



03062  
17.  
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y de  
Postgrado del Colegio de Ciencias y Humanidades

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

CARACTERIZACION MOLECULAR DE AISLADOS MEXICANOS DE  
TRYPANOSOMA cruzi.

FALLA DE ORIGEN

Tesis que para obtener el grado de  
MAESTRIA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

presenta

JORGE EDUARDO ZAVALA CASTRO

México, D.F., 1991



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.

## CONTENIDO

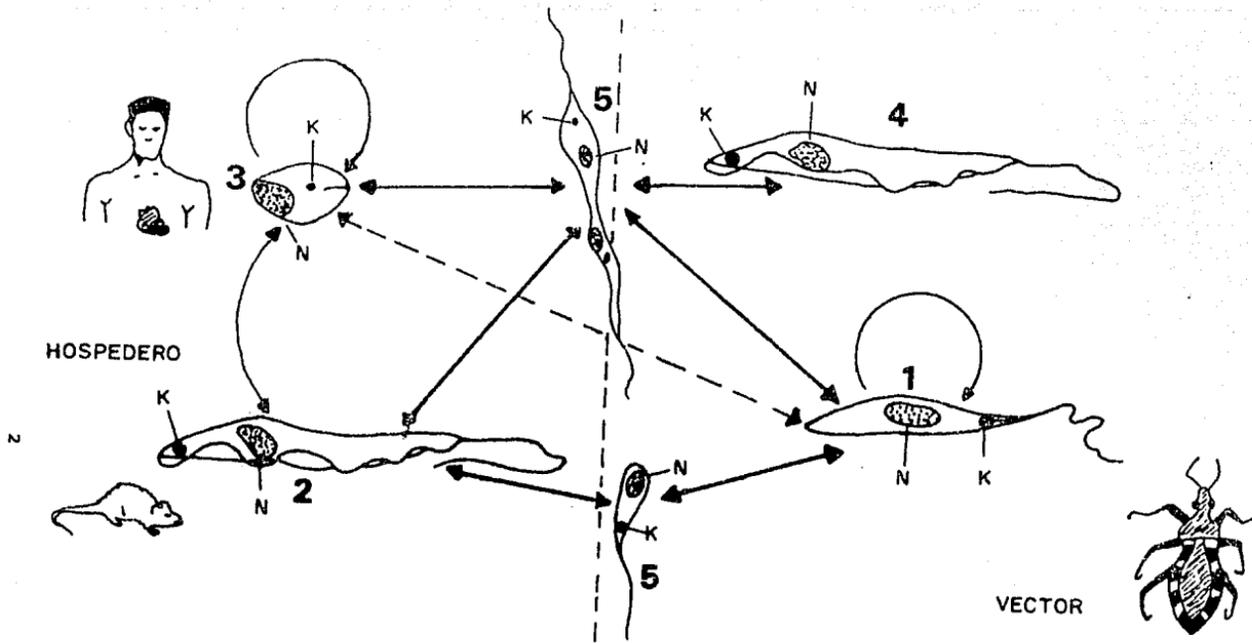
INTRODUCCION .....	1
MATERIALES Y METODOS .....	10
RESULTADOS .....	19
DISCUSION .....	35
CONCLUSIONES .....	45
BIBLIOGRAFIA .....	47
ANEXO I .....	51

## INTRODUCCION.

Trypanosoma cruzi es un parásito flagelado perteneciente a la familia de los Tripanosomatídeos, incluida en el orden de los kinetoplastidos de la clase Zoomastigina. Esta familia comprende parásitos de vida libre (Proleptomonas), parásitos monogénicos de invertebrados (Crithidia, Leptomonas, Rastocritidia, Herpetomona y Rhyncoïdomona), parásitos digénicos de invertebrados y plantas (Phytomona), y parásitos digénicos de invertebrados y vertebrados como los géneros Leishmania y Trypanosoma. La familia Tripanosomatidae se caracteriza por la presencia de un organelo conocido como cinetoplasto ( 1 ).

T. cruzi es un parásito unicelular con un ciclo de vida complejo que involucra 4 estadios básicos de desarrollo comprendidos en 2 fases, una en el vector invertebrado y otra en el hospedero mamífero. Entre los cuatro estadios principales existen otros llamados intermedios que aumentan la complejidad del ciclo (fig. 1). Los estadios se definen por su forma, la posición del cinetoplasto con relación al núcleo, y a la región por donde sale el flagelo ( 2 ).

La transmisión del parásito se produce por insectos de los géneros Panstrongylus, Rhodnius y Triatoma, en donde T. cruzi crece extracelularmente y se diferencia en la porción distal del



Ciclo De Vida De *Trypanosoma cruzi*

- 1 EPIMASTIGOTE
- 2 TRIPOMASTIGOTE (Prociclico)
- 3 AMASTIGOTE
- 4 TRIPOMASTIGOTE (Metaciclico)
- 5 FORMAS INTERMEDIAS

N=Nucleo  
K=Cinetoplasto

fig. 1

intestino hacia tripomastigote metacíclico, el cual constituye la forma infectiva. Los parásitos son depositados por medio de las heces fecales en el mamífero al cual entran a través de mucosas o heridas en la piel, penetrando posteriormente al espacio intracelular en donde se diferencia hacia amastigote completando su ciclo de vida con su diferenciación a tripomastigote sanguíneo y su liberación para invadir otra célula o infectar a un vector.

La enfermedad causada por este parásito es la Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas, que se compone de 3 fases:

- 1.- Fase Aguda: esta fase se detecta principalmente en niños, en los cuales puede ser causa de muerte.
- 2.- Fase Indeterminada: es una fase silente que puede abarcar hasta 30 años durante los cuales se pueden presentar defunciones por causas no determinadas.
- 3.- Fase Crónica: existen alteraciones en miocardio y músculos lisos (principalmente esófago y colon).

La Enfermedad de Chagas constituye un problema de salud en casi todo Centro y Sudamérica en donde existen más de 24 millones de personas enfermas y 65 millones de personas en riesgo de contraerla ( 3,4 ).

En México se desconoce su magnitud y trascendencia a nivel nacional, siendo únicamente estimada en algunas localidades aisladas , sin embargo, existen las condiciones para la

transmisión de la enfermedad y se considera como probable área endémica a todo territorio que se encuentra entre 0 y 1800 mts. sobre el nivel del mar ( 5-7 ).

Existe una gran variación en el tiempo de evolución de la enfermedad y en las formas clínicas que presenta, esta variabilidad se puede deber en gran parte al natural pleomorfismo demostrado en el parásito, el cual presenta diferencias biológicas, bioquímicas y moleculares entre diferentes aislados (8-11). Estas variaciones en el comportamiento del parásito han hecho de su caracterización una condición necesaria para su estudio y control, sin embargo, aunque los intentos hasta el momento para establecer parámetros confiables que permitan formar grupos con características similares han sido muchos, los resultados obtenidos han sido limitados (12-16). En nuestro país los escasos estudios realizados para conocer las características de los aislados presentan resultados que van en desacuerdo con la heterogeneidad demostrada en el parásito ( 17 ).

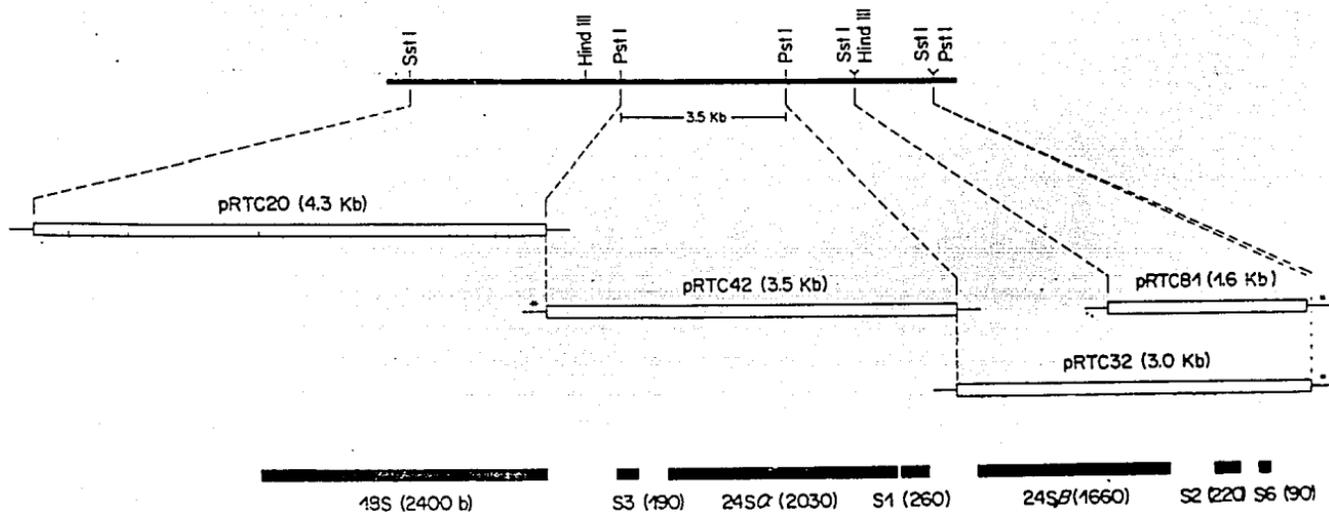
Este trabajo tiene como objetivo conocer la heterogeneidad a nivel molecular que presentan aislados mexicanos de diferentes zonas geográficas a través de los espaciadores no transcritos del DNA ribosomal y de los maxicirculos del DNA de cinetoplasto, así como, explorar la posibilidad de utilizarlos como una herramienta de clasificación en el estudio del parásito.

