



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL OCH
Instituto de Investigaciones Biomédicas

CLONACION Y CARACTERIZACION DE
GENES DE RNA RIBOSOMAL DE

Taenia crassiceps

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A I
JOSE LUIS REYES TABOADA

TEJIS CON
FALLA DE ORIGEN

1992

9
2 ej.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

I. Resumen.	1
II. Introducción.	2
1. Sistemática de <i>Taenia solium</i> y <i>T. crassiceps</i> .	3
2. Ciclo de vida de <i>T. solium</i> .	4
3. La cisticercosis murina como modelo de la cisticercosis humana y porcina.	8
A. Morfología de los cisticercos de <i>T. crassiceps</i> .	9
4. El RNA ribosomal.	11
A. Los Ribosomas	11
B. Estructura Ribosomal	11
C. Mecanismo de Síntesis de Proteínas.	13
5. 18S RNA Ribosomal.	16
III. Objetivos.	19
IV. Materiales y Métodos.	20
1. Material biológico.	20
2. Métodos.	21
A. Construcción de un banco genómico de <i>T. crassiceps</i> .	21
B. Tamizaje del Banco en EMBLA.	23
3. Manipulaciones de DNA.	25

4. Secuenciación de las clonas.	27
5. Soluciones y Medios de Cultivo.	29
V. Resultados.	30
1. Construcción del banco genómico de <u>T. crassiceps</u> .	30
2. Tamizaje del banco.	32
3. Caracterización de las clonas positivas.	37
4. Comparaciones con otros céstodos.	40
VI. Discusión.	43
VII. Referencias.	50

I. RESUMEN.

En el presente trabajo de tesis se utilizó *Taenia crassiceps* como modelo para el estudio de la cisticercosis y teniasis causadas por *Taenia solium*. El conocimiento molecular de éstos y otros organismos taénidos es muy limitado, solo recientemente se han comenzado a aplicar las metodologías provenientes de la biología molecular para su estudio. Como uno de los primeros pasos en la caracterización de los mecanismos de regulación de estos organismos, se contruyó un banco genómico a partir de DNA total extraído de cisticercos de *T. crassiceps*, del cual se aislaron clonas que incluyen tanto el gen para el RNA ribosomal 18S (rRNA 18S) como otros genes correspondientes a las otras especies de RNA ribosomal. Estas clonas se identificaron como genes de RNA ribosomal mediante hibridaciones tipo Southern utilizando como sondas los genes de rRNA 18S y 28S de *Trypanosoma cruzi*. El DNA de las clonas A4 y E10 se digirió con diferentes enzimas de restricción para subclonar fragmentos más pequeños (clonas A4-7,Pst-1.4 y E10-7,Pst-1.4) que se secuenciaron posteriormente. El análisis de las secuencias obtenidas confirmó que los fragmentos subclonados correspondían a los genes para rRNA 18S que contienen un segmento no presente en las secuencias de otros organismos. Este segmento puede corresponder a un intrón que se remueve para dar lugar a la molécula madura. Se discuten las posibilidades de que realmente se trate de un intrón y se proponen sus probables aplicaciones en estudios de inferencia filogenética y en el diseño de métodos de diagnóstico.

II. INTRODUCCION.

El parasitismo es una de las relaciones simbióticas que existen entre los seres vivos, que aunque comparte características con las otras (comensalismo, forosis, mutualismo) se distingue de ellas por que uno de los organismos (huésped) resulta dañado por el otro (parásito). Los seres humanos son afectados directamente por varios cientos de especies parásitas, e indirectamente por la acción de muchas más sobre sus fuentes de alimento (cultivos, cría de animales, etc.) y otras actividades.

Las enfermedades parasitarias afectan principalmente a la población que habita en los países subdesarrollados. Este es el caso de la teniasis/cisticercosis que en diversas partes de Africa, Asia, y en algunos países latinoamericanos, incluyendo a México, causa problemas serios de salud pública y de economía en el mercado de la carne de cerdo (Hird y Pullen, 1979; Aluja, et al., 1982; Flisser, et al., 1982; Documento: FAO/UNDP/WHO, 1984; Flisser, 1988).

Taenia solium es el agente causal de la teniasis humana (ocasionada por el gusano adulto o solitaria) y de la cisticercosis porcina y humana (causada por la fase larvaria - cisticerco). Puesto que el humano es el único huésped definitivo de la *T. solium*, la prevalencia de la teniasis/cisticercosis depende exclusivamente de la relación que el ser humano mantiene con el cerdo. Las más altas prevalencias se presentan en regiones en donde la población vive en condiciones insalubres y en promiscuidad con el ganado porcino (Madeley, 1984).

1. SISTEMÁTICA DE *Taenia solium* Y *Taenia crassiceps*.

T. solium y *T. crassiceps* son organismos pertenecientes al phylum Platyhelminthes. Los representantes de este phylum presentan las características más simples entre los animales con cefalización. Los plathelminthos son gusanos planos con cuerpo blando y en forma de cinta. Son organismos acelomados con simetría bilateral y órganos ya conformados por tejidos y organizados en sistemas (Margulis, y Schwartz, 1976). Pueden ser de vida libre, comensales o parásitos: se conocen alrededor de 15,000 especies. Tradicionalmente el phylum se ha dividido en tres clases: Turbellaria, Trematoda y Cestoda. Los turbeláridos (planarias) son casi todos de vida libre y ocupan habitats terrestres, marinos y dulceacuícolas. Los tremátodos (como *Fasciola hepatica* y *Schistosoma mansoni*) pueden ser parásitos internos o externos. En cambio, los céstodos (*T. solium*, *T. crassiceps*, *Echinococcus granulosus* entre otros), son exclusivamente parásitos internos. En general, los tremátodos presentan estadios de vida libre, mientras que todos los estadios de los céstodos son parásitos. Clasificaciones más modernas presentan al Phylum dividido en ocho clases: Turbellaria, Temnocephaloidea, Monogenea, Aspidogastrea, Trematoda Didymozoida, Cestodaria y Cestoda.

Posición taxonómica:

Reino: Animalia

Subreino: Metazoa

Phylum: Platyhelminthes

Clase: Cestoda

Subclase: Eucestoda

Orden: Cyclophyllidea

Superfamilia: Taenoidea

Familia: Taenidae

Género: Taenia

Especie: *Taenia solium*, *Taenia crassiceps*.

2. CICLO DE VIDA DE *T. solium*.

La *T. solium*, al igual que otros taénidos, requiere de dos huéspedes: el cerdo como huésped intermediario y el humano como definitivo (Figura 1). La descripción del ciclo de vida se puede iniciar con el gusano adulto o tenia, habitando en el tubo digestivo del ser humano, quien es su único huésped definitivo. Presenta una región cefálica llamada escólex en donde se encuentran los órganos de fijación (ventosas y ganchos rostelares), así como algunos elementos neuronales. El escólex se adelgaza en una región llamada cuello, que posee una masa central de células mitóticamente activas, de las cuales se derivan los tejidos de la siguiente región: el estróbilo, que consta de una gran cantidad de proglótidos. Existe un gradiente antero-posterior de organogénesis reproductiva en el estróbilo, es decir que los proglótidos más cercanos al cuello son los más jóvenes e indiferenciados, mientras que los más distales no solo presentan genitales

perfectamente diferenciados, sino que además se encuentran repletos de huevecillos, por lo que se les conoce como proglótidos grávidos. Estos son desprendidos espontáneamente y llegan al medio ambiente junto con las heces fecales del huésped.

La descomposición de los proglótidos en el medio ambiente produce la liberación de los huevecillos, los cuales tienen forma ligeramente elipsoidal con diámetro mayor de 35-45 μm (Laclette, et al., 1982). Los huevecillos son la única fase del ciclo de vida de este parásito que aparece (aunque no se desarrolla) en el medio ambiente, por lo que presentan una serie de envolturas protectoras. La envoltura más externa, denominada vitelo, se encuentra delimitada por su propia membrana o cápsula. Hacia adentro, la siguiente serie de envolturas, entre las cuales destaca el embrióforo, se originan por las llamadas células embrioforales, que constituyen un sincicio citoplásmico. La célula embrioforal se encuentra delimitada exteriormente por su propia membrana plasmática, y hacia adentro por la membrana oncosférica que envuelve directamente al embrión hexacanto, también conocido como oncosfera (Laclette, et al., 1982). Es posible que los huevecillos de *T. solium* puedan sobrevivir largos periodos en el medio ambiente, al igual que los de otras especies de ténidos (Gemmell y Lawson, 1982).

El ciclo de vida continúa cuando los huevecillos son ingeridos por el huésped intermediario a través de alimentos o aguas contaminadas: el cerdo. El ácido clorhídrico y la pepsina gástrica del tracto digestivo del huésped intermediario, inician la disgregación del embrióforo. Esta envoltura, que sin duda es la más importante en cuanto a su papel protector, está formada por bloques proteicos que se mantienen unidos por medio de un material cementante. Posteriormente, la

acción de las enzimas intestinales, principalmente la tripsina, terminan la degradación del material cementante (Laclette, et al., 1982). Los bloques embriofóricos se dispersan liberando así a la oncosfera todavía envuelta por su membrana oncosferal (Trejo, 1986). La señal que produce la activación del embrión hexacanto consiste aparentemente en un incremento en la permeabilidad de la membrana oncosferal provocado por las sales biliares (Laclette, et al., 1982). El embrión activado inicia movimientos de sus tres pares de ganchos hasta deshacerse de la membrana. La oncosfera activada atraviesa la mucosa intestinal con ayuda de secreciones líticas así como por acción mecánica de los ganchos, hasta alcanzar capilares sanguíneos y linfáticos que la llevan a diferentes órganos dentro del huésped en donde se desarrolla hasta convertirse en una larva o cisticerco.

El cisticerco de *T. solium* está formado por una bolsa translúcida de 5 a 10 mm. de diámetro con un escólex invaginado que presenta, al igual que la forma adulta, cuatro ventosas y un rostelo con una doble corona de ganchos. El escólex está rodeado por un líquido contenido en la bolsa o pared vesicular denominado fluido vesicular. La superficie externa de la pared vesicular está constituida por un tegumento sincicial y continuo cuya membrana plasmática presenta unas prolongaciones digitiformes, a las que Rothman denominó microtricas (Rothman, 1963). Se ha calculado que la superficie tegumental en el cisticerco de *T. solium* es aumentada 136 veces por la presencia de las microtricas (Ramírez-Bon, et al., 1982). El tegumento es la estructura parasitaria en contacto con el huésped por lo que muchas de sus funciones como la alimentación, excreción y defensa contra la respuesta inmunológica del huésped son llevadas a cabo por este órgano

(Lumsden, et al., 1982).

El ciclo biológico se cierra cuando el hombre ingiere carne de cerdo cisticercoso insuficientemente cocida, de tal modo que las larvas permanecen viables e infectantes. Durante el paso de los cisticercos por el estómago y la primera parte del intestino delgado, los contenidos gástricos e intestinales activan al escólex para evaginar de la vesícula protectora. Estudios *in vitro* indican que la evaginación del cisticercos de *T. solium* es inducida eficientemente por sales biliares y tripsina (Cañedo, et al., 1982). Una vez evaginado, el escólex se fija a la mucosa intestinal por medio de sus ventosas y ganchos y se desarrolla en una tenia adulta. Al igual que el cerdo, el hombre puede adquirir la cisticercosis al ingerir los huevecillos de *T. solium* a través de alimentos y/o aguas contaminadas.

