

## Tesis de Posgrado

# Caracterización del ADN de dos especies de Calomys (Rodentia, Cricetidae)

Corach, Daniel

1987

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Corach, Daniel. (1987). Caracterización del ADN de dos especies de Calomys (Rodentia, Cricetidae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2040\\_Corach.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2040_Corach.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Corach, Daniel. "Caracterización del ADN de dos especies de Calomys (Rodentia, Cricetidae)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1987.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2040\\_Corach.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2040_Corach.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

CARACTERIZACION DEL ADN DE DOS ESPECIES DE Calomys (RODENTIA, CRICETIDAE)



DANIEL CORACH

1987

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tema de Tesis

Caracterización del ADN de dos especies  
de Calomys (Rodentia, Cricetidae).

Autor

Daniel Corach

Director de Tesis

Dr. Néstor O. Bianchi

Lugar de Trabajo

Instituto Multidisciplinario de Biología Celular  
(IMBICE) - La Plata

Tesis presentada para optar por el título de  
Doctor en Ciencias Biológicas

Año 1987

Reg. 2040

Tesis - 2040

y. 2

## ·AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a la Dra. Lidia Vidal Rioja, quien me introdujo en el apasionante campo de la evolución molecular, al Dr. Néstor O. Bianchi quien con gran generosidad permitió que este trabajo viera la luz, a la Lic. Liliana Semorile y al Dr. Alberto Sarachu quienes, con espíritu crítico sugirieron modificaciones de los manuscritos, permitiendo que el trabajo en su forma final fuera comprensible. A la Dra. Estela Lopretto por sus consejos introductorios. Al Dr. Carlos A. C. Frasch por haber abierto las puertas de su laboratorio para que pudiera concluir numerosos experimentos, brindándome material y valiosos consejos metodológicos; al Dr. Daniel Sánchez, al Dr. Héctor Targovnik y al Dr. Juan Carlos Garberi por el estímulo permanente que me brindaran durante mi paso por el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina. Al Lic. Roberto Macina, quien facilitó la obtención de buena parte de la bibliografía consultada, al Sr. Francisco Propatto por su colaboración, al Prof. César Horgan por parte de los dibujos presentados y a la Dra. Vida Hodara por las fotografías de los especímenes.

A mi esposa Ana y a mis hijos Alejandra y Lucas quienes cedieron incontables horas para que este trabajo pudiera ser concluido.

## INDICE

Pag.

### INTRODUCCION

La sistemática bioquímica .....	3
Consideraciones generales sobre el ADN	
Establecimiento de la función .....	6
La estructura .....	6
Propiedades fisicoquímicas .....	10
ADN: su empleo en sistemática bioquímica .....	13
A - Composición del ADN .....	14
B - Desnaturalización térmica .....	15
C - Ultracentrifugación analítica .....	16
D - Reasociación del ADN .....	18
E - Análisis de restricción .....	21
Los Roedores Cricétidos del Género <u>Calomys</u> .....	23
Consideraciones sobre la Familia Cricetidae .....	27
Origen y antigüedad de los cricétidos sudamericanos .....	27
Importancia evolutiva del género <u>Calomys</u> .....	29
Situación taxonómica del género <u>Calomys</u> .....	30
Estudios citogenéticos .....	30
Estudios alozímicos .....	33
Importancia sanitaria y económica del género .....	33

### MATERIALES Y METODOS

1 - Animales .....	36
2 - ADN .....	36
2.1- Extracción y purificación .....	36
2.2- Criterio de pureza .....	38
2.3- Cuantificación .....	39
2.4- Fragmentación .....	39
2.5- Determinación del tamaño de los fragmentos .....	39

2.6-	Geles de agarosa alcalina .....	40
3 -	Ultracentrifugación isopícnica en gradientes de ClCs .....	41
A -	Equipo empleado .....	41
B -	Preparación de las muestras .....	41
C -	Ejecución del experimento .....	42
D -	Expresión gráfica de los resultados Obtención de parámetros típicos .....	42
4 -	Desnaturalización térmica .....	42
4.1-	Procedimiento analítico .....	42
A -	Equipo empleado .....	43
B -	Preparación de las muestras .....	43
C -	Ejecución del experimento .....	43
D -	Expresión gráfica de los resultados .....	43
E -	Obtención de parámetros típicos .....	44
4.2-	Procedimiento preparativo .....	46
5 -	Cinética de reasociación .....	46
5.1-	Generalidades .....	46
A -	Parámetro Cot .....	47
B -	Condiciones de incubación .....	47
5.2-	Método de hipocromicidad óptica .....	49
A -	Ejecución del experimento .....	49
B -	Cuantificación del ADN reasociado .....	50
5.3-	Método de cromatografía en columnas de hidroxapatita .....	50
A -	Ejecución del experimento .....	50
B -	Cuantificación del ADN reasociado .....	51
5.4-	Expresión gráfica de los resultados, obtención de parámetros típicos .....	51
6 -	Clivaje de ADN con endonucleasas de restricción (ER) .....	52
6.1-	Digestión con ER .....	52
6.2-	Electroforesis .....	52
A -	Equipo empleado .....	53
B -	Procedimiento .....	54
6.3-	Elución de bandas de ADN a partir de geles de agarosa .....	54