## GENES PARA RNA RIBOSOMAL Y ESPACIADORES.

Los genes de RNA ribosomal (RNAr) son de los más estudiados en eucariotes, en la mayoría se encuentran organizados en tandem constituyendo una familia de genes medianamente repetidos con 50 a 250 elementos. Las regiones codificadoras (para las moléculas 18S, 5.8S y 28S), son transcritas por la polimerasa I como parte de un RNA precursor, que al ser procesado por cortes endonucleotídicos genera las moléculas maduras de RNAr, y elimina las regiones internas de RNA (espaciadores transcritos internos). Las unidades de transcripción alternan con regiones no transcritas que varían en tamaño aún en un mismo organismo llamadas espaciadores no transcritos (18).

En los tripanosomatídeos la organización del RNA ribosomal es diferente a la del resto de los eucariotes; la unidad de transcripción cuenta con 8 moléculas que surgen del procesamiento no usual del componente mayor de su ribosoma, RNA 24S, que genera 2 fragmentos grandes (24S  $\alpha$  y 24S  $\beta$ ) y 4 RNAs pequeños (S1, S2, S4 y S6) (19,20, fig 2).

Los espaciadores no transcritos varían en secuencia y en longitud entre especies relacionadas, y aún dentro de una misma especie, por lo que son una herramienta útil para establecer relaciones de filogenia y/o taxonomía aún entre especies muy cercanas evolutivamente ( 21 ).



**Fig. 2** Mapa del cistron de RNA ribosomal en *Trypanosoma cruzi*. Línea superior DNA genómico. Barras abiertas - Insertos genómicos clonados. Barras cerradas - RNA ribosomal maduro. (20).

## DNA DE CINETOPLASTO.

La familia de los tripanosomatideos se caracteriza por la presencia de un organelo situado en una porción especializada de su única mitocondria llamado cinetoplasto, que consiste en una red formada por 2 tipos de DNA circular llamados por su tamaño minicirculos y maxicirculos. Estos representan, en conjunto, del 10 al 20% del DNA total de la célula ( 22 ).

Los maxicirculos se encuentran concatenados con los minicirculos, y son considerados como el DNA mitocondrial de los tripanosomatideos, debido a que en ellos se han encontrado genes que codifican para enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial. Se encuentran en un número reducido de copias (aprox. 20-50) y varían en tamaño entre las diferentes especies (26 kb en T. cruzi) ( 23,24 ). El DNA de los maxicirculos consta de dos regiones: una llamada región constante, que contiene los genes de las enzimas mitocondriales, algunos tRNAs, y marcos abiertos de lectura con funciones desconocidas hasta el momento, y otra llamada región variable que al parecer no codifica y no se transcribe. La variación en tamaño de los maxicirculos entre especies esta dada por la región variable, la cual presenta no solo diferencias en la longitud sino también en la secuencia, siendo el origen de replicación la única región conservada entre ellos.

La función de los minicírculos es casi desconocida hasta el momento, aparentemente codifican para una molécula de RNA que sirve como guía en el proceso de edición de los genes codificados en los maxicírculos (25,26). Existen diferencias en el tamaño y secuencia inter e intra especie, contienen su propio origen de replicación ( 4 en el caso de T.cruzi ) siendo la única región conservada entre las diferentes especies ( 27 ).El DNAk, específicamente de los minicírculos, ha sido utilizado para la caracterización y clasificación de los tripanosomatídeos ( 28 ).

OBJETIVO GENERAL: Caracterizar molecularmente aislados mexicanos de T. cruzi.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1.- Búsqueda de polimorfismos asociados al locus nuclear de RNA ribosomal.
- 2.- Búsqueda de heterogeneidad en el DNA de cinetoplasto.

## METODOLOGIA

\* **AISLADOS DE L.cruzi.** Se estudiaron 22 aislados provenientes de 5 Estados de la República Mexicana y 2 países de Sudamérica, y que abarcaban los 3 orígenes posibles del parásito: reservorio mamífero, transmisor y humano ( tabla 1 ). Los cultivos fueron mantenidos a 28°C en medio de LIT (infusión de hígado/triptosa) y suplementado con 10% de suero fetal bovino.

Para la extracción del DNA total y de cinetoplasto, los cultivos fueron expandidos en frascos para cultivo celular (costar) de 75 cm<sup>2</sup> con 100 ml del medio y las condiciones descritas anteriormente.

\* **EXTRACCION DE DNA TOTAL.-** Los cultivos en expansión, con una densidad celular de 60-70 millones de células por mililitro, fueron cosechados por centrifugación a 8krpm por 10 min. a una temperatura de 4°C. La pastilla fue lavada 2 veces con SSC 1X manteniendo las condiciones de temperatura. La última pastilla se resuspendió en 2 ml de SE frío.

Se agregó Sarkosyl para una concentración final de 0.5% y Pronasa (500 µg/ml concentración final, preincubada a 37 grados por 1 hr), incubando 1h a 50°C. Posteriormente se agregó Ribonucleasa A para una concentración final de 100 µg/ml y se incubó 1h a 50°C, se agregó nuevamente Pronasa a la misma concentración, y se incubó 30 minutos a 50°C.

TABLA 1

## AISLADOS DE T. cruzi

NOMBRE	PROCEDENCIA	ORIGEN
* C4	JALISCO	Triatoma
** EA	MORELOS	Humano
** Zacatecas	ZACATECAS	Humano
** CID	OAXACA	Humano
** FRV	OAXACA	Humano
** Ninoa	OAXACA	Humano
*** H1	YUCATAN	Humano
*** H3	YUCATAN	Humano
*** H4	YUCATAN	Humano
*** H5	YUCATAN	Humano
*** H9	YUCATAN	Humano
*** H10	YUCATAN	Humano
*** H6	YUCATAN	Humano
*** T	YUCATAN	Triatoma
*** Z10	YUCATAN	Reservorio
*** Z17	YUCATAN	Reservorio
*** Z21	YUCATAN	Reservorio
**** CL	BRASIL	Triatoma
**** Y	BRASIL	Humano
**** Silvio X10 CL1	BRASIL	Humano
**** Esmeraldo CL3	BRASIL	Humano
**** Perú	PERU	Humano <sup>1</sup>

\* Dr. J. Tay. Depto Ecología Humana. Facultad de Medicina UNAM.

\*\* Dr. Velasco Castrejón. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia.

\*\*\* Dr. Jorge Zavala V. Centro de Investigaciones Regionales. Universidad de Yucatán.

\*\*\*\* Dra. Magdalen So. Clinica Scripps San Diego, California.

Los ácidos nucleicos se extrajeron 3 veces: con 1 volumen fenol (equilibrado en tris 0.1M pH 8), 1 volumen fenol/cloroformo (1:1), y 1 volumen de cloroformo. Se dializó 2 veces contra SSC 0.1X y 2 veces contra TE. La fase acuosa obtenida se precipitó con LiCl 0.8M final y 2 volúmenes de Etanol absoluto a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 2h, posteriormente se centrifugó a 8 krpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y la pastilla se resuspende en 6,6,0.2.

\* EXTRACCION DEL DNA DE CINETOPLASTO.- Los cultivos en expansión con una densidad celular de 60 - 70 millones de cel/ml, fueron cosechados por centrifugación a 8 krpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , lavados 2 veces con SET frío y resuspendidos con la misma solución a una concentración de 100 millones de cel/ml. Se agregó Sarkosyl para una concentración final de 0.3%, Pronasa 500 $\mu\text{g/ml}$  concentración final y se incubó 3h a  $60^{\circ}\text{C}$ ; al terminar la incubación se pasó el material por una jeringa con aguja # 18 a una presión de 25 psi.

El material obtenido se centrifugó 1 1/2 h a 22 krpm en un rotor SW40, la pastilla se resuspendió con TE pH 7.2 y se pasó a través de un gradiente de CsCl por 15 minutos a 20 krpm (CsCl superior  $n = 1.3705$ , CsCl inferior con 100 $\mu\text{g/ml}$  de EtBr  $n=1.4040$ ). Se visualizaron 2 bandas con luz UV, se obtuvo el DNA por punción de la banda inferior, y se diluyó con 1 volumen de agua y se precipitó con 2.5 volúmenes de Etanol absoluto a

temperatura ambiente por 24 h. Posteriormente se centrifugó a 10 krpm por 20 minutos a una temperatura de 10°C, resuspendiendo la pastilla final en 6,6,0.2.

Cuando el material se encontró disuelto en su totalidad, se agregó 0.15 ml de Sarkosyl al 10% y 0.4 ml de LiCl 8M. Se extrajo una vez con fenol/cloroformo 1:1 ( fenol equilibrado en tris pH 9.2 ), se mezcla la fase acuosa con 11.3 ml de Etanol absoluto, y se precipita a -20°C por 2 h. Se centrifugó a 8 krpm por 20 minutos y se resuspende en 6,6,0.2.

\* **SONDAS MOLECULARES.**— Las sondas utilizadas fueron los insertos de las clonas pRTC 81 y pRTC 42 obtenidas por trabajo previo del Dr. Roberto Hernández ( 20 ).

**INSERTO pRTC 81 :** Clonado en el sitio SstI de Puc 18, presenta un tamaño de 1.6 Kb y contiene parte de la molécula 24S  $\beta$ , las moléculas S2 y S6, y los espaciadores internos que las separan (fig. 2).

**INSERTO pRTC 42 :** Clonado en el sitio PstI de Puc 18, presenta un tamaño de 3.5 kb y contiene las moléculas 24S  $\alpha$ , S3 y S1, y los espaciadores internos que las separan (fig. 2).