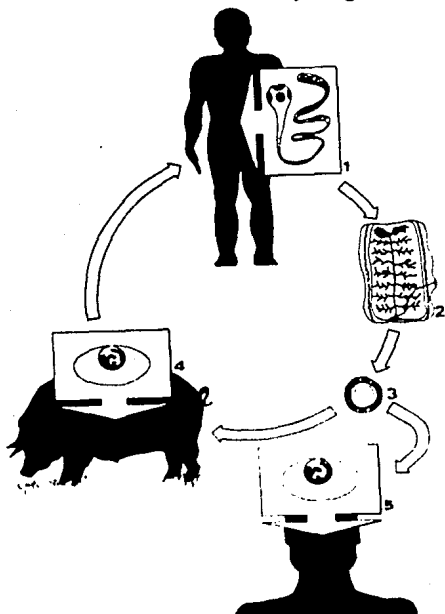


Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium*. 1, Parásito adulto; 2, Proglótido gravido; 3, huevecillo; 4 y 5, Cisticercos. (Cortesía de A. Flisser y J. P. Laclette).

3. LA CISTICERCOSIS MURINA COMO MODELO DE LA CISTICERCOSIS HUMANA Y PORCINA.

Los factores biológicos que determinan la sobrevivencia o destrucción del cisticerco dentro del huésped son difíciles de estudiar en el hombre. Aunque el cerdo es el huésped intermediario natural de la *T. solium*, es el modelo ideal desde el punto de vista biológico, se ha usado poco en estudios experimentales de la cisticercosis debido a la dificultad de su manejo y a su alto costo. En cambio, la cisticercosis murina causada por la *T. crassiceps* es un modelo útil para una variedad de estudios sobre cisticercosis. Los cisticercos de *T. crassiceps* son más pequeños que los de *T. solium*, pero tienen un gran parecido anatómico y tisular. *T. crassiceps* posee varias ventajas como modelo; los cisticercos se mantienen fácilmente por pasaje intraperitoneal en ratones pudiéndose controlar la dosis parasitaria y la edad de la infección. En cuanto al huésped, se pueden utilizar determinadas cepas singénicas murinas, con lo cual la composición genética del huésped es homogénea (Freeman, 1962; Good, et al., 1982; Williams, et al., 1982; Larralde, et al., 1989; Sciutto, et al., 1991). Otras ventajas para usar *T. crassiceps* incluyen la posibilidad de mantener los cisticercos en medio de cultivo y el evitar el manejo de los huevecillos.

A. Morfología de los cisticercos de *T. crassiceps*.

Aunque existe una gran diversidad de metacéstodos (cisticercos, cisticercoides, plerocercoides, etc.), ello no implica que exista diversidad en su citoarquitectura (Cheng, 1973, Lumsden, et al., 1982). En las diferentes especies la vesícula difiere en tamaño y forma, sin embargo, la organización tisular es básicamente la misma.

Una cepa de *T. crassiceps* llamada ORF no puede infectar a su huésped definitivo debido a que el cisticercos carece de escólex, por lo que se trata de una estructura únicamente vesicular. Los cisticercos de la cepa ORF se reproducen asexualmente por gemación polar múltiple y son fáciles de mantener en este estadio por pases sucesivos en ratones (Figura 2).

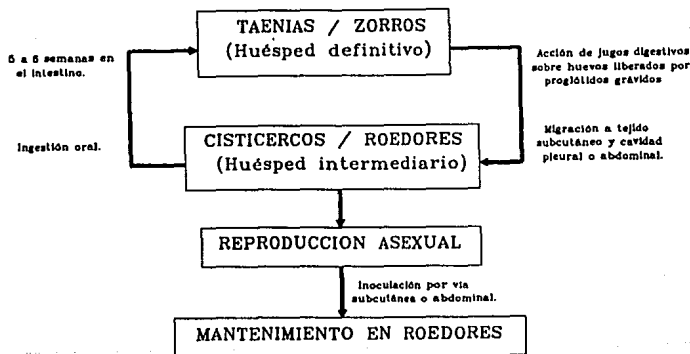


Figura 2. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*. Se muestra el huésped intermediario y el definitivo. Se indica la etapa evolutiva del parásito y los factores que influyen en el desarrollo de los diferentes estadios evolutivos (tomado de Freeman, 1962).

El conocimiento molecular de éste y otros organismos taénidos es muy limitado. No se sabe siquiera el número de cromosomas que tiene *T. solium* o *T. crassiceps*. Solo recientemente se han comenzado a aplicar las metodologías provenientes de la biología molecular al estudio de la *T. solium*: lo que ha llevado a la caracterización y secuenciación de genes de actina (Campos, et al., 1990), la caracterización y expresión de paramiosina (Laclette, et al., 1991), y la caracterización de secuencias de DNA repetitivo como sondas de diagnóstico (Vallejo, 1990).

El presente trabajo de tesis continúa con el objetivo del grupo de incrementar el conocimiento de sistemas génicos básicos; usando los genes que codifican los RNA ribosomales (rRNA) de la *T. crassiceps*. Además, el conocimiento de los genes ribosomales puede tener aplicaciones en el desarrollo de métodos de detección e identificación de huevecillos de *T. solium* en muestras fecales de pacientes teniásicos, así como en estudios de inferencia filogenética dirigidos a aclarar las relaciones taxonómicas de estos organismos (ver Discusión).

4. EL RNA RIBOSOMAL.

A. Los Ribosomas.

Los ribosomas son los organelos en donde se sintetizan las proteínas en todas las células. No existe sistema biológico capaz de sintetizar proteínas en ausencia de ribosomas. Así, hasta los organismos más sencillos que carecen de ribosomas propios utilizan la maquinaria biosintética de la célula infectada para producir las proteínas necesarias para su desarrollo (Darnell, et al., 1990).

La información genética contenida en el DNA es transcrita a RNA mensajero (mRNA) por la acción de una RNA polimerasa, la información en el mRNA es posteriormente leída y traducida a una secuencia de aminoácidos (proteína) por los ribosomas. La secuencia de eventos que ocurren durante la traducción del mRNA en un polipéptido requiere de la intervención progresiva de los distintos componentes ribosomales (Darnell, et al., 1990).

B. Estructura Ribosomal.

Todos los ribosomas de una célula son similares entre sí, y constan de dos subunidades: una pequeña y una mayor formados por RNA y proteínas (Figura 3). En el caso de las células procariontes la subunidad pequeña tiene un coeficiente de sedimentación 30S y está constituida por un total de 21 proteínas ribosomales y una molécula de RNA con un coeficiente de sedimentación 16S (aunque puede variar) de alrededor de 1500 nucleótidos. La subunidad mayor o 60S, contiene 31 proteínas ribosomales y dos moléculas de RNA ribosomal, que por su coeficiente de sedimentación se llaman 23S (2.8 Kb) y 5S (120b).

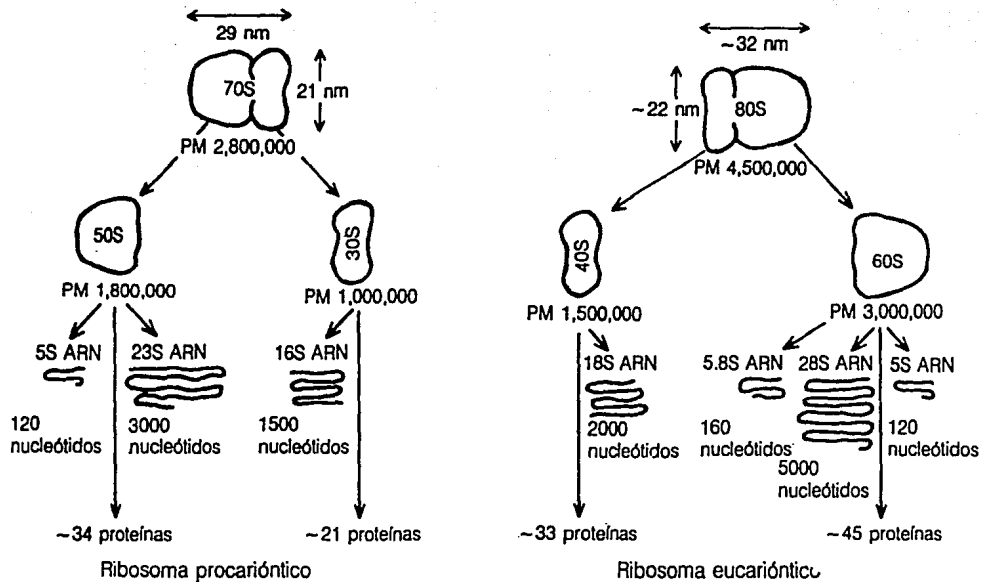


Figura 3. Componentes Ribosomales. Los ribosomas están formados por RNA y proteínas cuya composición se mantiene casi invariable entre procariontes y eucariontes (tomado de Talamás, et al., 1986).

En los organismos eucariontes se mantiene la misma estructura general, pero los ribosomas son más grandes que en los procariontes. El contenido total de RNA y proteínas es mayor; los RNAs principales son más largos en secuencia, y el número de especies de proteínas es mayor. La subunidad pequeña contiene 33 polipéptidos y su rRNA tiene un coeficiente de sedimentación 18S (aproximadamente 1800 b). La subunidad mayor contiene 49 polipéptidos y tres rRNAs principalmente: 28S (4600 b, equivalente al 23S procariontíco), 5S (120 b), y uno exclusivo de eucariontes 5.8S (aproximadamente 160b) (Lewin, 1990).

C. Mecanismo de la Síntesis de Proteínas.

La traducción de mRNA en proteínas llevada a cabo por el ribosoma, consta de tres fases: Iniciación, Elongación y Terminación que se describen a continuación (Figura 4).

Iniciación. Un factor de iniciación (IF_2 en procariontes, eIF_2 en eucariontes) se une a una molécula de GTP y a una molécula de RNA de transferencia unido al aminoácido metionina (Met-tRNA) para formar un solo complejo (en eubacterias la metionina inicial está formilada). Este complejo se une a otros factores de iniciación (IF_3 , eIF_3 , etc.), al mRNA, y a la subunidad pequeña del ribosoma, 30S en procariontes, y 40S en eucariontes. Los factores de iniciación son esenciales para encontrar las señales de inicio de traducción: solo cuando el codón de inicio AUG es localizado, se une la subunidad mayor para completar el ribosoma funcional. El Met-tRNA, llevando el primer aminoácido, está unido al ribosoma en el sitio P (peptidil-tRNA). El complejo de iniciación se encuentra así preparado para iniciar la síntesis de la cadena peptídica.

Elongación. El polipéptido naciente se encuentra siempre unido al tRNA que donó el último aminoácido. Un nuevo tRNA aminoacilado, se une al ribosoma en el sitio A (aminoacil-tRNA). Durante la elongación en procariontes, el complejo proteico Tu-Ts cataliza la unión de cada aminoacil-tRNA al ribosoma. En eucariontes existe un complejo similar de factores de elongación (EF_1 y EF_{1B}). Un complejo activado Tu-GTP se une a una asa (dobléz circular) que se encuentra en todos los tRNAs (asa T ϕ CG) y que permite la unión correcta del tRNA con el ribosoma en el sitio A. El GTP es hidrolizado y el ciclo se repite cuando el factor Ts ayuda en la reactivación de Tu. Después de colocar correctamente el aminoacil-tRNA en el sitio A (cuando el apareamiento codón-anticodón es correcto), la cadena peptídica es transferida al grupo amino del aminoacil-tRNA en el sitio A. El ribosoma se mueve a lo largo del mRNA un codón. Esta reacción de translocación es catalizada (en procariontes por el factor G, en eucariontes EF_2) usando energía de la hidrólisis de GTP. Con este movimiento el tRNA vacío en el sitio P es liberado del ribosoma y el peptidil-tRNA se mueve al sitio P. Esta secuencia se repite con la adición de un nuevo aminoácido a la cadena creciente. Así, en cada ciclo se utilizan dos moléculas de GTP, una para colocar el aminoacil-tRNA y otra en la translocación del ribosoma.