	Pag.
7 - Adsorción de ADN a membranas .....	55
7.1- Técnica de transferencia de Southern .....	55
7.2- Técnica de transferencia bidireccional .....	56
7.3- Técnica de Dot-Blot .....	58
8 - Marcación de ADN "in vitro" con isótopos radiactivos .....	58
8.1- Marcación de ADN con <sup>3</sup> H .....	59
8.2- Marcación de ADN con <sup>32</sup> P .....	60
9 - Hibridación de sondas con <sup>32</sup> P-ADN sobre fragmentos de ADN transferidos a membranas .....	60
10 - Hibridación "in situ" .....	62
11 - Hibridación ADN-ADN en solución .....	63
A - Aislamiento de ADN de copia única .....	63
B - Reacción de hibridación .....	64

## RESULTADOS

### Capítulo I

Caracterización fisicoquímica y molecular del ADN de las especies <u>Calomys musculinus</u> y <u>C. laucha</u> ...	68
1 - Extracción y purificación del ADN .....	68
2 - Ultracentrifugación analítica .....	68
3 - Desnaturalización térmica .....	73
4 - Cinética de reasociación .....	78
5 - Patrones de restricción de ADN .....	91

### Capítulo II

Análisis molecular de un componente termoestable presente en el ADN de <u>Calomys musculinus</u> .....	97
Aislamiento del componente termoestable .....	99
Cinética de reasociación del componente termoestable .....	99
Presencia del componente termoestable en especies relacionadas .....	104

	Pag.
Organización, riqueza en G+C y metilación .....	107
Estructura del componente termoestable .....	114
Localización cromosómica del componente termoestable .....	120
 <u>Capítulo III</u>	
Estudios de homología entre ADNs de especies pertenecientes a diferentes géneros de cricéti- dos con distribución argentina .....	123
 <u>DISCUSION</u>	
Capítulo I .....	146
Capítulo II .....	152
Capítulo III .....	156
 <u>CONCLUSIONES</u> .....	 160
 APENDICE 1 .....	 163
 APENDICE 2 .....	 165
 APENDICE 3 .....	 170
 <u>BIBLIOGRAFIA</u> .....	 173

I N T R O D U C C I O N

Las especies del género Calomys (Rodentia - Cricetidae), C.musculus y C.laucha, han sido objeto de especial atención, particularmente desde el punto de vista epidemiológico, constituyendo uno de los géneros de roedores más intensamente estudiados en nuestro país, desde principios de la década de 1960.

En 1959 Parodi y colaboradores postularon la posible relación entre el agente etiológico de la Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA), el Virus Junín, y varios roedores, entre ellos las especies de Calomys antes mencionadas. En 1967 Sabbattini y colaboradores demostraron experimentalmente que C.musculus constituye el reservorio y vector del mencionado Arenavirus.

El estudio de los Calomys no se restringió únicamente a aspectos relacionados con la FHA, sino que abarcó diversas áreas de interés biológico. Se publicaron numerosos trabajos sobre su morfología, etoecología, citogenética, parámetros reproductivos, espermeología y polimorfismos proteicos, así como sus relaciones evolutivas con otros cricétidos taxonómicamente relacionados. Sin embargo, los estudios tendientes a aclarar aspectos relativos al material genético primordial, el ácido deoxirribonucleico (ADN), no han sido abordados hasta el presente.

Este trabajo se encuadra dentro de la sistemática bioquímica. En el mismo se analizan, en primer lugar, algunas características fisicoquímicas del ADN de las especies Calomys musculus y Calomys laucha. En segundo lugar se determinan los niveles de homología entre los ADNs de las especies mencionadas, así como entre éstos y los de otros cricétidos, estableciéndose relaciones filogenéticas tentativas a partir de estas comparaciones.

Los resultados obtenidos durante la caracterización de los ADNs han puesto de manifiesto diferencias entre ambas especies. La detección de un componente con alto grado de estabilidad térmica en el ADN de C.musculus abriría nuevos interrogantes. Las comparaciones de los ADNs altamente repetidos sugerirían procesos de marcada amplificación en las especies de cricétidos analizadas.