\* **CUANTIFICACION DEL DNA Y DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE SU PUREZA.**— La concentración del DNA se estimó con la lectura en un espectofotómetro a 260 nm (1 D.O.260 nm = 50  $\mu$ g/ml). La pureza se determinó con el cociente 260/280.

\* **DIGESTIONES CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN.**- Las digestiones de DNA se realizaron con un exceso de enzima de 3.5 a 7 veces, con las condiciones recomendadas por la casa comercial (29), y con un tiempo de incubación de 5 h.

La caracterización por patrones electroforéticos de enzimas de restricción se llevó a cabo con las enzimas HinfI y EcoRI utilizando 3  $\mu$ g de DNA total y 1  $\mu$ g de DNA de cinetoplasto en un volumen final de digestión de 30 a 50  $\mu$ l.

En la caracterización por sondas moleculares, se utilizaron las enzimas HindIII, SstI y PstI con 3  $\mu$ g de DNA total + 0.5 $\mu$ g de DNA del fago lambda como control interno de digestión, y en un volumen final de 30 a 50  $\mu$ l.

\* **ELECTROFORESIS.**- Se utilizaron geles verticales de Agarosa al 0.8%, con un soporte de Acrilamida-Bis acrilamida (30% - 0.8% concentración final), y TBE como buffer de corrida. Los geles se corrieron a 70 v en un tiempo de 7-8 h.

\* **AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LOS INSERTOS.**- Se obtuvieron los insertos de las clonas genómicas con las endonucleasas correspondientes, se realizó una electroforesis en un gel horizontal de Agarosa al 0.8% y se localizó la banda de interés con una lámpara manual de luz UV de longitud de onda larga. El fragmento del gel que contenía la banda fué cortado y colocado en una bolsa de diálisis con TBE 1X, y sometido a electroforesis

en una cámara horizontal por 2h. Al término de la corrida se invirtieron los polos 2 minutos y posteriormente 15 segundos. El material obtenido fue precipitado con LiCl 0.8M final y Etanol absoluto a -20°C por 2h, posteriormente se centrifugó y la pastilla fué resuspendida en 6,6,0.2.

\* MARCAJE RADIOACTIVO DE LAS SONDAS.- Se empleó el método de "Nick Translation", que consiste en la formación de una cadena de DNA con dATP $\alpha$ -P32 incorporado, utilizando las sondas como templado y una columna de cromatografía de exclusión para separar los nucleótidos radioactivos libres de las sondas marcadas ( 30 ).

\* EXPERIMENTOS SOUTHERN.- El DNA total fué digerido con las endonucleasas de restricción y las condiciones descritas previamente, y fraccionado por electroforesis en un gel vertical de Agarosa al 0.8%, con TBE 1X como buffer de corrida. Los geles fueron corridos a 70 v de 7-8 hr utilizando como marcador de peso molecular DNA del fago lambda digerido con HindIII.

El DNA fué transferido a filtros de nitrocelulosa por el método de Southern (31). Los filtros se secaron a temperatura ambiente y fueron horneados a 80°C con vacío por 2h, posteriormente fueron prehibridados con 20 ml de solución de hibridación (Formamida 50%, Denharts 4X, SDS 0.2%, EDTA pH 7.4 2 mM, Buffer de Fosfatos 120 mM, y SSC 2X) por 3 h como mínimo.



Se centrifugó entre las extracciones a 5 krpm por 10 minutos a 4°C en tubos para cultivo 16 x 100 mm.

El último sobrenadante se transfirió a tubos eppendorf (300µl/tubo), y se precipitó con LiCl (0.8 M final) y Etanol Absoluto a -20°C por 2 h. Se centrifugó a 14 krpm por 10 minutos y la pastilla se resuspendió en 125 µl de 6,6,0.2.

\* **ANALISIS FILOGENETICO.**- El análisis filogenético se realizó con un método de matriz de distancia (UPGMA), a partir de las divergencias nucleotídicas obtenidas de los fragmentos de restricción resultantes de la hibridación de la sonda pRTC81 con el DNA total digerido con HindIII, utilizando el método de Nei ( 32 ).

## RESULTADOS

### CARACTERIZACION DE PATRONES ELECTROFORETICOS DE DIGESTION CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCION.-

Observaciones previas realizadas en el laboratorio revelaron la presencia de bandas fácilmente distinguibles de alto peso molecular, que aparecen en electroforesis de un digerido del DNA total de T. cruzi con la endonucleasa de restricción HinfI (comunicación personal).

Con las bandas obtenidas con HinfI, encontramos 11 tipos de patrones electroforéticos entre los 22 aislados analizados. 3 de esos patrones son compartidos por más de un aislado, y entre los 3 contienen al 63.6% de la muestra estudiada. Los 8 restantes eran patrones individuales que abarcan el porcentaje restante (fig 3,4).

Para establecer los patrones, se tomaron en cuenta las bandas que aparecen por arriba de una banda común a todos los aislados de 3.7 Kb aproximadamente, la cual se tomó arbitrariamente como referencia.

Los patrones electroforéticos fueron nombrados con una letra de acuerdo al orden cronológico de su aparición (tabla 2).

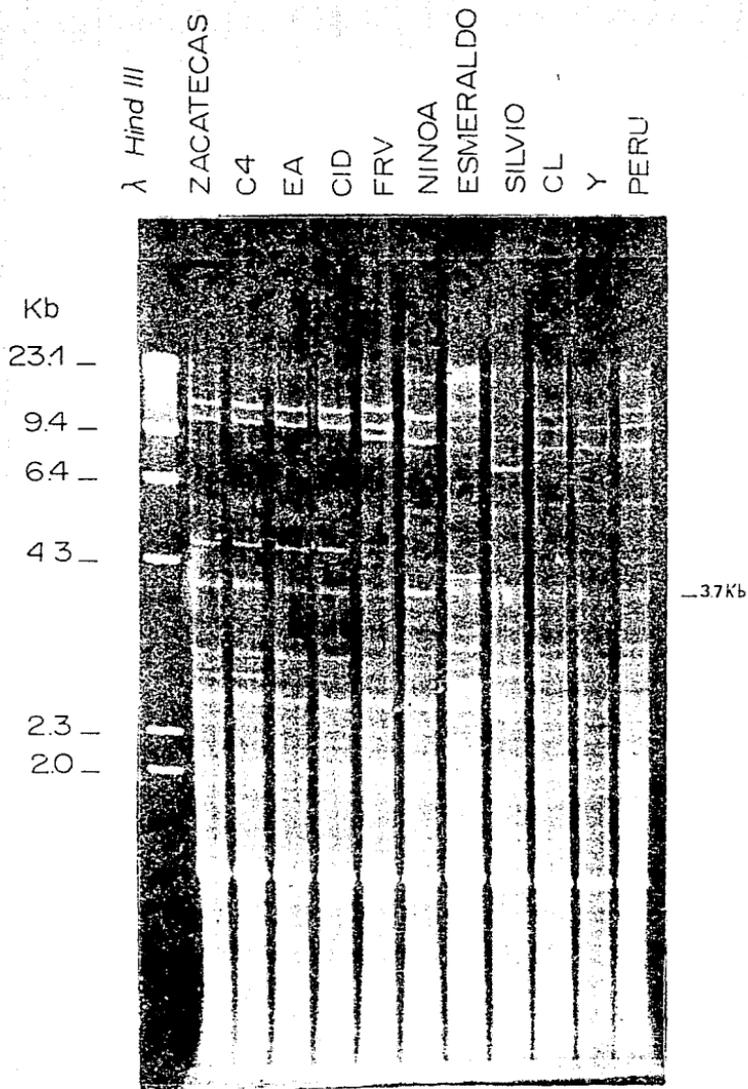


Fig. 3 Patrones electroforéticos de DNA total digerido con *Hinf*I, en un gel de Agarosa al 0.8%.

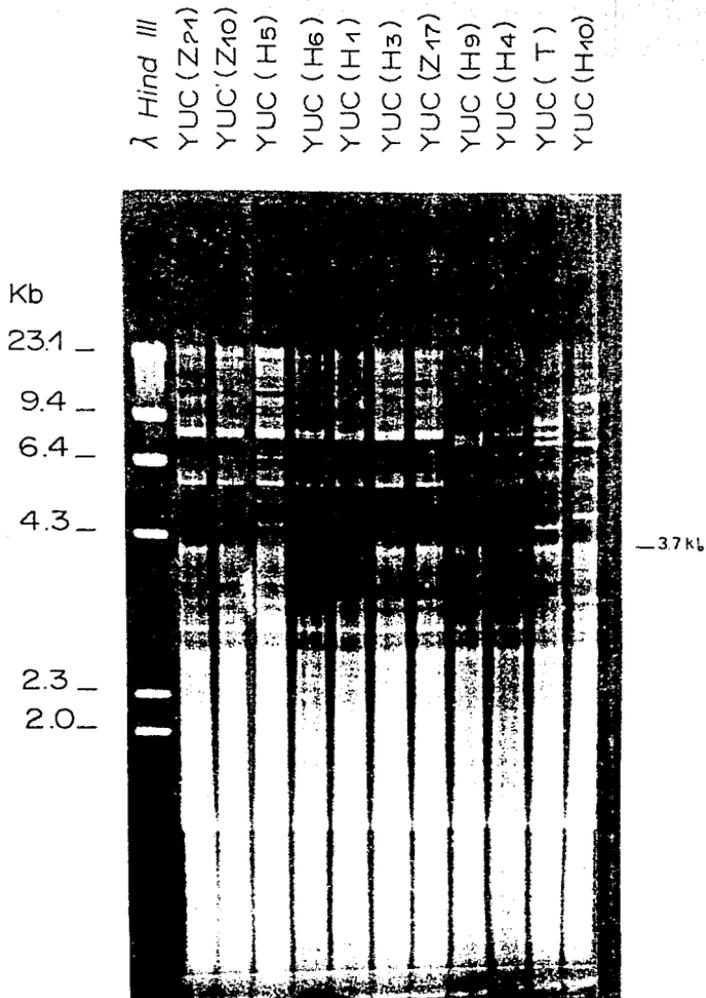


FIG. 4 PATRONES ELECTROFORÉTICOS DE DNA TOTAL DIGERIDO CON HINF I, EN UN GEL DE AGAROSA AL 0.8%.