Terminación. Cuando el ribosoma llega a alguno de los codones de terminación (UGA, UAA o UAG), la traducción se completa con la ayuda de factores de terminación (tres en procariontes, uno en eucariontes). La hidrólisis del peptidil-tRNA en el ribosoma, con la liberación del polipéptido completo y el último tRNA vacío, es seguida de la disociación de las dos subunidades ribosomales. Este último paso también

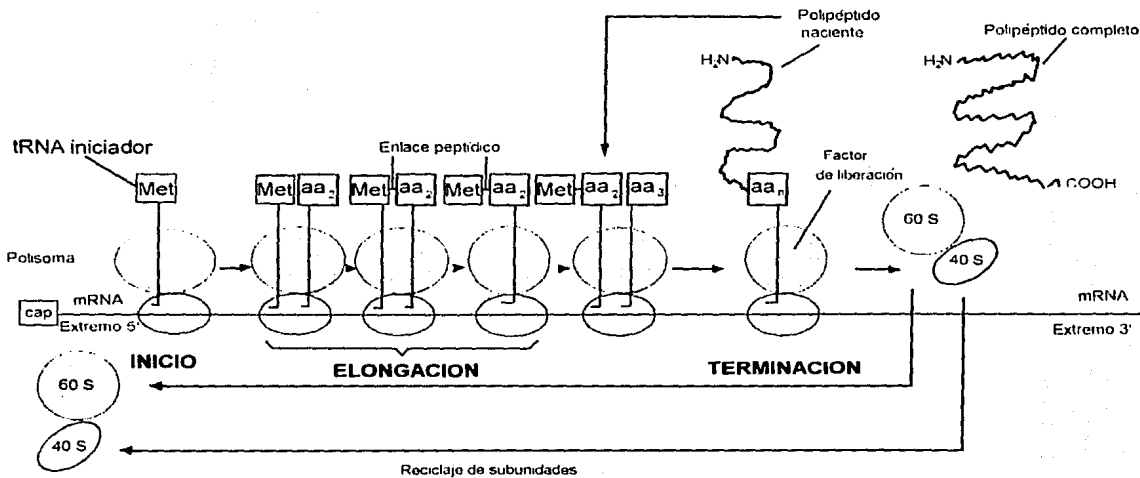


Figura 4. Mecanismo de Traducción. Se muestra en forma general la secuencia de pasos durante la síntesis de proteínas en organismos eucariotes (tomado de Gilbert, 1988).

requiere hidrólisis de GTP (Darnell, *et al.*, 1990).

5. RNA Ribosomal 18S.

El gen que codifica el rRNA 18S en organismos eucariontes se encuentra asociado a los genes para el 5.8S y 28S rRNA en una sola unidad de transcripción repetida varios cientos de veces en el genoma (Figura 5). Los genes ribosomales son transcritos por la RNA polimerasa I, generando un solo transcrito que contiene los tres rRNAs (28S, 18S y 5.8 S). Posteriormente los espaciadores son removidos para dejar los tres rRNAs maduros.

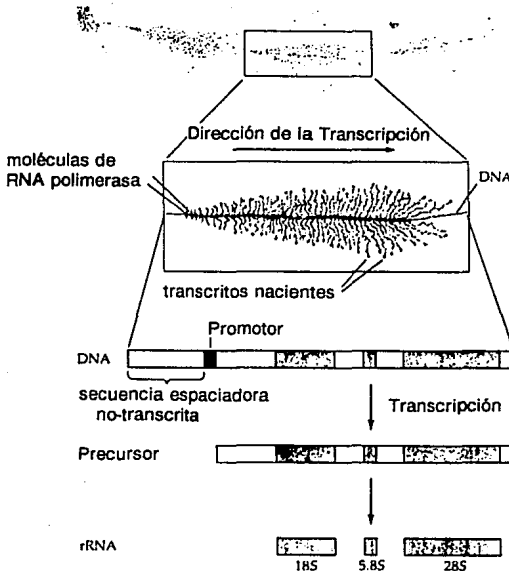


Figura 5. Estructura génica del RNA ribosomal. La micrografía electrónica (arriba), muestra tres de los cientos de copias de las unidades de transcripción de rDNA siendo transcritos en un solo precursor que contiene los rRNA's 18S, 5.8S y 28S (tomado de Campbell, 1990).

Por comparaciones de las secuencias de rRNA 18S de diferentes organismos se ha podido establecer cuál es la estructura secundaria que adopta esta molécula dentro el ribosoma. En esta estructura se han definido cuatro dominios (Fig. 6):

- I. Dominio 5' equivalente a las regiones V1, V2 y V3.
- II. Dominio central equivalente a las regiones V4 y V5.
- III. Dominio mayor 3' equivalente a las regiones V7 y V8.
- IV. Dominio menor 3' equivalente a la región V9.

Estos cuatro dominios se encuentran conservados en todos los organismos (Dams, et al., 1988; Lewin, 1990). A su vez, a lo largo de la molécula se encuentran regiones muy conservadas entre los diferentes organismos, intercaladas con otras más variables, por lo que han sido ampliamente utilizados como marcadores de relaciones filogenéticas tanto en bacterias (Woese, 1987) como para eucariontes (Field, et al., 1988).

En el caso de organismos procariontes el dominio menor 3' está involucrado en el reconocimiento del RNA mensajero por parte de la subunidad pequeña del ribosoma. El rRNA 16S contiene la secuencia 5' C C U C C 3' cerca del extremo 3' que resulta ser complementaria con una secuencia presente en los RNA mensajeros cuyo consenso es: 5' G G A G G 3' denominada Shine-Dalgarno, por los investigadores que la describieron inicialmente (Shine y Dalgarno, 1974). Evidencia experimental sugiere que el mRNA se aparee con el rRNA 16S en esta región como parte del reconocimiento entre mRNA y subunidad pequeña (Hui, et al., 1987; Jacob, et al., 1987).

No se han podido identificar claramente secuencias equivalentes a la Shine-Dalgarno en el mRNA o en el rRNA de eucariontes; sin embargo, existe evidencia de un reconocimiento del mRNA por parte del 18S rRNA que involucra ciertos nucleótidos alrededor del codón de inicio AUG (Kozak, 1986), y en el caso de *Giardia lamblia* se encontró una secuencia tipo Shine-Dalgarno (Sogin, et al., 1989), aunque existen dudas sobre si realmente funciona como tal por lo pequeño de la región descrita (Adam, 1991).

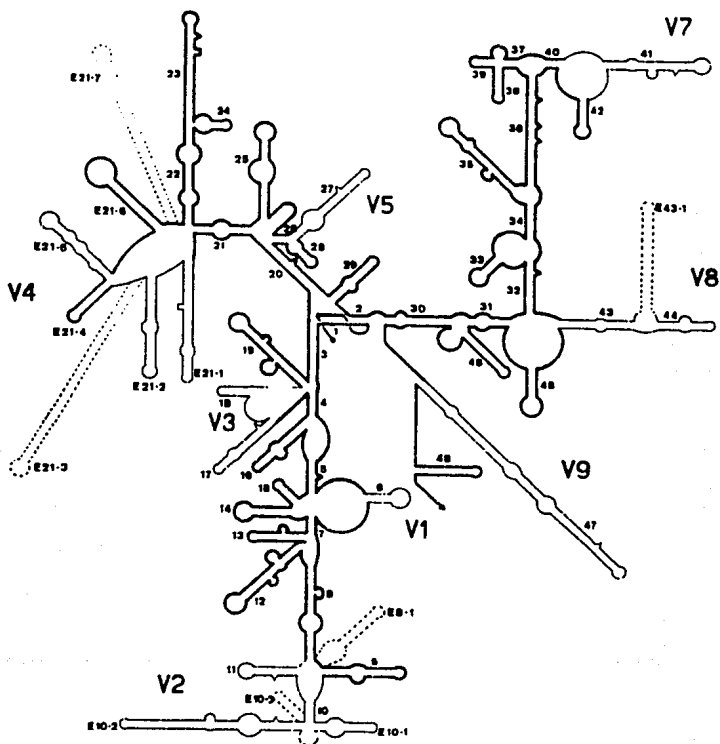


Figura 6. Modelo de estructura secundaria para el 18S rRNA. El extremo 5' se simboliza por un círculo cerrado y el 3' por una flecha. Las hélices se nombran en el orden 5' → 3', las que son particulares de eucariontes están precedidas por una 'E'. Las regiones relativamente constantes en secuencia y longitud de las hélices se muestran en líneas gruesas, zonas variables en líneas delgadas. La región variable V6 no se encuentra en eucariontes (tomado de Dams, et al., 1988).

III. OBJETIVOS.

GENERAL:

Comenzar a caracterizar los mecanismos moleculares de regulación en los cisticercos de *Taenia crassiceps* como modelo experimental de *Taenia solium*.

ESPECIFICOS:

1. Construcción de una banco genómico de *T. crassiceps* en un vector derivado del bacteriófago Lambda para éste y otros trabajos posteriores.
2. La identificación de clonas que contengan los genes correspondientes a los RNA ribosomales principales mediante hibridaciones DNA-DNA usando una sonda heteróloga.
3. Secuenciación del DNA de una clona para determinar la estructura primaria y la posible estructura secundaria del 18S rRNA de *T. crassiceps*.

IV. MATERIALES Y METODOS.

1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Los cisticercos de Taenia crassiceps son mantenidos en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, mediante pases sucesivos (de peritoneo a peritoneo) en ratones hembras, cepa BALB/c de 6 semanas de edad.

Las cepas de Escherichia coli utilizadas en el trabajo y el genotipo de cada una se muestran en la Tabla I.

Tabla I. Cepas de E. coli utilizadas*

NM 539	<u>supE, hsdR, lacY, (P2cox)</u>	Crecimiento del fago Lambda
NM 538	<u>supE, hsdR, trpB, lacY</u>	Crecimiento del fago Lambda
JM 101	<u>supE, thi, (lac-proAB)</u> <u>F'[traD36, proAB⁺, lacI^q, lacZ M15]</u>	Transformación de plásmidos
TG 1	<u>supE, hsd 5, thi (lac-proAB)</u> <u>F'[traD36, proAB⁺, lacI^q, lacZ M15]</u>	Crecimiento del fago M13

* Sambrook, et al., 1989.

Como vector para la construcción de la biblioteca se utilizó EMBL4, el cual es un derivado del bacteriófago Lambda de E. coli que permite la inserción de fragmentos de DNA de 12 a 22 Kb. Además posee un sitio único de Eco RI que facilita la clonación

y la recuperación del inserto. Los bacteriófagos recombinantes son fácilmente seleccionados, ya que, a diferencia de los silvestres, son capaces de crecer en la cepa NM 539 de *E. coli* (Frischauf, et al., 1983).

Las clonas fueron secuenciadas utilizando dos derivados del bacteriófago M13: M13mp18 y M13mp19, que permiten obtener DNA de cadena sencilla que se usa como templado en las reacciones de secuenciación (Messing, 1983). El plásmido pBR322 se utilizó como control negativo en las hibridaciones (Bolívar et al., 1977).

2. METODOS.

A. Construcción de un banco genómico de *T. crassiceps*.

Purificación de DNA de *Taenia crassiceps*: Los cisticercos de *T. crassiceps* fueron extraídos de la cavidad peritoneal de ratones con 6-8 semanas de infección. Los ratones fueron sacrificados por sobreenestesia con eter etílico. Para la purificación del DNA genómico, inicialmente se utilizó el método descrito por Sambrook et al., (1989), pero debido al bajo rendimiento obtenido se decidió modificarlo como se describe a continuación. Los cisticercos se incubaron con dos volúmenes de una solución de 0.5% de sarkosyl, 0.5M EDTA y 0.1 mg/ml de proteinasa K, durante una noche a 55 °C. Posteriormente, los ácidos nucleicos fueron extraídos 2 veces con un volumen de fenol:cloroformo y una vez más con cloroformo solo. La fase acuosa fué aplicada a una columna de sepharosa G50, equilibrada con TE, en una cromatografía de filtración por peso molecular. Las fracciones resultantes de la columna se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (ver adelante) para determinar cuales contenían

DNA. Se mezclaron las fracciones con DNA y se extrajo nuevamente con fenol:cloroformo. Los ácidos nucleicos extraídos fueron concentrados por precipitación etanólica (2.5 volúmenes de etanol y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 0.3M), dejando 20 minutos a -70°C o toda la noche a -20°C . La mezcla fue centrifugada a 10,000 g durante 15 minutos y el botón resultante se secó y se resuspendió en TE. La concentración final del DNA se calculó por evaluación visual, comparando la intensidad de fluorescencia de una alícuota con otras de concentración conocida al ser corridas en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

Restricción del DNA de *I. crassiceps*: El DNA purificado fue digerido con la enzima Sau 3AI, a distintas concentraciones y a distintos tiempos, para estimar las condiciones en las cuales el DNA tenía un tamaño cercano a 20 Kb. Estas condiciones fueron 23 μg de DNA digeridos con 1.456 U de Sau 3AI en un volumen de 1 ml durante 4 hrs a 37°C . Posteriormente se extrajo el DNA con fenol:cloroformo, se precipitó con etanol y acetato de sodio y se trató con fosfatasa alcalina (23 U para 20 μg).