## LA SISTEMÁTICA BIOQUÍMICA

El estudio de la diversidad y variación de las moléculas biológicas en diferentes sistemas de organismos constituyen las bases de la Sistemática Bioquímica. Este campo comenzó a desarrollarse hacia principios de siglo, cuando Nuttall (1901) y Bateson (1913) reconocieron que los caracteres bioquímicos podrían emplearse para refinar aspectos de la sistemática -o conocimiento de la diversidad orgánica- vigente. Desde entonces y hasta la década del 50 fueron publicados numerosos trabajos en los que se aportaba al conocimiento de diferencias y similitudes entre organismos, fundamentalmente sobre la base de comparaciones inmunológicas. En la década del 40 y principios de la siguiente ya se habían incorporado nuevas técnicas en favor de los estudios de sistemática bioquímica, tales como la cromatografía y la electroforesis sobre papel. Sin embargo, sus alcances se vieron restringidos dada la baja resolución de los métodos, característica incompatible con los estudios comparativos detallados.

El empleo extensivo de los caracteres bioquímicos en el campo sistemático estuvo, en parte, condicionado al desarrollo de nuevas metodologías, así como a los avances teóricos en el ámbito de la biología molecular, en particular aquellos aspectos referentes a la estructura, función e interacciones de las macromoléculas informacionales (proteínas y ácidos nucleicos).

Las metodologías empleadas inicialmente, tales como la cromatografía cuantitativa sobre papel, la centrifugación en gradientes de densidad, la desnaturalización térmica y los estudios cinéticos de reasociación, aportaron datos "estadísticos" acerca de la composición relativa de nucleótidos y de la organización de las secuencias de ADN de distintos organismos. Este tipo de información permitió la comparación "estática" de los parámetros inferidos a partir de las propiedades fisicoquímicas de los ADNs analizados y aportó nuevos elementos diagnósticos de valor en sistemática bioquímica. Posteriormente se desarrollaron métodos de comparación que podrían considerarse "dinámicos", basados en la detección interespecífica de secuencias nucleotídicas presentes en diferentes

especies de organismos. Estas metodologías, como la reasociación competitiva interespecífica o la hibridación de ADN en solución, permitieron iniciar estudios de homologías, pudiendo establecerse los porcentajes de sustitución de nucleótidos en ADNs de diferentes especies. Si bien estos métodos permitieron comparaciones "dinámicas" no dejaban de ser "estadísticos", dado que tales comparaciones se efectuaban entre el ADN total de determinada especie y el ADN total de otra, o bien entre las secuencias de copia única de dos especies en estudio. Las comparaciones de determinadas secuencias de nucleótidos sólo fueron posibles una vez que se hubieron desarrollado las metodologías de ADN recombinante. Las técnicas de secuenciación hicieron posible la comparación nucleótido a nucleótido, de genes o de secuencias no expresables -como las unidades de repetición de los ADNs satélites- presentes en diferentes organismos, permitiendo así el establecimiento del grado exacto de homología entre tales secuencias. El uso de estas técnicas en experimentos estratégicamente diseñados, tanto con respecto a la elección de las secuencias nucleotídicas a analizar como a los grupos taxonómicos en consideración, posibilitará la formulación de árboles filogenéticos con mínimo sesgo ya que estarán basados de modo específico en componentes determinados del genotipo de los organismos en estudio.

En el presente trabajo de caracterización de los ADNs de las especies Calomys musculus y Calomys laucha, todos los métodos empleados pueden considerarse "estáticos" si aceptamos que el genoma constituye una población de componentes sobre los que enfocamos nuestra atención. De acuerdo con lo expuesto, si tomamos al genoma como una población de pares de nucleótidos, podremos caracterizarla de acuerdo con la concentración relativa de uno u otro par -sólo son posibles los pares AT y GC- en determinado genoma. Asimismo, si consideramos a éste como una población de secuencias con diferente grado de repetición, podremos agruparlas en familias de acuerdo con el grado de redundancia. La cuantificación de estas familias nos permitirá saber con qué frecuencia se encuentran presentes en la población de secuencias que constituye el genoma de una determinada especie.

Los métodos "estadísticos" empleados en este trabajo han permitido comparaciones que pueden ser denominadas "estáticas" o "dinámicas" según el caso. Se entiende por comparaciones "estáticas" aquéllas en las que se comparan los parámetros inherentes a los ADNs de cada especie (v.g. valor de  $T_m$ , densidad de flotación, contenido porcentual de GC, número de familias de secuencias nucleotídicas con diferente grado de repetición, etc). Las comparaciones "dinámicas", por su parte, se basan en las comparaciones de parámetros que surgen de experimentos en los que se analiza el ADN de dos especies en forma simultánea, es decir, experimentos de hibridación de ADN. Este tipo de comparaciones no se fundamenta en meras descripciones de los ADNs de diferentes especies, sino que permite establecer posibles relaciones de parentesco sobre la base de homologías.

## CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE EL ADN

### Establecimiento de la función

En todos los organismos la información hereditaria es almacenada en el ácido deoxirribonucleico (ADN), constituyendo éste el material genético primordial. Esta regla tiene una excepción: algunos virus almacenan su información genética en el ácido ribonucleico (ARN).

Aunque el ADN fue descubierto durante la segunda mitad del siglo pasado por Miescher (1871), recién se lo identificó como portador de la información genética cuando Avery, MacLeod y McCarthy (1944) lograron la transformación hereditaria de cepas no virulentas de Pneumococcus pneumoniae, en formas virulentas. Si bien en la actualidad las conclusiones de Avery y sus colaboradores resultan casi obvias, en el momento de su publicación -plena "Era de las Proteínas"- no tuvieron aceptación inmediata. Algunos investigadores llegaron a sugerir que las muestras de ADN empleadas podrían haber estado contaminadas con trazas de proteínas las que, según ellos, eran las verdaderas responsables de la transformación. El problema fue aclarado, en forma elegante, por Hershey y Chase (1952) quienes, mediante la infección de cultivos bacterianos con bacteriofagos cuyas proteínas y cuyo ADN habían sido marcados en forma radiactiva con  $^{35}\text{S}$  y  $^{32}\text{P}$  respectivamente, demostraron que sólo el ADN ingresaba a las células, en tanto que las proteínas quedaban adsorbidas a la superficie celular.

La función básica del ADN había sido aclarada, pero su estructura era aún desconocida.

### La estructura

James Watson y Francis Crick (1953 a) sugieren un modelo estructural para el ADN, así como las posibles implicancias genéticas del mismo (Watson & Crick, 1953 b). Tanto el modelo tridimensional como el mecanismo de replicación por ellos propuesto fueron confirmados posteriormente, con lo que comenzaba la que podría llamarse "Era de los Acidos Nucleicos".

De acuerdo con el modelo estructural de Watson y Crick el ADN

es una molécula bicatenaria; constituida, cada cadena, por la secuencia de unidades químicas denominadas nucleótidos. Cada nucleótido está compuesto por una pentosa, la deoxirribosa, un grupo fosfato y una base nitrogenada. Los nucleótidos difieren solamente a nivel de las bases nitrogenadas, que son de dos tipos: las purinas y las pirimidinas. Las primeras, representadas por la guanina (G) y la adenina (A), presentan dos anillos heterocíclicos fusionados, uno de seis y otro de cinco átomos. Las pirimidinas, con un único heterociclo de seis átomos, incluyen la citosina (C) y la timina (T). Las bases nitrogenadas se unen al C'<sub>1</sub> de la deoxirribosa por una unión N-glicosídica con el N<sub>1</sub> de las pirimidinas o con el N<sub>9</sub> de las purinas. La unión entre una base nitrogenada y un azúcar constituye un compuesto denominado nucleósido. Si a éste se une un grupo fosfato en el C'<sub>5</sub> de la deoxirribosa, el compuesto se denomina nucleótido (Figura 1).

A lo largo de la cadena polinucleotídica, los nucleótidos se unen por uniones fosfodiéster, donde cada grupo fosfato está covalentemente unido al C'<sub>5</sub> de la deoxirribosa y establece un enlace covalente adicional con el C'<sub>3</sub> del azúcar de un segundo nucleótido. De esta manera el esqueleto de la cadena polinucleotídica resulta en una secuencia alternante azúcar-fosfato, emergiendo las bases nitrogenadas -unidas a la posición C'<sub>1</sub> del azúcar- en forma perpendicular a esta estructura.