TABLA 2

## Clasificación por Patrones de Kinetoplasto

PATRON	NOMBRE	PROCEDECENCIA
A	C4	JALISCO
	EA	MORELOS
	CID	OAXACA
	ZACATECAS	ZACATECAS
B	FRV	OAXACA
C	Ninoo	OAXACA
D	H4	YUCATAN
E	T	YUCATAN
F	H1	YUCATAN
	H3	YUCATAN
	H5	YUCATAN
	H6	YUCATAN
	Z10	YUCATAN
	Z17	YUCATAN
Z21	YUCATAN	
G	H9	YUCATAN
H	H10	YUCATAN
I	CL	BRASIL
	Y	BRASIL
	Peru	PERU
J	Silvia X10	BRASIL
	CL1	
K	Esmeraldo CL3	BRASIL

Para conocer el origen de las bandas observadas, primeramente se extrajo DNA de cinetoplasto de varias cepas, y se corroboró su pureza hibridandolo contra la sonda pRTC81 (fig 5). Posteriormente se realizó una comparación entre los patrones de restricción del DNA total y el DNA de cinetoplasto del parásito. Encontramos que las bandas observadas pertenecen al DNAk, y por su tamaño a los maxicirculos (fig 6).

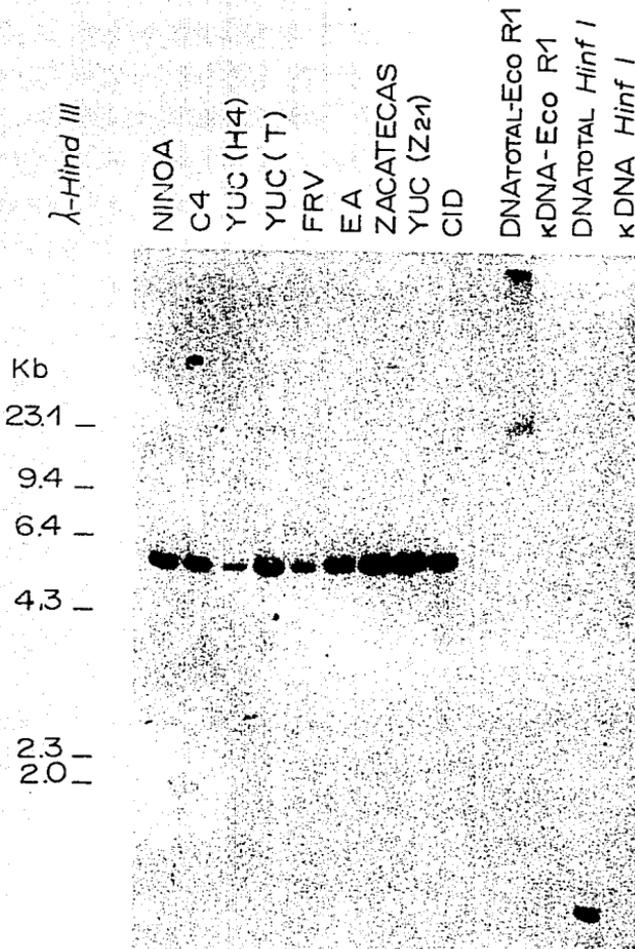
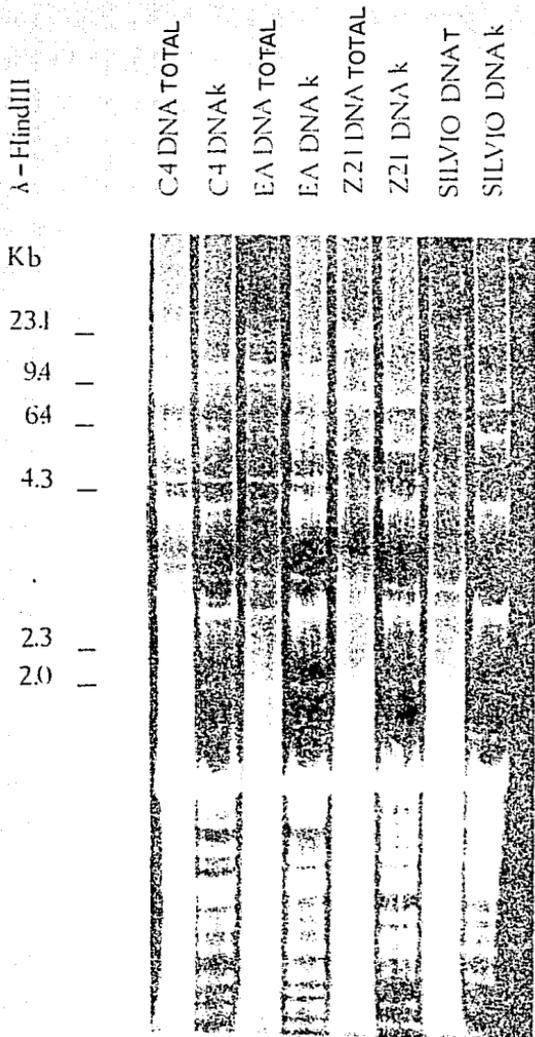


FIG. 5 PATRONES DE HIBRIDACION CONTRA LA SONDA pITC42  
 CARRILES 1-9 : DNA TOTAL DIGERIDO CON HIND III.  
 CARRIL 11: DNA TOTAL DIGERIDO CON EcoRI (CEPA (4)).  
 CARRIL 12: DNA TOTAL DIGERIDO CON EcoRI (CEPA (4)).  
 CARRIL 13: DNA TOTAL DIGERIDO CON HINF I (CEPA (4)).  
 CARRIL 14: DNA DE CINETOPLASTO DIGERIDO CON HINF I (CEPA (4)).



**Fig. 6** Digestión del DNA total y DNA de cinetoplasto con *Hinfl*. Gel de Aragosa al 0.8 % .

## CARACTERIZACION POR SONDAS DE DNA RIBOSOMAL.-

Al mismo tiempo, los **ESPACIADORES TRANSCRITOS INTERNOS** fueron analizados mediante la digestión del DNA total con las endonucleasas de restricción HindIII y SstI, y la hibridación posterior con las sondas pRTC 81 y pRTC 42, abarcando de esta manera todos los espaciadores transcritos internos (fig 2).

El resultado obtenido reveló una banda única de hibridación en todos los aislados, excepto en la cepa Esmeraldo (fig 7). Lo anterior descarta la posibilidad de utilizar a los espaciadores internos como herramienta taxonómica en T.cruzi.

El análisis de los **ESPACIADORES NO TRANSCRITOS** en los aislados de T.cruzi, se llevó a cabo con la digestión del DNA total del parásito con la endonucleasa de restricción HindIII, y la hibridación posterior con la sonda pRTC 81 que contiene el extremo 5' de la unidad de transcripción (fig 2). Para descartar digestiones parciales se utilizó DNA del fago lambda como control interno de digestión (fig 8).

Se observaron 14 bandas de hibridación en promedio entre los 22 aislados con valores mínimo y máximo de 12 y 17 bandas respectivamente. Este resultado revela diferencias entre los ENT de un mismo organismo, que no son extremas tomando en cuenta que T.cruzi presenta 110 copias de los genes de RNA ribosomal por genoma haploide (33), sin embargo, presentan una distribución desigual entre los espaciadores inferida por las

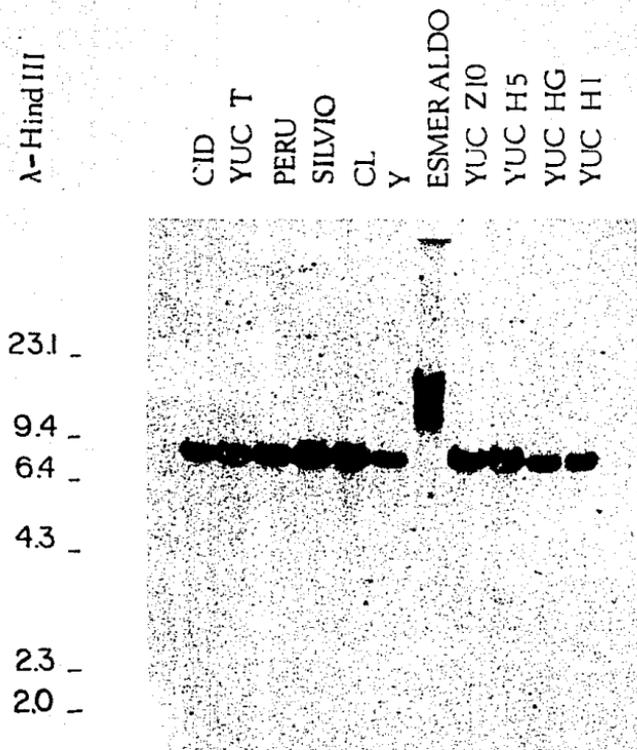


Fig. 7 PATRONES DE HIBRIDACIÓN DEL DNA TOTAL DIGERIDO CON HINDIII CONTRA LA SONDA PRTC42.

