

N° 141
2/EJ



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"ELABORACION DE UN BANCO GENOMICO DE
TRYPANOSOMA CRUZI Y AISLAMIENTO DE
SECUENCIAS REPETIDAS"



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A

MIREYA ROMERO HERNANDEZ

México, D.F

1992

FALLA DE ORIGEN



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

ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCION.....	3
1. Epidemiología de la enfermedad de Chagas.....	3
2. La infección y ciclo biológico de <u>T. cruzi</u>	3
3. La enfermedad.....	5
4. Definición de banco genómico.....	6
5. Organización genómica de eucariontes.....	8
6. Organización genómica de <u>T. cruzi</u>	9
7. Justificación del trabajo.....	12
8. Hipótesis de trabajo.....	12
OBJETIVOS.....	14
MATERIALES Y METODOS.....	15
1. Cultivo y extracción de ácidos nucleicos de <u>T. cruzi</u>	15
1.1. Cultivos celulares.....	15
1.2. Extracción de DNA genómico.....	15
2. Digestiones con endonucleasas de restricción.....	16
2.1. Digestiones parciales con <u>Sau</u> 3A.....	16
2.2. Digestiones totales con endonucleasas de restricción.....	17
3. Construcción, marcaje e identificación de moléculas.....	

recombinantes.....	17
3.1. Aislamiento de DNA para la construcción del banco genómico.....	17
3.2. Determinación de la concentración del DNA.....	18
3.2.1. Electroforesis.....	18
3.2.2. "DOT".....	19
3.2.3. Espectroscópicamente.....	19
3.3. Marcaje de ADN.....	19
3.4. Ligaciones.....	20
3.5. Preparación y transformación de células competentes de la cepa MC 1061 de <u>E. coli</u>	21
3.5.1. Protocolo modificado para la preparación de células competentes.....	22
3.6. Hibridación <u>in situ</u>	23
3.7. Purificación de plásmido a pequeña escala.....	23
3.8. Purificación del plásmido por gradiente de cloruro de cesio y bromuro de etidio.....	25
4. Caracterizaciones génicas.....	26
4.1. Estimación gruesa del número de copias.....	26
4.2. Experimentos tipo "Southern".....	27
4.2.1. Hibridaciones cruzadas.....	27
4.2.2. Experimentos tipo "Southern genómico".....	28
4.3. Mapeo de sitios de restricción.....	29
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	31
RESULTADOS.....	32
1. Construcción del banco genómico.....	32

2. Caracterización del banco genómico.....	35
3. Amplificación y conservación del banco genómico ...	39
4. Aislamiento de secuencias repetidas.....	40
5. Hibridaciones cruzadas.....	45
6. Experimentos tipo "Southern genómico".....	47
7. Mapeo de sitios de restricción.....	51
DISCUSION.....	52
1. Representatividad del genoma de <u>T. cruzi</u> en el banco genómico construido.....	52
2. Secuencias repetidas aisladas.....	53
CONCLUSIONES.....	57
GLOSARIO.....	58
APENDICE.....	63
BIBLIOGRAFIA.....	64

ABREVIATURAS

BND-celulosa	Benzoilato naftoilato DEAE-celulosa
cpm	cuentas por minuto
Ci	Curie
dATP	trifosfato de desoxiadenosina
DNA.	ácido deoxirribonucleico
DNasa	deoxirribonucleasa
DNA pol.I.	DNA polimerasa I
dNTP	5'trifostato de 2'desoxinucleosidos
DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
E	sitio de restricción para la endonucleasa Eco RI
EDTA	Ac. etilendiamino tetracético
g	unidad de fuerza de gravedad
H	sitio de restricción para la endonucleasa Hind III
kb	kilobase
NC	nitrocelulosa
NP 40	nonidet p40
OPS-OMS	Organización Panamericana de Salud—Organización Mundial de Salud
P	sitio de restricción para la endonucleasa Pst I

pb	pares de bases
PVP	polivinil pirrolidona
RNA.	ácido ribonucleico
RNasa	ribonucleasa
RNA pol. III.	RNA polimerasa III
RNAr.	ácido ribonucleico ribosomal.
RNAt.	ácido ribonucleico de transferencia.
rpm	revoluciones por minuto
SAR	secuencias altamente repetidas
SDS	dodecil sulfonato de sodio
SMR	secuencias moderadamente repetidas
SU	secuencias únicas

INTRODUCCION

1. Epidemiología de la enfermedad de Chagas.

Las enfermedades parasitarias son de gran trascendencia mundial en términos de prevalencia y gravedad.

La enfermedad de Chagas es una parasitosis ocasionada por el parásito heteroxénico Trypanosoma cruzi y está ampliamente distribuida en América. Los cálculos realizados por la OPS-OMS indican que en toda latinoamérica existían en 1981 por los menos 24 millones de casos, de tripanosomiasis y otros 65 millones de individuos en riesgo de infección. En México se ha encontrado a T. cruzi en reservorios, vectores y humanos de todos los estados de la república (2).

Los insectos vectores y los mamíferos reservorios están confinados al continente americano, entre las latitudes 42 norte (sur de Estados Unidos) y 43 sur (sur de Argentina) a menos de 2,400m sobre el nivel del mar en México (2).

2. La infección y ciclo biológico de T. cruzi.

Los insectos -conocidos como vectores para la transmisión de la enfermedad de Chagas- pertenecen al menos a 120 especies de 9 géneros de triatomídeos, los más importantes son: Triatoma infestans, Rhodnius prolixus y Panstrongilus megistus. Todos los

estadios de los insectos, incluyendo el de ninfa y adulto, pueden ser infectivos.

La infección sucede cuando la chinche infectada defeca durante la ingestión de sangre. Las heces contaminan las mucosas intactas o la herida hecha por la picadura, teniendo de este modo la forma infectiva -el tripomastigote metacíclico- acceso al tejido subcutáneo o al torrente sanguíneo. La transmisión de la infección puede ocurrir también a través de transfusiones sanguíneas con sangre parasitada o de manera congénita por vía transplacentaria (1).

Una vez que la forma infectiva entra en la célula, pierde el flagelo y la membrana ondulante, adoptando la forma de amastigote. Esta forma se multiplica intracelularmente por fisión binaria y toma la forma de tripomastigote al romperse la célula parasitada. El tripomastigote puede infectar nuevamente células vecinas o bien pasar al torrente sanguíneo. El tripomastigote puede entonces aparecer en sangre periférica y ser ingerido por la chinche. Se multiplica en el tracto digestivo de ésta y pasa de tripomastigote a epimastigote o esferomastigote y finalmente convertirse en tripomastigote metacíclico cerrando de esta forma su ciclo vital.

El tripomastigote metacíclico de T. cruzi aparece en el recto del insecto vector.

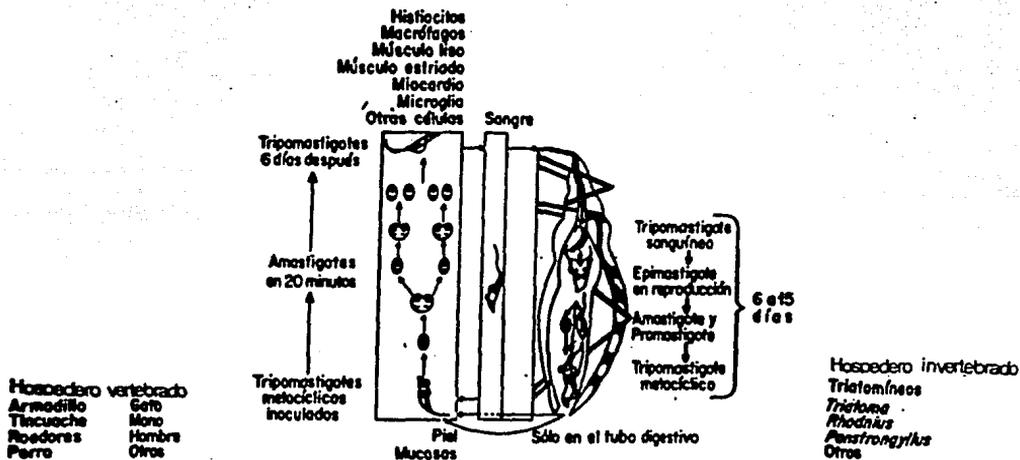


fig. 1 Ciclo biológico de Trypanosoma cruzi.

3. La enfermedad.

Los tripomastigotes metacíclicos invaden células reticuloendoteliales locales, se multiplican y pueden producir lesiones como edema bupalpebral -signo de Romaña- si el sitio de

la infección es el ojo o un chagoma cutáneo si la infección es en la epidermis.

La fase aguda de la infección puede variar en gravedad desde asintomática hasta presentar síntomas fatales, incluyendo fiebre, linfadenopatías y arritmias.

La fase subsecuente de la infección es la fase indeterminada asintomática la cual puede permanecer durante años o toda la vida. Y por último, la fase crónica presenta miocarditis, anormalidades electrocardiográficas, cardiomegalia, aperistalsis, megaesófago y megacólon.

La fase crónica es más severa que la aguda en términos de morbilidad y mortalidad. En las áreas endémicas, la enfermedad de Chagas produce alrededor del 70% de muertes por paros cardiacos en los adultos jóvenes; además el megaesófago avanzado es mortal cuando el paciente es incapaz de deglutir.

4. Definición de banco genómico.

Se entiende por banco genómico al conjunto de híbridos construidos in vitro (unión covalente de un vector de clonación y un fragmento de DNA de algún organismo en particular mediante una reacción enzimática de ligación).

Un banco genómico ideal deberá contener secuencias de DNA representativas del

genoma entero en un número manejable de híbridos estables que se sobrelapen. Los fragmentos clonados deberán ser lo suficiente grandes para contener genes completos y las secuencias que los flanquean.

Tomando en cuenta lo azaroso de la representación de una secuencia en un banco genómico y considerando que cada fragmento de DNA insertado es idéntico en tamaño y que el tamaño del genoma es conocido, Clarke y Carbon (11) han elaborado una ecuación mediante la cual se puede determinar el tamaño del banco genómico que tendrá una probabilidad arbitraria de incluir una secuencia en particular. En la práctica, aunque ninguna de estas condiciones son estrictamente verdaderas es posible tener una aproximación satisfactoria para la mayoría de los propósitos.

Pero en la construcción de un banco genómico no sólo es indispensable poner atención en la cantidad de híbridos que lo constituyen, sino también deberá considerarse el aspecto cualitativo de los mismos. Como se mencionó anteriormente, es importante seleccionar un tamaño adecuado de inserto con objeto de:

- Construir híbridos estables
- Tener un número manejable de híbridos
- Contener genes completos con las secuencias que los flanquean

- Tener un mapa de restricción accesible de los fragmentos clonados

Y por otro lado, se deberán seleccionar las condiciones de la reacción de ligación adecuadas a fin de generar híbridos monoméricos primordialmente.

Hasta el momento se reconocen siete parámetros que afectan la velocidad de reacción de ligación, pero sólo dos de ellos afectan simultáneamente de manera cualitativa a los productos. Estos dos parámetros son: concentración de los DNA a ligar y tamaño de los fragmentos.

Su importancia radica en que de ellos depende favorecer las reacciones intramoleculares o intermoleculares. Un tratamiento matemático elaborado por Dugaiczyk (3) analiza la reacción de ligación en función de estos parámetros.

5. Organización genómica de eucariontes.

Por otra parte, para introducir de manera general sobre la organización genómica de eucariontes, es pertinente decir que, el DNA genómico de eucariontes está constituido por tres diferentes clases de secuencias: secuencias únicas, moderadamente repetidas y altamente repetidas. Esta clasificación está basada, por supuesto, en la reiteración de las secuencias y a otras

características que a continuación se señalan.

	SECUENCIAS UNICAS	SECUENCIAS MODERADAMENTE REPETIDAS	SECUENCIAS ALTAMENTE REPETIDAS
Reiteración	aprox. una copia/genoma haploide	aprox. de 10^3 a 10^5 copias/genoma haploide	aprox. 10^6 copias/genoma haploide
Organización	algunas interrumpidas por intrones	dos categorías: -corto periodo de interdispersión -largo periodo de interdispersión	secuencias cortas (aprox. 6pb) organizadas en tandem
Transcritos	presentes	presentes	ausentes
Función	generalmente codifican para proteínas	genes: RNAr, RNAt, RNAr 5S otros sin función aparente	telómeros y centrómeros cromosomales

6. Organización genómica de T. cruzi.

Los estudios realizados sobre la organización genómica de T. cruzi, así como la de otros flagelados pertenecientes al orden Kinetoplastidia han sido aplazados por el estudio del peculiar contenido de DNA en la mitocondria llamada cinetoplasto. No es sino hasta 1980 que se sabe que el genoma de T. cruzi como el de los eucariontes hasta el momento estudiados, está constituido por tres diferentes clases de secuencias (4).