Gradiente de Sacarosa: El DNA digerido se cargó en un gradiente del 10 al 50% de sacarosa para diferenciarlo por tamaño y eliminar el RNA y las proteínas residuales. Las fracciones resultantes del gradiente se colectaron en alícuotas de 250 μl y se determinó cuales fracciones contenían DNA de alrededor de 20 Kb, por electroforesis en geles de agarosa. Estas fracciones se juntaron para ser dializadas y posteriormente ligadas al vector.

Ligación y Empacamiento: La ligación del DNA de *I. crassiceps* con el vector

EMBL4 se realizó en un volumen de 10 μ l con una relación 1:1 (p/p) o 300 ng de cada fracción, incubando a 14 °C toda la noche con la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4. El Empacamiento de esta ligación en partículas virales se realizó con un extracto comercial de la compañía Stratagene según sus indicaciones.

Infección de las células NM538 y NM539: Las partículas virales se utilizaron para infectar células de *E. coli* en 10mM MgSO₄, durante 20 min a 37 °C antes de sembrarlas en cajas de petri con medio LB y 10mM MgSO₄, y dejarlas crecer a 37 °C toda la noche. Por medio de una titulación se encontró que el banco contenía alrededor de 400,000 placas independientes. Suponiendo un promedio de 15 Kb por inserto, ello significa que el banco es representativo para el 99.99% del genoma de *I. crassiceps*.

B. TAMIZAJE DEL BANCO EN EMBL4.

Se sembraron cinco cajas de Petri en medio LB/10mM MgSO₄, con alrededor de 200,000 placas líticas del banco genómico, de las cuales se hicieron replicas en filtros de nitrocelulosa (Benton y Davis, 1977). Los filtros fueron humedecidos durante un minuto en una solución desnaturalizante (0.2M NaOH, 1.5M NaCl); 2 veces un minuto a solución neutralizante (0.5M Tris-HCl pH 7.5, 3M NaCl) y finalmente, un minuto en 2X SSC. El DNA se fijó al filtro horneándolo 2 hrs a 80 °C, al vacío.

Los filtros se pusieron a prehibridizar 2 hrs a 65 °C en solución A (buffer fosfatos 0.1M, Denhardt's 10X, SSC 5X) y a hibridizar toda la noche a 65 °C en solución A con las sondas para genes de rRNA 18S y 24S, marcadas con P³² en pRTC27 y pRTC42,

facilitados amablemente por el Dr. Roberto Hernández (Hernández, et al., 1988). Después de eliminar la solución de hibridización se hicieron al menos cuatro lavados con 10ml de solución B (SSC 2X, SDS 0.1%), durante 15 min a temperatura ambiente y otros cuatro lavados en solución B a 55 °C. Finalmente, se eliminó el exceso de SDS con un lavado de SSC 2X 15 min a temperatura ambiente. Los filtros se secaron con papel Whatman y se pusieron a autorradiografiar durante dos a tres noches.

Recuperación de las placas: Las placas que hibridaron positivamente con la sonda para rRNA 18S se recuperaron directamente de la caja de Petri mediante succión con una pipeta Pasteur. La placa se colocó en 200 µl de SM y se dejaron difundir los fagos por 2 hrs.

Southern Blots (Southern, 1975): Los fragmentos de DNA fueron separados por electroforesis en gel de agarosa con TBE. El gel se trató después a 4 °C, 2 veces 15 min con 0.25 N HCl, 2 veces 15 min con 0.25N NaOH/0.25M NaCl y finalmente 2 veces 30 min con 0.5M Tris-HCl pH 7.4/1.5M NaCl. El DNA se transfirió por capilaridad del gel a un filtro de nitrocelulosa, que después se horneó 2 hrs a 80 °C al vacío, ó utilizando un filtro de nylon que permite realizar la fijación por irradiación con luz ultravioleta. La prehibridización e hibridización se realizaron en las mismas condiciones que las empleadas en el tamizaje del banco genómico.

3. MANIPULACIONES DE DNA.

Purificación del DNA de Fago Lambda: Se creció un cultivo de 100 ml de LB o SOBMB con 1 ml de células cepa NM539 crecidas toda la noche y una cantidad de fago que produzca 1×10^8 placas durante 6 horas. Se añadieron 6 ml de cloroformo y se incubó el cultivo 15 minutos más. Los ácidos nucleicos bacterianos fueron eliminados por tratamiento con DNasa I y RNasa A ($1 \mu\text{g/ml}$ de cada una) durante 30 min a temperatura ambiente. Las partículas virales se precipitaron añadiendo NaCl y PEG (Polietilenglicol p.m. 8,000), hasta una concentración final de 1M y 10%, respectivamente, incubando la mezcla en hielo durante una hora. Posteriormente, la mezcla fue centrifugada a 7,000 rpm durante 15 min a 4°C (Sambrook, et al., 1989) y resuspendida en SM. Esta preparación de fagos es estable por meses a 4°C en buffer SM adicionado con una gota de cloroformo.

Una alícuota de $200 \mu\text{l}$ de la preparación de fagos fue utilizada para purificar DNA fágico: se le agregaron $2 \mu\text{l}$ de 10% SDS y $2 \mu\text{l}$ de 0.5M EDTA y se incubó la mezcla a 65°C durante 15 min. Se realizaron extracciones con fenol/cloroformo y se concentró el DNA por precipitación etanólica (ver arriba). El botón se resuspendió en TE y se cuantificó el DNA por electroforesis en geles de agarosa (Ausubel, et al., 1989).

Digestiones con enzimas de restricción: Todas las enzimas de restricción utilizadas fueron adquiridas comercialmente de New England Biolabs y de BRL Inc. Las reacciones se llevaron a cabo casi siempre en volúmenes de $10 \mu\text{l}$, usando 10 U de enzima con el buffer adecuado (Tabla II). Normalmente, las reacciones se incubaron

2 horas a 37°C y 10 min a 65°C para inactivar la enzima.

Tabla II. Enzimas de restricción utilizadas y sus buffers.

enzima	buffer
Bam HI	3
Eco RI	3
Hind III	2
Pst I	2
Sal I	4

Buffer 2 10x: 50mM Tris-HCl pH 8, 10mM MgCl₂, 50mM NaCl.

Buffer 3 10x: 50mM Tris-HCl pH 8, 10mM MgCl₂, 100mM NaCl.

Buffer 4 10x: 20mM Tris-HCl pH 8, 5mM MgCl₂, 50mM KCl.

Ligaciones: Las reacciones de ligación se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µl usando 40 U de T4 DNA ligasa (New England Biolabs) con buffer para la enzima provisto por la compañía (Tris, MgCl₂), 10mM dATP, y concentraciones equimolares de los fragmentos de DNA a ligar (normalmente entre 50 y 100 ng de c/u). La reacciones se incubaron durante 16 hrs a 14°C ó 3 hrs a temperatura ambiente.

Transformación de E. coli.

Obtención de células competentes: Se tomaron colonias aisladas de las cepas JM 101 ó TG1 y se crecieron durante la noche en cultivos de 5 ml en LB ó SOBMB a 37°C. Al día siguiente se tomaron 100 µl de este cultivo para inocular 10 ml de medio fresco que se incubaron con agitación a 37°C, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 590 nm. Se centrifugó el cultivo por 5 min a 4000 g y se resuspendió el botón celular en 1/2 volumen de CaCl₂ 100 mM. Después de incubar 20 min en hielo, las células fueron centrifugadas nuevamente por 5 min a 4000 g y el botón fué

resuspendido en 1 ml de CaCl_2 . En este paso las bacterias están listas para transformación o se pueden almacenar hasta 24 hrs sin disminuir significativamente su viabilidad.

Transformación de las células competentes: Una alícuota de 200 μl de bacterias en CaCl_2 se mezclaron con las mezclas de ligación o y se incubaron de 30 min a 1 hr en hielo. Posteriormente las células fueron sometidas a choque térmico durante 2 min a 42°C y enfriadas en hielo durante 5 min. Las células fueron plateadas en cajas de Petri con medio SOBMB diluyendo en 2.5 mL de agar suave en presencia de 0.1M IPTG (iso-propil tiogalactósido) y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosido). Las cajas de Petri fueron incubadas toda la noche a 37°C y al día siguiente se muestrearon las placas de lisis blancas para su posterior secuenciación. Las placas blancas se deben a la carencia de función de la beta-galactosidasa que indica la presencia de un inserto en el bacteriófago M13.

4. SECUENCIACION DE LAS CLONAS.

Obtención de DNA de cadena sencilla: Las placas blancas de M13 fueron muestreadas con un palillo de madera para inocular 5 ml de medio líquido SOBMB adicionando 50 μl de células TG1 crecidas en el mismo medio durante toda la noche. Los cultivos se incubaron durante 5 a 6 hrs y se centrifugaron para descartar el botón de células y coleccionar el sobrenadante con partículas virales de cadena sencilla. Para purificar el DNA se tomó 1 ml de sobrenadante y se precipitó con 200 μl de PEG 20% en NaCl 2M durante 30 min a temperatura ambiente. Después, se centrifugó durante 10 min en microfuga. El precipitado se extrajo dos veces con fenol y una vez con

cloroformo para precipitar finalmente con etanol frío. El DNA se secó al vacío y se resuspendió en 20 μ l de TE de los cuales se usaron 3 o 4 μ l para cada reacción de secuencia.

Oligonucleótidos: Para llevar a cabo las reacciones de secuencia se usaron 4 diferentes oligonucleótidos como primeros de la enzima DNA polimerasa, uno corresponde al que viene incluido en el kit de secuencia de USB Co. Los otros tres fueron sintetizados para completar la secuencia:

JLR 3: 5' CCGTCAATTCCTTTAAGTTTC 3'

JLR 9: 5' GAAACTTAAAGGAATTCACGG 3'

JLR 10: 5' GGCAGAGGCAGTGGCAGAGG 3'

Estos oligonucleótidos fueron escogidos porque representan secuencias de RNA ribosomal conservadas entre diversos organismos y era de esperarse que funcionaran también con *I. crassiceps*.

Reacciones de secuenciación: Las reacciones de secuencia se llevaron a cabo utilizando [³⁵S]-dATP y un kit para secuenciación (United States Biochemicals, Inc.), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las reacciones de secuencia se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Se utilizaron geles de 7.6% ó 4% de acrilamida con urea 8M, TBE 1x, TEMED (20 μ l) y persulfato de amonio 10% (200 μ l). Los geles se corrieron a 50W (1500-1700 V). Una vez terminada la electroforesis el gel fue fijado con ácido acético al 10% durante 30 min y secado durante 1 hr a 150°C. Una vez seco, la autorradiografía del gel se llevó a cabo exponiendo una placa de rayos X (Kodak XK-1) de uno a tres días a -75°C.

5. SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO*

- LB.** Bacto-triptona 1%
extracto de levadura 0.5%
NaCl 1%
- SOBM.** Bacto-triptona 2%
extracto de levadura 0.5%
NaCl 0.05%
10mM MgCl₂
- SM.** 50mM Tris-HCl pH 7.5
10mM MgSO₄
gelatina 0.01%
NaCl 0.1M
- M9.** Na₂HPO₄·H₂O 1.3%
KH₂PO₄ 0.3%
NaCl 0.05%
NH₄Cl 0.1%
vitamina B1 (0.02mL por cada 100 ml de una solución 0.1%)
glucosa 0.2%

* Para preparar cajas de Petri con medios sólidos se añadió Bacto-agar a una concentración final de 1.5% y de 0.75% para el agar suave.

- TE.** 10mM Tris-HCl pH 7.5
1mM EDTA pH 8.
- TBE.** 9mM Tris-borato
2mM EDTA pH 8.0
- 20X SSC** NaCl 17.5%
citrato de sodio 8.8%
ajustar a pH 8.0 con NaOH

(tomado de Sambrook, et al., 1989).

V. RESULTADOS.

1. CONSTRUCCION DEL BANCO GENOMICO DE *I. crassiceps*.

Los primeros intentos de purificación de DNA a partir de cisticercos de *I. crassiceps* siguiendo el procedimiento por gradiente de CsCl descrito en (Sambrook, et al., 1989) resultaron poco exitosos, por lo que se introdujeron algunas modificaciones (ver Materiales y Métodos, sección 2). La Tabla IV resume las modificaciones introducidas y muestra que el procedimiento modificado resulta en mejores rendimientos y en un ahorro considerable de tiempo.

Tabla III. Comparación del rendimiento de los métodos utilizados.

Método	Resumen de pasos	tiempo (días)	Rendimiento (en ug/ml)
Gradiente CsCl	Proteinasa K Fenol:cloroformo Diálisis Fenol:cloroformo Diálisis Gradiente de CsCl	4	5
Procedimiento Modificado	Proteinasa K Fenol:cloroformo Columna de sefarosa G50 Precipitación etanólica	1.5	11

Para producir fragmentos grandes de DNA, que tuvieran extremos compatibles con los extremos del vector EMBL4, el DNA de *I. crassiceps* fue digerido parcialmente con Sau 3AI. Posteriormente, el DNA fue fraccionado en un gradiente de sacarosa para obtener la fracción de fragmentos de 17-20Kb. A su vez, el EMBL4 fué digerido con

Bam HI y **Sal I** para eliminar el fragmento central de 17Kb y dejar los brazos con extremos **Bam HI** listos para recibir un inserto de 10 a 20Kb (Fig. 7). Después de la ligación y empacamiento de 300 ng del DNA de *I. crassiceps*, las titulaciones realizadas mostraron que el banco consta de alrededor de 400,000 clones independientes.

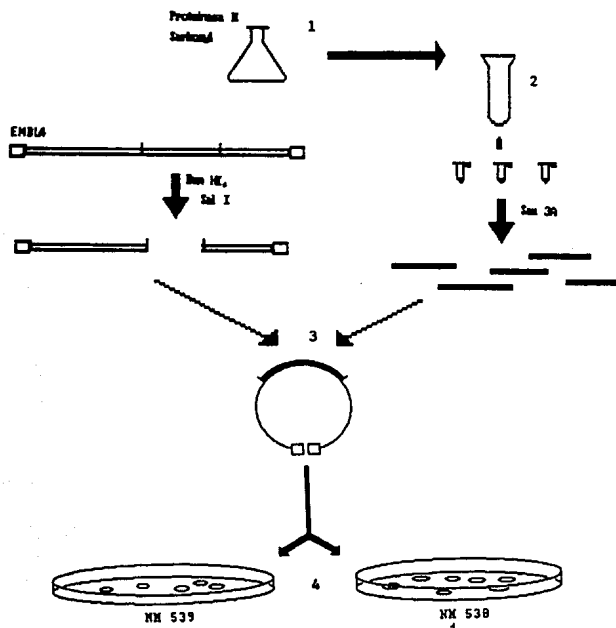


Figura 7. Construcción del banco genómico. 1, Obtención de un lisado de cisticercos; 2, Separación de DNA por cromatografía de exclusión por peso molecular; 3, Ligación y empacamiento de las partículas recombinantes; 4, Selección de fagos recombinantes en la cepa NM 539 de *E. coli*.

El análisis de diez placas líticas muestreadas al azar y digeridas para liberar los insertos indicó que su tamaño promedio es de 15 kb. Considerando un tamaño del genoma de *I. crassiceps* de alrededor de 10 Mb (Li, y Graur, 1991), la representatividad del banco es del 99.99%. Esto quiere decir (de acuerdo a la ecuación 1), que la probabilidad de encontrar un gen de copia única es casi igual a la unidad.

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - f)} \quad (1)$$

P: probabilidad deseada

f: fracción del genoma representada en cada inserto (tamaño del inserto/ tamaño del genoma entero)

N: número de recombinantes necesarios para una probabilidad dada (Clarke y Carbon, 1976).

2. TAMIZAJE DEL BANCO.

Se utilizaron sondas de genes 18S y de 24S de *Trypanosoma cruzi* en pRTC27 y pRTC42, respectivamente. Los ensayos iniciales con el gen 18S completo dentro del plásmido pRTC20 produjeron una señal inespecífica demasiado fuerte causada por el DNA ribosomal bacteriano. Por tanto, se utilizó el fragmento Bgl II/Hind III de 1700 pb de pRTC27, que corresponde a la región V4 del gen 18S (Fig. 6), debido a que incluye una región que se encuentra conservada en organismos eucariontes y no en

procariontes. Para el tamizaje propiamente dicho, se platearon alrededor de 40,000 placas líicas y solo se consideraron positivas las placas que aparecían en ambos filtros de nitrocelulosa. En el tamizaje primario se colectaron solo las diez placas (de entre más de cincuenta placas positivas) que parecían más positivas. Solo una de ellas resultó negativa en el segundo tamizaje (Figura 8).

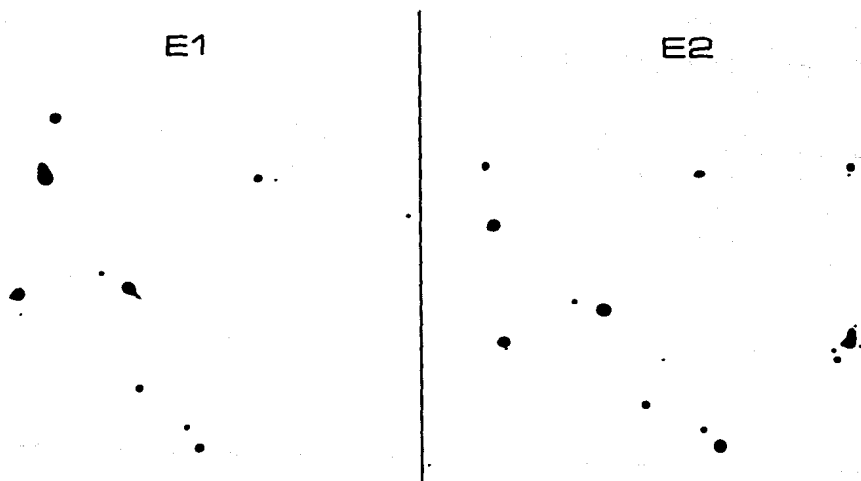


Figura 8. Tamizaje del banco. Utilizando como sonda el inserto de pRTC27, las hibridaciones resultaron más claras y sin falsos negativos, que utilizando pRTC20.

Para comprobar que los insertos de las clonas positivas correspondían al gen 18S rDNA, se realizó un Southern blot con DNA de 4 placas denominadas A2, A4, E2 y E10 digeridas con Eco RI. Esta enzima tiene solo dos sitios de corte en el vector EMBL4 por lo que genera dos fragmentos de 23 y 9 Kb correspondientes a los brazos del vector. Las cuatro clonas mostraron una banda positiva de alrededor de 7 Kb (Fig. 9). Cuando se utiliza la misma digestión de las clonas pero el inserto del plásmido pRTC42 como sonda, las cuatro clonas dan dos bandas de hibridización que no concuerdan con las que hibridizan con el inserto de pRTC27 (Fig. 10), lo cual indica que las clonas contienen al menos los genes 18S y 28S rDNA (equivalente al 24S rDNA de *I. cruzi*).

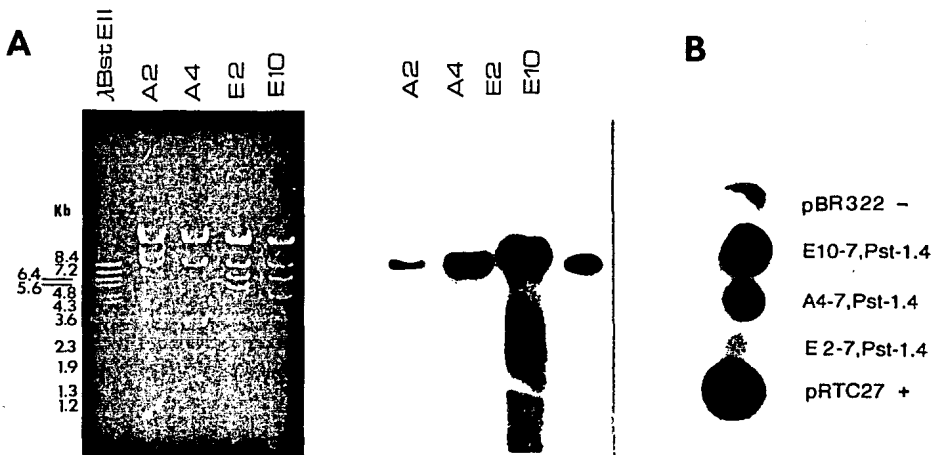


Figura 9. Hibridaciones de las clonas en EMBL4 contra pRTC27. A) Southern blot de 4 clonas positivas, todas mostraron señal positiva en un fragmento Eco RI de 7-8 Kb. B) Dot blots de los fragmentos de 1.4 Kb subclonados.

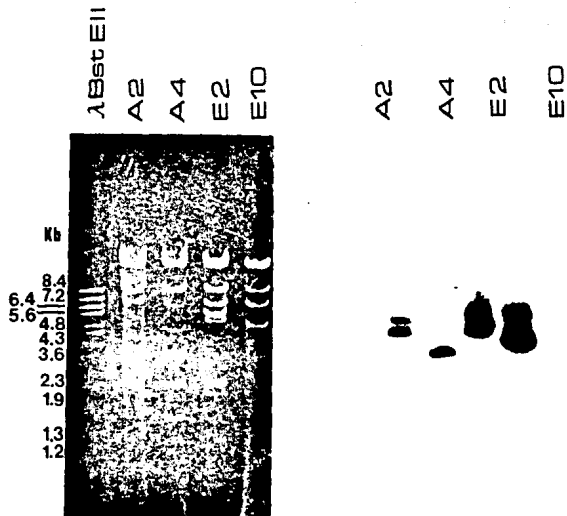


Figura 10. Southern blot de 4 clonas contra pRTC42. Se muestran las mismas clonas de la Figura 9 hibridizadas contra una sonda de 24S rRNA de *T. cruzi*.

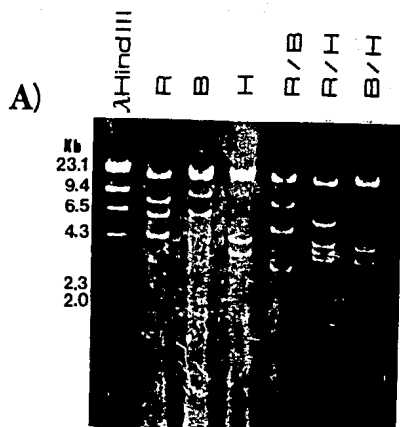
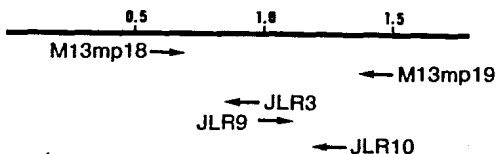


Figura 11. Mapa de restricción de la clona E10. A) Digestiones con 3 enzimas: Eco RI(R), Bam HI(B) y Hind III(H) junto con los datos obtenidos de secuenciación permitieron realizar el mapa en B) **—————** vector; **—————** inserto.