Las dos cadenas polinucleotídicas dextrohelicoidales, enrolladas sobre un mismo eje, constituyen una doble hélice. Cada una de ellas presenta una orientación de sus puentes fosfodiéster 3'—5' internucleotídicos opuesta a la de la otra, determinándose así el antiparalelismo de las cadenas. Las bases nitrogenadas se encuentran en el interior de la doble hélice, con sus respectivos planos paralelos entre sí y perpendiculares al eje de la misma. Las bases nitrogenadas de una de las cadenas se aparean, sobre el mismo plano, con las emergentes de la otra cadena. Debido a problemas estéricos, sólo son posibles dos tipos de apareamiento: A-T y G-C, que son precisamente los que presentan una exacta equimolaridad en todos los ADNs estudiados (Chargaff, 1950). Por otro lado debe destacarse que el par A-T está mantenido por dos puentes de hidrógeno,

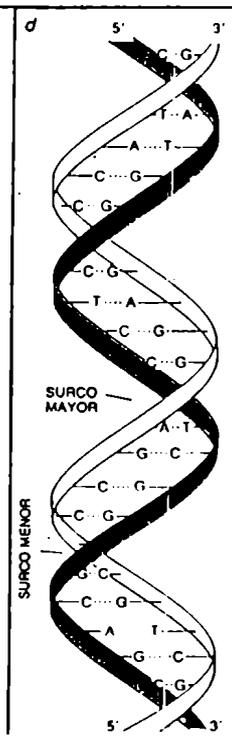
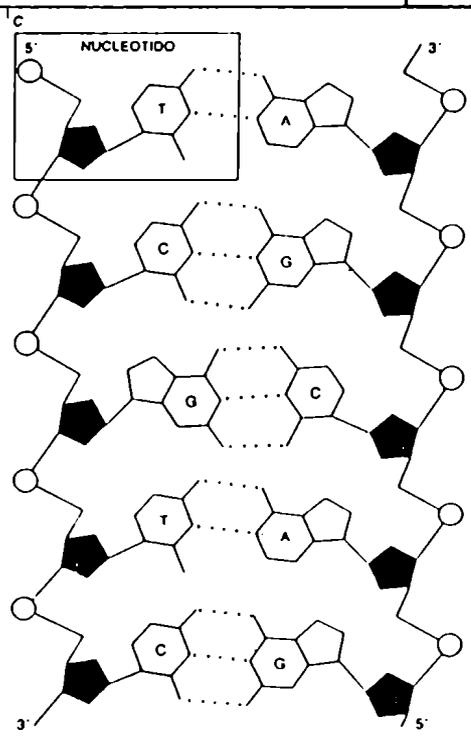
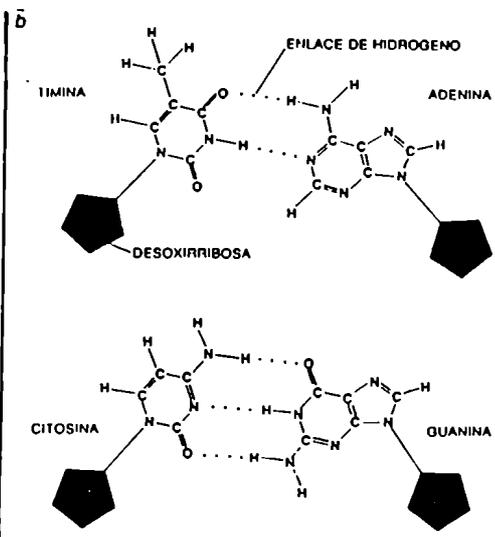
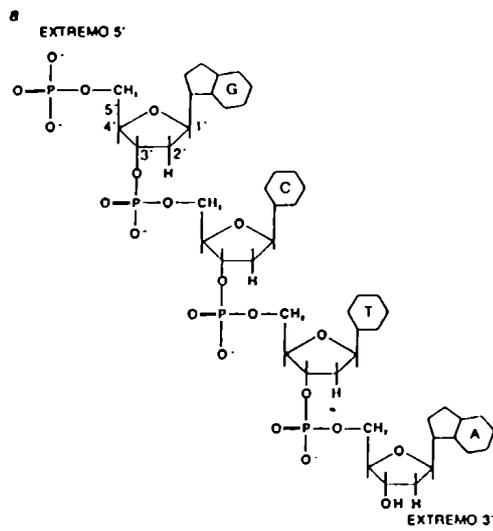


Figura 1. Estructura del ADN.

- a. Cadena de nucleótidos, constituidos por la unión de una pentosa, la desoxirribosa (pentágono con un átomo de O en el vértice superior), un grupo fosfato (estructuras que llevan una P en el centro) y una base nitrogenada: guanina (G), citosina (C), adenina (A) o timina (T).
- b. Naturaleza de los enlaces de hidrógeno que se establecen entre las bases. Adenina se aparea siempre con timina por dos puentes de hidrógeno y guanina lo hace siempre con citosina por tres puentes de hidrógeno.
- c. La estructura bicatenaria mostrada en dos dimensiones.
- d. La misma estructura presentada en tres dimensiones.

en tanto que el par G-C lo está por tres. Las bases purínicas y pirimidínicas son hidrofóbicas, ubicándose en el interior de la doble hélice, en tanto que los restos carbohidratos y fosfatos secundarios, cargados eléctricamente, están expuestos al contacto con el agua. De esta manera la estructura del ADN no sólo está mantenida por los puentes de hidrógeno, sino también por las interacciones hidrofóbicas generadas cooperativamente al apilarse las bases.