En 1981 Lanar (5) y Castro (6) comprobaron mediante cinéticas de renaturalización que en efecto, el genoma de este organismo está constituido por tres diferentes clases de secuencias y

determinaron la proporción de cada una de ellas.

S.U.	9%	9%
S.M.R.	51%	35%
S.A.R.	23%	49%
	Lanar(5)	Castro (6)

Estos resultados aunque no dejan de ser útiles, debe de tenerse en cuenta que la información que ofrecen respecto a la organización genómica es limitada, pues la interpretación de cinéticas de renaturalización del DNA genómico total tiene varias complicaciones: La primera de ellas es que, debido a que las secuencias repetidas, son familias de secuencias semejantes más que familias de secuencias idénticas, la velocidad de renaturalización es abatida; la segunda es la incapacidad de distinguir entre las secuencias agrupadas de las dispersas mediante estos ensayos; y la tercera es debida a la dependencia de la velocidad de renaturalización de la longitud de las secuencias complementarias. Así, la cinética de renaturalización revela solamente la longitud total de todas las secuencias repetidas como una fracción de DNA y el promedio de grado de reiteración, no implicando esto la longitud de una secuencia repetida en particular o su distribución en el genoma.

Pero, con el advenimiento de las técnicas de clonación se ha permitido efectuar análisis de organización genómica a otro nivel de precisión. (8). Actualmente se cuenta con un cúmulo de

información minuciosa concerniente a la organización genómica de eucariontes, a raíz de la cual, ha surgido especial interés sobre las secuencias repetidas pues presentan características muy singulares, que a continuación se enumeran:

CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS SECUENCIAS MODERADAMENTE REPETIDAS

	CORTO PERIODO DE INTERDISPERSION	LARGO PERIODO DE INTERDISPERSION
Tamaño	70 - 300pb	6.000 - 7.000pb
Reiteración	aprox. 10^5 copias/genoma haploide	aprox. 10^4 copias/genoma haploide
Longitud de secuencia única que los separa	aprox. de 1.000 a 2.000 pb	aprox. 35kb
Otras características	<p>móviles (retroposición) generan duplicaciones en el sitio de inserción</p> <p>presentan promotor para RNA pol. III interno</p> <p>presentan extremo 3' rico en adenina</p>	<p>móviles (retroposición) generan duplicaciones en el sitio de inserción</p> <p>presentan uno o más marcos de lectura abiertos</p> <p>presentan extremo 3' rico en adenina</p>

El significado de la existencia de las secuencias repetidas y su amplia distribución en el reino eucarionte aún es desconocido, pero un prerrequisito para entenderlo es hacer una descripción precisa de su estructura y organización en el genoma.

Las secuencias moderadamente repetidas en el genoma de T. cruzi presentan tamaños de alrededor de 7,800 pb cuya reiteración es del orden de 10^3 (6), que de acuerdo con lo descrito anteriormente son características del patrón de largo periodo de interdispersión. Este patrón parece presentar una singular organización interna descrita en T. cruzi (25) y otros organismos (26-38).

7. Justificación del trabajo.

Nuestro grupo de trabajo está interesado en hacer estudios sobre la estructura, organización y dinámica genómica de T. cruzi. Esto además de ser importante resulta atrayente, pues T. cruzi pertenece al phylum Protozoos, donde están contenidos los más variados y versátiles entes vivientes del reino eucarionte.

Así consideramos pertinente la construcción de un banco genómico de T. cruzi, con la intención de contar en el laboratorio con una fuente más accesible de DNA del sistema biológico en estudio que conlleva a un ahorro en tiempo y reactivos. Y aislar de éste secuencias repetidas, con objeto de entender un poco más acerca de la organización genómica de T. cruzi.

8. Hipótesis de trabajo.

Sabiendo que se pueden clonar hasta 10^7 híbridos y considerando que se requieren clonar 10^5 híbridos independientes cada uno de ellos conteniendo alrededor de 5.4kb para tener una probabilidad del 99% de la representación del genoma de T. cruzi se intentará unir covalentemente fragmentos del genoma de T. cruzi con estos tamaños a un vehículo de clonación y estos híbridos clonarlos para tener un banco genómico de T. cruzi lo más representativo posible.

Por otro lado, la búsqueda de las secuencias repetidas dentro del banco genómico construido se basa en la mayor cantidad relativa de estas secuencias en la sonda empleada (DNA total de T. cruzi marcado radiactivamente) y en la semicuantitatividad de la técnica de hibridación, esperando tener una señal de hibridación más intensa en aquellas clonas que contengan híbridos con fragmentos de secuencias repetidas en el DNA de T. cruzi lo que nos permitirá identificarlas.

OBJETIVOS

1. Construcción de un banco genómico de Trypanosoma cruzi como reactivo biológico indispensable en la infraestructura de laboratorio de Biología Molecular.
2. Aislamiento de secuencias repetidas en el genoma de T cruzi.

MATERIALES Y METODOS

1. Cultivo y extracción de ácidos nucleicos de T. cruzi.

1.1 Cultivos celulares

La cepa de T. cruzi utilizada fue aislada en La Cruz, Jalisco por el grupo del Dr. Jorge Tay, Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, U.N.A.M. Los cultivos se realizaron en medio de infusión de hígado y triptosa, adicionado con suero bovino fetal al 10%, y se mantuvieron en agitación a 28 °C (12).

1.2 Extracción de DNA genómico de T. cruzi.

Los cultivos celulares fueron cosechados en la fase media del crecimiento logarítmico, por centrifugación a 10,000g durante 10 minutos a 4 °C (temperatura mantenida a lo largo de toda la purificación). Posteriormente las células fueron lavadas dos veces en Tris-HCl 20mM (pH 7.8), KCl 100 mM, CaCl₂ 2mM y MgCl₂ 5mM (solución N) y guardados como precipitado a -70 °C. Este material fue descongelado a 4 °C, para resuspenderlo en solución N a una densidad de 10⁹ células por ml. Las células fueron lisadas con NP40 al 1% y se incubó a 37 °C por 15 minutos. La incubación se continuó por 2hrs. más con pronasa de Sigma Chem (preincubada 1h a 37 °C) a una concentración de 1mg/ml. Después

de adicionar perclorato de sodio a una concentración final de 1M, los ácidos nucleicos se purificaron mediante extracción con una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se dializaron contra 1.000 volúmenes y 3 cambios de SSC 0.1X (NaCl 150mM, citrato de sodio 15mM). La purificación continuó mediante un tratamiento con ribonucleasa I (precalentada 10 minutos a 80 ° C) 100 µg/ml durante 30 minutos a 37 ° C. Finalmente se extrajo con cloroformo-alcohol isoamílico y se dializó exhaustivamente contra SSC 0.1X. A la preparación de DNA así obtenida, se le midió su densidad óptica (DO) a longitudes de onda de 230, 260 y 280nm y fue conservada a 4 °C.

2. Digestiones con endonucleasas de restricción.

2.1 Digestiones parciales con Sau 3AI.

A fin de obtener una preparación de DNA de T. cruzi enriquecida en fragmentos de tamaños entre 4.3 y 6.6kb se realizaron digestiones parciales con la endonucleasa Sau 3AI (BRL) en donde la relación Unidades enzimáticas/µg de DNA fue de 1.66 en un volumen final de 20ul en presencia de (NaCl 50mM, Tris-HCl (pH 7.5) 10mM, MgCl₂ 10mM y DTT 1mM) incubados 5 y 10 minutos a 37 ° C. La reacción de digestión fue detenida mediante extracción con una mezcla de fenol-cloroformo (1:1).

2.2 Digestiones totales con endonucleasas de restricción (Bam HI, Eco RI, Hind III y Pst I).

Las digestiones de DNA se realizaron empleando concentraciones de enzimas en un exceso de 5 a 10 veces, considerando las condiciones recomendadas por la casa comercial (BRL)(13). Las reacciones de digestión, en un volumen de 20ul, fueron detenidas a 60 °C por 5 minutos con 5ul de la siguiente mezcla: TBE 1X (Tris 5.4%, ác. bórico 2.74% y EDTA 0.46%) SDS 0.2%, ficoll 400 10%, azul de bromo fenol 0.05% y xilen-cianol 0.05%.

3. Construcción, marcaje e identificación de moléculas recombinantes.

3.1 Aislamiento de DNA para la construcción del banco genómico.

El DNA genómico digerido parcialmente con la endonucleasa Sau 3AI fue fraccionado por electroforesis en un gel preparativo de 0.8% agarosa adicionado de bromuro de etidio (0.5ug/ml) de 15x20 cm y 0.5 cm de espesor a 50v durante el tiempo necesario hasta que el colorante migrara aproximadamente 7/8 de la longitud del gel. Simultáneamente fueron fraccionados los fragmentos de restricción del DNA del fago lambda digerido con la endonucleasa

Hind III (13) como control de peso molecular.

Usando una lámpara de luz ultravioleta de longitud de onda larga y con ayuda del control de peso molecular se localizó la porción de gel que contenía el DNA de nuestro interés. Se cortó y se sometió a electroelución a 100v/2h dentro de una bolsa de diálisis, usando como amortiguador TBE 1X, de acuerdo al método descrito por Maniatis (14). Posteriormente el DNA se purificó por adsorción a una columna de BND celulosa preequilibrada en TBE 1X y tratada con 0.1M LiCl, 10 mM Tris HCl (pH 7.4) y 1mM EDTA (pH 7.4) y eluido con la solución antes mencionada.

3.2 Determinación de la concentración de DNA.

3.2.1 Electroforesis.

En un gel de agarosa se fraccionaron cantidades conocidas de DNA junto con volúmenes conocidos del preparado de DNA. La concentración se estimó por comparación de la intensidad de fluorescencia.

3.2.2 "DOT"

A un volumen constante de una solución de bromuro de etidio se adicionó cantidades conocidas de DNA contenidas en un volumen constante. Se adiciona el mismo volumen del preparado de DNA y

la concentración de éste se estimó mediante la comparación de la intensidad de fluorescencia.

3.2.3 Espectroscópica.

Sabiendo que 50µg/ml de DNA absorbe a 260nm una unidad de absorbancia y conociendo la absorbancia de nuestro preparado de DNA se puede determinar de una manera más precisa la concentración de éste.

3.3. Marcaje de DNA.

El DNA empleado como sonda fue marcado radiactivamente con ^{32}P dATP por medio de la técnica de corte y copiado del molde ("Nick translation") (15). La DNA polimerasa I de E. coli agrega desoxirribonucleótidos al extremo 3'-oxhidrilo que se genera cuando es cortada una hebra de una molécula de DNA de cadena doble; además, esta enzima puede remover desoxirribonucleótidos del lado 5' del corte, en virtud de su actividad exonucleotídica de 5' a 3'.

La eliminación de desoxirribonucleótidos del extremo 5', seguida de la adición de desoxirribonucleótidos al extremo 3' da por resultado que el corte se mueva o traslade a lo largo del

DNA. Si se reemplazan los nucleótidos preexistentes, por nucleótidos radiactivos, es posible preparar moléculas de DNA marcadas. Las reacciones de "nick translation" se llevaron a cabo con 0.2 μ g del DNA en 6 μ l de Tris pH 7.5 200mM, MgCl₂ 20mM, albúmina sérica bovina 20 μ g/ml; 1 μ l de la mezcla de 1mM dNTP; 5 μ l de dilución de DNasa (0.075 μ g/ml); 1.5 μ l de ³²P dATP (15 μ Cu) y 5 unidades de DNA polimerasa I de E. coli, en un volumen de 25 μ l. Esta mezcla fue incubada por 1.5h a 14 °C. La reacción se detuvo con 2 μ l de SDS 20% y 20 μ l de EDTA 0.2M. La separación del DNA marcado radiactivamente, de los dNTPs no incorporados, se llevó a cabo en una columna de cromatografía de exclusión molecular, con sephadex G-50(15) equilibrada en 1XTBE (pH 8) y empacada por centrifugación a 3,000 rpm por 5 minutos. El DNA marcado fue recogido en el volumen de exclusión. La radiactividad específica obtenida por este procedimiento, registrada en un contador de centelleo líquido, fue de 3.2 x10⁶ cpm/ μ g de DNA.