3. CARACTERIZACION DE LAS CLONAS POSITIVAS.

El DNA de las bandas de 7 Kb (denominadas A4-7 y E10-7) generadas por la digestión con Eco RI (Fig. 11), se digirió con diferentes enzimas de restricción para obtener fragmentos más pequeños susceptibles de ser subclonados en M13. Las dos bandas produjeron solo dos fragmentos con Pst I, uno de los cuales (de 1.4 kb) siguió siendo positivo al inserto de pRTC27 en pruebas de dot-blot (Fig. 9b). Ambos fragmentos, denominados A4-7,Pst-1.4 y E10-7,Pst-1.4, se subclonaron en M13mp18 y M13mp19 previamente digeridos con Eco RI y Pst I. Las dos clonas en M13 con ambas orientaciones, se secuenciaron utilizando oligonucleótidos que hibridizan con el vector y otros sintetizados ex profeso para hibridizar con regiones conservadas del RNA ribosomal 18S (Fig 12).

18S rRNA *Caenorhabditis elegans*



18S rRNA *T. crassiceps*

Figura 12. Estrategia de secuenciación utilizando diferentes oligonucleótidos sintéticos como iniciadores de las reacciones de secuencia. Abajo se muestra con una línea continua el fragmento obtenido para *T. crassiceps* y su correspondencia con *C. elegans*. Los oligonucleótidos internos fueron diseñados tomando como base las secuencias descritas previamente (Lane et al., 1987).

En las reacciones iniciales de secuenciación de los fragmentos A4-7, Pst-1.4 y E10-7, Pst-1.4, se encontró que ambas secuencias son idénticas por lo que se decidió terminar solamente la secuencia de E10-7, Pst-1.4. El análisis de la secuencia obtenida (Figura 13) indica que el fragmento E10-7, Pst-1.4 corresponde a las regiones V4, V5, V7 y V8 del gen 18S rRNA (Figura 6).

1	CTGCAGTGTG	TGTTCTGTGTG	GGTTGTGTGTG	TCGTGGCCAT	GAAGGAGCAC	TGTCGTGTCA
61	AGCCGGCAAG	CGACGGTGTG	ACCTTFAAGC	CATGTATGTG	GTGTAACAAC	CACAGGTGTG
121	GATGGGTGTT	GGGCGGTGCT	TCGCCAGCGT	TGTGGAGCCT	CTCGGCTCGT	CTGCATGCCT
181	TTGGATGCC	TTGAAAAGTG	TCGCCGGCAG	TGGCACGTTT	ACTTTGAACA	AAATTTGAGT
241	CTCAAGGCAG	GCCGTGTGTG	CCTGAAAAGT	TTTGCATGGA	ATAATGGAAT	AGGACTTCGG
301	TTCATTTTCG	TTTTGGTTTT	GGATCCGAAG	TAATGATCAA	AAGAGACAGG	CGGGGACGTT
361	TGTACGGCTG	CGCTAGAGGT	GAAATTCATG	GACCGTAGCC	AGACAAACTA	AAGCGAAACG
421	ATTCTGTAAG	CATGTTTTCA	TTGGCCATGA	GCGAAAAGTCA	GAGGCTCGAA	GACGATCAGA
481	TACCGTCCCTA	GTTCTGACCA	TAAACGATGC	CAACTTACGA	TCCGTGGTGG	TAGTAATGTT
541	ACCTTCCCCA	CGGGCAGTCC	CCGGGAAACC	TPTAAGTGTG	TGGGTTCGGG	GGAAAGTATGG
601	TTGCAAAGCT	GAAACTTAAA	GGAAATRRCGA	AGGCACCACC	AGGAGTGCCA	TGCCGGCTTAA
661	TTTGACTCAA	CACGGGAAAA	CTCACCCGGG	CCGGACACTA	TGAGGATTGA	CAGATTGAGA
721	GCTCTTTCTT	GATTTGGTGG	ATGGTGGTGC	ATGGCCGTTT	TTAGTTGGTG	GAGCGATTTG
781	TCTGGTTAAT	TCCGATAACG	AACGAGACTC	CAGCCTGCTA	ATTAGTCCGT	TTGTCCACTG
841	CACCTGGGTA	GGTGATGTTG	GATGACGCCA	TTTACCATAG	GCGCCTCGGT	CCTGCTTAC
901	CCAATTCCTGC	TGTCGTGCTA	CTGCTCTACC	TCTACCTCTG	CCACTGCCTC	TGCCATGTC
961	TATCCTTCCC	TGCTCCTACA	CCTGCTCCTG	CTCTGCCCTG	GTPTGGTTGCA	TGGTTGTTGG
1021	GAGTGGAGTG	GAGTGGAGTG	GAGTGGAGTG	CAGTGCAGTG	GAGGGTGGGG	GTTTGGGGGT
1081	GGGGTAATGC	GGGGTTAGCG	GCTGACGGGA	GGGGATGTAT	GGAGTGGGCT	TGACTGCTTG
1141	TTGTTGGTTA	GTCTAGCGTT	GGCTCCGGGT	GTGGCCGGAA	TGCTTACTTC	TTAGAGGGAC
1201	AAGCGGGAGA	AGCCGCACGA	AATAGAGCAA	TAACAGGTCT	GTGATGCCCT	TAGATTGTGG
1261	GGGCCGCACG	CGCGCTACAA	TGACGGTGTG	AGCCAGTCTG	ACCTTCTGGC	CCGAAAGGGT
1321	TGGGCNAACT	GGATACAATC	ACCGTCTGTA	CAGGGATCCG	GGCNTGGAAT	ATGTTCTTCT
1381	CCGTGAACGA	T				

Figura 13. Secuencia nucleotídica completa del inserto de la clona E10-7, Pst-1.4. Se muestran resaltadas las siguientes regiones: posiciones 1-200, región no homóloga con la secuencia de *C. elegans*; 825-1156, fragmento de 332 pb exclusivo de *I. crassiceps*, que podría corresponder a un intrón.

Tomando como base la secuencia del gen 18S de *C. elegans*, las posiciones 201 a 1391 de E10-7,Pst-1.4, corresponden a las posiciones 701 a 1439 del nemátodo (Figura 15). La diferencia en el tamaño de ambas regiones se debe a un fragmento de 332 pb que aparece en *T. crassiceps* y que no aparece en *C. elegans*. Este fragmento podría ser un intrón pues posee secuencias consenso para sitios de procesamiento de RNA (Figura 14). El extremo 5' de las 332 pb que podría corresponder al sitio donador, presenta la secuencia GT conservada en todos los intrones conocidos. El extremo 3' presenta la secuencia AG también presente en todos los intrones. Además, existe un sitio potencial de unión del donador en las posiciones 1127-1133. Esta secuencia, conocida como caja TACTAAC, corresponde al sitio donde el extremo 5' del intrón formaría la estructura intermediaria de Lariat. Por último, la secuencia de los primeros 200 nucleótidos de *T. crassiceps* no exhibe ninguna similitud con *C. elegans*.

SITIO DONADOR

consenso

5' A G G T A A G T 3'

I. crassiceps (823-40)

T A G T G C G T

SITIO ACEPTOR

consenso

5' Py Py Py Py Py Py N C A G N 3'

I. crassiceps (1143-57)

G T T A G T C T A G C

CAJA TACTAAC (SITIO DE UNION DEL DONADOR)

consenso

5' Py N Py Py Pu A Py 3'

I. crassiceps (1128-33)G C T T G A C

Figura 14. Secuencias potenciales para procesamiento de RNA en el fragmento adicional (332 pb) de *I. crassiceps*. Las bases resaltadas corresponden a posiciones homólogas a la secuencia consenso.

4. Comparaciones con otros céstodos: La secuencia del inserto de la clona E10-7, Pst-1.4 es homóloga con las secuencias disponibles de organismos cercanos como el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Dams, et al., 1988). De mayor interés es la comparación con las secuencias parciales de los céstodos *Acanthobothrium heterodonti* y *Spirometra erinacei* (Baverstock, et al., 1991). Las tres secuencias pueden ser fácilmente alineadas de acuerdo a la estructura secundaria que adopta el RNA ribosomal. Como modelo de estructura se tomó el propuesto por Dams y colaboradores (1988). Estas comparaciones dieron lugar a dos regiones independientes y alineables (Figuras 15 y 16), que se localizan en el dominio central y dominio 3' mayor del 18S rRNA (Figura 6).

e 601		AAAGCTCGTA	GTTGGATCTA	GGTTACGTGC	CGCAGTTCGC	
e 641	AATTTGCGTC	AACTGTGGTC	GTGACTTCTA	ATTTGCTGGT	TTGAGGTTGG	GTTTCGCCCTT
c 201	TCGCGGGCAG	TGGCACGTTT	ACTTTGAACA	AATTTGAGTG	CTCAAGGCAG	GCCGTGTGTTG
e 701	CAA.T.C...	---.G....	.C.....T.	...CA.....TA..A	..GC...C.T
c 261	CCTGAAAAGT	TTTGCATGGA	ATAATGGAAT	AGGACTTCGG	TTCTATTTCG	TTTGGTTTTC
e 758	---...T..C	.CAT.....A..CT...-	..-....C.A
c 321	GGATCCGAAG	TAATGATCAA	AAGAGACAGG	CGGGACGTTT	GTAcCGcCGT	GCGcCTAGAG
a 1						...-.....
e 813	.A.-.T..TTG.T..	G..G....AA	.C..GG.CA.	TC-GTaT.A.	TACG.g....
c 381	GTGAAATTCa	TGGACCGTAG	CCAGACAAAC	TAAAGCGAAA	GCATTCGTCA	AGCATGTTTTT
a 10			.n.....
s 1	.n.n.....C	.n-.n.nn..n.....n..
e 871GTG	...GCC.	A.C.....T.C..	..A....C..
c 441	CATTGGCCAT	GAGCGAAAGt	CAGAGGCTCG	AAGACGATCA	GATACCGTCC	TAGTTCTGAC
a 69	n.....
s 59	.n.....n.....n.....
e 931AAT..A	..A.....T..	...G....T.C..
c 501	CATAAACGAT	GCCAACTGAC	GATCCGTGGT	GGTAGTAATG	TTACC-TTCC	CCACGGGCAG
a 129	n.....TCnT	nn.n.nn...nn..
s 119C.....	n.CT.CGT.G	TnGTnGT..T	nnnA.Cn...	..n..nn.n.
e 991	.G.....T..CG.	...T.--..A	..GTT.TTGC	CCTG.CGAGG	AGCTAT----
c 560	TCCCCGGGAA	ACCTTTAAGT	GTTTGGGTT			
a 190	C....			
s 179n.....				
e1045	----.C....	..-GA....	C...c....			