Las dos cadenas de la doble hélice no son idénticas, ni en composición ni en secuencia de nucleótidos, pero sí mutuamente complementarias. En efecto, enfrentada a una T siempre habrá una A en la otra cadena, así como enfrentada a una C de una cadena siempre habrá una G en la otra y viceversa. Esta complementaridad sólo puede darse en forma antiparalela, presentando una de las cadenas el sentido 5'—3' -determinado por las uniones fosfodiéster internucleotídicas- y la otra el sentido 3'—5'.

El modelo postulado por Watson y Crick sobre la estructura del ADN les permitió proponer, a la vez, un mecanismo de replicación. Ya que las dos cadenas del ADN son complementarias, tanto en estructura como en información, plantearon que durante la replicación podría producirse la separación de las cadenas de la molécula, constituyendo cada una el molde sobre el que se sintetizaría la cadena hija, complementaria. Como resultado se obtendrían dos moléculas hijas, constituida cada una de ellas por una cadena parental y una sintetizada "de novo" usando aquella como molde. Se plantearon así las bases de la replicación semiconservativa del ADN, posteriormente comprobada en forma experimental por Meselson y Stahl (1958).

### Propiedades fisicoquímicas

El ADN de alto peso molecular, también denominado ADN nativo, presenta alta viscosidad en solución a pH neutro y temperatura ambiente. La elevación de la temperatura de la solución (hasta 95 - 100°C) o el cambio del pH a valores extremos, determinan la rápida disminución de la viscosidad. Tal cambio sugiere que la molécula sufre ciertas alteraciones físicas. Tanto las temperatu-

ras altas como los pHs extremos rompen los puentes de hidrógeno que mantienen apareadas a las bases, así como desestabilizan las interacciones hidrofóbicas que mantienen el apilamiento de los pares de bases en la molécula. Estas alteraciones determinan que la doble hélice pierda su estructura, desenrollándose y separándose las cadenas que la constituyen, pasando a un estado de ovillo al azar. Este fenómeno es denominado desnaturalización ("melting") del ADN. En su transcurso se afectan las uniones de hidrógeno así como las interacciones hidrofóbicas, en tanto que no se alteran las uniones covalentes de cada cadena.

El proceso inverso -la reasociación- puede producirse, bajo condiciones controladas, al descender la temperatura o al llevar la solución a valores de pH próximos a la neutralidad siendo, por lo tanto, un proceso reversible. La reasociación se produce en dos etapas, una lenta y otra rápida; la primera dependerá de que cada cadena encuentre su complementaria, fenómeno afectado por condiciones tales como concentración de cationes en el medio, concentración del ADN desnaturalizado presente y temperatura. Esta etapa concluye una vez que se establece un corto segmento bicatenario, luego del encuentro de las cadenas complementarias por colisiones al azar. La segunda etapa es más rápida, requiriendo que las bases de cada cadena reconozcan a sus complementarias y reformen la doble hélice. La reasociación del ADN sigue una cinética de segundo orden.

Algunas propiedades físicas de los ADNs bicatenarios pueden reflejar su contenido en pares de bases (GC y AT). Al calentar una solución de ADN en forma lenta y controlada, se producirá su desnaturalización (a una temperatura determinada). La transición entre el ADN del estado nativo al desnaturalizado puede ser detectada por el incremento de la absorción de radiación ultravioleta (efecto hipercrómico) o bien por la disminución de la viscosidad de la solución. El ADN de determinado organismo tendrá una temperatura de desnaturalización ( $T_m$ , "melting temperature") característica. El parámetro  $T_m$  puede definirse como la temperatura a la que desnaturalizan el 50% de las secuencias polinucleotídicas presentes en una muestra. Se ha comprobado que existe una relación

directa entre el valor de  $T_m$  y el contenido en pares GC en una muestra determinada de ADN (Marmur & Doty, 1962). Los pares GC son más estables y por lo tanto requieren mayor energía para disociarse que los pares AT, debido a que la guanina y la citosina están unidas por tres puentes de hidrógeno, en tanto que la adenina y la timina sólo lo están por dos. Otra característica física del ADN que se relaciona con el contenido en pares GC es su densidad de flotación. En este caso, como en el anterior, la relación entre el contenido en GC y la densidad de flotación es lineal (Schildkraut et al., 1962). La mayor densidad de los pares GC en comparación con los pares AT se debe también al mayor número de puentes de hidrógeno que mantienen unidos a los primeros.