3.4. Ligaciones.

pUC18 es un vehículo de clonación plasmídico de 2686pb que presenta un enlazador múltiple ("polilinker") que contiene sitios únicos para 13 diferentes enzimas de restricción (fig. 3). Este plásmido porta el gen de beta-lactamasa que confiere resistencia a ampicilina (16), lo que permite la selección positiva de las células transformadas.

Se trabajó con pUC18 linearizado mediante la digestión con la endonucleasa Bam HI (isosquizómero de Sau 3AI) en NaCl 50 mM, Tris HCl (pH 7.5) 10mM, MgCl₂ 10mM y DTT 1mM, incubado 4h a 37°C; después se adicionó 10U de BamHI (BRL) y se incubó 2H a 37° C. La reacción de digestión se detuvo por calor a 65° C por 15 minutos. Posteriormente fue tratado con 45U de fosfatasa alcalina de carnero por 2h a 37° C, 5 minutos a 55°C y 20 minutos a 37° C. La reacción de desfosforilación se detuvo mediante una extracción con fenol-cloroformo. Finalmente el plásmido fue recuperado por precipitación con etanol absoluto-LiCl. El DNA genómico de I. cruzi a ligar, como se describió anteriormente, fue digerido parcialmente con Sau 3AI y purificado hasta obtener fragmentos de 4.3 a 6.6kb.

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo, generalmente, con 0.1µg de pUC18 y 0.05µg de DNA genómico, 0.98 Unidades de ligasa y dATP 0.5mM, en 20µl de Tris-HCl 46mM, MgCl₂ 6.6mM y DTT 10mM.

3.5. Preparación y transformación de células competentes de la cepa MC 1061 de E. coli.

Se dejó crecer toda la noche un cultivo de la cepa MC 1061 de E. coli a 37° C. Posteriormente se realizó una dilución 1:80 de este cultivo y se dejó crecer hasta fase logarítmica (DO a 550nm de 0.2), a 37.° C con agitación fuerte (150 rpm). El cultivo fue

centrifugado a 6.000rpm por 10 minutos a 4 °C. y las células fueron resuspendidas en la mitad del volumen inicial, en CaCl₂ 100mM. Se dejó reposar 30 minutos a 4 °C, y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones. Las células fueron resuspendidas en un décimo del volumen inicial, en la misma disolución y se conservaron a 4 °C. Posteriormente se tomaron 200 µl de la suspensión celular y se le adicionaron de 10 a 20ng de DNA (plásmidos híbridos generados en la reacción de ligación). Se dejó en hielo por 30 minutos y se calentó a 42 °C por 90 segundos. Después se agregaron 1.5 ml de medio Luria con ampicilina (50µg/ml de medio), se incubó 50 minutos a 37 °C con agitación. De ahí se tomaron alícuotas y se sembraron en una placa de Luria-ampicilina usando asa triangular. Las eficiencias de transformación fueron calculadas con pUC18 superenrollado como control.

3.5.1 Protocolo modificado para la preparación de células competentes.

La preparación de células competentes mediante este método tiene un paso adicional al descrito anteriormente. Este consiste en una dilución 1:80 más del cultivo e incubación por 4h (bajo las mismas condiciones de agitación y temperatura) previo al tratamiento con CaCl₂.

3.6. Hibridación in situ.

La hibridación in situ de colonias transformadas se efectuó de acuerdo al método descrito por Rowekamp y Firtel (17).

A continuación se describe brevemente este método.

Las colonias fueron transferidas a filtro de papel Whatman 540, luego se colocaron por 8 minutos en disolución desnaturalizadora (NaOH 2%, NaCl 8.7%), 10 minutos en disolución neutralizadora (NaCl 8.7%, Tris 6.6%, pH 7.0) y 15 minutos en una mezcla de etanol absoluto y LiCl 8M (9:1). Después, los filtros se dejaron secar a temperatura ambiente y se prehibridaron por 18-24h en 8ml de disolución a 37 °C. Las disoluciones empleadas para prehibridar se prepararon de igual manera que las disoluciones empleadas en los experimentos tipo "Southern"; sólo que en éste caso no contienen SDS. Se hibridó con 0.4×10^6 cpm de DNA total de T.cruzi marcado con ^{32}P por cada filtro. El lavado de los filtros, así como la obtención de la autorradiografía, se realizó bajo las mismas condiciones de los experimentos tipo "Southern".

3.7. Purificación de plásmido en pequeña escala ("minipreps").

Con objeto de conocer el tipo de plásmidos híbridos contenidos en las células transformadas (estimación del porcentaje de

plásmidos recircularizados, recombinantes y artificiosos bioquímicamente y aislamiento de plásmidos que mostraron una señal de hibridación intensa después de la hibridación in situ). una asada de células con el plásmido fue inoculada en 3ml de medio Luria líquido con ampicilina (50 μ g/ml) y se incubó a 37 °C con agitación fuerte (250-300 rpm) durante toda la noche. Al día siguiente se colocó 1ml de este cultivo en un tubo Eppendorf y se centrifugó 45 segundos a 13,000 rpm. El botón celular fue resuspendido en 100 μ l de Tris-HCl 25mM (pH 8), lisozima 0.02%, EDTA 1mM (pH 7.2) y glucosa 50mM; posteriormente se mantuvo 30 minutos en hielo y se le agregaron 200 μ l de la mezcla de SDS al 1% y NaOH 0.2N. Se dejó en hielo otros 5 minutos y se agregaron 150 μ l de acetato de sodio 3M (pH 4.8) y se mantuvo en hielo por 25 minutos más. Después se centrifugó 5 minutos a 13,000rpm y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo, agregando 1ml de etanol absoluto y manteniéndolo a -20 °C. Luego se centrifugó 10 minutos a 13,000rpm y el botón fue resuspendido en 200 μ l de 6,6,0.2 (Tris-HCl 6mM pH 7.4, NaCl 6mM; EDTA 0.2mM) agregando después 550 μ l de etanol absoluto y 20 μ l de LiCl 8M. Se dejó a -20 °C por 30 minutos y se centrifugó 10 minutos a 13,000rpm. Finalmente el botón fue resuspendido en 70 μ l de 6,6,0.2. Se conservó a -20 °C.

3.8. Purificación del plásmido por gradiente de cloruro de cesio y bromuro de etidio.

Esta técnica se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Maniatis (14), con algunas modificaciones.

La primera parte de esta técnica fue realizada en forma similar a la técnica de "minipreps", pero a gran escala; partiendo de un cultivo celular de 200ml. Después de la última precipitación el material fue sometido a un gradiente de cloruro de cesio para lo cual se hizo lo siguiente: El precipitado fue resuspendido en 9ml de 6,6,0.2 y dividido en partes iguales en dos tubos. En cada tubo se agregaron 6.25g de cloruro de cesio y se agitó suavemente hasta que se disolviera totalmente. Luego se adicionaron 1.5ml de una mezcla de Tris 0.45M (pH 8), Tris 0.41M (pH 9.4) y EDTA 0.08M (pH 7.2), así como 0.25ml de bromuro de etidio (10mg/ml) y 0.25ml de sarkosil al 10%. Toda esta mezcla fue transferida a tubos de nitrato de celulosa, se centrifugaron por 15h a 55,000rpm, en el rotor UUY:65.1 (Beckman) vertical. Concluido el tiempo de centrifugación se extrajo con jeringa la banda correspondiente al plásmido. El DNA se diluyó con un volumen de agua y se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol absoluto, luego se centrifugó por 10 minutos a 10,000rpm y se suspendió el botón en 5ml de 6,6,0.2 y fue medida su absorbancia a 260 y 280nm.

4. Caracterizaciones génicas.

4.1. Estimación gruesa del número de copias.

Como control del número de copias se empleó al plásmido pRTc81 (18). Dicho inserto de 1.6kb presenta parte del cistrón ribosomal de T. cruzi (que contiene parte de la secuencia codificadora de la molécula 24S de RNAr, así como los genes completos de las moléculas S2 y S6 de RNAr). Se sabe que el número de copias para estos genes es de 114 por núcleo (18). La estimación del número de copias de las clonas aisladas se fundó en:

- La semicuantitividad de las técnicas de hibridación.
- En el conocimiento del orden de reiteración de los genes ribosomales contenidos en pRTc81, que es de 10^2 copias por núcleo,

Esta estimación comparativa se realizó de dos maneras:

- Mediante la hibridación in situ de las células transformadas con las clonas aisladas y pRTc81.
- Mediante experimentos tipo "Southern" de los insertos fraccionados por electroforesis en geles horizontales de agarosa y transferidos a nitro celulosa.

En ambos casos la sonda empleada fue DNA total de T. cruzi digerido con la endonucleasa Sau 3AI y marcado radiactivamente por "nick-translation" (0.5×10^6 cpm/filtro).

4.2 Experimentos tipo "Southern".

4.2.1 Hibridaciones cruzadas.

Los plásmidos híbridos aislados fueron digeridos con las endonucleasas Eco RI y Hind III con objeto de separar las secuencias clonadas del vehículo de clonación. Los productos de estas digestiones fueron fraccionados por electroforesis en geles horizontales con 5mm de espesor de agarosa al 0.8% adicionada de bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g/ml}$). Se recuperaron todos los insertos por separado mediante electroelución y adsorción a BND celulosa. Cada una de las secuencias fueron marcadas radiactivamente por "nick-translation".

Nuevamente los plásmidos híbridos fueron digeridos y fraccionadas junto con el marcador de peso molecular. El DNA fue transferido a filtros de nitro celulosa, de acuerdo al método descrito Por Southern (19). Luego los filtros se secaron a temperatura ambiente y se hornearon con vacío a 80°C por 2h, fueron prehibridados en 15ml de formamida 50%, EDTA 2mM, SDS

0.2%, fosfatos de sodio 120mM (pH 7), SSC 2x y disolución Denhardtts 4x (Ficoll 400 0.002%, PVP-40 0.002% y albúmina sérica bovina 0.02%) por 3 h. Los filtros se hibridaron con 0.5×10^6 cpm de DNA correspondiente a cada una de las secuencias marcadas con ^{32}P , desnaturalizadas por calor en 8ml de una disolución preparada igualmente que la de prehibridación. Los filtros fueron lavados en tres ciclos que incluyeron enjuague en SSC 0.2% e incubación en SSC 0.2x y SDS 0.1% a 37°C , con agitación constante durante 1h. La autorradiografía se obtuvo al sobreponer el filtro seco a una placa de rayos X (XOMatt RP Kodak) en presencia de una pantalla intensificadora en lapsos de 1 a 3 días a -70°C .

4.2.2. Experimentos tipo "Southern genómico".

El DNA genómico fue digerido con las endonucleasas de restricción (Eco RI, Hind III y Pst I) y fue fraccionado por electroforesis en gel horizontal de agarosa al 0.8% en TBE 1X de $15 \times 20 \times 0.5\text{cm}$, con bromuro de etidio ($0.5\mu\text{g/ml}$). Los geles, de 5mm de espesor fueron sometidos a una diferencia de potencial de 50 a 100v, las bandas de DNA fueron visualizadas con luz ultravioleta de onda corta. El tamaño de los fragmentos de DNA fue calculado mediante la calibración de los geles con los

fragmentos de restricción del DNA del fago lambda con la endonucleasa Hind III (17). Posteriormente el DNA de los geles fue transferido e hibridado bajo las condiciones descritas para las hibridaciones cruzadas. Las sondas empleadas fueron todas y cada uno de las secuencias aisladas (prospectos de secuencias repetidas en el genoma de T. cruzi).

4.3. Mapeo de sitios de restricción.

Las secuencias aisladas (Prospectos de secuencias repetidas en el genoma de T. cruzi) que mostraron sitios internos para EcoRI y/o Hind III se sometieron a digestiones sencillas y dobles con estas endonucleasas para determinar la ubicación relativa de éstos.