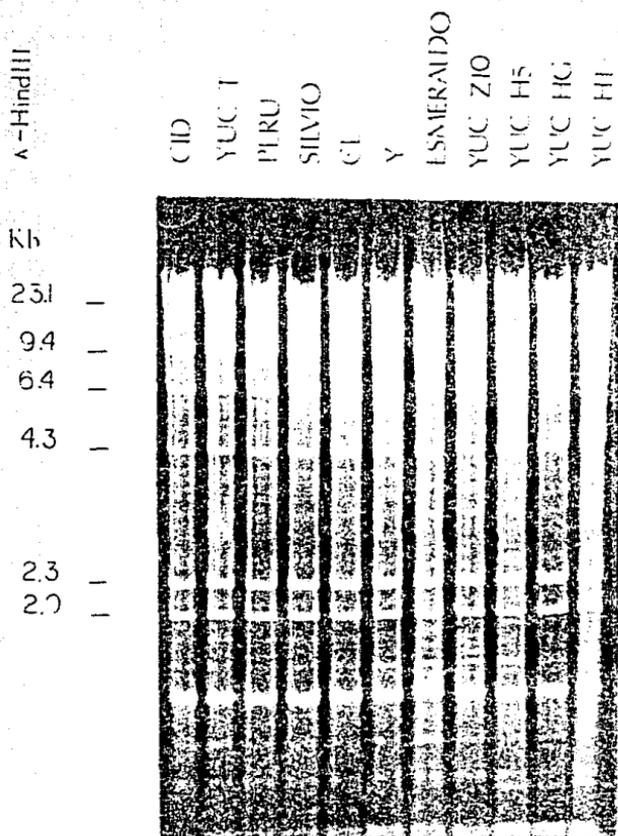
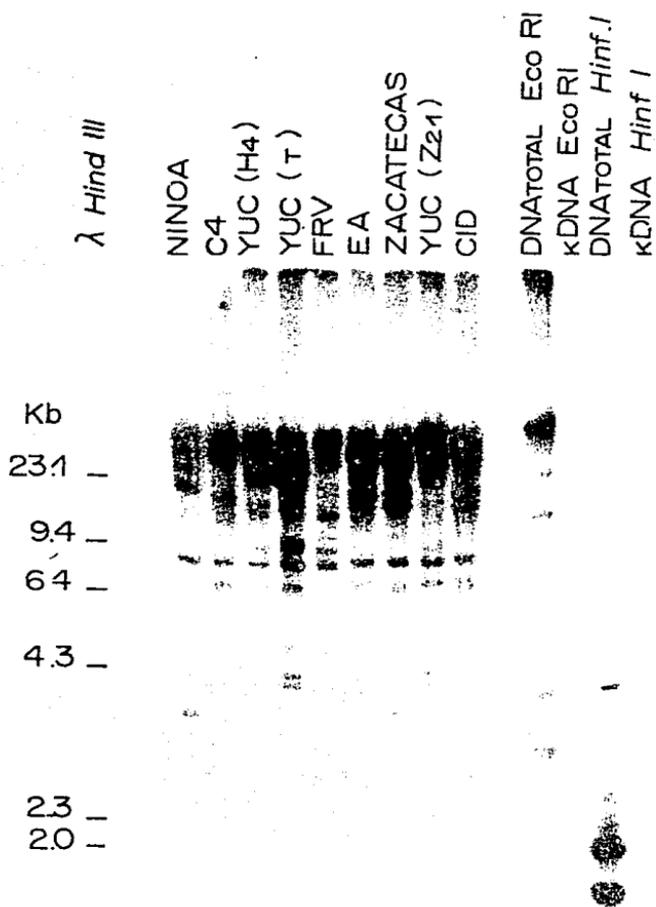


Fig. 8 DNA total digerido con *HindIII*, utilizando DNA del fago lambda como control interno de digestión.

diferencias en la intensidad de hibridación, lo que puede ser indicador de variaciones en el número de copias que representa cada una de ellas (fig 9).

Las digestiones presentan patrones singulares de hibridación con la sonda pRTC81 para cada aislado, característica que podría ser de utilidad para la identificación de las cepas (fig. 10).



**Fig. 9** Patrones de hibridación contra la sonda pRTC81.  
 Carriles 1-9 : DNA total digerido con *HindIII*.  
 Carril 11 : DNA total digerido con *EcoRI*.  
 Carril 12 : DNA de cinetoplasto digerido con *EcoRI*.  
 Carril 13 : DNA total digerido con *HinfI*.  
 Carril 14 : DNA de cinetoplasto digerido con *HinfI*.

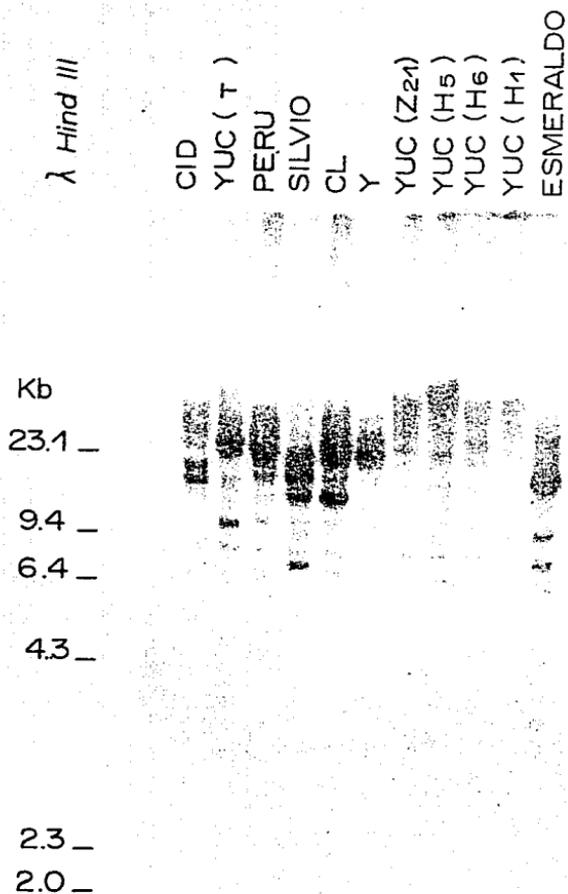


FIG. 10 PATRONES DE HIBRIDACIÓN DEL DNA TOTAL DIGERIDO CON HINDIII CONTRA LA SONDA PRTC81.

## ANALISIS FILGENETICO.-

Para la construcción de un árbol filogenético, se estimaron las divergencias nucleotídicas entre los aislados a partir de los fragmentos de restricción obtenidos con la sonda pRTC81 y el DNA total digerido con HindIII, comprendidos entre los límites preestablecidos, utilizando el método de Nei (32).

El método consiste en comparar los patrones de hibridación entre sí para obtener la proporción de fragmentos compartidos con la fórmula:

$$F = 2m_{xy} / (m_x + m_y)$$

donde  $m_x$  y  $m_y$  son el total de fragmentos de restricción de los aislados X y Y respectivamente, y  $m_{xy}$  es el número de fragmentos compartidos entre los dos aislados.

A partir del valor de F, podemos inferir la probabilidad de que un sitio de restricción ancestral permanezca sin cambios entre dos aislados con la fórmula:

$$G = [F(3-2G_1)]^k$$

tomando  $G_1 = F^k$  como valor inicial, y obteniendo G cuando sea igual a  $G_1$ .

y finalmente las divergencias nucleotídicas se obtienen con la fórmula:

$$d = -(2/r) \log_e G$$

siendo r el número de bases que reconoce la enzima utilizada.

Ejemplo:

Si tomamos como ejemplo los aislados Y y Z10 de la fig.11, tenemos que:

El No. total de bandas de cada aislado es

Cepa Y= 12

Cepa Z10=16

El No. de bandas compartidas es de 4.

Para obtener la divergencia nucleotídica entre Y y Z10 aplicamos las fórmulas y tenemos que:

$$F = 2(4)/12+16$$

$$F = 0.2857$$

Con el valor de F podremos aplicar la siguiente fórmula:

$$G_1 = (0.2857)^k$$

$$G_1 = 0.7311$$

$$G = [0.2857(3-2 \cdot 0.7311)]^k$$

$$G = 0.7963$$

y finalmente:

$$d = -(2/r) \log_e G$$

siendo que en este caso utilizamos la enzima HindIII que reconoce 6 pares de bases,  $r = 6$

$$d = -(2/6) \log_e 0.7963$$

$$d = 0.0759$$

por lo que el valor inferido del número de sustituciones por sitio entre las cepas Y y Z10 es de 0.07963.

