. Sin embargo, hay que tomar en consideración que los huevos de *T. saginata* se mantuvieron en congelación hasta su uso, mientras que los de *T. solium* se mantuvieron en alcohol al 70%, lo que pudo haber influido en los resultados.

Por otra parte, cuando se hibrida DNA total de *T. solium* a DNA total de *T. saginata* y de *T. solium* se observa una marca de hibridación muy semejante entre el DNA de la misma especie que con el heterólogo. Sin embargo, cuando se usa como sonda el DNA genómico total de *T. saginata* y se hibrida con DNA genómico total de *T. solium* y *T. saginata*, se observa una marca de hibridación mucho mayor con el DNA de *T. saginata* que con el de *T. solium* (Fig.1). Estos resultados concuerdan con los anteriores y con la suposición de que ambas especies comparten ciertas secuencias repetidas que están en mayor número en el DNA de *T. saginata* que en el genoma de *T. solium*, dando como resultado que se unan más moléculas de DNA de *T. solium* al DNA de *T. saginata* que viceversa (Flisser, comunicación personal).

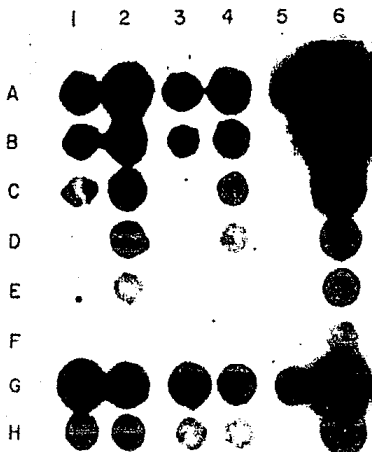


Fig. 1. las columnas 1, 3 y 5 presentan huevos de *T. solium* y las columnas 2, 4 y 6 huevos de *T. saginata*, la fila A contiene 300 huevos; la fila B, 100; la fila C, 50; la fila D, 10 y la F, 1. Las alícuotas de huevos fueron hervidas a 90°C durante 5 min, colocados inmediatamente después en hielo y fijados a la MNC por el método del "dot blot". También se fijó a la MNC DNA genómico total del gusano adulto de *T. solium* (columnas 1 y 3), de cisticercos de *T. solium* (columna 5) y del gusano adulto de *T. saginata*, 10 ng para la fila G y 1 ng para la H. Las sondas utilizadas para hibridar fueron tres: 1 µg de DNA del gusano adulto de *T. solium* para las columnas 1 y 2, 1 µg de DNA de cisticercos de *T. solium* para las columnas 3 y 4 y 1 µg de DNA del gusano adulto de *T. saginata* para las columnas 5 y 6, las sondas fueron marcadas con P^{32} por el método de "nick translation".

II. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

El presente trabajo forma parte de un proyecto cuya finalidad es desarrollar un método diagnóstico que permita diferenciar los huevos de *T. solium* de los de *T. saginata*.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

2.1 Demostrar la presencia de secuencias repetidas en el DNA de *T. solium* y *T. saginata*.

2.2 Determinar si las secuencias repetidas corresponden a genes ribosomales.

III. MATERIAL Y METODOS

1. EXTRACCION DEL DNA

Se obtuvieron 100 cisticercos de *T. solium* de músculo de cerdo infectado que inmediatamente se colocaron en alcohol al 70% a 4°C donde se mantuvieron hasta su uso.

La técnica de extracción del DNA es una modificación de la descrita por Maniatis y col., (1982). Los cisticercos se colocaron en un mortero que contenía nitrógeno líquido y se homogenizaron. El homogenado fué resuspendido en 0.3 ml de sulfato dodecil de sodio (SDS) al 10% y 2.7 ml de TE que está compuesto por tris (hidroximetil) aminometano (Tris) (Sigma Chemical Company) y ácido etilendiaminotetracético (EDTA) (Sigma). Posteriormente se agregaron 120 µl de proteinasa K (Sigma) a una concentración de 20 mg/ml y se incubó 1 h a 37°C con agitación constante. Al término de la incubación se realizaron dos extracciones con fenol, una con fenol cloroformo y otra con cloroformo. En cada extracción se agregó un volumen del solvente respectivo mezclando suavemente 5 min y centrifugando a 4080 G durante 5 min, en cada extracción se recuperó siempre la fase acuosa.

El RNA presente en la muestra fué degradado agregando 6µl de ribonucleasa (RNAsa) de páncreas de bovino tipo XII A

Nota: la preparación de todas las soluciones empleadas en esta tesis se describe en la sección de anexos.

(1mg/ml) (Sigma) y se incubó a 37°C por 1 h. Finalizada la incubación se realizó una extracción con fenol-cloroformo, una con cloroformo y dos con éter.

El DNA fué precipitado con 2.5 vol. de etanol y 1/10 del volumen total de acetato de sodio 3M, colocándolo a -70°C durante 1 h y centrifugando a 12000 G durante 20 min a 4°C.

El DNA precipitado fué lavado dos veces con etanol al 70% y centrifugado nuevamente a 12000 G durante 10 min. Finalmente el DNA precipitado y secado fué resuspendido en agua bidestilada estéril y guardado a 4°C.

El DNA de *T. saginata* fué obtenido con la misma técnica pero a partir del gusano adulto. La tenia fué lavada tres veces en solución TE y antibióticos (penicilina y estreptomycinina 250 µg/ml) y posteriormente congelada a -70°C hasta su uso.

2. CUANTIFICACION Y DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE LA PUREZA DEL DNA.

Para determinar la cantidad de DNA obtenido de la extracción, se midió la densidad óptica de la solución de DNA haciendo una dilución de 1:200 de la misma y leyendo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm (1 U.O. a 260 nm = 50 µg/ml). La pureza fué determinada leyendo además a 280 nm y calculando el cociente de 260/280 (Maniatis y col., 1982).

3. DETERMINACION SEMICUANTITATIVA DEL DNA EN GELES DE AGAROSA.

Se llevó a cabo una electroforesis en agarosa (Bio-Rad) de varias diluciones del DNA obtenido y de un marcador de peso molecular (DNA del fago λ - Hind III) (Cuadro I) y se determinaron de manera aproximada tanto la cantidad de DNA obtenido así como su grado de fragmentación.

CUADRO I. VALORES DE REFERENCIA DE UNA MUESTRA DE 200 NG DE DNA DEL FAGO λ DIGERIDO CON Hind III.

BANDA N°	FAGO λ (pb) 48427 pb	CANTIDAD (ng) 200ng
1	23130	95.1
2	9416	38.7
3	6682	27.4
4	4361	17.9
5	2322	9.5
6	2027	8.3
7	564	2.3
8	125	0.5

4. PREPARACION DE GELES DE AGAROSA.

La preparación de geles de agarosa se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Maniatis y col. (1982).

A 0.8 g de agarosa estandar de bajo peso molecular (Bio-Rad), se agregaron 10 ml de solución de Tris-borato-EDTA (TBE) 10X y 90 ml de agua destilada. La agarosa se disolvió en un horno de microondas y se agregaron 2 μ l de una solución de bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/ml. La agarosa se vertió en la cámara de electroforesis y se dejó solidificar; posteriormente se agregó 1 μ l de amortiguador

para electroforesis (TBE 1X con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio) y se esperó unos minutos antes de quitar el peine.