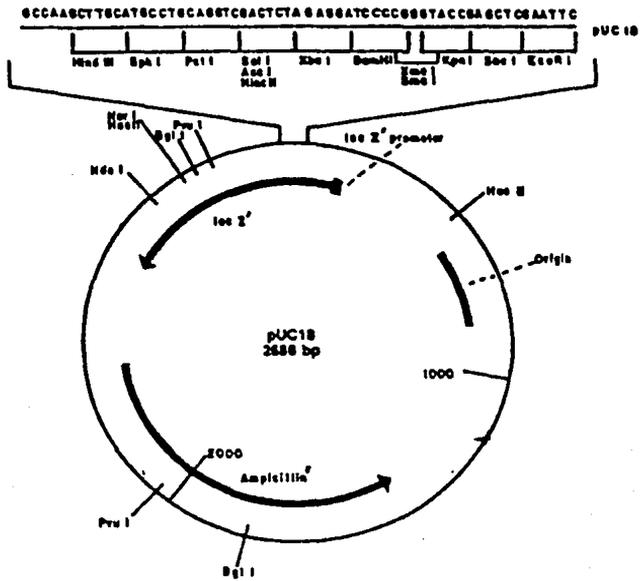
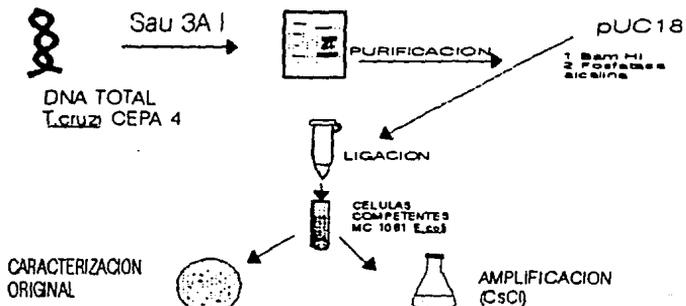


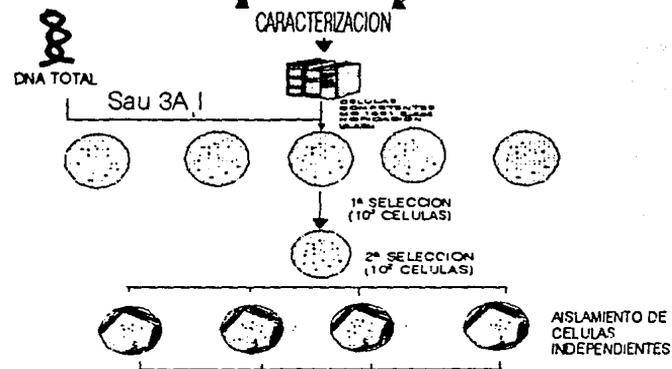
fig. 2 Mapa de restricción del vehículo plasmídico de clonación empleado

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

CONSTRUCCION
DEL
BANCO

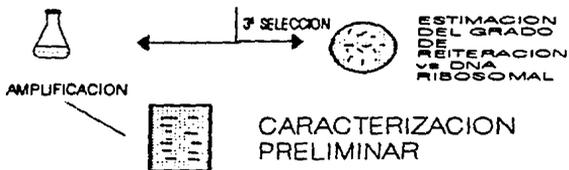


CARACTERIZACION ORIGINAL



ASLAMIENTO DE
CELULAS
INDEPENDIENTES

DE
SECUCENCIAS



RESULTADOS

1. Construcción del banco genómico.

Para la construcción del banco genómico se emplearon fragmentos de DNA total de T. cruzi cuyos tamaños fueron de 4.3 a 6.6kb (obtenidos de la digestión parcial con Sau 3AI del DNA total de T. cruzi). Estos tamaños fueron seleccionados por ser tamaños fácilmente identificables ya que comigran con marcadores del fago lambda digeridos con Hind III. Con estos fragmentos se generaron plásmidos recombinantes estables, pues el fragmento a clonar más grande tenía un tamaño de 6.6kb; fragmento que no triplica en tamaño al vehículo de clonación (14). Por otro lado, si se hubiesen generado plásmidos recombinantes con 2 insertos de origen no contiguo en el genoma de T. cruzi, estos se reconocerían fácilmente pues el tamaño total del DNA insertado sería por lo menos dos veces 4.3 kb (i.e. 8.6), tamaño mayor que 6.6 kb (límite superior de insertos seleccionados).

La endonucleasa Sau 3AI fue elegida por ser una endonucleasa de restricción que reconoce un tetranucleótido. Por ser un tetranucleótido, la probabilidad de su frecuencia a lo largo del genoma es alta. Esta característica ofrece obtener tras una digestión parcial de DNA genómico productos de digestión en una amplia gamma de tamaños, cuyas secuencias pueden

sobrelaparse (23). Por otro lado, los extremos generados por Sau 3A son compatibles con los de Bam HI, sitio presente en el enlazador múltiple de clonación del vehículo empleado pUC 18.

Para efectuar el aislamiento de los fragmentos de nuestro interés se digirieron 15 μ g de DNA en las condiciones consideradas como apropiadas para el enriquecimiento de dichos fragmentos (0.66U enzimáticas de Sau 3AI/ μ g de DNA e incubados 10 y 15 minutos a 37 °C).

La concentración del preparado fue estimada comparativamente mediante la electroforesis simultanea de un volumen conocido de nuestro concentrado y de μ g conocidos de DNA; verificando al mismo tiempo los tamaños de los DNA aislados con ayuda del marcador de peso molecular.

Por otro lado se preparó al vehículo de clonación pUC18 ampicilina, el cual fue digerido con la endonucleasa Bam HI (que genera extremos cohesivos compatibles con los extremos generados por la endonucleasa Sau 3AI) y desfosforilado en sus extremos 5'.

Ya teniendo listos estos dos reactivos se dispuso a realizar la ligación de ellos (tabla 1).

tabla 1

CONDICIONES DE LA REACCION DE LIGACION

CELULAS TRANSFORMANTES

M pUC18	M ADN	j/i pUC18	j/i ADN	RELACION MOLAR	No DE COLONIAS TRANSFORMANTES	% DE PLASMIDO RECIRCULARIZADO
2.9×10^9	7.9×10^{10}	62	21	4	32,810	-
2.9×10^9	-	-	-	-	-	ND
					EFICIENCIA DE	TRANSFORMACION. ND
2.9×10^9	7.9×10^{10}	62	21	4	43,500	-
2.9×10^9	-	-	-	-	-	510
					EFICIENCIA DE	TRANSFORMACION 1.13×10^7 CEL/ μ g de DNA
2.9×10^9	7.2×10^{10}	62	21	4	18,360	-
2.9×10^9	-	-	-	-	-	1,542
					EFICIENCIA DE	TRANSFORMACION. 1.13×10^7 CEL/ μ g de DNA

TABLA 1. CONDICIONES Y CARACTERIZACION DE LOS PRODUCTOS DE LAS REACCIONES DE LIGACION
^{*}pUC18 MOLARIDAD DE pUC18, ^{*}ADN DE L. ginzii, j/i PARAMETROS DE DUGAICYK (7)
 ND NODETERMINADO

2. Caracterización del banco genómico.

Con objeto de hacer un análisis tanto cualitativo como cuantitativo de los productos de ligación, se transformaron células competentes de la cepa MC 1061 de E. coli con los productos de estas reacciones. Simultáneamente se transformaron éstas con cantidades conocidas de pUC18 superenrollado a fin de estimar la eficiencia de transformación y con los productos de recircularización de la reacción de ligación (determinación de plásmidos recircularizados biológicamente) (tabla 1)

Luego de obtener las células transformantes, se extrajo mediante la técnica de "mini preps" un determinado número de plásmidos híbridos (reconocidos por el fenotipo conferido a las células: resistencia a ampicilina) que cumplieran con el único requisito de estar contenidos en colonias de E. coli francamente aisladas. Estos plásmidos fueron digeridos con las endonucleasas de restricción Eco RI y Hind III cuyos sitios de restricción flanquean -en un plásmido híbrido- al fragmento de DNA clonado.

Puesto que dentro del mismo fragmento clonado pueden existir sitios de restricción para estas endonucleasas se espera tener diferentes productos de digestión (fig 3).

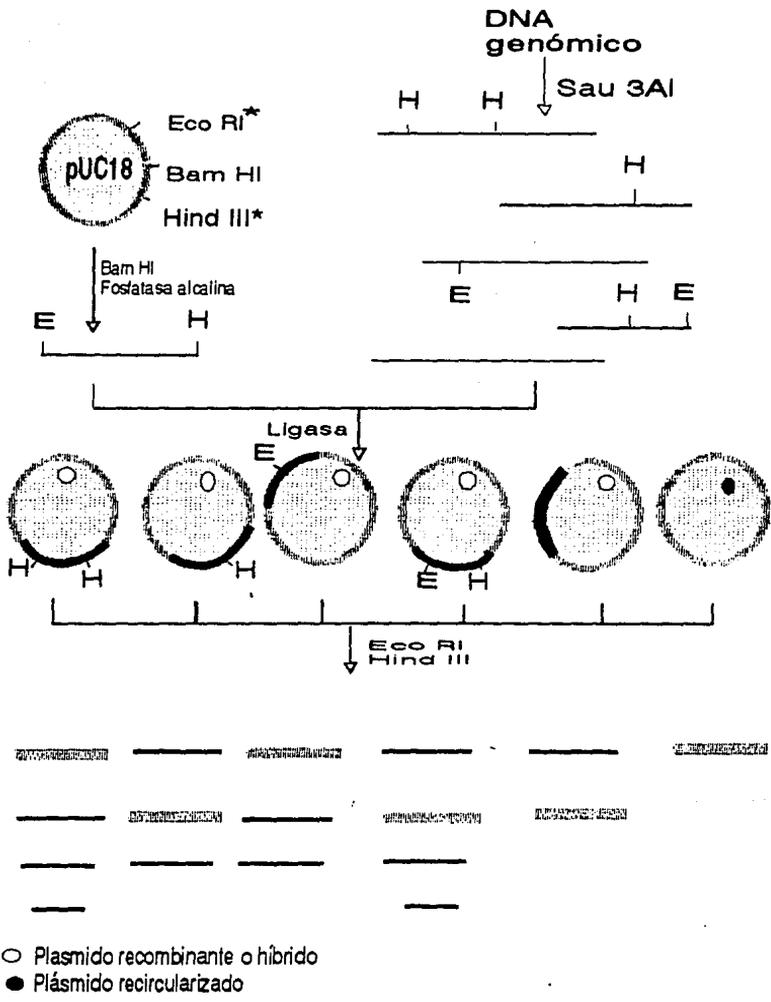


fig. 3 Esquema de los plásmidos recombinantes construidos y de los posibles productos de la digestión doble con Eco RI (E) y Hind III (H). E* y H* sitios de restricción para Eco RI y Hind III dentro del "polilinker" en el vehículo de clonación

La información obtenida de este tipo de ensayos fue:

- Aproximación del porcentaje de plásmido recircularizado (determinado biológicamente).
- Aproximación del porcentaje de plásmido recircularizado (determinado bioquímicamente).
- Aproximación del porcentaje de plásmido artificial (considerando como plásmido artificial aquel cuyo inserto tuviera un tamaño mayor de 6.6kb).
- Tamaño promedio de los fragmentos de DNA clonados.

A continuación se presentan tabulados los resultados obtenidos en nuestros intentos por construir un banco genómico lo más completo posible (tabla 2).

TABLA 2
BANCOS GENOMICOS ANTES DE AMPLIFICAR

BANCO	Nº DE COLONIAS TRANSFORMATES	% DE PLASMIDO RECIRC BIOL.	% PLASMIDO RECIRC BIOQ	% PLASMIDO ARTIFICIOSO	Nº DE RECOMBINANTES
1	32,810	ND	ND	ND	ND
2	43,500	ND	ND	33	ND
3	18,360	84	130	NO	16,892

ND No determinado NO No observado

Con la intención de incrementar el número de clonas recombinantes se procuró mejorar la eficiencia de transformación aumentando la actividad metabólica de las células (21), previo al tratamiento de CaCl_2 en la preparación de células competentes siguiendo el protocolo modificado.

Mediante este método realmente se logró mejorar la eficiencia de transformación, pues aumentó en un orden de magnitud el número de células transformantes con plásmido superenrollado (datos no presentados) sin aumentar el N° de células transformadas con los plásmidos recombinantes generados en la reacción de ligación. Ya que la conformación del DNA -se ha informado- no afecta de manera importante a la eficiencia de transformación (20), es factible pensar que el bajo número de plásmidos recombinantes clonados se deba a las características de la suspensión de plásmidos recombinantes per se y no a la capacidad de las células para incluirlo.

De los bancos genómicos con un bajo porcentaje de plásmidos recircularizados y artificiosos que adicionalmente mostraron mayor número de plásmidos recombinantes (10^4) se amplificaron y de cada uno de ellos se determinó nuevamente cada uno de estos valores de una manera semejante con objeto de estimar la magnitud del efecto de minirrepresentación de los plásmidos recombinantes.

Además se determinó para cada banco el número de colonias transformantes generadas por μl del concentrado de plásmidos recombinantes (tabla 3).