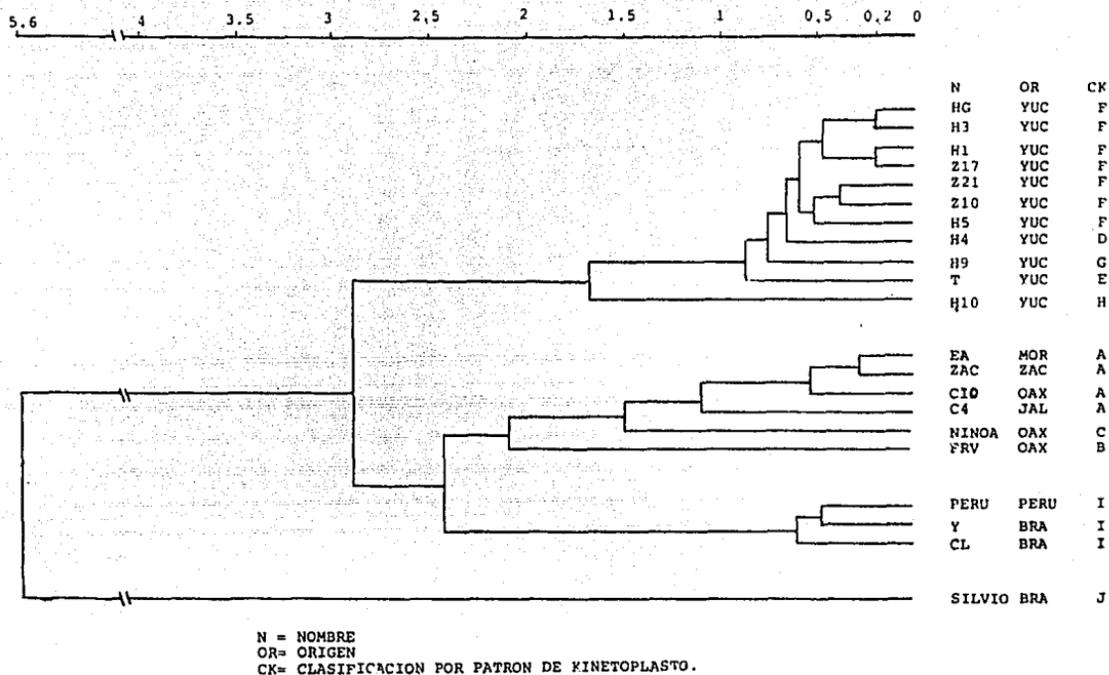
El análisis se llevó a cabo utilizando las divergencias nucleotídicas como valores de distancia, presentándolos en una matriz única en el método de matriz de distancia UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) (Tabla 3).

Cada uno de los aislados se consideró como una unidad taxonómica independiente, y el método consiste en localizar las unidades con las distancias más pequeñas y agruparlas con una ramificación a una distancia igual para ambas unidades. Este par es colocado como una sola unidad, calculando los promedios entre esta y las otras unidades, y reagrupándolos en una nueva matriz para repetir el proceso hasta que todas las unidades taxonómicas operacionales sean agrupadas.

En la topología obtenida encontramos que las divergencias nucleotídicas entre algunos aislados son pequeñas, por lo que dan la apariencia de estar conformando agrupaciones. Esta impresión se incrementa cuando entre estas agrupaciones las divergencias nucleotídicas se amplían grandemente (fig. 11).

	HG	H3	H1	Z17	Z21	Z10	H5	H4	H9	T	H10	EA	ZAC	C4	NIN	FRV	PERU	CL	Y	SILVIO
HG																				
H3	.0039																			
H1	.0107	.0107																		
Z17	.0099	.0097	.0039																	
Z21	.0099	.0099	.0126	.0164																
Z10	.0099	.0145	.0126	.0164	.0075															
H5	.0107	.0107	.0087	.0126	.0081	.0126														
H4	.0164	.0117	.0099	.0093	.0135	.0135	.0145													
H9	.0145	.0145	.0126	.0164	.0164	.0214	.0177	.0135												
T	.0213	.0157	.0137	.0126	.0233	.0233	.0192	.0145	.0177											
H10	.0346	.0346	.0325	.0366	.0295	.0295	.0233	.0387	.0366	.0325										
EA	.0885	.0702	.0826	.0847	.0721	.0721	.0816	.0886	.0723	.0826	.0565									
ZAC	.2281	.0631	.0804	.0702	.0702	.0847	.066	.0867	.0707	.0804	.0544	.0053								
C4	.0408	.0316	.066	.0847	.0702	.0702	.066	.0804	.0585	.0804	.0448	.0135	.0035							
NINCA	.0468	.0468	.0544	.0488	.0702	.0585	.0544	.0604	.0488	.0544	.0544	.0181	.0164	.0271						
FRV	.0544	.066	.0638	.0681	.0565	.0681	.0638	.0585	.0565	.0782	.0346	.0271	.0252	.0315	.0315					
PERU	.0468	.0468	.0448	.0488	.0406	.0488	.0448	.0352	.0488	.0488	.0448	.0426	.0488	.0488	.0585	.0315				
CL	.0782	.0782	.0759	.0804	.0804	.0804	.0759	.0681	.066	.0948	.0212	.0468	.0544	.0448	.0448	.0346	.0544			
Y	.0759	.0759	.0736	.0782	.0638	.0782	.0593	.0804	.0638	.0924	.0593	.0544	.0523	.0523	.0427	.0501	.0523	.0116		
SILVIO	.0136	.0593	.0712	.0759	.0759	.0759	.0569	.0782	.0616	.0899	.0567	.0427	.0406	.0406	.0406	.0384	.0501	.0094	.0126	
	.1682	.1682	.1636	.1709	.1709	.1709	.1656	.1735	.1709	.1723	.1172	.0782	.1222	.1222	.0759	.1198	.1222	.0455	.0431	.0519

TABLA. 3 MATRICES DE DISTANCIA OBTENIDAS A PARTIR DEL NÚMERO DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN COMPARTIDOS ENTRE LOS AISLADOS POR EL MÉTODO DE NEI (32).



**Fig. 11** Topología reconstruida (UPGMA) a partir del número de fragmentos de restricción compartidos, siguiendo los métodos de Nei (32). El número de sustituciones es por cada 100 nucleótidos.

En los aislados que conforman los "grupos", se destaca una asociación entre los patrones de hibridación con la sonda pRTCB1, las zonas geográficas de las que provienen y/o los patrones electroforéticos del DNA de cinetoplasto (fig. 11).

## DISCUSION

### DNA DE CINETOPLASTO.-

Es característico de T.cruzi una gran heterogeneidad biológica encontrada a todos los niveles entre diferentes aislados. A la fecha la heterogeneidad natural de T.cruzi en México es virtualmente desconocida. En un intento por conocer características genéticas de aislados mexicanos, analizamos las bandas de alto peso molecular que aparecen con la digestión del DNA total con la enzima HinfI.

Encontramos que estos fragmentos de restricción pertenecen a los maxicirculos del DNA de cinetoplasto, y que pueden ser de utilidad para formar grupos entre los aislados de T. cruzi.

Los patrones electroforéticos formados con los fragmentos de restricción de los maxicirculos, presentan las siguientes características:

1.- Objetividad en la apreciación de los resultados:

Los patrones son fácilmente distinguibles entre sí.

2.- Estabilidad de los patrones a través del tiempo:

Esta es una de las características mas importantes de los criterios que se utilizan para establecer clasificaciones. El hecho de que los aislados se hayan mantenido en medios diferentes durante varios años, hace pensar que las bandas obtenidas con la enzima HinfI tengan la estabilidad necesaria para ser

consideradas como un criterio taxonómico de utilidad en el estudio de este parásito.

Los fragmentos de restricción de los maxicirulos se han utilizado en otro parásito perteneciente a la familia de los Tripanosomatideos, como es Trypanosoma brucei, en donde se observó que pueden ser de utilidad para determinar la relación filogenética existente entre subespecies (34).

Es evidente que el análisis de los maxicirulos a través de los patrones electroforéticos obtenidos con la endonucleasa HinfI, lo hacen una herramienta útil para formar agrupaciones en éste parásito, y que su importancia se puede reforzar con la correlación encontrada en el análisis filogenético con el genoma nuclear a través de los resultados obtenidos con los espaciadores no transcritos.

Es importante e ineludible un análisis amplio de los aislados bajo los criterios biológicos y bioquímicos preestablecidos, que nos permita determinar si un aislado que pertenezca a un grupo o grupos de patrones electroforéticos pueda ser representativo, en la totalidad de sus características, de toda una población.

## ESPACIADORES TRANSCRITOS INTERNOS.-

La búsqueda de polimorfismos en la unidad de transcripción entre los aislados, nos llevó al estudio de los espaciadores transcritos internos, los cuales pueden presentar diferencias en longitud y secuencia entre especies relacionadas (35,36).

En base a una banda única de hibridación encontrada en todos los aislados, podemos inferir que las diferencias que pudieran presentar no son lo suficientemente importantes como para ser detectadas por el método que utilizamos.

En cuanto a la cepa Esmeraldo, se encontró que presenta bandas de hibridación diferentes, estas diferencias pueden deberse a:

- 1.- Digestiones parciales.- Cabe la posibilidad de que los resultados se deban a digestiones parciales, aunque se obtuvieron los mismos resultados en varios experimentos.
- 2.- Artefacto de laboratorio.- La cepa Esmeraldo es un aislado de humano obtenido hace más de 20 años en Brasil. Es una cepa de referencia internacional que ha sido mantenida en diferentes medios de cultivo y animales de experimentación en varios laboratorios del mundo a lo largo de esos años. Es posible que bajo las condiciones artificiales en que se encontraba haya sufrido una mutación que suprimió el sitio de restricción que analizamos en la unidad de transcripción, sin afectar la

función del RNA ribosomal. Cabe también la posibilidad de que existan alteraciones en otras partes de la secuencia, o que se trate de una contaminación con otro Tripanosomatideo, aunque esto último es muy poco probable.

Se plantea la necesidad de comparar los resultado con los que se pudieran obtener con la misma cepa proveniente de otro laboratorio, así como un mapeo de restricción para descartar la presencia y/o ausencia de otras diferencias dentro de la unidad de transcripción.