5. DIGESTION DE DNA.

El DNA de *T. solius* y de *T. saginata* fué digerido con siete diferentes enzimas llamadas endonucleasas de restricción: Bam HI, Eco RI, Hind III, Xba I, Xho I, Hae III e Hinf I (Bethesda Research Laboratories, BRL). Las condiciones empleadas para las digestiones con las enzimas corresponden a las especificadas por la casa comercial. La concentración de enzima utilizada correspondió a una unidad por µg de DNA digerido. En el cuadro II se muestran los amortiguadores usados, la temperatura de reacción y la secuencia que reconoce cada enzima. En el cuadro III se muestra la composición de los diferentes amortiguadores empleados para las enzimas.

CUADRO II. ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

ENZIMA	AMORTIGUADOR	TEMPERATURA DE INCUBACION	SECUENCIA QUE RECONOCE
Bam HI	3	37°C	G-GATCC
Eco RI	3	37°C	G-AATTC
Hae III	2	37°C-70°C	GG-CC
Hinc II	4	37°C	GTPy-PuAC
Hind III	2	37°C-55°C	A-AGCTT
Hinf I	2	37°C	G-ANTC
Sau 3A	2	37°C	-GATC
Xba I	2	37°C	T-CTAGA
Xho I	2	37°C	C-TCGAG

CUADRO III. SOLUCIONES AMORTIGUADORAS USADAS CON LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

SOLUCION AMORTIGUADORA	NaCl	Tris-cl	MgCl	Ditiotreitol
1	~	50mM	10mM	1mM
2	50mM	50mM	10mM	1mM
3	100mM	50mM	10mM	1mM

En 7 tubos Eppendorf se agregaron 200 ng de DNA de *T. solium* y en otros 7, 200 ng de DNA de *T. saginata*. El DNA de los tubos 1 y 8 fué digerido con la enzima Bam HI, el de los tubos 2 y 9 fué digerido con Eco RI, los tubos 3 y 10 con Hind III, los 4 y 11 con Xba I, los tubos 5 y 12 con Xho I, los tubos 6 y 13 con Hae III y los tubos 7 y 14 con Hinf I. A cada tubo se agregaron los reactivos en el siguiente orden: el DNA a digerir, la solución amortiguadora de la enzima (1/10 del volumen total de la reacción), agua destilada (para completar 200 μ l) y por último la enzima (1 U/ μ g).

Los tubos se incubaron durante 6 h a 37°C. Para comprobar si el DNA estaba bien digerido, de cada tubo se tomaron 10 μ l y se les agregaron 2 μ l de una solución de azul de bromofenol 6X y se llevó a cabo una electroforesis en un gel de agarosa 0.8%.

El DNA digerido fué precipitado y resuspendido en 10 μ l de TE y 2 μ l de azul de bromofenol 6X y se llevó a cabo la electroforesis del mismo en un gel de agarosa 0.8% a 90 V.

El gel fué observado en un transiluminador de luz UV y fotografiado.

6. MARCAJE RADIACTIVO DE DNA DE GENES RIBOSOMALES POR EL METODO DE NICK TRANSLATION

Se tomaron 250 ng (10 μ l) de la clona pR1C81 que contiene a los genes ribosomales S2, S6 y parte del 24S de *Trypanosoma cruzi* (Fig. 2). Se agregaron 5 μ l de la solución amortiguadora 10X para "nick translation" (BRL), 1 μ l de dCTP 1 mM, 1 μ l de dGTP 1 mM, 1 μ l de dTTP 1 nM y 33 μ l de agua destilada. Todo ello se mezcló suavemente agregándose posteriormente 1 μ l de DNAasa (BRL) (manteniendo siempre la enzima en hielo) a una concentración de 10 ng/ μ l y se dejó incubando durante 30 seg a 37°C. Después se agregó 1 μ l de DNA polimerasa I (BRL) a una concentración de 5 μ g/ μ l y 2 μ l de α dATP³² (3000 Ci/mmol, Dupont) incubándose durante 90 min a 16°C (Maniatis y col., 1982). Los isótopos radiactivos se manejaron con mucho cuidado usando doble guante, bata y pantalla de acrílico como protección, teniendo siempre a la mano el contador Geiger para revisar los instrumentos o lugares que pudieran haber sido contaminados por ellos.

Al término de la incubación se realizaron tres extracciones, una con fenol y dos con éter. La mezcla se guardó a -20°C en un vial de plomo durante una noche.

Para separar el DNA marcado de los nucleótidos no incorporados, se preparó una columna de Sephadex G-50 (Bio-Rad) en una pipeta estéril de 5 ml para pasar por ella

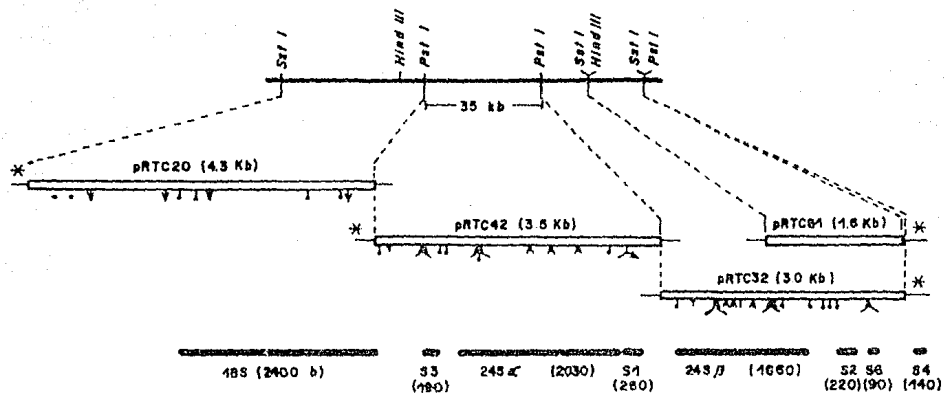


Fig. 2 Mapa del gen que codifica para el RNA ribosomal en *T. cruzi* insertado en puc 18 (Hernández y Castañeda, 1988).

la mezcla radiactiva. La columna fué lavada con 5 ml de TE después de los cuales se fué agregando el DNA marcado. Una vez que éste entró en la columna, se continuó agregando lentamente la solución TE para evitar la dilución del DNA. En cuanto se agregó la mezcla radiactiva se recolectaron 6 gotas por tubo en un total de 20 tubos.

En frascos numerados del 1 al 20 se agregaron 5 ml de líquido de centelleo y 1 μ l de la fracción previamente recolectada en cada uno de los tubos. Los frascos fueron leídos en el contador de líquido de centelleo para cuantificar el nivel de marcaje del DNA.

Los tubos que contenían la fracción del DNA marcado se juntaron en una sola fracción y antes de ser agregada a la solución de hibridación (previamente calentada a 68°C) fué hervida durante 10 min para separar la doble cadena de DNA.

Las clonas pRTC20 y pRTC42 (Fig. 2) también fueron utilizadas para hibridar al DNA de *T. solium* y de *T. saginata*. Para ello se digirieron 2 μ g de la clona pRTC20 con la enzima Hinc II y 2 μ g de la clona pRTC42 con Sau 3A, con el objeto de separar el gen ribosomal del plásmido (pUC18) en el que estaba insertado. Al digerir el pRTC20 con Hinc II se obtuvo un fragmento del gen ribosomal de aproximadamente 1440 pb que fué seleccionado para ser usado como sonda, otro de alrededor de 3800 pb que contenía el vector y los extremos 3' y 5' del gen ribosomal, así como

otros fragmentos más pequeños de 960 y 800 pb. Por otro lado, al digerir la clona pRTC42 con la enzima Sau 3A se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1667 pb que fué usado como sonda el cual contenía una gran parte del gen ribosomal 24S y otros fragmentos más pequeños de 1070, 945, 792, 725 pb. La digestión se llevó a cabo durante 3 horas siguiendo las condiciones ya descritas en la digestión del DNA.