3. Amplificación del banco genómico y conservación.

El banco considerado como el de mejores características (banco N23, tabla 2) fue conservado a -20°C como una suspensión de plásmidos recombinantes superenrollados aislados del total de transformantes del cultivo. De esta forma se evita la problemática del mantenimiento de colonias bacterianas transformantes viables: que además por tratarse de E. coli MC 1061, (que es Rec A^{+}), se corre el riesgo de perder las secuencias clonadas por recombinación, o bien, se pueden perder los plásmidos cuando disminuya la presión selectiva (actividad bacteriostática de la ampicilina) presente en el medio de cultivo.

El banco genómico construido no es representativo del genoma de T. cruzi, pues el mayor número de clonas obtenidas fue de 1.7 por 10^6 con un porcentaje de plásmido recircularizado del 8.4%. De este modo, empleando la ecuación probabilística informada por Clarke y Carbon(11) y considerando que el tamaño del genoma es de 3.9×10^8 pb (5 y 7), sólo existe una probabilidad de 0.22 de contener cualquier secuencia de DNA en particular dentro del banco. Adicionalmente, durante la amplificación se observó un efecto de minirrepresentación de plásmidos recombinantes (incremento de plásmidos recircularizados) y enriquecimiento de algunos plásmidos recombinantes.

TABLA 3
BANCO DESPUES DE AMPLIFICAR

BANCO	COLONIAS TRANSFORMANTES	% DE PLASMIDO RECIRCULARIZADO	TITULO	Nº DE PLASMIDOS RECOMBINANTES
3	18,360	379	1.3×10^7	16,892

4. Aislamiento de secuencias repetidas.

El DNA total de *T. cruzi* marcado radiactivamente (con una radiactividad específica de 3.2×10^6) fue empleado como sonda para identificar mediante hibridación *in situ* aquellas colonias transformantes poseedoras del plásmido recombinante, cuyo inserto corresponde a secuencias repetidas en el genoma.

Aún cuando no se usa una sonda específica para este tipo de secuencias, es posible identificarlas debido a la peculiar cinética de renaturalización que muestran y al mayor número relativo de copias presentes a lo largo del genoma. Estas diferencias con respecto al resto de las secuencias permitirán distinguirlas, pues la intensidad de las señales en una autorradiografía tras hibridar contra DNA total serán de mayor intensidad.

Esta sonda fue empleada para hibridar 8,000 colonias transformadas con el banco genómico antes mencionado. En las

autorradiografías de esta primera hibridación se observan señales con diferentes intensidades y se escogieron aquellas que mostraron una señal muy intensa y constante en densidades de 10^3 , 10^2 y 10^1 colonias/ placa. De las 8 colonias finalmente seleccionadas y aisladas se tomaron 3 de ellas para hacer -a grosso modo- una estimación de la reiteración mediante la comparación de la intensidad de la señal, aprovechando la semicuantitividad de la técnica y tomando como referencia la clona pRTc81 que contiene un fragmento del cistrón de rRNA de T. cruzi, del cual se sabe tiene aproximadamente 10^2 copias por genoma haploide (18).fig. 4



fig. 4 Autorradiografía de la hibridación in situ de 3 clones aislados y la clona pRTc81 donde se empleó DNA total como sonda; ooo ubicación de los controles que no mostraron señal de hibridación.

Al observar la autorradiografía de este experimento, se cree que las clonas aisladas son cuando menos 10 veces más reiteradas que los genes ribosomales; tras esta confirmación acerca del grado de reiteración de estas secuencias (aprox. 10^3

copias/genoma haploide) se consideró necesario verificar si se trata de plásmidos recombinantes monoméricos. Para esto fue indispensable aislarlos y fraccionarlos por electroforesis junto con el marcador de peso molecular y el plásmido pRTc81 para ratificar la reiteración de las secuencias.

De esta manera sabremos si son plásmidos monoméricos (conociendo el tamaño de los plásmidos híbridos) y corroboraremos su reiteración relativa tras transferir a NC e hibridar contra DNA total (fig. 5 y 6)

Los tamaños que mostraron los diferentes plásmidos híbridos aislados no excedieron de 9.3kb, por esto se cree que se trata de plásmidos monoméricos. Al mismo tiempo se observó que aparentemente 5 secuencias de las 8 aisladas son semejantes, pues presentaron un patrón de restricción muy similar tras digerirlas con las endonucleasas Eco RI y Hind III (fig. 5).

La autorradiografía obtenida de la hibridación con DNA total muestra que en todos los casos, a excepción del fragmento pequeño de 0.5kb (27-3, fig. 6), se trata de secuencias repetidas sin lugar a dudas, además, es notable que los diferentes fragmentos generados por la digestión de las clonas semejantes (27-1, 27-2 y 27-3, fig.5) tienen -asi como el resto de las secuencias aisladas- diferentes intensidades en sus señales de hibridación (fig.6), por esto se sospecha que cada fragmento corresponda a secuencias diferentes con diferente grado de reiteración.

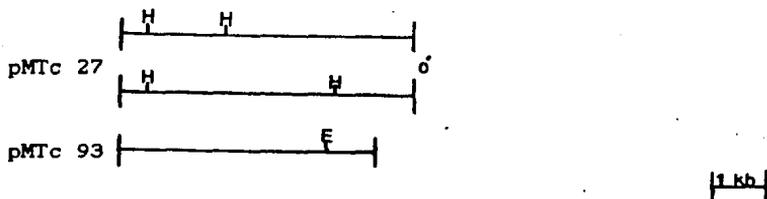
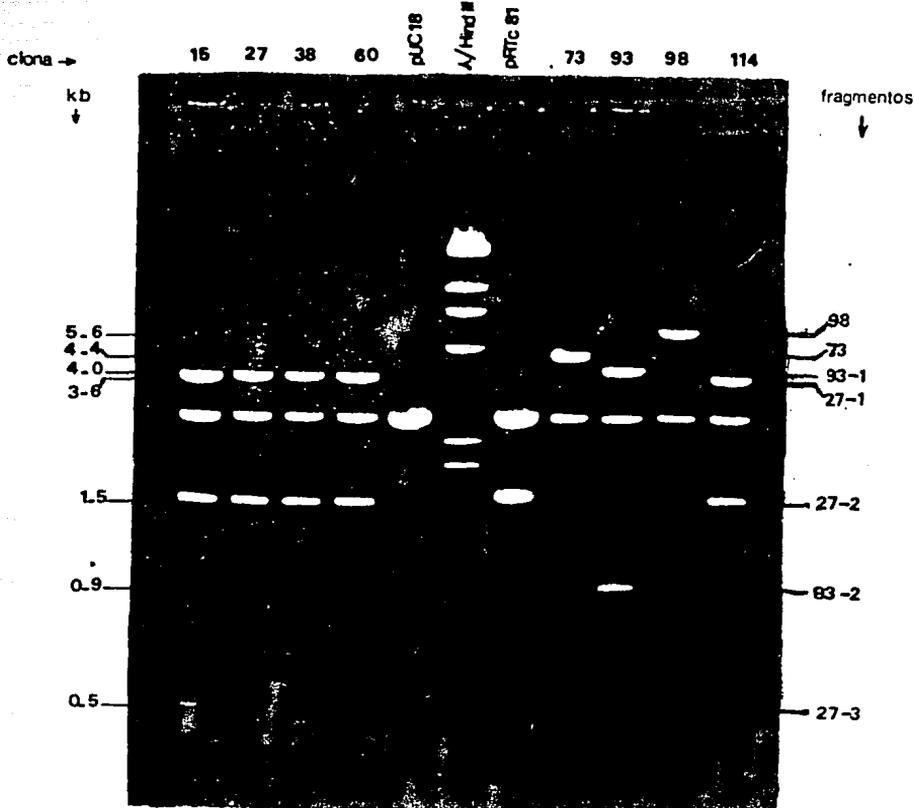


fig. 5 Perfil electroforético de las clonas aisladas (carriles 1-4 y 8-11) y pRTc81 (carril 7) digeridos con *Eco* RI y *Hind* III pUC18 (carril 5), control de peso molecular (carril 6). Conjuntamente se muestran los tamaños y denominaciones de cada uno de los fragmentos generados en la digestión doble de las secuencias aisladas para una fácil identificación en lo futuro.

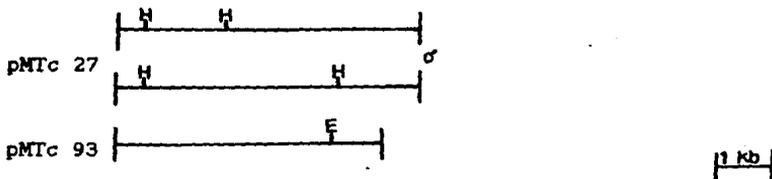
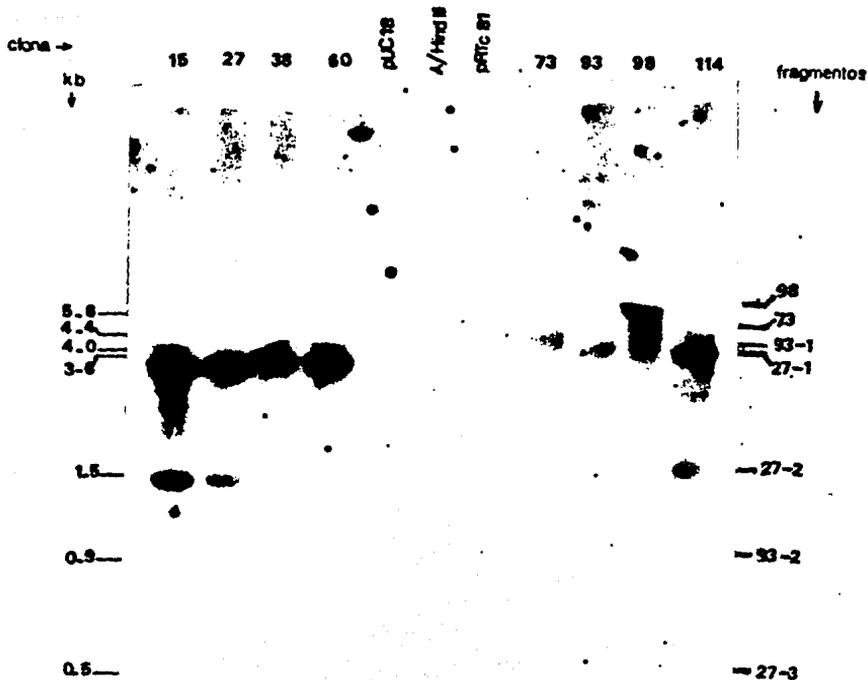


fig. 6 Autorradiografía del experimento tipo "Southern" del perfil electroforético mostrado anteriormente (fig.5) donde el DNA total de T. cruzi fue empleado como sonda.

5. Hibridaciones cruzadas.

Posteriormente se realizaron hibridaciones cruzadas entre todos y cada uno de los fragmentos generados en la digestión doble de las secuencias (con Eco RI y Hind III) con objeto de averiguar si se trata de secuencias relacionadas entre sí o bien de secuencias lo suficientemente diferentes que no muestren hibridación cruzada (fig.7 y 8).

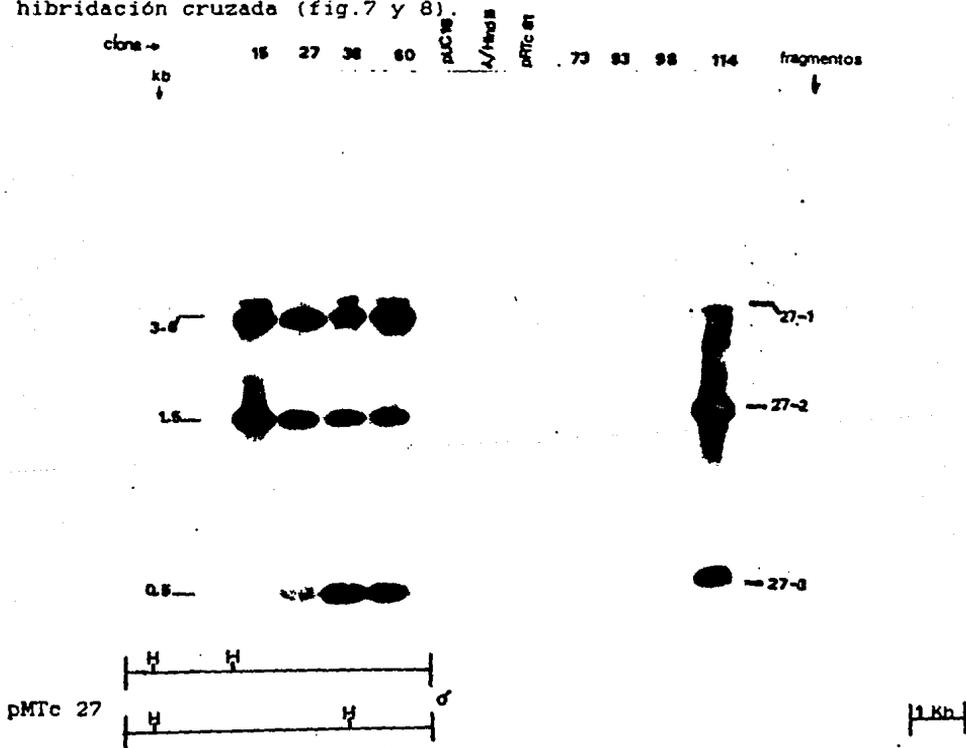


fig. 7 Autorradiografía del experimento tipo "Southern" donde las clonas aisladas fueron digeridas con Eco RI y Hind III, e hibridadas contra el inserto completo de la clona pMTc27.