## ADN: SU EMPLEO EN SISTEMÁTICA BIOQUÍMICA

El ADN puede ser considerado como el material más adecuado para encarar estudios sistemático-evolutivos. Esta consideración se basa en que en dicha molécula se encuentran codificados, en términos de secuencias nucleotídicas, por un lado los genes que luego de ser transcriptos se traducen en las proteínas estructurales y enzimáticas y por otro las secuencias, que pueden o no transcribirse, y que constituyen posibles efectores de los mecanismos de regulación y modulación de la expresión génica. En conjunto, las secuencias codogénicas y las reguladoras -el genotipo- determinarán las características morfológicas, metabólicas y fisiológicas -el fenotipo- de cada organismo viviente.

Por lo tanto, las comparaciones del ADN de diferentes especies de organismos permitirán efectuar estimaciones más precisas de las relaciones evolutivas que los vinculan, que las que podrían emerger de las comparaciones de los productos génicos o bien de los fenotipos en su conjunto.

De acuerdo con lo antedicho, el estudio comparativo del ADN de diferentes especies podría aclarar las posibles relaciones sistemático-evolutivas; no obstante, debido al enorme tamaño del genoma eucariota las comparaciones base a base para el genoma completo son por ahora imposibles. Sin embargo, desde antes del establecimiento de la estructura tridimensional del ADN ya se habían comenzado a analizar las diferencias entre los ADNs de distintos organismos, surgiendo entonces un nuevo criterio diagnóstico para los seres vivos: las características de sus ADNs.

A continuación se comentarán en orden cronológico algunas de las metodologías empleadas en la caracterización del ADN, varias de las cuales han sido usadas en el presente trabajo. De hecho, casi todas ellas fueron inicialmente diseñadas para estudiar problemas funcionales y/o estructurales, siendo su empleo en sistemática bioquímica una adaptación ulterior.

## A. Composición del ADN

Chargaff (1950), mediante el empleo de la cromatografía cuantitativa en papel, estableció las concentraciones molares de los nucleótidos presentes en muestras de ADN obtenidas a partir de diversos organismos procariotas, eucariotas y virus. El uso de esta técnica posibilitó la cuantificación exacta de las concentraciones de nucleótidos presentes en el ADN. Hasta ese momento se aceptaba que los cuatro deoxirribonucleótidos se encontraban en concentraciones equimolares, en todos los ADNs. Las conclusiones de Chargaff modificaron este concepto y ampliaron el espectro de la biología molecular de aquellos días. Sus aportes pueden resumirse tal como sigue:

1. El ADN aislado de distintos órganos de individuos de la misma especie posee igual composición de bases.

2. La composición de bases varía de una especie a otra.

3. La composición de bases de una especie determinada no varía con la edad, ni con el estado nutricional, ni con cambios ambientales.

4. En casi todos los ADNs examinados, la concentración de los restos citosina es igual a la de los restos guanina ( $C = G$ ), así como la concentración de los restos adenina es igual a la de los restos timina ( $A = T$ ), de modo que la suma de los restos purínicos es igual a la suma de los restos pirimidínicos ( $A + G = C + T$ ).

5. Los ADNs de especies muy relacionadas tienen una composición de bases similar, en tanto que en aquellos de especies muy alejadas es probable que sea completamente distinta. De hecho, la composición de bases del ADN puede utilizarse como parámetro en la taxonomía de los organismos.

Las implicancias de las conclusiones son múltiples:

a. Desplaza la "Teoría del Tetranucleótido" (Levene, 1931), según la cual  $A = C = G = T$ . De acuerdo con esta teoría, el ADN presentaba una marcada monotonía, incompatible con la función informacional. A partir de los datos aportados por Chargaff pudo inferirse que el ADN portaba la información genética bajo las secuencias específicas de sus bases nucleotídicas.

b. Las equivalencias de bases establecidas por este autor, jun-

to con los datos de difracción de rayos X, permitieron a Watson y Crick postular el modelo tridimensional del ADN.

c. La universalidad de la regla de las equivalencias, posteriormente comprobada, hizo posible la descripción de la composición relativa de bases de diferentes ADNs en términos de un único parámetro -GC % o AT % -.

Desde el punto de vista de la sistemática bioquímica, los estudios de Chargaff permitieron reubicar especies sobre la base de la concentración relativa de nucleótidos en sus ADNs. Este tipo de análisis tuvo una aplicación de particular importancia en el estudio de procariotas, debido al amplio rango de variación de la concentración relativa de GC (27-78 %), que presentan los ADNs de estos organismos. En vertebrados, en cambio, las variaciones del ADN total respecto de la concentración molar de las bases es mucho más reducida, oscilando entre 40 y 44 %.