Se realizaron tres extracciones, una con fenol y dos con eter.

El DNA fué precipitado y una vez seco fué resuspendido en 15 μ l de TE. Finalmente, se llevó a cabo una electroforesis de las digestiones en un gel de poliacrilamida.

7. ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE POLIACRILAMIDA AL 5%

Se prepararon 58 ml de una solución de acrilamida al 28% y bisacrilamida al 0.6%, a la que se le agregaron 8 ml de TBE 10X y 580 μ l de persulfato de amonio (Bio-Rad) a una concentración de 100 mg/ml. Todo ello se mezcló y se degasificó al vacío luego de lo cual se agregaron 58 μ l de tetrametiletilendiamino (Temed Bio-Rad), mezclándose suavemente para evitar que entrara aire en la mezcla y vertiéndose inmediatamente en la cámara de electroforesis, la cual fué construida con dos vidrios y tres separadores (Fig 3). Una vez vertida la mezcla de poliacrilamida se colocó el peine y se dejó polimerizar después de lo cual el peine fué

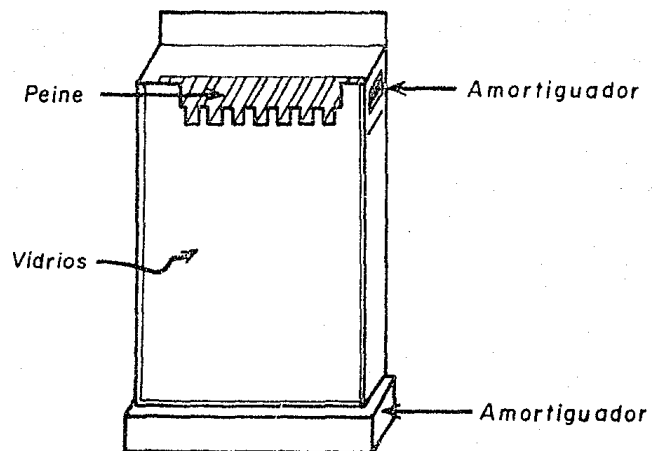


Fig. 3. Camara para electroforesis de geles de poliacrilamida

retirado del gel y se agregó la solución amortiguadora de electroforesis (TBE IX) (Maniatis y col., 1982).

El DNA digerido de las clonas pRTC20 y pRIC42 así como 200 ng de DNA del fago λ digerido con Hind III (como control de peso molecular) fueron depositados en los pocitos del gel y sometidos a electroforesis durante 10 h a 120 V. Al término de la misma el gel fué colocado con 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio en TBE IX durante 45 min y se observó en el transiluminador de luz UV.

B. AISLAMIENTO DE FRAGMENTOS DE DNA DE GELES DE POLIACRILAMIDA

Una vez localizadas en el gel, las bandas de DNA seleccionadas fueron cortadas con una navaja estéril y colocadas en una caja de Petri, en donde se cortaron en fragmentos muy finos. Estos fueron transferidos a tubos Eppendorf. A cada tubo se le agregó amortiguador de elución 1:1 y se taparon incubándose a 37°C durante toda la noche. Los tubos fueron centrifugados a 12000 G durante 10 min, se guardó el sobrenadante y al precipitado se le agregó medio volumen adicional de amortiguador de elución para ser nuevamente centrifugado. Se recuperó el sobrenadante y se juntó con el primero.

Para eliminar cualquier fragmento de poliacrilamida del DNA, éste fué pasado a través de una columna de fibra de

vidrio que se montó en una pipeta estéril de 5 ml, en cuya punta fué colocada la fibra.

El DNA fué precipitado y una vez seco se resuspendió en 10 μ l de TE y se procedió a marcarlo radiactivamente por el método de "nick translation" ya descrito arriba.

9. TRANSFERENCIA DE DNA A MEMBRANA DE NITROCELULOSA POR EL METODO DE SOUTHERN

Se digirió 1 μ g de DNA tanto de *T. solium* como de *T. saginata* con las siguientes enzimas: Bam HI, Hind III, Xba I, Hae III e Hinf I en las mismas condiciones que se mencionan en la sección de digestión del DNA. Se llevó a cabo una electroforesis del DNA digerido en un gel de agarosa 0.8% junto con un marcador de peso molecular (DNA λ Hind III).

El gel fué fotografiado y colocado en una solución desnaturalizante durante 1 h en agitación constante y 1 h en una solución neutralizante en agitación.

La membrana de nitrocelulosa (Schleider and Schuell) fué cortada con una navaja estéril al igual que dos hojas de papel Whatman 3MM del mismo tamaño del gel y otras dos tiras de papel Whatman más anchas que el gel. Tanto la membrana como el papel fueron posteriormente humedecidos en solución SSC 2X.

La cámara en la cual se llevó a cabo la transferencia fué llenada con solución SSC 10X y se colocó en su interior un

soporte de plástico del ancho del gel. Las dos tiras del papel Whatman se pusieron sobre el soporte seguidas por el gel que fué colocado en sentido inverso al que se llevó a cabo la electroforesis. El papel de nitrocelulosa fué colocado sobre el gel y se cortó la esquina derecha para reconocer posteriormente su orientación. Los cuadros de papel Whatman fueron colocados sobre el papel de nitrocelulosa. En cada paso se evitó que quedaran atrapadas burbujas de aire que interfirieran en la transferencia. Por último, se colocó una pila de toallas de papel con un peso encima de ellas de aproximadamente 1 kg para permitir el flujo del amortiguador a través del sistema (Fig. 4).

La transferencia se realizó durante toda la noche a temperatura ambiente, después de lo cual se quitaron las toallas de papel, el papel Whatman y se colocó la membrana de nitrocelulosa en una solución SSC 6X durante 10 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el exceso de solución y se dejó secando a temperatura ambiente sobre papel filtro.

Para fijar el DNA a la membrana de nitrocelulosa, ésta fué colocada entre dos hojas de papel Whatman y en una cámara de vacío a 80°C durante 2 h. La membrana de nitrocelulosa se conservó a temperatura ambiente en una cámara de vacío cubierta por papel Whatman hasta que fué utilizada (Maniatis, y col. 1982).

Por otra parte, el gel transferido se colocó en una solución de TBE IX con bromuro de etidio a una concentración

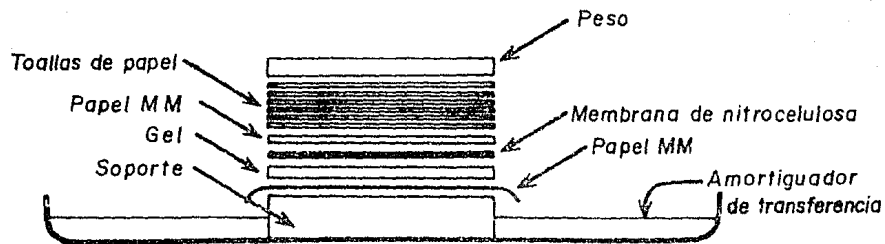


Fig. 4. Método de transferencia del DNA de un gel de agarosa a una membrana de nitrocelulosa

de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ durante 20 minutos y se observó en un transiluminador de luz UV para comprobar la ausencia de DNA y su transferencia a la membrana de nitrocelulosa.

10. HIBRIDACION DE DNA A MEMBRANAS DE NITROCELULOSA

La membrana de nitrocelulosa a la que se transfirió previamente el DNA fué humedecida en una solución SSC 6X durante 3 min. La membrana de nitrocelulosa fué colocada dentro de una bolsa de plástico que se selló con calor, dejando únicamente una abertura en una esquina de la misma por la que se agregaron 0.2 ml de solución de prehibridación (previamente calentada a 68°C) por cada centímetro cuadrado de membrana de nitrocelulosa. Se sacó todo el aire de la bolsa y se cerró la abertura con un sellador de calor.