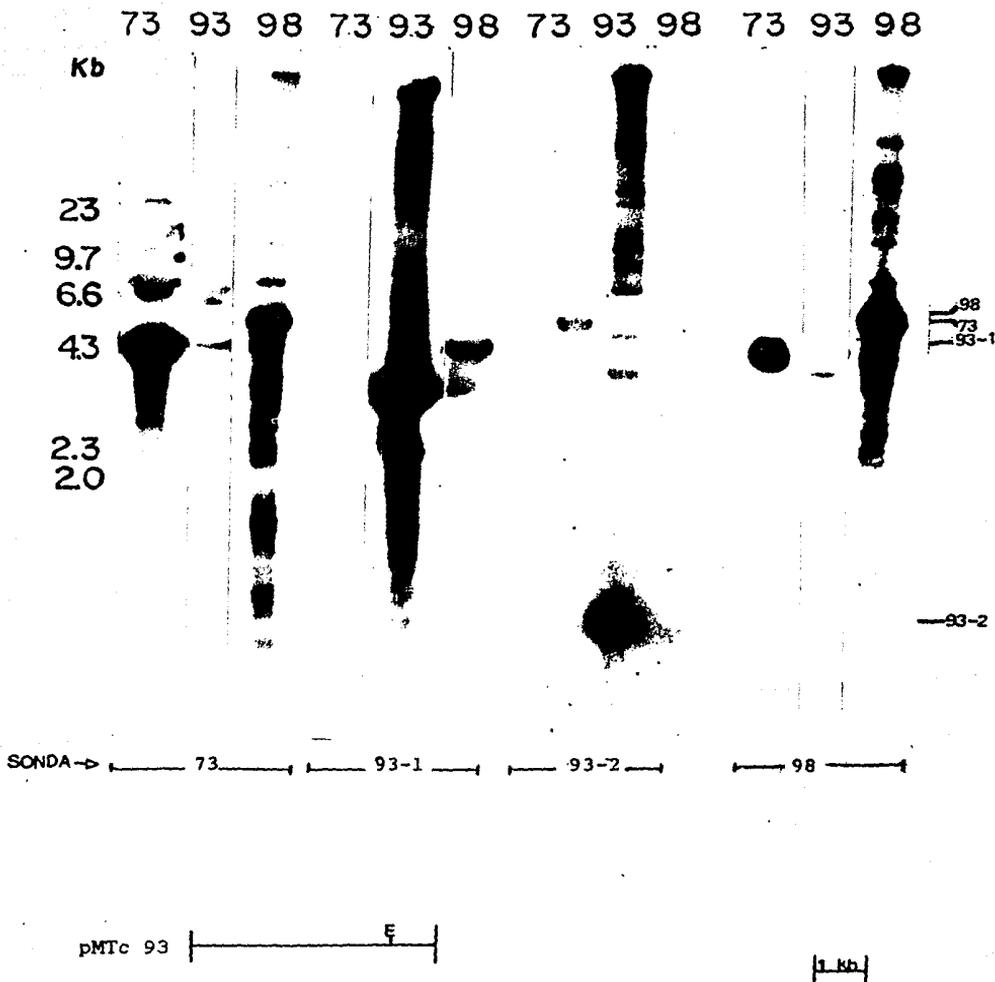


fig.8 Autorradiografía del experimento tipo "Southern" donde las clones 73, 93 y 98 fueron digeridas con EcoRI y Hind III, hibridadas contra los fragmentos 73, 93-1, 93-2 y 98.

De estas hibridaciones se concluyó que:

- Las clonas que mostraron un patron de restricci3n semejante (15, 27, 38, 60 y 114, fig 5), al parecer se trata en realidad de clonas hermanas (pMTc27) (fig. 7).
- Los tres fragmentos generados de la digesti3n doble de esta clona (27-1, 27-2 y 27-3) son secuencias que no est3n relacionadas entre s3 (no est3n ilustrados estos datos), y que por resultados anteriores se sospecha que se trata de secuencias diferentes con, diferente grado de reiteraci3n, (fig.6)
- Los fragmentos 93-1 y 93-2 (fig. 8) no mostraron hibridaci3n cruzada en los experimentos realizados.
- En las clonas aisladas aparentemente est3n contenidas siete diferentes fragmentos de secuencias repetidas (27-1, 27-2, 27-3, 73, 93-1, 93-2 y 98) de las cuales solo dos de ellas (73 y 98, fig.8) parecen estar relacionadas entre s3.

6. Experimentos tipo "Southern gen3micos".

Para iniciar su caracterizaci3n se realizaron experimentos tipo "Southern" empleando como sonda todos y cada uno de los

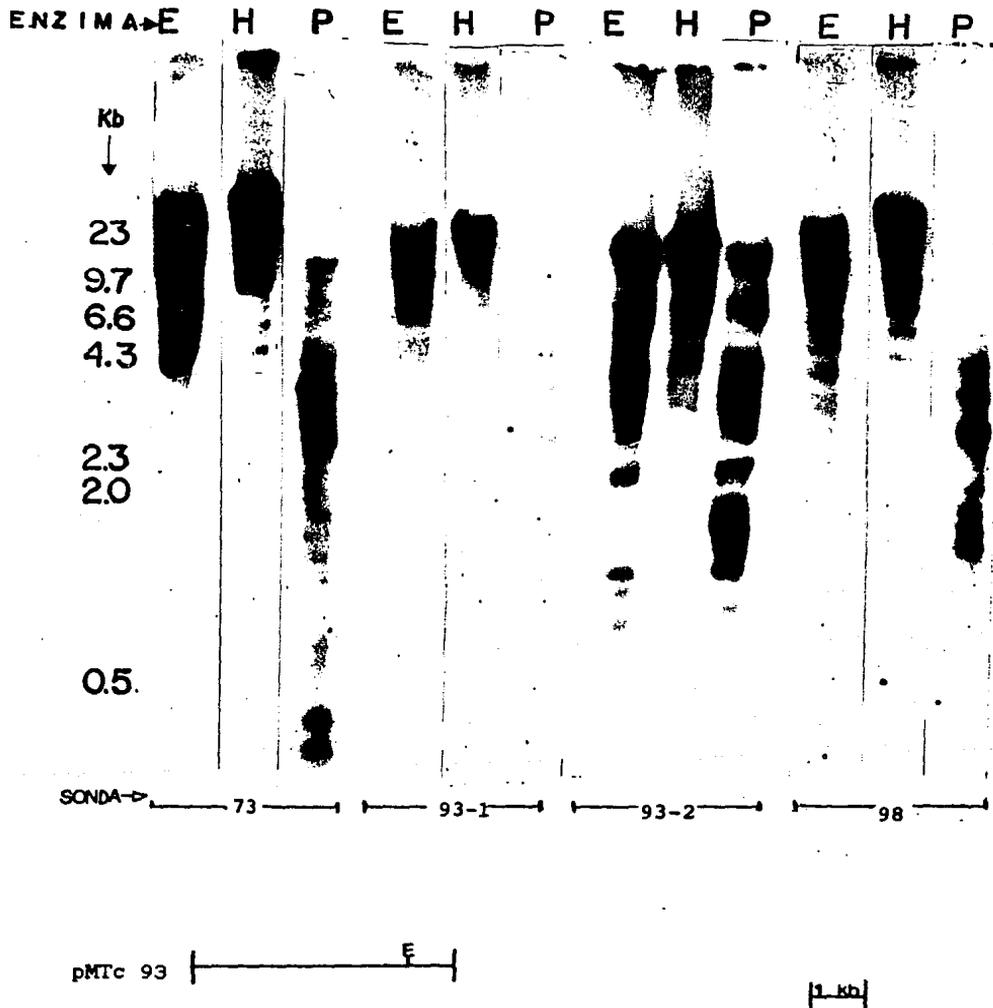


fig.10 Autorradiografía del experimento tipo "Southern genómico" donde el DNA genómico fue digerido con EcoRI (E), Hind III (H) y Pst I (P) e hibridado con los fragmentos 73, 93-1, 93-2 y 98.

Los perfiles de hibridación que muestran los fragmentos 27-1, 27-2 y 27-3 (fig. 9) confirman que cuando menos uno de ellos -el fragmento 27-1- corresponde a secuencias con un grado de reiteración diferente y cada uno con un patrón de dispersión distinto. Al mismo tiempo se observó que los fragmentos clonados corresponden a sólo una porción de una secuencia repetida más grande, mayor de 9.7kb.

Además se confirmó que las clonas 15, 27, 38, 60 y 114 (fig. 5) son clonas hermanas, pues al contener una porción de secuencia única en 5 diferentes clonas (fig. 9) dentro del banco genómico sólo se explica considerándolas como clonas hermanas.

Se corroboró que los fragmentos 73, 93-1 y 93-2 (fig. 5) son secuencias repetidas que presentan cuando menos un patrón de dispersión diferente, pero por otro lado, existe cierta semejanza entre el patrón de dispersión de los fragmentos 73 y 98 (fig. 10), lo cual concuerda con los resultados de los ensayos de hibridación cruzada (fig. 8) pues existe el antecedente de que aparentemente se encuentran relacionadas entre sí y también en estos casos los fragmentos clonados parecen constituir una secuencia más grande.

Además es notable que los sitios de restricción Eco RI y Hind III o no están muy conservados o no están organizados periódicamente en las familias de secuencias repetidas.

7. Mapeo de sitios de restricción.

Las secuencias clonadas en pMTc27 y pMTc93 (fig. 5) que mostraron sitios internos para EcoRI y/Hind III se sometieron a digestiones sencillas y dobles para así determinar la ubicación relativa de éstos.

De estos experimentos se dedujo la posición relativa de los sitios de restricción internos para estas endonucleasas del fragmento clonado en pMTc93 y para los sitios internos de la clona pMTc27 sólo se determinó cuales son pero no se concluyó su posición relativa.

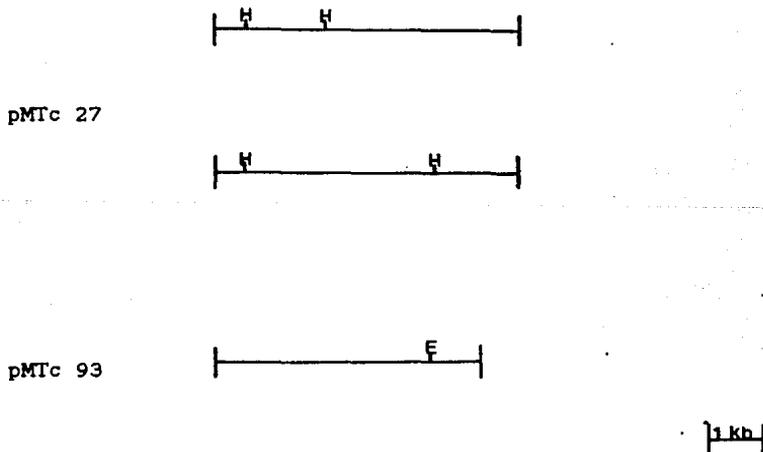


fig. 11 Mapa de los sitios de restricción para Eco RI, Hind III y Sau 3AI. La ubicación relativa de los sitios de restricción para Eco RI en el plásmido pMTc 27 se desconoce

DISCUSION

1. Representatividad del genoma de T. cruzi en el banco genómico construido.

Asumiendo que el contenido de DNA total en T. cruzi es de aproximadamente 3.9×10^8 pb (DNA nuclear + DNA de cinetoplasto) (5) y considerando que se tienen 1.56×10^4 clonas independientes construidas, que contiene cada una un promedio de 5.45kb y aplicando la ecuación probabilística reportada por Clarke y Carbon (1976), (11) tenemos:

$$P = 1 - (1-f)^N$$

donde $f = \frac{5.45 \times 10^3}{3.29 \times 10^8} = 1.656 \times 10^{-5}$

$$N = 1.56 \times 10^4 \text{ clonas}$$

entonces $P = 1 - (1 - 1.6 \times 10^{-5})^{1.56 \times 10^4}$

$$P = 0.22$$

De esta manera, existe una probabilidad de 0.22 de encontrar en dicho banco genómico cualquier secuencia en particular. Esta probabilidad es, por supuesto, referida a secuencias únicas.