3.- Diferencias en la secuencia del RNA ribosomal.- Las diferencias encontradas en la cepa Esmeraldo, pueden deberse a que presenta diferencias "naturales" en la secuencia del RNA ribosomal con relación a otros aislados. Se han encontrado diferencias, bajo ciertas condiciones, en el RNA ribosomal entre Tripanosomatideos(37); un estudio más profundo y detallado de la unidad de transcripción de la cepa Esmeraldo, encontrar otros aislados que presenten las mismas características de hibridación, así como descartar los puntos 1 y 2 , podría ayudar a dilucidar si se trata de una subespecie de T.cruzi, o estamos en presencia de otra especie conocida de Kinetoplastido.

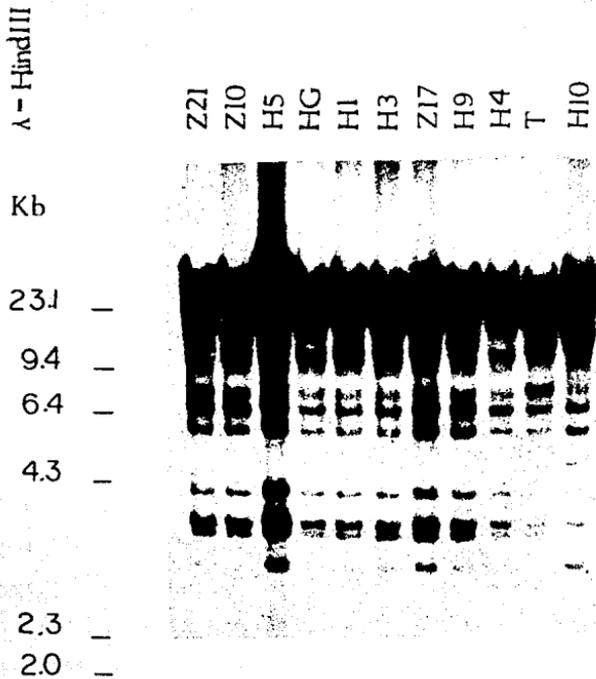
## ESPACIADORES NO TRANSCRITOS.-

En cuanto a los espaciadores no transcritos, las diferencias en longitud y secuencia, aún entre especies muy relacionadas, ha permitido utilizarlos como criterio taxonómico en varios organismos, como insectos y plantas (38-40). Dentro de los componentes de la familia de los tripanosomatídeos, en Leishmania se han utilizado como criterio para establecer especies teniendo como resultado la presencia de 3 patrones de hibridación entre las 15 cepas estudiadas, pudiendo establecer 3 grupos que son propuestos como especies del Género (41). En T.cruzi, no se han establecido los criterios para definir el concepto de especie, a pesar de que la gran heterogeneidad demostrada entre los aislados estudiados pueda hacer pensar en la presencia de especiación en este parásito (42).

A diferencia de lo que sucedió en Leishmania, la heterogeneidad entre los espaciadores no transcritos de los aislados de T.cruzi, limita la posibilidad de que sean utilizados por sí solos como criterio clasificatorio en el estudio del parásito, sin embargo podrían ser de utilidad en la identificación de cepas, debido a la característica de que cada una presenta un patrón específico de hibridación.

Un análisis más detallado de los patrones de hibridación, reveló que las bandas son compartidas, en mayor o menor grado, entre los aislados, por lo que se decidió utilizarlas para establecer una relación filogenética entre ellos utilizando el método de Nei para relaciones filogenéticas a partir de fragmentos de restricción (32).

Observamos que el porcentaje de bandas compartidas aumentaba entre aislados de una misma zona geográfica y/o que compartían el patrón electroforético obtenido del análisis del DNA de cinetoplasto (fig 12,13 ). Esta correlación se estrechó aún más al utilizar los fragmentos de restricción en la elaboración de un árbol filogenético.



**Fig. 12** Patrones de hibridación del DNA total digerido con *HindIII* contra la sonda pRTC81. Cepas Yucatecas.

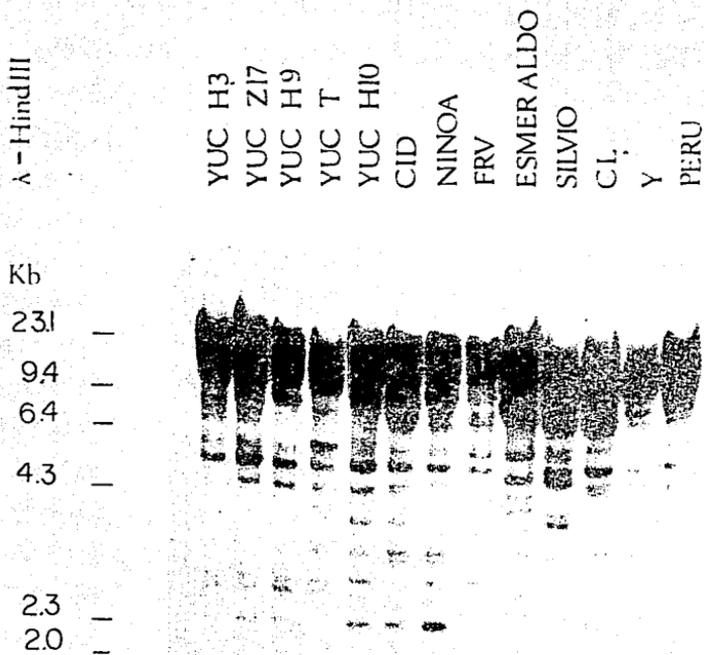


Fig. 13 Patrones de hibridación del DNA total digerido con *HindIII* contra la sonda pRTC81.

#### ANALISIS FILOGENETICO.-

La distribución obtenida en el dendrograma evoca la teoría multiclinal de reproducción inferida para T.cruzi a partir de datos obtenidos con patrones de isoenzimas, y con los que se propone una divergencia antigua y evolución independiente de múltiples clonas (43,44). La topología apoya esta teoría de primera instancia si tomamos en cuenta que cada agrupación pudiera representar una clona que evoluciona independientemente de las demás, lo que estaría claramente reflejado en el caso de Yucatán en donde los aislados se caracterizan por su baja patogenicidad y virulencia en comparación con los del centro de la república, en donde podemos encontrar un comportamiento más agresivo de los aislados y que son representados en este caso por una agrupación diferente (fig 11).

Los grupos, que aparentemente se forman en el dendrograma de la fig 11, presentan divergencias nucleotídicas entre sí tan grandes como las encontradas y utilizadas para determinar especies en el género Leishmania (45).

Sin embargo, es importante tener en cuenta la característica de variabilidad de los ENT que explica tanto las diferencias encontradas intragrupación (muy pequeñas), como las que se encuentran entre los grupos (muy grandes). Considero que es necesario ampliar el estudio utilizando un mayor número de

enzimas de restricción en el análisis de los ENT, y emplear una sonda genética medianamente conservada para tratar de apoyar la especiación sugerida en este estudio.

Es importante señalar que la cepa Esmeraldo no pudo ser incluida en el dendrograma, porque solamente comparte fragmentos de restricción con 5 de las 22 cepas.

Lo que es evidente en estos momentos, es la relación existente entre los patrones de DNAK y los patrones de hibridación con la sonda pRTCE1, por lo que es importante conocer las características biológicas y bioquímicas de los aislados estudiados, para determinar si esta asociación entre los genomas nuclear y mitocondrial se extiende hasta poder tomar a un organismo perteneciente a una agrupación como representativo de toda esa población, en cualquier nivel a estudiar (inmunológico, fisiológico, etc.).

## CONCLUSIONES

1.- Los maxicirculos del DNA del cinetoplasto de T.cruzi, son de utilidad para agrupar aislados de diferentes zonas geograficas a través de los fragmentos de restriccion de la endonucleasa HinfI, y ofrece las siguientes ventajas:

a) El análisis se realiza con el DNA total del parásito, sin tener la necesidad de extraer DNA de cinetoplasto lo que disminuye la dificultad y el costo del método.

b) El análisis se simplifica aún más con la técnica de extracción de DNA total a baja escala.

d) Los patrones electroforéticos son fácilmente distinguibles.

2.- Existe heterogeneidad entre los espaciadores no transcritos de los aislados de T.cruzi incluidos en este estudio, por lo que es posible que puedan utilizarse como marcadores cepa especificos.

3.- Existe una relación núcleo/cinetoplasto expresada por la asociación encontrada entre los patrones electroforéticos del DNA de cinetoplasto, y los patrones de hibridación de la sonda pRTC81.