La bolsa se incubó durante 4 h sumergiéndola en un baño de agua a 68°C, pasado este tiempo se cortó uno de los extremos de la bolsa y se extrajo la solución de prehibridación. Inmediatamente después se agregó la solución de hibridación a la bolsa, la cual contenía la sonda marcada radiactivamente, previamente desnaturalizada a 96°C durante 10 min, (aprox. 50 $\mu\text{l/cm}^2$ de membrana de nitrocelulosa). Se sacaron las burbujas de aire y se selló nuevamente la bolsa incubándose a 68°C durante 24 h.

Al término de la hibridación, la membrana de nitrocelulosa fué colocada en una solución SSC 2X y SDS 0.5%

incubándose a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente la membrana fué transferida a un recipiente que contenía una solución SSC 2X y fué incubada durante 15 min a temperatura ambiente con agitación ocasional. Por último, la membrana fué transferida a una solución SSC 0.01M y SDS 0.5% y se incubó a 37°C durante 2 h con agitación suave. Se cambió la solución y se continuó incubando durante 30 min más.

La membrana de nitrocelulosa se dejó secar a temperatura ambiente sobre una hoja de papel filtro y se cubrió con egapack; luego se colocó sobre una placa fotográfica dentro de una caja metálica protegida de la luz, y se dejó exponiendo durante 24 h a -70°C, al término de las cuales la placa fotográfica fué revelada. En los casos en que las bandas de hibridación no se vieron claramente en la placa se dejó exponiendo durante 48 h una nueva placa (Maniatis y col., 1982).

IV RESULTADOS

De la lectura en un espectrofotómetro a 260 nm de las soluciones de DNA de *T. solium* y *T. saginata* se obtuvo como resultado una cantidad total de 30 µg y 80 µg respectivamente. La pureza fué determinada obteniendo el cociente de D.D. de 260 nm/280 nm, que para *T. solium* fué de 2.0 y para *T. saginata* 2.2, cercanos a 1.8 que corresponde al valor del DNA completamente puro.

Las digestiones de 200 ng de DNA de *T. solium* y *T. saginata* con siete enzimas diferentes (Eco RI, Bam HI, Hind III, Xba I, Xho I, Hae III e Hinf I) y la electroforesis de las mismas dió como resultado la observación de bandas de DNA repetido en ambas especies (Fig. 5).

En *T. solium* se observó un menor número de bandas que en *T. saginata*; en la digestión con la enzima Eco RI se observó una banda de 15500 pb, con la enzima Hind III se observó una banda de alrededor de 5400 pb, y en la digestión con Xba I se observaron tres bandas, de 5000 pb, de 4500 pb y 4000 pb. El patrón de digestión del DNA con el resto de las enzimas utilizadas no presentó ningún patrón de bandeo (Cuadro IV).

Cuando se digirieron mayores cantidades de DNA (1 µg) de *T. solium* se observó un mayor número de bandas. Las bandas encontradas no fueron observadas en las digestiones con menor

cantidad de DNA. En la digestión con la enzima Hind III las bandas presentes fueron de 15500 pb, 3500 pb y 2600 pb aproximadamente y para la enzima Hae III el tamaño de las bandas fué alrededor de 15500 pb, 2800 pb y 1600 pb (Cuadro IV y Fig. 6).

CUADRO IV. BANDAS DE DNA REPETIDO ENCONTRADAS EN LOS GENOMAS DE *T. solium* Y *T. saginata* CON SIETE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN DIFERENTES.

ENZIMAS	BANDAS DE DNA REPETIDO DE <i>T. solium</i> .		BANDAS DE DNA REPETIDO DE <i>T. saginata</i>	
	200 ng	700 ó 1000ng	200 ng	700 ó 1000 ng
Eco RI	14800 pb	**	13000 pb	**
Bam HI	-	-	-	-
Hind III	3400 pb	15500 pb 3500 pb 2600 pb	6000 pb 3400 pb	-
Xba I	5000 pb 4500 pb 4000 pb	-	5000 pb 4000 pb 3550 pb	-
Xho I	-	**	-	**
Hae III	-	15500 pb 2800 pb 1600 pb	-	6000 pb
Hinf I	-	-	-	4400 pb 1800 pb

** No se realizaron digestiones con estas enzimas.

En las digestiones de 200 ng DNA de *T. saginata* se observaron bandas de DNA repetido con las enzimas Eco RI, Hind III y Xba I. En la digestión con Eco RI se observó una banda de aproximadamente 13000 pb, con Hind III se obtuvieron

2 bandas de DNA repetido una de alrededor de 6000 pb y la otra de 5400 pb. Con Xba I se observaron 3 bandas de alrededor de 5000 pb, 4000 pb y 3550 pb (Cuadro IV). Con las enzimas restantes no se observó ninguna banda.

Cuando se digirieron 700 ng ó 1 µg de DNA se observaron únicamente tres bandas: una con la enzima Hae III de alrededor de 6900 pb y dos con la enzima Hinf I de 4400 pb y 1800 pb aproximadamente (Cuadro IV, Fig. 7 y 8). Con el resto de las enzimas no se lograron observar bandas por exceso de DNA. Para comprobar estos resultados el experimento fué repetido tres veces y el patrón de digestión fué el mismo en todos los casos.

Para descartar la posibilidad de que éstas secuencias repetidas encontradas fueran genes ribosomales y tomando en consideración que éstos genes se encuentran muy conservados entre diferentes especies, se hicieron hibridaciones de DNA de ambas especies con clonas de genes ribosomales de *Trypanosoma cruzi*. Los genes se encontraban insertados en el vector pUC18 y las clonas utilizadas fueron tres: la pRTC81 que contenía parte del gen ribosomal 24S β, el S2 y el S6, la pRTC20 que contenía casi completo al gen ribosomal 18S y la pRTC42 que contenía a tres genes ribosomales el 24S α, el S3 y el S1.

Las clonas fueron marcadas con dATP 5' (α - P^{32}) por el método de "nick translation" obteniendo diferentes valores de marcaje. Para el caso de la clona pRTC81 el valor obtenido fué de 9325.7 CPM, para la clona pRTC20 fué de 8130 CPM y para la clona pRTC42 fué de 320958 CPM. En los tres casos el marcaje fué bueno para llevar a cabo la hibridación.

El DNA de *T. saginata* (1 μ g) sometido a electroforesis (Fig. 7) fué transferido a una membrana de nitrocelulosa y se llevó a cabo la hibridación con la clona pRTC81 marcada. La membrana de nitrocelulosa se autoradiografó en una placa fotográfica durante 48 h a -70°C . La placa fué luego revelada, encontrándose bandas de hibridación. Al comparar con la foto del gel tomada antes de la transferencia, ninguna de las bandas de hibridación presentó una posición igual a la de las bandas de DNA repetido (Fig. 9).

Las bandas de hibridación que se observaron fueron tres, que correspondieron a las enzimas Bam HI, Hae III e Hinf I. Para Hind III y Xba I no se observó ninguna banda sólo un barrido en la parte superior de cada carril que también se observó para el DNA digerido con Bam HI.

Para Bam HI la banda de hibridación correspondió a un peso molecular de 1550 pb, para Hae III se observó una banda de peso molecular de 500 y para Hinf I se obtuvo una banda de alrededor de 1000 pb (Cuadro V).