Figura 15. Alineación de secuencias de RNA ribosomal 18S de la *I. crassiceps* con otros helmintos. Esta figura solo incluye la región entre los nucleótidos 201-826 (ver Figura 13). Abreviaciones: e, *C. elegans*; c, *I. crassiceps*; a, *A. heterodonti*; s, *S. erinacei*. En las figuras 15, 16 y 17, los puntos significan identidad y las líneas ausencia respecto a la secuencia de *I. crassiceps*.

```

c 1170 TGTGGCGCGA ATGCTTACTT CTTAGAGGGA CAAGCGGGAG A-AGCCGCAC GAAATAGAGC
e 1321 .C.TCG.GTT CGTA.A.... T.....TGT TT..... ..G..T....

c 1229 AATAACAGGT CTGTGATGCC CTTAGATGTG CGGGGcCGCA CGCGCGcTAC AATGACGGTG
a 1 .....n nnnnnn-.n. ......... ..A....
s 1 .....n. ......... ..A....
e 1381 G..... ..C .....T... ..t..... .C..Gt..A.

c 1289 TCAGCGAGTC AGACCTTCTG GCCCGAAAGG GTTGGGcNAA CTGGATACAA TCACCGTCGT
a 37 Gn.AT..... T.....C... ..n..... ..nNA... ..TC.ATn A.CnnnATnA
s 25 C.n-..... T.n..... ..n-.n.. .n.....n.n ..TC.ATC A.CnnCCTnA
e 1441 .....G..T Ttt...A-.. --..... TA.c..tA.. .CGTTG.A.T ..Tt.CAT..

c 1349 CCGGACAGGG ATCGGGGcnT GGAATATGTT CTTCTCCGTG AACGAT
a 97 .A..G----- ..n..n.nT. ....-.... .CC--AA... ..CnAGGAA TTCCTAGTAA
s 83 .A..G----- .....n. ....-n.. .CC.---... ..CGnnGnA TTCCTAGTAA
e 1498 ....G----- ..A...TAT. .T...TAT.G .CCT.AAAC. .GGA..GCCT aGTAAGTGTG

a 149 GTGCAAG
s 133 GTGCAAGT
e 1554 AGTCATCAGCTCACGTT

```

Figura 16. Alineación de secuencias de RNA ribosomal 18S de la *I. crassiceps* con otros helmintos. Esta figura solo incluye la región entre los nucleótidos 1170-1391 (ver Figura 13). Abreviaciones: e, *C. elegans*; c, *I. crassiceps*; a, *A. heterodonti*; s, *S. erinacei*.

VI. DISCUSION

En este trabajo se construyó un banco genómico a partir del DNA total de cisticercos de *T. crassiceps* en el vector EMBL4, derivado del fago Lambda (Frischauf, et al., 1983). El tamaño promedio de los fragmentos clonados es de 17.5 kb. Este tamaño de insertos facilita la localización de secuencias de interés, pues disminuye el número de placas que se necesita analizar, y permite además obtener en la misma clona las secuencias próximas a la de interés. Puesto que el tamaño promedio de las unidades de transcripción de genes ribosomales en eucariontes es de alrededor de 9 Kb (6.6 Kb en levadura y 13.0 Kb en humano [Darnell, et al., 1990]), el uso de un banco de fragmentos grandes permitía aspirar a conseguir clonas conteniendo la unidad completa.

En el presente trabajo de tesis se obtuvieron 4 clonas de características similares. Dos de ellas fueron caracterizadas en detalle y resultaron ser casi idénticas, por lo que se decidió terminar la caracterización de una sola. Esta clona de 11 kb denominada E10, debe contener una unidad de transcripción completa de *T. crassiceps*, puesto que hibridizó positivamente con las sondas para genes 18S y 28S que normalmente se localizan en los extremos de la unidad de transcripción, aunque falta definir si las regiones de control de transcripción están incluidas mediante secuenciación o hibridizaciones.

Estos resultados sugieren que la unidad transcripcional se encuentra reiterada, y probablemente en tandem, como en otros organismos (Darnell, et al., 1990). Al

respecto, se ha observado que las distintas copias de genes ribosomales se mantienen idénticas, es decir, que evolucionan en forma concertada. Cuando ocurre un cambio en la secuencia de una copia, se puede eliminar o dispersar al resto de los genes mediante un mecanismo de conversión genica (Li y Graur, 1991). Este fenómeno de recombinación no-homóloga, permite la homogeneización de los genes en la cadena, asegurando que todos las copias transcriban rRNA idénticos para mantener ribosomas funcionales. Este mismo fenómeno es consistente con la gran similitud entre las clonas independientes que se obtuvieron del banco de *T. crassiceps*.

Sin embargo, el hecho de que los patrones de restricción de las clonas no sean iguales, indica que existe cierta heterogeneidad entre las copias, probablemente en regiones no sujetas a una presión selectiva de funcionalidad. Un ejemplo de esto son los espaciadores transcritos y no-transcritos que, de hecho, se han utilizado para diferenciar entre organismos muy cercanos evolutivamente donde los genes en sí no muestran diferencias significativas (Barker *et al.*, 1988).

Existe también la posibilidad de que la heterogeneidad de las clonas obedezca a otras causas, y que no se presente en las regiones espaciadoras sino en los genes mismos. Por ejemplo, una expresión estadio-específica de los distintos genes de rRNA permitiría regular la expresión de proteínas específicas en ciertas etapas del desarrollo ontogénico. Este es el caso de protistas tales como *Plasmodium* que hasta ahora se mantiene como un ejemplo único (McCutchan, 1986).

Finalmente, una posibilidad no demostrada sería una expresión tejido-específica de los diferentes genes ribosomales. De manera similar a la expresión estadio-específica, esta forma podría regular la síntesis de proteínas en ciertos tejidos. Por ejemplo, algunos mRNAs podrían ser solo traducidos por ribosomas con determinada composición de RNA presentes en algunos tejidos.

La forma de establecer si alguna de estas posibilidades ocurre en *I. crassiceps* requerirá la secuenciación directa del rRNA purificado de distintos tejidos o de distintos estadios en el desarrollo del gusano. Cabe mencionar que actualmente se dispone de metodologías para secuenciar directamente el rRNA a partir de muestras de RNA total (Lane, *et al.*, 1985). Sin embargo, el hecho de que los céstodos son organismos sinciciales añade una dificultad adicional a la obtención de muestras de RNA de los distintos tejidos.

La secuencia del gen de rRNA 18S de *I. crassiceps* que se obtuvo a partir de un fragmento de 1.4 kb de la clona E10, corresponde a los dominios central y 3' mayor siguiendo la nomenclatura de Dams, *et al.* 1988. Es decir, que se logró secuenciar alrededor del 54% (969 pb) del gen estructural completo (1,800 pb como promedio en otros organismos eucariontes Dams *et al.*, 1988).

El fragmento secuenciado (1,391 pb) contiene además un segmento de 332 bases que no corresponde a ninguna secuencia de 18S rRNA y que interrumpe las regiones estructurales. Es posible que se trate de un intrón, ya que muestra secuencias que podrían corresponder a las secuencias consenso de inicio y final de los intrones del tipo II (Figura 14). Esta posibilidad es especialmente interesante puesto

que sólo se han reportado intrones en los genes de rRNA 18S de *Plasmodium lophurae* (Unnasch y Wirth, 1983), de un hongo de posición taxonómica incierta *Pneumocystis carinii* (Sogin, et al., 1989), un alga verde *Ankistrodesmus stipitatus* (Dávila-Aponte, et al., 1991), el basidiomiceto *Ustilago maydis*, y uno no nuclear en el genoma del cloroplasto de *Chlamydomonas moewusii* (De Wachter, et al., 1992). Algunas especies que presentan intrones en los genes 28S, carecen de las señales normales de procesamiento (Van Keulen, et al., 1985). Es probable que la heterogeneidad observada en los fragmentos de restricción de las clonas, sea debida a diferencias entre los intrones de distintas copias génicas.

Eliminando la región supuestamente intrónica, la secuencia de *I. crassiceps* se puede alinear sin interrupción con la del humano, la de *Xenopus laevis* y la de *C. elegans* (Dams, et al., 1988), (Figura 17). Lo anterior, es consistente con la hipótesis de un intrón que se remueve durante la maduración del rRNA 18S.

c	ACTCCAGCCT	GCTAATTACG	TTGGCT----	--CCGGGTGT	GGCGGAATG	CTTACTTCTT
sTG..A.	C....C..-	..ACGCGACC	C-...A.C.G	TCG...TCCC	.CA.....
lTC.A.C..-	..ACGCGACC	C--.C.C.G	TCG...T---	.CA.....
eT.....A..-GAATC	TT-----C.G	.TTCGT.T--	A.....

↑

Figura 17. Alineación de secuencias de 18S rRNA sin el intrón. La flecha indica la posición donde se eliminó el posible intrón para alinear la secuencia de E10-7,Pst-1.4 con las secuencias de otros organismos: c, *I. crassiceps*; e, *C. elegans*; s, *Homo sapiens*; l, *Xenopus laevis*.

Otra posibilidad es que el fragmento adicional de 332 bases en la clona E10-7,Pst-1.4 represente de un segmento de expansión, es decir, una secuencia adicional de 20 bases o más que no se encuentre en procariontes y que puede localizarse tanto en el rRNA 18s como en el 28S (Ware, *et al.*, 1983). Sin embargo, es demasiado grande para pensar que forme parte de la secuencia definitiva del rRNA 18S sin alterar la estructura del ribosoma.

Los fragmentos caracterizados tienen dos posibles aplicaciones. La primera consiste en el uso de estas secuencias para realizar análisis de inferencia filogenética. Las secuencias de los genes rRNA 18S ya han sido utilizadas con bastante éxito en el desarrollo de árboles filogenéticos. Los genes 16S han sido utilizados para establecer las relaciones evolutivas de procariontes que no son fácilmente definibles por otros criterios (Fox, *et al.*, 1980). Además, las secuencias 18S de protistas han sido utilizadas para establecer las relaciones entre los grandes grupos de protoctistas (Sogin, *et al.*, 1986; Sogin, 1989) y de animales (Field, *et al.*, 1988; Sogin, 1991). A partir de estos estudios de inferencia filogenética se ha propuesto, por ejemplo, la existencia de únicamente tres linajes celulares: Eubacterias, Arqueobacterias y Eucariontes (Woese, 1987).

Recientemente se utilizaron secuencias parciales de 18S rRNA (secuencias del dominio central y 3' mayor) para establecer relaciones filogenéticas entre algunas clases del phylum Platyhelminthes (Baverstock, *et al.*, 1991). Sin embargo, la información acerca de las relaciones evolutivas de la familia Taenidae es muy escasa. En este sentido, la comparación de secuencias de rRNA 18S puede ser un indicador

útil para establecer no solo sus relaciones filogenéticas sino también la historia de sus asociaciones con los respectivos huéspedes.

Con la caracterización de la secuencia del 18S rRNA de *T. crassiceps* se abre el camino para obtener las secuencias homólogas de otros organismos cercanos para los estudios de inferencia filogenética. En caso de que este grupo presente un intrón en el gen 18S puede significar la disponibilidad de una herramienta de análisis mucho más sensible, puesto que se trataría de una característica sinapomórfica del grupo. Al respecto, actualmente se realizan esfuerzos para determinar si *T. solium* y *T. saginata* también poseen el fragmento adicional. La identificación de las especies comparten esta secuencia nos permitirá agruparlas naturalmente, a la vez que nos podrían aclarar su origen.

La segunda posibilidad que depende de la identificación de secuencias especie-específicas dentro de los genes ribosomales, permitiría su uso como sondas diagnósticas. Por ejemplo, la *T. solium* y la *T. saginata* tienen como huésped definitivo exclusivamente al ser humano. Sin embargo, únicamente la forma larvaria (cisticerco) de la *T. solium* infecta también al hombre ocasionando la cisticercosis, que tiene especial importancia en nuestro país. Puesto que la morfología de los huevecillos no permite la identificación de especie (Laclette et al., 1982; Willms, 1992), la disponibilidad de una sonda específica abre la posibilidad de desarrollar un procedimiento diagnóstico de teniasis en heces.

Los genes ribosomales son ideales para utilizarse con fines diagnósticos puesto que se trata de secuencias con cientos de copias en el genoma de los eucariontes que

ya se han empleado en la detección de *Plasmodium* (Waters y McCutchan, 1990). Es decir que el disponer de una muestra de una sola célula de un huevecillo significaría la disponibilidad de cientos de copias de los genes ribosomales, susceptibles de ser detectadas por hibridización con una sonda. Este factor de amplificación natural constituye una gran ventaja para aumentar la sensibilidad del método diagnóstico.