Un banco genómico de T. cruzi representativo ($P > 0.9$) con el mismo tamaño de fragmentos clonados requiere de aproximadamente 1×10^5 clonas independientes. Esta cantidad se pretendía alcanzar considerando que se pueden tener hasta 10^7 clonas (20).

El bajo número de clonas construidas muy probablemente no se deba a la poca capacidad de las células competentes de incluir DNA exógeno, sino a la baja eficiencia de transformación de los plásmidos recombinantes construidos.

Sin embargo, el banco genómico es útil para aislar genes o secuencias con un grado de reiteración de 10^3 copias por genoma haploide. Tal es el caso de las secuencias aisladas en el desarrollo de este proyecto, así como el aislamiento del gen 5S de T. cruzi (60).

2. Secuencias repetidas aisladas.

Se aislaron 4 clonas diferentes cuyos insertos tienen un tamaño promedio de 5kb y cuya reiteración es del orden de 10^3 copias por genoma haploide.

Estas secuencias no corresponden a DNA de cinetoplasto (minicírculos) pues su tamaño y reiteración descartan la posibilidad (24).

Por otro lado, muestran una organización interna, que consiste en diferentes dominios formadores de una secuencia repetida más larga (>9.3 kb) e interdispersa en el genoma de T. cruzi, que parecen estar dispuestos de diversas maneras dentro

de cada miembro de la familia de secuencias.

Organizaciones de este tipo ya han sido reportadas para secuencias repetidas de T. cruzi (25) y de algunos otros organismos (26-38). Esta estructura parece ser característica de las secuencias repetidas, largas e interdispersas.

Un modelo sobre la organización interna de estas secuencias fue propuesto por Moyzis (28) quien se basa en los resultados obtenidos en los experimentos de reasociación, usando las fracciones de renaturalización largas (>2,000pb) y cortas (300 pb) de secuencias moderadamente repetidas (resistentes al tratamiento con nucleasa S_1) como "driver" donde observa que todas las secuencias repetidas están presentes en ambas fracciones (largas y cortas). Los experimentos de reasociación indican que algunos de los fragmentos pequeños resistentes al tratamiento con nucleasa S_1 están presentes en el DNA de hamster como parte de una secuencia repetida mas grande.

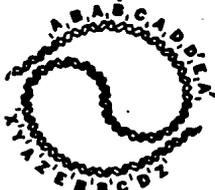


fig. 12 Representación de una porción de DNA que incluye dos bloques de secuencias repetidas (en oscuro) organizadas en "scrambled tandem clusters" flanqueados por secuencias de DNA no repetidas (en claro). Los bloques de DNA repetido está dividido en distintas secuencias repetidas mas cortas designadas por las letras A,B..Z. Dos secuencias repetidas de DNA invertidas son designadas por A' y D'.

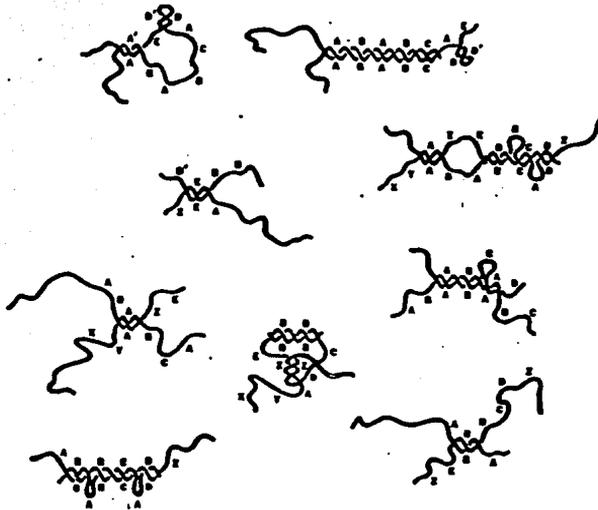


fig. 13 Algunas estructuras de renaturalización propuestos para las secuencias repetidas representadas en la fig.12.

Asumiendo esta organización se ha propuesto que probablemente algunas secuencias repetidas interdispersas consideradas como cortas, en realidad son segmentos de una secuencia más larga (26) y tomando en cuenta la homología encontrada entre secuencias repetidas cortas y largas también se ha sugerido la probabilidad de que las secuencias cortas existentes hayan evolucionado de las secuencias repetidas largas (38) o bien que hayan divergido a tiempos similares (45).

El significado de la prevalencia y amplia distribución de las secuencias repetidas e interdispersas en el genoma de eucariontes

es aún una incógnita. Un análisis probabilístico refuta la idea de que se trate de secuencias parásitas (39) cómo había sido sugerido anteriormente (40 y 41). Esto aunado a su distribución en el genoma (48-57); a los transcritos encontrados (8, 51-53) y a sus características estructurales sugiere su intervención en alguna función desconocida hasta el momento. Además, existe cierta semejanza con el modelo de regulación de expresión génica propuesto por Davidson, E.H. y Britten, R.J. (1979) (46).

Pero todo esto no deja de ser mera especulación. Lo que hasta hoy sí ha sido demostrado para muchas secuencias repetidas e interdispersas es su movilidad, que se cree, es mediante retroposición (10,29, 42-44) y han llegado a considerarse como retroposones no virales.

En base a su movilidad se cree pueden ser -en parte- responsables de la marcada fluidez de la información genética de eucariontes (10).

Esta posibilidad concuerda con la plasticidad descrita para genomas de parásitos y puede explicar el alto grado de polimorfismo encontrado entre diferentes aislados de T. cruzi.

Una característica importante y útil de este tipo de secuencias es que -por lo regular- son especie específica, así de ellas pueden generarse sondas con fines diagnósticos, taxonómicos o m a p e o g e n é t i c o . (5 3 - 5 9) .

CONCLUSIONES

- Fue construido un banco genómico de T. cruzi que consta de 1.7×10^4 clonas independientes conservado a -20°C como una suspensión de plásmidos recombinantes superenrollados.

- Se analizó el banco genómico cualitativamente y cuantitativamente de donde se obtuvieron los siguientes resultados.

Nº de clonas independientes: 1.7×10^4

Porcentaje de plásmido recircularizado: 37.9%

Título (Nº de colonias transformantes

por μl del concentrado): 1.3×10^7

cuando la eficiencia de transformación fue: $7.7 \times 10^6 / \mu\text{g DNA}$

La probabilidad de aislar una secuencia única del genoma de T. cruzi según la ecuación de Clarke y Carbon (11) es de 0.22%

- Fueron aisladas secuencias repetidas en el genoma de T. cruzi cuyos tamaños son mayores de 9 kb y su reiteración es del orden de 10^3 copias por genoma haploide.

- Fue observada una peculiar organización interna de las secuencias repetidas constituida por pequeños y diferentes dominios formadores de una secuencia repetida más larga

que parecen estar dispuestos de diversas maneras dentro de cada miembro de la familia.

GLOSARIO

- Agente etiológico. agente causal
- Amastigote. Fase intracelular de protozoario flagelado
- Amplificación. Producción selectiva de múltiples copias de una o varias secuencias de DNA.
- Aperistalsis. Ausencia de peristalsis
Peristalsis . Movimiento vermiforme del intestino, una onda de contracciones circulares alternadas.
- Cardiomegalia. Crecimiento del corazón.
- Células reticuloendoteliales. Sistema de macrófagos, fagocitos activos que incluyen partículas, están presentes en los ganglios y retículos de varios tejidos de órganos (bazo, hígado, nodos linfáticos, tejido conectivo, etc.
- Células competentes. Células bacterianas capaces de incorporar DNA exógeno y llegar a transformarse por él. La competencia es una propiedad transitoria de los cultivos bacterianos.
- Cinetoplasto. Estructura circular teñida intensamente DNA⁺ encontrado en parásitos flagelados cerca de la base del flagelo. Es un organelo celular autoreplicativo que contiene DNA, que ordinariamente se divide antes que el núcleo. Según microscopía electrónica es un saco que contiene fibrillas densas que contienen DNA y crestas típicas mitocondriales formadas a partir de la membrana interna.

- Clonación molecular. Inserción de moléculas de DNA de origen procarionte o eucarionte a un vehículo de clonación. El procedimiento empleado para la clonación molecular requiere un vehículo de clonación apropiado para la replicación (plásmido o bacteriofago) y la selección del DNA extraño , una técnica para la unión covalente de los fragmentos de DNA procedentes de diferentes fuentes biológicas, y un método para la introducción de las moléculas híbridas resultantes en bacterias receptoras, sin que se altere sustancialmente la viabilidad bacteriana.
- DNA híbrido o DNA recombinante. ADN generado de la unión covalente de dos moléculas de DNA de diferente origen.
- Duplicación. Cambio de estructura cromosomal resultado de hacer doble una sección del genoma de procariontes y eucariontes. El tamaño del segmento varía.
- Eficiencia de transformación. número de colonias transformadas por μg de DNA.
- Epimastigote. Es el estado de protozoarios flagelados donde el flagelo emerge de la parte anterior del cinetoplasto .
- Haploide. Una sola copia del genoma.
- Heteroxénico. Digenético, subclase de parásito caracterizado por un ciclo de vida complejo que incluye estados de desarrollo en hospedero vertebrado e invertebrado.
- Hibridación: Renaturalización de moléculas de DNA-DNA o

DNA-RNA. La hibridación de ácidos nucleicos se puede usar para determinar si existe homología apreciable, entre una secuencia de prueba y una fracción dada del genoma.

- Isosquizómero. Endonucleasas que reconocen la misma secuencia pudiendo realizar cortes en el mismo lugar o en diferentes lugares y generar extremos de corte compatibles.
- Linfadenopatías. Cualquier desorden que afecte a los nodos linfáticos.
- Marco de lectura abierta. Se establece por la presencia de codones de iniciación, terminación además de tener los tripletes de los codones no desfasados.
- Megacolon. condición extrema de dilatación e hipertrofia del colon.
- Miocarditis. Inflamación del miocardio.
- Morbilidad. Porción de una comunidad afectada por una enfermedad.
- Mortalidad. Porción de una comunidad que muere por una enfermedad.
- Polimorfismo. ocurrencia regular y simultánea en la misma población de dos o más variantes de genomas en frecuencias que no pueden explicarse por mutación recurrente.
- Recombinación génica. Un conjunto de procesos que producen nuevas relaciones de ligamento de los genes o de las unidades de recombinación. La recombinación genética requiere la asociación íntima de dos (o más) genotipos diferentes.

- Reservorio. organismo acarreador de cualquier forma de vida que permite la supervivencia del segundo.
- Retrotransposon. Secuencia de DNA discreta móvil dentro del genoma mediante un intermediario de RNA.
- Tripomastigote. estado de parásitos flagelados donde el flagelo emerge de la parte posterior del cinetoplasto.
- Unidad enzimática para DNasa. Una unidad causa un incremento en absorvancia a 260nm de 0.001 por minuro por ml a 25° C con DNA como substrato.
- Unidad enzimática para DNA ligasa. Una unidad liga 1µg de DNA del fago lambda previamente digerido de forma total con la endonucleasa Eco RI, en 1h a 22° C en 20µl de reacción.
- Unidad enzimática para DNA polimerasa I de E. coli. Una unidad convierte 10 nanomoles de desoxirribonucleotidos en material insoluble en ácido en 30 minutos a 37° C.
- Unidad enzimática para endonucleasas. cantidad de enzima requerida para digerir 1µg de DNA en 60 segundos a 37° C.
- Unidad enzimática para fosfatasa alcalina. cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1.0µmol de fosfato de p-nitrofenol por minuto a 37° C a pH 10.4.y
- Vector. Insecto acarreador de cualquier forma de vida que sea agente infeccioso.
- Vehículo de clonación. plásmido o bacteriofago intacto o modificado al cual se pueden unir covalentemente secuencias de DNA de origen procarionte o eucarionte, que tiene la capacidad de autoreplicarse.