CUADRO V. COMPARACION DEL NUMERO DE PARES DE BASES DE LAS BANDAS DE DNA REPETIDO DE *T. saginata* CON LAS BANDAS DE LOS GENES RIBOSOMALES (clona pRTC81).

ENZIMAS	BANDAS DE DNA REPETIDO EN <i>T. saginata</i>	BANDAS DE HIBRIDACION CON GENES RIBOSOMALES
Bam HI	-	1500 pb
Hind III	-	-
Xba I	-	-
Hae III	6000 pb	- de 500 pb
Hinf I	4400 pb 1800 pb	1000 pb

El DNA (700 ng) de *T. saginata* sometido a electroforesis (Fig. 8) fué transferido a una membrana de nitrocelulosa y se hibridó con el DNA de los genes ribosomales de las clonas pRTC20 y pRTC42, La autoradiografía del mismo se realizó durante 24 h a -70°C .

Se obtuvieron 5 bandas de hibridación bien definidas, una en el DNA digerido con la enzima Hind III, de aproximadamente 3000 pb, dos para el DNA digerido con Hae III de aproximadamente 1000 pb y 500 pb y dos para el DNA digerido con Hinf I de un peso molecular aproximado de 1200 pb y 1000 pb. Para las digestiones con Bam HI y Xba I se observó un barrido en la parte superior del gel pero ninguna banda (Cuadro VI, Fig. 10).

Las bandas de hibridación observadas se compararon con la posición de las bandas de DNA repetido. La posición de las

bandas de hibridación no correspondió en ningún caso a la posición de las secuencias repetidas.

CUADRO VI. COMPARACION DEL NUMERO DE PARES DE BASES DE LAS BANDAS REPETIDAS DEL DNA DE *T. saginata* CON LAS BANDAS DE HIBRIDACION DE LOS GENES RIBOSOMALES (clonas pRTC20 y pRTC42).

ENZIMAS	BANDAS DE DNA REPETIDO EN <i>T. saginata</i>	BANDAS DE HIBRIDACIÓN CON GENES RIBOSOMALES
Bam HI	-	-
Hind III	-	8000 pb
Xba I	-	-
Hae III	6000 pb	700 pb
		500 pb
Hinf I	4400 pb	1200 pb
	1800 pb	1000 pb

Por último, se llevó a cabo una hibridación del DNA de *T. solium* transferido a una membrana de nitrocelulosa, con la misma sonda de genes ribosomales pRTC20 y pRTC42 empleada para la hibridación con *T. saginata*. La autoradiografía de la misma se realizó durante 48 h, ya que a las 24 h de exposición no se logró detectar ninguna banda. Se encontraron tres bandas de hibridación un poco tenues que al comparar con la posición de las bandas de DNA repetido del gel no correspondieron a estas últimas (Fig. 11), una banda para el DNA digerido con Hind III de alrededor de 700pb, una para el DNA digerido con Xba I de 1200 pb y otra mas para el DNA digerido con Hae III de aproximadamente 400 pb. Para las

digestiones con Bam HI, Xba I e Hinf I se observó un barrido en la parte superior del gel (Cuadro VII).

CUADRO VII. COMPARACION DEL NUMERO DE PARES DE BASES DE LAS BANDAS DE DNA REPETIDO DE *T. solium* CON LAS DE HIBRIDACION DE LOS GENES RIBOSOMALES (clonas pRTC20 y pRTC42).

ENZIMAS	BANDAS DE DNA REPETIDO EN <i>T. solium</i>	BANDAS DE HIBRIDACIÓN CON GENES RIBOSOMALES.
Bam HI	-	-
Hind III	15500 pb 3500 pb 2600 pb	700 pb
Xba I	4500 pb 4000 pb	1200 pb
Hae III	15500 pb 2800 pb 1000 pb	400 pb
Hinf I	-	-

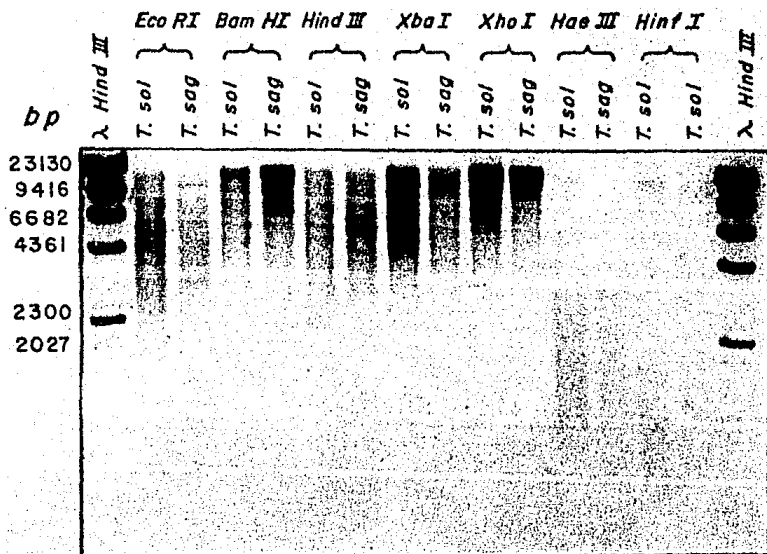


Fig. 5. Electroforesis en un gel de agarosa 0.8% de digestiones de 200 ng de DNA total de *T. sol* y *T. saginata*, con 7 diferentes enzimas. Los carriles 1 y 14 corresponden al marcador de peso molecular.

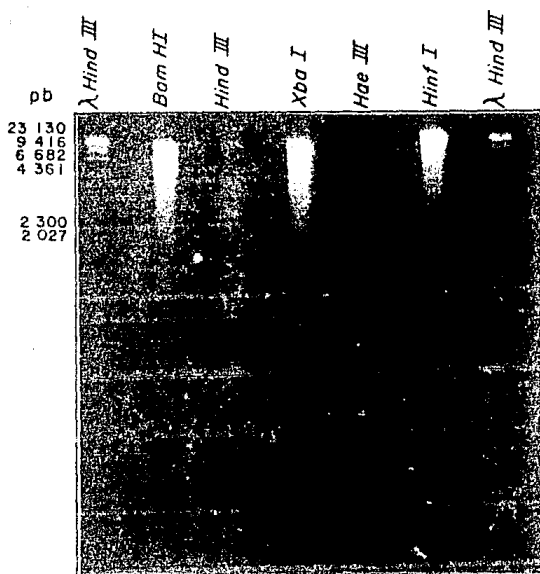


Fig. 6. Electroforesis en un gel de agarosa 0.8% de 1 μ g DNA de *T. solium* digerido con diferentes enzimas de restricci3n. Los carriles 1 y 7 corresponden al marcador de peso molecular.

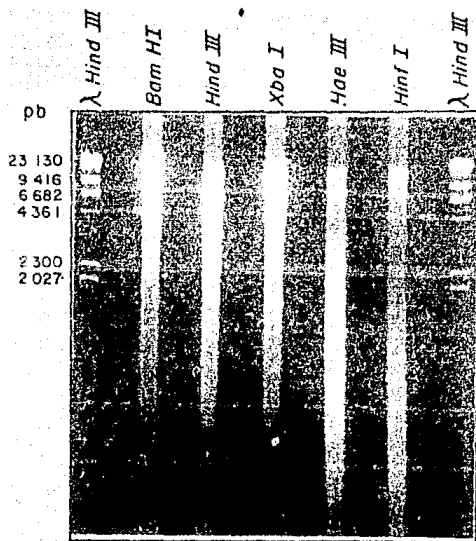


Fig. 7. Electroforesis en un gel de agarosa 0.8% de digestiones de 1 μ g de DNA de *T. saginata* con 5 diferentes enzimas. Los carriles 1 y 7 corresponden al marcador de peso molecular.