VII. REFERENCIAS.

- Adam, R. D. (1991). The Biology of *Giardia* spp. Microbiol. Rev. 55: 706-732.
- Aluja, A. S. (1982). Frequency of Porcine Cysticercosis in Mexico. In: Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives. Academic Press, N.Y. 53-62.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith y K. Struhl (1989). Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, N. Y. 42-43.
- Barker, R. F., N. P. Harberd, M. G. Jarvis y R. B. Flavell (1988). Structure and Evolution of the Intergenic Region in a Ribosomal DNA Repeat Unit of Wheat. J. Mol. Biol. 201: 1-17.
- Baverstock, P. R., R. Fielke, A. M. Johnson, R. A. Bray y I. Beveridge (1991). Conflicting Phylogenetic Hypotheses for the Parasitic Platyhelminths Tested by Partial Sequencing of 18S Ribosomal RNA. Intl. J. Parasitol. 21(3): 329-339.
- Benton, W.D., y R.W. Davis (1977). Screening gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. Science 196: 180.
- Bolívar, F., R. L. Rodríguez, P. J. Greene, M. C. Betlach, H. L. Heynøker y W. Boyer (1977). Construction and Characterization of New Cloning Vehicles: II. A Multipurpose Cloning System. Gene 2: 95-113.
- Campbell, N. A. (1990). Biology. Benjamin-Cummings. N. Y. 908p.
- Campos, A., P. Bernard, A. Fauconnier, A. Landa, E. Gómez, R. Hernandez, K. Willms y J. P. Lacleste (1990). Cloning and sequencing of two actin genes from *Taenia solium* (Cestoda). Mol. Biochem. Parasitol. 4Q: 87-94.
- Cañedo, L., J. P. Lacleste y E. Morales (1982). Evagination of the Metacystode of *Taenia solium*. In: Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives. Academic Press, N. Y. 363-373.
- Cheng, T. C. (1973). General Parasitology. Academic Press, N.Y.
- Clarke, L., y J. Carbon (1976). A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. Cell 9: 91
- Dams, E., L. Hendriks, Y. Van de Peer, J. M. Neefs, G. Smits, I. Vandenberg, y R. De Wachter (1988). Compilation of small Ribosomal Subunit RNA Sequences. Nuc. Acid Res. 16: r87-r173.

- Darnell, J., H. Lodish y D. Baltimore (1990). *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman Co. N. Y., 1105pp.
- Dávila-Aponte, J. A., V. A. R. Huss, M. L. Sogin y T. R. Cech (1991). A Self-splicing group I Intron in the Nuclear Pre-rRNA of the Green Alga, *Ankistrodesmus stipitatus*. *Nucleic Acid. Res.* 19(6): 4429-4436.
- De Wachter, R., J. Neefs, A. Goris y Y. Van de Peer (1992). The Gene Coding for Small Ribosomal Subunit RNA in the Basidiomycete *Ustilago maydis* Contains a Group I Intron. *Nucleic Acid. Res.* 20(6): 1251-1257.
- FAO/UNDP/WHO (1984). *Guidelines on Surveillance, Prevention and Control of taeniasis/Cysticercosis*. Document VPH/84.49, World Health Org., Geneva, Switzerland.
- Flisser, A., K. Willms, J. P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura, F. Beltrán (1982). *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Academic Press, N. Y. 53-62.
- Flisser, A. (1988). Neurocysticercosis in Mexico. *Parasitology Today* 4(5): 131-137.
- Field, K. G., G. J. Olsen, D. J. Lane, S. J. Giovannoni, M. T. Ghiselin, E. C. Raff, N. R. Pace y R. A. Raff (1988). Molecular Phylogeny of the Animal Kingdom. *Science* 239: 748-753.
- Fox, G. E., E. Stackebrandt, R. B. Hespell, J. Gibson, J. Maniloff, T. A. Dyer, R. S. Wolfe, W. E. Balch, R. S. Tanner, L. J. Magrum, L. B. Zablen, R. Blakemore, R. Gupta, L. Bonen, B. J. Lewis, D. A. Stahl, K. R. Luhrsén, K. N. Chen, C. R. Woese (1980). The Phylogeny of Prokaryotes. *Science* 209:457-463.
- Freeman, R. S. (1962). Studies on the Biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi (Cestoda). *Can. J. Zool.* 40: 969-990.
- Frischauf, A., H. Lehrach, A. Poustka y N. Murray (1983). Lambda Replacement Vectors Carrying Polylinker Sequences. *J. Mol. Biol.* 170: 827-842.
- Gemmell, M. A. y R. J. Lawson (1982). Ovin Cysticercosis: An Epidemiological Model for the Cysticercoses I. The Free-Living Egg phase. In: *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Academic Press, N. Y. 87-98.
- Gilbert, S. F. (1988). *Developmental Biology*. Sinauer Assoc. Sunderland, MA. 2a. Ed.
- Good, A. H., A. E. Siebert, P. Robbins y S. Zaun (1982). Modulation of the Host Immune Response by Larvae of *Taenia crassiceps*. In: *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Academic Press, N. Y. 593-610.

Hernández, R., F. Díaz de León, y M. Castañeda (1988). Molecular Cloning and Partial Characterization of Ribosomal RNA Genes from *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 27: 275-280.

Hird, D. W. y M. M. Pullen (1979). Tapeworms, Meat and Man: A Brief Review and Update of Cysticercosis Caused by *Taenia saginata* and *Taenia solium*. J. Food Protection 42: 58.

Hui, A. y H. A. Boer (1987). Specialized Ribosome System: Preferential Translation of a Single mRNA Species by a Subpopulation of Mutated Ribosomes in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 4762-4766.

Jacob, W. F., M. Santer y A. E. Dahlberg (1987). A Single Base Change in the Shine-Dalgarno Region of 16S rRNA of *Escherichia coli* Affects Translation of Many Proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 4757-4761.

Kozak, M. (1986). Point Mutations Define a Sequence Flanking the AUG Initiator Codon That Modulates Translation by Eukaryotic Ribosomes. Cell 44: 283-292.

Laclette, J. P., Y. Ornelas, M. T. Merchant y K. Willms (1982). Ultrastructure of the Surrounding Envelopes of *Taenia solium* Eggs. In: Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives. Academic Press, N. Y. 375-387.

Laclette, J. P., A. Landa, L. Arcos, K. Willms, A. E. Davis y C. B. Shoemaker (1991). Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (Trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium*. Mol. Biochem. Parasitol. 44: 287-296.

Lane, D. J., B. Pace, G. J. Olsen, D. A. Stahl, M. L. Sogin, y N. R. Pace (1985). Rapid Determination of 16S Ribosomal RNA Sequences For Phylogenetic Analyses. Proc. Natl. Acad. sci. 82: 6955-6959.

Laralde, C., E. Sciuto, L. Huerta, I. Terrazas, G. Fragoso, L. Trueba, D. Lemus, C. Lomeli, G. Tapia, R. M. Morntoya, M. L. Díaz y T. Govezensky (1989). Experimental Cysticercosis by *I. crassiceps* in Mice: Factors Involved in Susceptibility. Acta Leidensia 57(2):131-134.

Lewin, B. (1990). Genes IV. Oxford University Press. Oxford.

Li, W. H., y D. Graur (1991). Fundamentals of Molecular Evolution. Sinauer Assoc. Sunderland, MA. Chapter 6.

- Lumsden, R. D., M. Voge y F. Sogandares-Bernal (1982). The Metacestode Tegument: Fine Structure, Development, Topochemistry, and Interactions with the Host. In: Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives. Academic Press, N. Y. 307-361.
- Madeley, J. (1984). Cisticercosis: Una Enfermedad Espantosa. Salud Mundial, OMS. Marzo: 10-12.
- Margulis, L., y K. V. Schwartz (1976). Five Kingdoms. W. H. Freeman, San Francisco. 388 pp.
- McCutchan, T. F. (1986). The Ribosomal Genes of *Plasmodium*. Int. Rev. Cytol. **99**: 295-309.
- Messing, J. (1983). New M13 Vectors for Cloning. Methods Enzymol. **101**: 20-78
- Ramirez-Bon, E., M. T. Merchant, M. González del Pliego y Luis Cañedo (1982). Ultrastructure of the Bladder Wall of the Metacestode of *Taenia solium*. In: Cysticercosis; Present State of Knowledge and Perspectives. Academic Press, N. Y. 261-280.
- Rothman, A. (1963). Electron microscopy Studies of Tapeworms: The Surface Structures of *Hymenolepis diminuta* (Rudolphi, 1819) Blanchard, 1891. Trans. Am. Microsc. Soc. **82**: 22.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2a. edición. Cold Spring Harbor.
- Sciutto, E., G. Fragoso, M. L. Diaz, F. Valdéz, R. M. Montoya, T. Govezensky, C. Lomeli y C. Larraide (1991). Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 Complex and Sex Influence on Susceptibility. Parasitol. Res. **77**: 243-246.
- Shine, J. y L. Dalgarno (1974). The 3'-Terminal Sequence of *Escherichia coli* 16S Ribosomal RNA: Complementarity to Nonsense Triplets and Ribosome Binding Sites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **71**: 1342-1346.
- Sogin, M. L., H. J. Elwood y J. H. Gunderson (1986). Evolutionary Diversity of the Eukaryotic Small Subunit rRNA genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **83**:1383-1387.
- Sogin, M. L. (1989). Evolution of Eukaryotic Microorganisms and Their Small Subunit Ribosomal RNAs. Amer. Zool. **29**:487-499.
- Sogin, M. L. y J. C. Edman (1989). A Self-splicing Intron in the Small Subunit rRNA gene of *Pneumocystis carinii*. Nucleic Acid. Res. **17**(13): 5349-5359.

Sogin, M. L., J. H. Gunderson, H. J. Elwood, R. A. Alonso y D. A. Peattie (1989). Phylogenetic Meaning of the Kingdom Concept: An Unusual Ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science* **243**:75-77.

Sogin, M. L. (1991). Early Evolution and the Origin of Eukaryotes. *Curr. Opp. Gen. Dev.* **1**(4): 457-463

Southern, E. M. (1975). Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.

Talamás, P. R. (1986). Ribosomas y Síntesis de Proteínas. En: *Biología Celular, Aspectos Fundamentales*. R. López Revilla y otros Coordinadores. Soc. Mex. Cie. Fisiol. Ed. Alhambra. México 1986.

Trejo, G. V. (1986). Caracterización del Embrióforo del huevecillo de *Taenia solium*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 59pp.

Unnasch, T. R. y D. Wirth (1983). The Cloned rRNA Genes of *P. lophurae*: A Novel rDNA Structure. *Nucleic Acid Res.* **11**: 8460-8472.

Vallejo, V. (1990). Secuencias repetidas en el ADN de *Taenia solium* y *Taenia saginata*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. Junio 1990.

Van Keulen, H., P. T. Loverde, L. A. Bobek y D. M. Rekosh (1985). Organization of the Ribosomal RNA Genes in *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **15**: 215-230.

Ware, V. C., B. W. Tague, C. G. Clark, R. L. Gourse, R. C. Brande y S. A. Gerbi (1983). Sequence Analysis of 28S Ribosomal-DNA from the Amphibian *Xenopus laevis*. *Nucleic Acid. Res.* **11**: 7795-7817.

Waters, A. P. y T. F. McCutchan (1990). Ribosomal RNA: Nature's Own Polimerase-amplified Target for Diagnosis. *Parasitology Today* **6**(2): 56-59.

Williams, J. F., P. G. Engelkirk y M. C. Lindsay (1982). Mechanisms of Immunity in Rodent Cysticercosis. In: *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Academic Press, N. Y. 621-630.

Willms, K (1992). Cestodes (Tapeworms). En: *Infectious Diseases*. W. B. Sanders, Phil. 2021-2037.

Woese, C. R. (1987). Bacterial Evolution. *Microbiol. Rev.* **51** (2): 221-271.