5.- No existen diferencias entre las unidades de transcripción de los aislados analizados, o no son detectables con el método de análisis utilizado, con excepción de la cepa Esmeraldo que presenta diferencias en la hibridación con la sonda pRTC81.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Mc.Ghee, RB. y Cosgrove, WB. (1980) Biology and Physiology of the lower Trypanosomatidae. Microbiol. Rev. 44: 140-173.
- 2.- Souza, W de. (1984) Cell Biology of Trypanosoma cruzi. Int. Rev Cytol. 86: 197-283.
- 3.- Nogueira, N. (1986) American Tripanosomiasis: Antigens and Host-Parasite Interactions. En Parasite Antigens: Toward New Strategies for Vaccines (Pearson, TW, ed). Dekker, New York.
- 4.- Organización Panamericana de la Salud. (1984). Situación de la Enfermedad de Chagas en las Américas. Bol. Epidem. 5: 5-9.
- 5.- Tay, J., Salazar-Schetino, FM., Ontiveros, A., Jimenez, J., Haro Arteaga, I de., Garcia Yañez, Y., Gutiérrez Quiroz, M. (1987). Epidemiología de la Enfermedad de Chagas en una población de Oaxaca México. Bol. of Sanit. Panam. 102(4) 325-332.
- 6.- Ortega, M., Beltrán-Hernández, F., Zavala, JE. (1976) Enfermedad de Chagas en Chiapas: Estudios clínicos y epidemiológicos. Salud Pública Mex. 28(5): 837-843.
- 7.- Zavala Velázquez, J. (1974) Enfermedad de Chagas en Yucatán. Informe Final. Proyecto 027 CoNaCyt.
- 8.- Andrade, SS. (1985) Morphological and Behavioural Characterization of Trypanosoma cruzi strains. Rev. da Soc. Bra. Med. Trop. 18(Suppl): 39-46.
- 9.- Engel, JC., Doyle, PS., Dvorak, JA. (1990) Isolate-dependent differences in the oxidative metabolism of Trypanosoma cruzi epimastigotes. Mol. Biochem. Parasitol. 39: 69-76.
- 10.- Dvorak, JA., Engel, JC., Leapman, RD., Swyt, CR., and Pella, PA. (1982) Trypanosoma cruzi: elemental composition heterogeneity of cloned stocks. Mol. Biochem. Parasitol. 31: 19-26.
- 11.- Aymerich, S., and Goldenberg, S. (1989) The Karyotype of Trypanosoma cruzi DM 28c: Comparison with other T. cruzi Strains and Tripanosomatids. Exp. Parasitol. 69: 107-115.
- 12.- Brener, S. (1985) General Review on Trypanosoma cruzi Classification and Taxonomy. Rev. da Soc. Bra. Med. Trop. 18 (Suppl): 1-8.

- 13.- Bogliolo,AR., Godfrey,DG. (1987) Isoenzyme changes during the life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med and Hyg.* 81: 222-229.
- 14.- Miles,MA.,Pévoa,MM.,Prata,A.,Cedillos,RA.,Souza,AA de., Macedo,V.(1981) Do Radically Dissimilar *Trypanosoma cruzi* Strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' Disease? *Lancet.* June 20: 1338-1340.
- 15.- Morel,C.,Chiari,E.,Plessman Camargo,E.,Mattei,DM., Romanha,AJ., Simpson,L.(1980) Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 77, No11: 6810-6814.
- 16.- Macina,RA.,Sánchez,DD.,Gluschankof,DA.,Burrone,OR.,and Frasch ACC. (1986) Sequence diversity in the kinetoplast DNA minicircles of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 21: 25-32.
- 17.- Galvan,SC.,Rubio,J.,Sánchez,R.,Ortega,J.,and Castañeda,M. (1983) Phenetic Variation in *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* isolates. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol.74B No.3: 573-578.
- 18.- Long,EO.,and Dawid IB.(1980) Repetead Genes in Eukaryotes. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 727-764.
- 19.- Hernández,R.,Nava,G.,Castañeda,M. (1983) Small-Size Ribosomal RNA Species in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem Parasitol.* 8: 297-304.
- 20.- Hernández,R.,Díaz-de León,F.,Castañeda,M. (1988) Molecular cloning and partial characterization of ribosomal RNA genes from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 27: 275-280.
- 21.- Fedoroff,NV. (1979) On Spacers. *Cell* 16: 697-710.
- 22.- Stuart,K. (1983) Kinetoplast DNA, mitochondrial DNA with a difference. *Mol. Biochem. Parasitol.* 9: 93-104.
- 23.- León,W.,Frasch,ACC.,Hoeijmakers,JHJ.,Fase-Fowler,F., Borst,P. Brunel,F.,Davison,J. (1980) Maxi-circles and minicircles in kinetoplast DNA from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Acta* 607: 221-231.
- 24.- Borst,P.,Hoeijmakers,JHJ.(1979) Kinetoplast DNA. *Plasmid* 2: 20-40.

- 25.- Stuart,K.(1989) RNA Editing:New Insights into the Storage and Expression of Genetic Information. Parasitology Today. Vol.5 No.3: 1365-1367.
- 26.- Storm,NR.,Simpson,L.(1990). Kinetoplast DNA minicircles Encode Guide RNAs for Editing of Cytochrome Oxidase Subunit III mRNA. Cell Vol.61: 879-884.
- 27.- Ray,DS. (1989) Conserved Sequence Blocks in Kinetoplast Minicircles from Diverse Species of Trypanosomes. Mol. Cell. Biol. Vol. 9 No.3: 1365-1367.
- 28.- Macina,RA.,Arauzo,S.,Reyes,ME.,Sanchez,DO.,Basombrio,MA.,Montamat,EE.,Solari,A., Frasc,ACC.(1987) *Trypanosoma cruzi* isolates from Argentina and Chile grouped with the aid of DNA probes. Mol. Biochem. Parasitol. 25: 45-53.
- 29.- Biolabs. 1990. catalog. New England.
- 30.- Maniatis,T.,Fritsch,EF.,Sambrook,J.(1982) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory.
- 31.- Southern,E. (1975) Detection of Specific Sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503.
- 32.- Nei,M.,and Li,WH. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 76 No.10: 5269-5273.
- 33.- Castro,C.,Hernández,R.,Castañeda,M. (1981). *Trypanosoma cruzi* Ribosomal RNA: Internal Break in the Large-Molecular-Mass species and Number of Genes. Mol.Biochem.Parasitol. 2:219-233.
- 34.- Borst,P.,Fase-Fowler,F., Hoeljmakers,JHJ., Frasc,ACC.(1980) Variations in Maxi-Circle and Mini-Circle sequences in kinetoplast DNAs from different *Trypanosoma brucei* Strains. Biochimica et Biophysica Acta, 610:197-210.
- 35.- Gómez-González.EO. RNA Ribosomal de *Trypanosoma cruzi*: Análisis Estructural y Filogenético de las Regiones que codifican para las moléculas S1 Y S3. [TESIS]. Instituto de Investigaciones Biomedicas; UNAM. 1990. 53pp.
- 36.- Hernández,R.,Rios,F.,Valdez,AM.,Piñero,D. (1990).Primary Structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA coding region: Comparisson with other Trypanosomatids. Mol. Biochem. Parasitol. 41:207-212.

- 37.- Villalba,E.,Dorta,E.,Ramirez,JL. (1985) Comparative Study of the Ribosomal RNA from Leishmania and Trypanosoma. J. Protozool. 32(1): 49-53.
- 38 .- Kelly,RJ.,and Siegel,A.(1989) The Cucurbita maxima ribosomal DNA intergenic spacer has a complex structure. Gene 80: 239-248.
- 39.- Lachance,MA.(1990) Ribosomal DNA Spacer Variation in the Cactophilic Yeast Clavispora opuntiae. Mol. Biol. Evol. 7 (2): 178-193.
- 40.- Botchan,F.,Reeder,RH.,Dawid,IB. (1977) Restriction Analysis of the Nontranscribed Spacers of Xenopus laevis Ribosomal DNA. Cell Vol.11: 599-607.
- 41.- Ramirez,JL.,and Guevara,P. (1987) The ribosomal gene spacer as a tool for the taxonomy of Leishmania. Mol. Biochem. Parasitol 22: 177-183.
- 42.- Tibayrenc,M.,Echalar,L.,Dujardin,JP.,Poch,O.,Desjeux,F. (1984) The microdistribution of isoenzymic strains of Trypanosoma cruzi in southern Bolivia; new isoenzyme profiles and further arguments against Mendelian sexuality. Trans. Roy. Sci. Trop. Med. and Hyg. 78: 519-525.
- 43.- Tibayrenc,M.,Ward,P.,Moya,A.,Ayala,FJ. (1986) Natural populations of Trypanosoma cruzi, the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol.83: 115-119.
- 44.- Tibayrenc,M.,Ejellberg,F.,Ayala,FJ. (1990) A clonal theory of parasitic protozoa: The population structures of Entamoeba, Giardia, Leishmania, Naegleria, Plasmodium, Trichomonas, and Trypanosoma and their medical and taxonomical consequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol.87: 2414-2418.
- 45.- Beverley,SM.,Ismach,RE.,McMahon Prat,D. (1987) Evolution of the genus Leishmania as revealed by comparisons of nuclear DNA restriction fragment patterns. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol.84: 484-488.

## ANEXO I. SOLUCIONES.

ABREVIACION	COMPOSICION
LIT	NaCl ..... 4.0g
	KCl ..... 0.4g
	Na2HPO4 ..... 8.0g
	Glucosa ..... 2.0g
	Triptosa ..... 5.0g
	Infusión de
	Hígado ..... 5.0g
	Hemina ..... 0.25g
	*Suero ..... 100ml
H2O ..... c.b.p 1000ml	
pH ..... 7.4	

### \* Suero Fetal Bovino.

SSC 1X	NaCl ..... 150mM
	15mM
SE 1X	NaCl ..... 150mM
	EDTA ..... 100mM
	pH ..... 8
TE 1X	Tris ..... 10mM
	EDTA ..... 1mM
	pH ..... 8
SET 1X	NaCl ..... 0.15M
	EDTA ..... 0.1 M
	Tris ..... 0.01M
	pH ..... 7.9
6,6,0.2	Tris ..... 6mM pH 7.4
	NaCl ..... 6mM
	EDTA ..... 0.2mM pH 7.2

TBE 1X

Tris Base ..... 89 mM  
Acido Bórico ... 89 mM  
EDTA ..... 2 mM

DENHARDTS 100X  
para 50 ml

Ficol 400 ..... 1g  
\*PVP-40 ..... 1g  
\*\*BSA ..... 1g

\* Polivinil Pyrrolidane

\*\* Albúmina Bovina