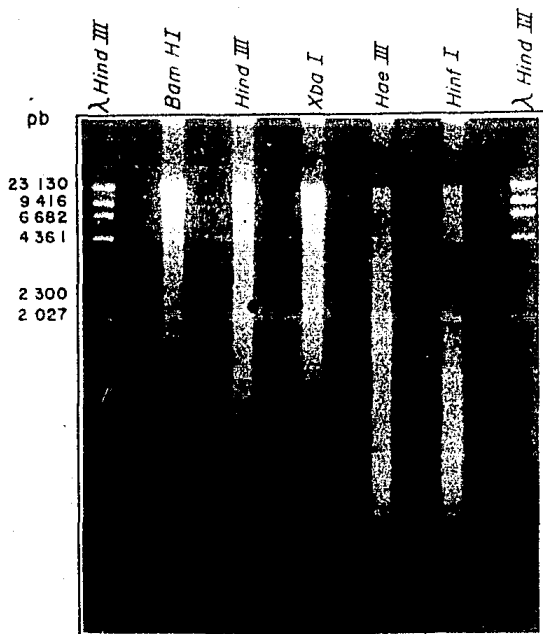


Fig. 8. Electroforesis de 700 ng de DNA de *T. saginata* digerido con 7 diferentes enzimas. Los carriles 1 y 7 corresponden al marcador de peso molecular.

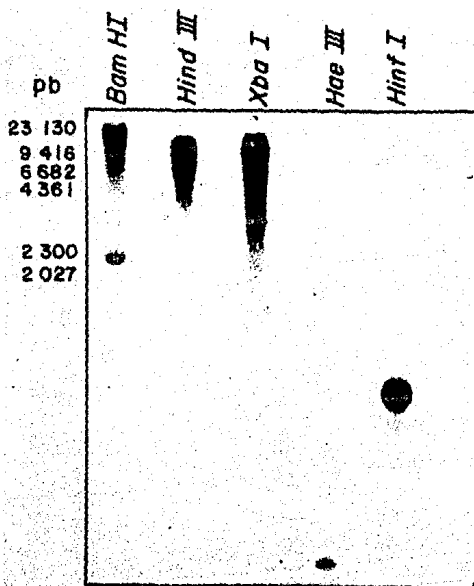


Fig. p. Southern blot de DNA de *T. saginata* digerido con diferentes enzimas que fué hibridado con genes ribosomales de *T. cruzi* los 24S β , 52 y 55.

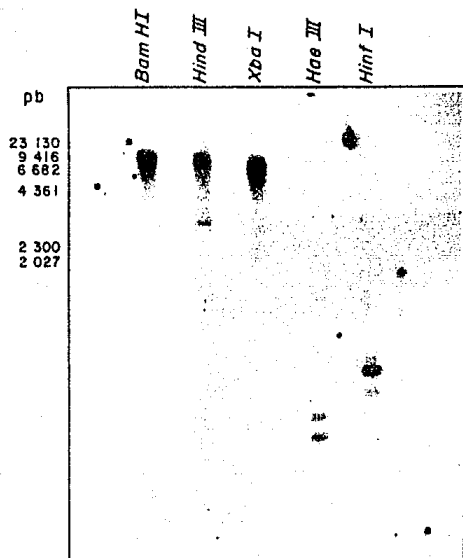


Fig. 10. Southern blot de DNA de *T. saginata* digerido con 7 diferentes enzimas que fué hibridado con genes ribosomales de *T. cruzi*, los 24S0, el S3, el S1 y el 18S.

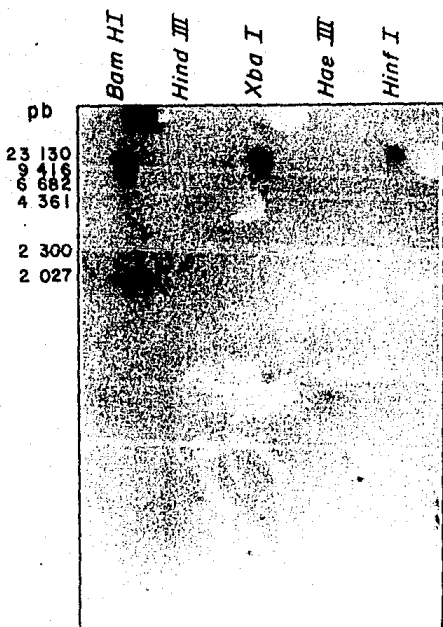


Fig. 14. Southern blot de DNA de *T. SOLIUM* digerido con 7 diferentes enzimas y al cual se hibridaron genes ribosomales de *T. CRUZI*, el 24S a, el S9, S1 y el 18S.

V. DISCUSION Y CONCLUSIONES

El objetivo de esta tesis fué demostrar la presencia de secuencias repetidas en el DNA de *T. solium* y *T. saginata*. Para ello se digirieron varias muestras de DNA con diferentes enzimas de restricción. Se encontraron bandas de DNA repetido en ambas especies, aunque el número de bandas varió según la especie y la cantidad de DNA que fué digerido.

Para el caso de *T. solium* se observó un menor número de bandas cuando se digirieron 200 ng de DNA que cuando se digirieron 700 ng o 1000 ng.

En cambio, en el caso de *T. saginata* cuando se digirió menor cantidad de DNA (200 ng) se observó un mayor número de bandas que cuando fué digerida una mayor cantidad (700 ng ó 1000 ng). Estos resultados se presentaron con las enzimas que dieron un patrón de digestión con fragmentos de DNA de pesos moleculares grandes (Hind III y Xba I), de tal manera, que al digerir mayores cantidades de DNA y llevar a cabo la electroforesis se tuvo un exceso del mismo por carril, enmascarando a las bandas e impidiendo así ser distinguidas. Por otro lado, con las enzimas que dieron un patrón de digestión con fragmentos de DNA de pesos moleculares más pequeños (Hae III e Hinf I) se lograron observar bandas que con menor cantidad de DNA (200 ng) no se vieron. Ello se debe probablemente a que las secuencias observadas con estas enzimas están repetidas un menor número de veces y por lo

tanto se requiere mayor cantidad de DNA digerido para poder ser vistas. Además, el hecho de que estas enzimas den fragmentos de DNA digerido de pesos moleculares en su mayoría pequeños evita que se acumule un exceso de DNA en la parte superior del carril observándose así las bandas de DNA repetido.

Para descartar la posibilidad de que las secuencias repetidas encontradas fueran genes ribosomales, se llevó a cabo la transferencia de DNA de ambas especies a papel de nitrocelulosa por el método de Southern y se hibridó contra genes ribosomales de *T. cruzi*. La posición de las bandas de hibridación encontradas en las dos especies no correspondió en ningún caso a la posición de las bandas de DNA repetido observadas.

Sin embargo, como en los geles que fueron utilizados para la transferencia se colocó mayor cantidad de DNA y como ya se mencionó con anterioridad en el caso de *T. saginata*, no se lograron observar bandas vistas con menor cantidad de DNA, en este caso no se pudo descartar la posibilidad de que las bandas correspondieran a genes ribosomales. En los resultados de las hibridaciones se observó un barrido en la parte superior de cada carril con las enzimas Bam HI, Hind III y Xba I. Sin embargo, para el caso de la digestión del DNA de *T. saginata* con Bam HI y la hibridación con la clona pR1CB1, por abajo de la zona del barrido se observó una banda de hibridación de aproximadamente 1500 pb y en el caso de la

digestión con Hind III y la hibridación con las clonas pRTC20 y pRTC42 también se observó además del barrido una banda de 3000 pb.