APENDICE

Medios de cultivo y disoluciones.

- Medio de infusión de hígado y triptosa: Infusión de hígado 0.5%, triptosa 0.2%, NaCl 0.4%, KCl 0.4%, Na₂HPQ 0.8%, glucosa 0.2%, suero bovino fetal 10% y hemina 0.0025%.
- Medio Luria: Peptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1% y agar 1.5%.
- Disolución Denhardts: ficoll 400 0.002%, PVP-40 0.002% y albúmina sérica bovina 0.02%.
- Disolución desnaturizadora: NaOH 2% y NaCl 8.7%.
- Disolución neutralizadora: NaCl 8.7% y Tris-HCl 6.6% llevado a pH 7.0
- SSC: NaCl 50mM y citrato de sodio 15mM.
- TBE: Tris-HCl 5.4%, ác. bórico 2.74% y EDTA 0.46%.
- 6,6,0.2: Tris-HCl 6mM (pH 7.4), NaCl 6mM y EDTA 0.2M.

BIBLIOGRAFIA

1. TSIEH SUN, M.D. (1982) Pathology and clinical features of parasitic diseases Ed. Masson Publishing. capítulos 10 y 11
2. VELASCO, C.O., Guzmán, B. C., Cruz, R.J., López, O.O., González, D.H., (1991). La enfermedad de Chagas. Publicación Técnica del INDRE N° 8, México, D.F.
3. DUAICZYK, A., Boyer, H. W. and Goodman H.M. (1975) Ligation of Eco RI endonuclease-generated DNA fragments in to linear and circular structures. J. Mol. Biol. 96: 171-184
4. BORST, P. Fase-Fowler, F. Frasch, A.C.C., Hoeijmakers, J.H.J. and Weijers, P.J. (1980) Characterization of DNA from Trypanosoma brucei and related trypanosomes by restriction endonuclease digestion. Mol. Biochem. Parasitol. 1: 221-246
5. LANAR, D.E., Levy, L. S. and Manning, J. E. (1981) Complexity and DNA content of de DNA and RNA in Trypanosoma cruzi. Mol. Biochem. Parasitol. 3: 327-341.
6. CASTRO, C., Craig, S.P. and Castañeda, M. (1981) Genome organization and ploidy number in Trypanosoma cruzi. Mol. Biochem. Parasitol. 4: 273-282
7. BORST, P., Van der Pleg, M. Van Hoek, J. F. Tas, J. and James, J. (1982) On DNA content and ploidy of Trypanosomes. Mol. Biochem. Parasitol. 6: 13-23
8. JELINEK, W.R. and SCHMID, W.C. (1982) Repetitive sequences in eukaryotic DNA and their expression. Ann. Rev. Biochem. 51: 813-844.
9. KING, R.C. (1976) Handbook of genetics. V. 5 Ed. Plenum Press New York
10. WEINER, A.M., Denninger, P. L. and Efstratiadis, A. (1986) Non viral retroposons: genes, pseudogenes and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information. Ann. Rev. Biochem. 55: 631-661
11. CLARKE, L. and CARBON, J. (1976) A colony bank containing syntetic Col. EI hybrid plasmids representative of entire Escherichia coli genome. Cell. 9: 91-99
12. CAMARGO, E.P., (1964) Growth and differentiation of Trypanosoma cruzi. Origin of metacyclic trypanosomes

- in liquid medium. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 6: 220-224
13. BETHESDA RESEARCH LABORATORIES, Inc. Catálogo de 1986.
 14. MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. and SAMBROOK, J. (1982) Molecular cloning, a laboratory manual. Cold. Spring Harbor, New York
 15. AUSUBEL, F.M. et. al. (1987) Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons, New York
 16. YANISCH-PERRON, C. VIEIRA, J. and MESSING, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUC19 vectors. Gene 33: 103-119.
 17. ROWECAMP, W. and FIRTEL, R.A. (1980) Isolation of developmentally regulated genes from Dictyostelium. Dev.Biol. 79: 409-418.
 18. CASTRO, C., HERNANDEZ, R. and CASTANEDA, M. (1981) Trypanosoma cruzi ribosomal RNA: internal break in the large molecular-mass species and number genes. Mol. Biochem.Parasitol. 2: 219-233
 19. SOUTHERN, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrofóresis. J. Mol. Biol. 98:503-517.
 20. HANAHAN, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmid. J. Mol. Biol. 166: 557-580
 21. JONES, I.M., Primrose, S.B., Robinson, A. and Ettwood, D.C. (1981) Effect of growth rate and nutrient limitation on the transformability of Escherichia coli with plasmid deoxiribonucleic acid. J. of Bact. 146(3):841-846
 22. WINNACKER, E.L. (1987) From genes to clones. VCH, New York.
 23. OLD, R.W. and PRIMROSE, S.B. (1985) Principles of gene manipulation. 3rd. ed. Blackwell Scientific publications. Great Britain
 24. ENGLUND, P.T., Hajduk S.L. and Marini, J.C. (1982) Molecular biology of Trypanosomes Ann.Rev.Biochem. 51(0):695-726
 25. WINCKER, P., ROIZAES, G., and GOLDENBERG, S. (1980)

Characterization of a Trypanosoma cruzi specific nuclear repeated sequence. Mol. Biol. Parasitol. 41: 147-1528

26. MOYZIS, R.K., Bonner, J., Li, D.W. and Tso, P.O.P.(1981) An alternative view or mammalian DNA sequence organization. Repetitive sequence interspersions in Syrian hamster DNA: A model system. J.Mol.Biol. 153: 841-870
27. CHAUDHARI, N. and CRAIG, S.P. (1979) Internal organization of long repetitive DNA sequences in sea urchin genomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76(12): 6101-6105
28. MOYZIS, R.K., Bonnet, K. Li, D. W. and Tso, P.O.P.(1981) An alternative view of mammalian DNA sequence organization SINE into scrambled tandem clusters in Syrian hamster DNA. J. Mol. Biol. 153(4): 871-896
29. PEATERSON, D.H., Gordon, M. and Hardman, N.(1985) Transposon like properties of mayor long repetitive sequence family in the genome of Physarum polycephalum. EMBO J. 4(19A):3557-3562
30. MANING, J.E., Schimidt, C. W. and Davidson, N.(1975) Interspersions of repetitive and non repetitive DNA sequences in the Drosophila melanogaster genome. Cell 4: 141-155
31. CECH, T.R., and Hearst, J. E.(1976) Organization of highly repeated sequences in mouse maind-band DNA. J. Mol. Biol. 100: 227-256
32. WENSINK, P.C., Tabata, S., and Pacht, C.(1979) The clusteres and scrambled arrangement in moderately repetitive elements in Drosophila DNA. Cell 18: 1231-1246
33. CRAIG, S.P., Chaudhari, N. and Steinert, M.(1979) Characterization of long and short repetitive sequences in the sea unrchins. Biochim. Biophys. Acta 565: 33-50
34. BROWN, S.D.M., et. al. (1981) Organization and evolutionary progress of a dispersed repetitive family of sequences in widely separated rodent genomes. J. Mol. Evol. 50: 441-466
35. MUSTI, A.M., Sobieski, D. A,m Chen, B.B. and Eden, F.C.(1981) Repeated deoxiribonucleic acid cluster in the chicken genome contain homologous sequences elementes in scrambled order. Biochemistry 20:2989-2999
36. EDEN, F.C., Musti, A. M., and Sobieski, D. A.(1981)

82

Clusters of repeated sequences of chicken DNA are extensively methylated but contain specific unmethylated regions. J.Mol.Biol.148: 129-151

37. SOARES, M.B., Schon, E. and Efstratiadis, A. (1985) Rat LINE 1: The origin and evolution of a family of long interspersed repetitive DNA elements. J.Mol. Evol. 22:117-133
38. MADHU, J. et. al. (1988) Organization and properties of repeated DNA sequences in rice genome. Plant. Sci. 55(1): 43-
39. BROOKFIELD, J.F.Y. (1982) Interspersed repetitive DNA sequence are unlikely to be parasitic. J.Theor.Biol. 94:281-299
40. DOOLITTLE, W.F. and SAPIENZA,C. (1980) Selfish genes, the fenotype paradigm and genome evolution. Nature 284: 601-603
41. ORGEL, L.E. and CRICK, F.H.C. (1980) Selfish DNA: the ultimate parasite. Nature 284: 603-607
42. SAKAKE, Y. (1987) RNA-mediated (?) Dispersion of L1 family of long interspersed in mammalian genomes. Mol. Biol. Med.4: 193-197
43. JAGADEESWARAN, P., Forget, B.G. and Weisman, Sh. M. (1981) Short interspersed repetitive DNA elements in eucaryotes: transposable element generated by reverse-transcription of RNAPol III transcripts? Cell 26: 141-142
44. DI NOCERA, P.P. and Sakaki, Y. (1990) LINES: a superfamily of transposable DNA elements. Trends in genetics 6(2):29-30
45. CHAUDHARI, N., and Craig, S. P. (1979) The evolution of long and short repetitive DNA in sea urchins. Biochim. Biophys. Acta 562:438-452
46. DAVIDSON, E.H. and BRITTEN, R.J. (1979) Regulation of gene expression: possible role of repetitive sequences. Science204: 1052-1059
47. OHSIMA, M. Kuroiwa, A., Obinata, M. and Natori, S. (1983) Structural organization of the tissue specific middle repetitive sequence of mouse genome. J.Biochem. 93(3): 819-820
48. ANACHLOVA, B. et. al. (1984) Isolation of short repetitive DNA sequences presents in the regions of

- initiation of mammalian DNA replication. Euro. J. Biochem. 141(1): 105-108
49. BRUNK, C.F. et. al. (1982) Reorganization of unique and repetitive DNA sequences during nuclear development in T. thermophila. Can.J.Biochem 60(9): 847-853
 50. SUKERI, C. and HARVEY, F.L. (1981) Repetitive DNA sequences cotranscribed with developmentally regulated Dictyostelium discoideum messenger RNA. Proc. Natl. Acad.Sci. USA 78(9): 5386-5390
 51. LEIBOLD, D., Gary, D. Swegold, M. Singer, F., Swergold, G.D., Singer, M.F., Thayer, R.E., Dombroski, B.A. and Fanning, T.G. (1990) Translation of LINE/1 DNA elements in vitro and in human cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(8): 6990-6994
 52. BRULET, P., Kaghad, M., Xu, Y-S., Croissant, O. and Jacob, F. (1983) Early differential tissue expression of transposon like repetitive DNA sequences of the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80(18): 5641-5651
 53. CANGIANO, G., Amsler, H. Waterston, R. and La Volse, A. (1990) Use of repetitive DNA probes as physical mapping strategy in Caenorhabditis elegans. Nucleic. Acid. Res. 18(17):5077-5082
 54. BIRSHTEN, V.YA. (1981) Do differential staining patterns of amphibian chromosomes indicate structural characteristics of genomic organization of lower vertebrates. Tsitologiya 23(8):843-860
 55. LAW, M. L., Davidson, J.N. and Kao Fa-ten. (1982) Isolation of a human repetitive sequence and its application to regional chromosoma mapping. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79(23):7390-7394
 56. SIRACUSA, L.D. et. al. (1983) Use of repetitive DNA sequence to distinguish Mus musculus and mus caroli cells by hybridization in situ. J.Embryol.Exp.Morphol.73(0) 163-178
 57. GONZALEZ, A., Prediger, E., Huecas, M. E., Nogueira, N. and Lizardi, P.M. (1984) Minichromosomal repetitive DNA in T. cruzi It's high-sensitivity parasite detection assay. Proc. Natl. Acad.Sci. USA 81(1): 3356-3360
 58. CRAIG, S.P. et. al. (1990) Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi: repetitive DNA sequence evolution in three geographically distinct isolates. Comp. Biochem. Physiol.

[B] 95(4):657-662.

59. FRANZEN, L., Shabo, R., Perlman, H., Wiyzell, H., Westin, G., Person, T. and Petterson, U. (1984) Analysis of clinical specimens by hibridization with probe containing repetitive DNA from Plasmodium falciparum. LANCET 326:525-527.
60. HERNANDEZ Rivas, Rosaura; Martínez Calvillo, Santiago; Romero, Mireya and Hernández, Roberto. (1992) Trypanosoma cruzi 5S rRNA genes: molecular cloning, structure and chromosomal organization. FEMS Microbiology letters 92:63-68