En las hibridaciones de las clonas pRTC20 y pRTC42 contra DNA de *T. solium* las bandas obtenidas fueron muy tenues debido a que el tiempo de vida media del P³² ya había disminuido.

Los resultados obtenidos indican claramente que las bandas de secuencias repetidas observadas en las digestiones de 700 ng ó 1000 ng de DNA de ambas especies no corresponden a genes ribosomales. Por otro lado también corroboran el hecho de que los genes ribosomales están muy conservados entre especies distantes, ya que se observa hibridación y por tanto homología entre DNA de especies filogenéticamente lejanas. Probablemente si se empleara una sonda de genes ribosomales de una especie filogenéticamente mas cercana a las tenias se podría observar mayor número de bandas de hibridación.

Si las secuencias repetidas encontradas hubieran correspondido a genes ribosomales se podrían caracterizar para encontrar alguna región no codificante que difiriera entre una especie y otra y nos permitiera obtener una sonda para diagnóstico diferencial entre *T. solium* y *T. saginata*. El empleo de regiones no transcritas de genes ribosomales como sondas para diagnóstico ya se ha utilizado para

Schistosoma haematobium, en la que se utilizan estas regiones como sonda para distinguir dicha especie de otras del mismo género (Walker, y col, 1986).

El tamaño de las secuencias repetidas encontradas en *T. solium* y *T. saginata* osciló entre las 1600 y 15500 pb aproximadamente. Comparando el tamaño de las bandas entre las dos especies se encontró un patrón de digestión semejante con algunas enzimas: en la digestión con Xba I se observaron tres bandas de tamaños parecidos cuando se digirieron 200 ng, ya que para *T. solium* los tamaños de las bandas fueron alrededor de 5000 pb, 4500 pb y 4000 pb, y para *T. saginata* los tamaños fueron de aproximadamente 5000 pb, 4000 pb y 3550 pb. Asimismo, en ambas especies en la digestión con Hind III se presentó una banda de alrededor de 5400 pb. Con el resto de las enzimas ninguna de las bandas observadas es similar en cuanto a tamaño entre las dos especies.

Con respecto a secuencias repetidas compartidas por especies, en cetáceos se han realizado estudios en los que se digirió DNA de diferentes familias y se encontró una banda de DNA repetido que presentaba un tamaño muy semejante entre las diferentes especies. Al analizarla se determinó que esta secuencia era compartida por varias especies que pertenecían a familias diferentes (Arnason, 1982 y Arnason y col, 1984). Esto sugiere que *T. solium* y *T. saginata*, que pertenecen a la misma familia e incluso al mismo género, pudieran compartir secuencias repetidas como las encontradas en posiciones

semejantes en la digestión con las mismas enzimas.

El empleo de secuencias repetidas como sondas en métodos diagnósticos ha sido aplicado en diferentes parasitosis. Murray y col. (1988) clonaron una secuencia repetida del DNA de *Onchocerca axillata* capaz de detectar una sola larva y que no presentaba una hibridación cruzada significativa con el DNA genómico total de otras especies del mismo género. Holmberg y col. (1986) emplearon una secuencia repetida del DNA de *Plasmodium falciparum* como sonda para identificar en muestras de sangre personas infectadas por este parásito.

Lo anterior implica que las secuencias repetidas de *T. solium* y *T. saginata* que presentan tamaños diferentes en la digestión con las mismas enzimas, podrían ser analizadas para su posible uso como sonda en un método diagnóstico que permita diferenciar los huevos de ambas especies además de dar una alta sensibilidad dada su repetitividad en el genoma.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J.D. (1983). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc., New York 1146 pp.
2. Aluja, A. S., Escobar, A., Escobedo, F., Flisser, A., Laclette, J. P., Larralde, C., Madrazo, I., Velázquez, V. y Willms, K. (1987). *Cisticercosis*. Fondo de Cultura Económico. México. 115 pp.
3. Arnason, U. (1982). Southern blot hybridization in cetaceans, using killer whale restriction fragment as a probe. *Hereditas* 97: 47-49.
4. Arnason, U., Höglund, M. y Widegren, B. (1984). Conservation of highly repetitive DNA in cetaceans. *Chromosoma* 89: 238-242.
5. Barker, D. C. (1989). Molecular approaches to DNA diagnosis. *Parasitology*. 99, S125-S146.
6. Britten, R. J. y Kohne, D. E. (1968). Repeated sequences in DNA. *Science* 1: 529-540.
7. Cárdenas, F., Quiroz, H., Meza, A., Plancarte, A., Dalma, A. y Flisser, A. (1989). Cisticercosis intraocular. En: *Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México*. Flisser, A. y Malagón, F. (Eds) Limusa. México. pp. 69-75.
8. Cheng, C.T. (1976). *General Parasitology*. Academic Press. N.Y. 965 pp.
9. Darnell, J., Lodish, H. y Baltimore, D. (1986). *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books, Inc. N.Y. 1192 pp.
10. Dore, E., Frontali, C., Forte, T. y Castañeda, M. (1983). Further studies and electron microscopic characterization of *Plasmodium berghei* DNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* 8: 339-352.
11. Flisser, A., Reid, A., García-Zepeda, E. y McManus, D. P. (1988). Specific detection of *Taenia saginata* eggs by DNA hybridization. *Lancet* 1429-1430.
12. Fränzel, L., Westin, G., Shabo, R., Aslund, L., Perlmann, H., Persson, T., Wigzell, H. y Petterson, U. (1984). Analysis of clinical specimens by hybridization with probe containing repetitive DNA from *Plasmodium falciparum*. *Lancet*, 525-527.
13. Freeland, J. H. (1981). El ADN clave de la vida. CONACYT. México. 177 pp.

14. Gemmell, M., Matyas, Z., Pawlowsky, Z. y Soulsby, E.J. (1983). "Guidelines for surveillance prevention and control of Taeniasis/cysticercosis. Organization Mondiale de la Sanite. Switzerland. 207 pp.
15. González-Barranco, D., Sandoval, I. M. y Trujillo, V. V. M. (1978). Reacción de inmunofluorescencia indirecta en cisticercosis. *Arch. Invest. Méd. (Mex)* 9: 51-58.
16. Hall, A., Lathman, M.C., Crompton, D. W. and Stephenson, L. S. (1981). *Taenia saginata* (Cestoda) in western Kenya: the reliability of faecal examinations in diagnosis. *Parasitology*. 83: 91-101.
17. Hammerberg, B., MacUnnis, G. A. y Hyler, T. (1978). *Taenia saginata* cysticerci in grazing steers in Virginia. *J. Am. Vet. Med.* 73: 1462-1464.
18. Hernández, R., Díaz de León, F. y Castañeda, M. (1988). Molecular cloning and partial characterization of ribosomal RNA genes from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 27: 275-280.
19. Holmberg, M., Björkman, A., Franzón, L., Aslund, L., Lebbad, M., Pettersson, U. y Wigzell, H. (1984). Diagnosis of *Plasmodium falciparum* infection by spot hybridization assay: specificity, sensitivity, and field applicability. *Bulletin of World Health Organization* 64(4): 579-585.
20. Kingsbury, D. T. (1987). DNA probes in the diagnosis of genetic and infectious diseases. *TIBTECH* 5: 107-11.
21. Laclette, J. P., Ornelas, Y., Merchant, M. T. and Willms, K. (1982). Ultrastructure of the surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. En: *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Flisser, A., Willms, W., Laclette, J. P. y Larralde, C. Ridaura, C. y Beltrán, F. (Eds). Academic Press N.Y. pp. 375-388.
22. Lewin, R. (1982). Repeated DNA still in search of a function. *Science*. 217: 621-623.
23. Mahajan, R. C. (1982). Geographical distribution of human cysticercosis. En: *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Flisser, A., Willms, K., Laclette, J.P. Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. (Eds) Academic Press. N.Y. p. 39-46.
24. Malagón, F. (1989). Elementos del binomio de taeniasis/cisticercosis una síntesis. En: *Cisticercosis Humana y Porcina. Su conocimiento e investigación en México*. Flisser, A. y Malagón, F. (Eds). Limusa. México. pp. 3-6.
25. Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982). *A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory. N.Y. 545 pp.

26. Meredith, S. E., Unnasch, I. R., Karam, M., Piessens, W. F. y Wirth, D. F. (1989). Cloning and characterization of an *Onchocerca volvulus* specific DNA sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.* 36: 1-10.
27. Murray, K. A., Post, R. J., Crampton, J. M., McCall, P. J. y Kouyate, B. (1988). Cloning and characterization of a species-specific repetitive DNA sequence from *Onchocerca armillata*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 30: 209-216.
28. Never-Nitsche, B., Lu, X. y Wernes, D. (1988). Functional role of a highly repetitive DNA sequence in anchorage of the mouse genome. *Nucleic Acids Research* 16(17): 8351-8357.
29. Noble, E. R. y Noble, G. A. (1976). *Parasitology. The Biology of Animal Parasites.* Lea and Febiger. Philadelphia. 566 pp.
30. Pawlowsky, Z. y Schultz, M. G. (1972). Taeniasis and Cysticercosis (*Taenia saginata*). *Adv. Parasitol.* 10: 269-343.
31. Pawlowsky, Z. (1982). Epidemiology and Prevention of *Taenia saginata* Infection. En: *Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives.* Flisser, A., Willms, K., Lacllette, J. P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. (Eds) Academic Press. N.Y. pp. 69-86.
32. Proctor, E. M. (1972). Identification of Tapeworms. *S.A. Medical Journal.* Supplement. 46: 234-238.
33. Rishi, A. K. y M. P. McManus (1987). DNA probes which unambiguously distinguish *Taenia solium* from *Taenia saginata*. *Lancet*, 1277-1276.
34. Robertis, E., Saez, A. F. y De Robertis, E. M. (1977). "Biología Celular. Ateneo. México. 528 pp.
35. Sarti, E. (1989). Epidemiología de la taeniasis/cisticercosis. En: *Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México.* Flisser, A. y Malagón, F. (Eds) Limusa. México. pp. 233-239.
36. Schenone, H., Villaroel, F., Rojas, A. y Ramírez, R. (1982). Epidemiology of Human Cysticercosis in Latin America. En: *Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives.* Flisser, A., Willms, K., Lacllette, J. P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. (Edit) Academic Press. N.Y. pp. 25.
37. Smyth, J. D. y McManus, D. P. (1989). *The physiology and biochemistry of cestodes.* Cambridge University Press. Great Britain. 398 pp.

38. Sornberg, A. (1978). Síntesis de DNA. H. Blume. Madrid. 450 pp.
39. Sterba, J. y Dyková, I. (1979). Syntomatology of Taeniasis caused by *Taenia saginata*. *Folia parasitologica*. 26: 281-284.
40. Stewart, M. A., Hall, L. M. C. y Maden, B. E. H. (1983). Multiple heterogeneties in the transcribed spacers of ribosomal DNA from *Xenopus laevis*. *Nuc. Acids. Res.* Vol. II (3): 629-646.
41. Walker, T. K., Rollinson, D. y Simpson, A. J. G. (1986). Differentiation of *Schistosoma haematobium* from related species using cloned ribosomal RNA gene probes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20: 123-131.
42. Warren, K. S. (1989). The global impact of parasitic diseases. En: *The Biology of Parasitism*. Englund, P. T. y Sher, A. (Edit) Alan R. Liss. Inc. N.Y. pp. 3-12.
43. Warren, R. J. y Schmid, C. W. (1989). Repetitive sequences in eukariotic DNA and their expression. *Ann. Rev. Biochem.* 51: 813-844.
44. Yagura, I., Yagura, M. y Muramatsu, M. (1979). *Drosophila melanogaster* has different ribosomal RNA sequences on X and Y chromosomes. *J. Mol. Biol.* 133: 533-547.

VII. ANEXOS

- Amortiguador de elución. Acetato de amonio 0.5 M y EDTA 1 mM (pH 8.0).

- Azul de bromofenol 6X. Azul de bromofenol 0.25%, glicerol 30% diluido en agua (se calentó un poco el glicerol para que se mezclara mejor con el agua).

- Bromuro de Etidio (10 mg/ml). Se agregó 1 g de bromuro de etidio a 100 ml de agua destilada, colocándose sobre un agitador magnético 3 h hasta que estuvo totalmente disuelto y el frasco que lo contenía se envolvió con papel aluminio para protegerlo de la luz a 4°C. El bromuro de etidio es una substancia extremadamente mutagénica por lo que se deben usar guantes y mascarilla cuando se está manejando.

- Líquido de centelleo. A 100 ml de metanol se agregaron 40 g de naftaleno, 4 g de PPO y 20 ml de etilenglicol, se mezcló y se aforó a 1 l con dioxeno.

- Sephadex G-50. A 250 ml de TE (pH 8.0) se agregaron 30 g de Sephadex G 50 y se calentó a 65°C 2 horas y se dejó enfriar. El sobrenadante se decantó y fué reemplazado con un volumen igual de TE (pH 8.0).

- Solución amortiguadora para "nick translation". 0.5 M Tris-Cl (pH 7.2), 0.1M MgSO₄, 1mM de ditiotreitól y 500 µg/ml de albúmina sérica de bovino (BSA Fracción V), se guardó a -20°C.

- Solución de Denhardt 50X. 5 g de Ficoll, 5 g de polivinilpirrolidona, 5 g de albúmina sérica de bovino fracción V y 500 ml de agua.

- Solución desnaturalizante. NaCl 1.5 M y NaOH 0.5 M.

- Solución de hibridación. SSC 6X, EDTA 0.01 M, 5 ml de solución Denhardt 5X, SDS 0.5% y la sonda de ADN marcado con P³².

- Solución neutralizante. Tris-Cl 1 M (pH 8.0) y NaCl 1.5 M.

- Solución de prehibridación. Sulfato dodecil de sodio (SDS) 0.5%, SSC 6X, 5 ml de solución Denhardt 5X.

- SDS 10%. 100 g de dodecil sulfato de sodio se agregaron a 900 ml de agua y se calentó a 68°C para facilitar su disolución, el pH se ajustó a 7.2 agregando HCl concentrado y finalmente se aforó a 1 l.

- SSC 20X. 175.3 g de NaCl y 88.2 g de citrato de sodio, se aforó a 1 l con agua destilada y el pH se ajustó a 7.0 con una solución de NaOH 10N.

- TAE 50X. 242 g de Tris-base, 57.1 ml de ácido acético glacial, 100 ml de EDTA 0.5 M (pH 8.0).

- TBE 10X. 108 g de Tris-base, 55 g de ácido bórico y 20 ml de EDTA 0.05 M (pH 8.0), se aforó a l con agua destilada.

- TE (pH 7.6). Tris hidroximetil aminometano hidroxilclorido (Tris-HCl) 10 mM (pH 7.6) y ácido etilendiamino tetracético (EDTA) 1 mM (pH 8.0).

- TES. Sacarosa al 8%, Tritón X-100 0.5%, EDTA 50 mM (pH 8.0) y Tris-Cl (pH 8.0).