La información suministrada por Chargaff, respecto a la concentración molar exacta de nucleótidos presente en ADNs de diferentes organismos, permitió correlacionar el contenido relativo de bases con ciertas características fisicoquímicas del ADN, como por ejemplo el valor de la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) o el valor de la densidad de flotación ( $\rho$ ).

#### b. Desnaturalización térmica

A fines de la década del 50 se publicaron numerosos trabajos en los que se empleaba esta técnica para resolver problemas sobre la estructura y la estabilidad de la molécula de ADN. Años después, Marmur y Doty (1962) establecieron una relación empírica entre el contenido relativo en GC de un determinado ADN y su temperatura media de desnaturalización ( $T_m$ ). El empleo de esta relación permitió obviar las determinaciones de las concentraciones molares de los nucleótidos por métodos cromatográficos cuantitativos, generalizándose su uso como método de diagnóstico taxonómico en bacteriología. Según se mencionara en el párrafo anterior, las bacterias presentan variaciones de amplio rango respecto del contenido relativo en GC, en tanto en los eucariotas es proporcionalmente menor, siendo por lo tanto reducida la variación de los valores

de  $T_m$ . Sin embargo, en eucariotas se detecta una notable variación en la amplitud térmica en la que se produce la desnaturalización, que pone de manifiesto secuencias (probablemente repetidas) enriquecidas en determinados pares de bases. Debido a que las inflexiones mencionadas no se visualizan con facilidad en los gráficos experimentales, se han empleado varios métodos numéricos de derivación (Pivec et al., 1970; Ansevin et al., 1971, 1976, 1983; Gabarro, 1978) que no incrementan la información neta sino que posibilitan la visualización e interpretación de los perfiles de desnaturalización.

Mediante el empleo de parámetros de desnaturalización térmica como:  $T_m$ , amplitud ( $2\sigma$ ), número de transiciones y los correspondientes  $T_{m_i} - T_m$  de los componentes individuales- ha sido posible relacionar diferentes grupos de especies (Guttman et al., 1977; Vidal Rioja et al., 1987 a,b). Esta metodología permite establecer, mediante la comparación de los parámetros intervinientes, relaciones de similitud entre especies, pudiendo considerársela de tipo estadístico y estática.

### c. Ultracentrifugación analítica

Meselson, Stahl y Vinograd (1957) desarrollaron una metodología que permitía establecer el peso molecular y el volumen específico parcial de las macromoléculas, en particular del ADN. La misma se basaba en la sedimentación hasta equilibrio de los biopolímeros disueltos en medios conteniendo sales de bajo peso molecular pero alta densidad, como las sales de cesio ( $CsCl$  o  $Cs_2SO_4$ ). El uso de esta técnica, con ligeras modificaciones, permitió a Meselson y Stahl (1958) comprobar en forma experimental la replicación semi-conservativa del ADN, propuesta inicialmente por Watson y Crick (1953 b).

La alta capacidad resolutive del método permitía la detección de ligeras variaciones en la densidad de flotación de las muestras de ADN en estudio. Dado que los pares GC presentan una densidad mayor que los AT, resultaba posible establecer el contenido relativo de bases en muestras de ADN. Si bien eran aplicables otros métodos para determinar el contenido relativo de nucleótidos, éste

presentaba ciertas ventajas, como el empleo de cantidades mínimas de ADN y el hecho de que éste podía estar impuro.

Schildkraut, Marmur y Doty (1962) establecieron una relación empírica entre el contenido relativo de bases y la densidad de flotación, disponiéndose así de una nueva herramienta en sistemática bioquímica. Los perfiles de sedimentación presentan gran semejanza con aquellos obtenidos por derivación numérica de los datos experimentales de desnaturalización térmica. Según ambos métodos, los ADNs de organismos procariotas presentan una estrecha distribución alrededor de la moda, correspondiente al valor de la densidad de flotación o del  $T_m$  de la muestra en estudio. Sin embargo, la posición de la moda podrá variar, con respecto a su posición en el gradiente o en el rango de temperatura, debido a la gran variación del contenido relativo en GC de estos organismos. Por otro lado, los perfiles de sedimentación del ADN de los eucariotas muestran una marcada estabilidad en cuanto a su densidad de flotación exhibiendo, en cambio, perfiles amplios y heterogéneos y en algunos casos picos u "hombros" diferenciables del componente principal, que representarían los denominados ADNs satélites (ADN sat), inicialmente descritos por Kit (1961). Una vez detectados los ADN sat por métodos analíticos, el aislamiento para su posterior caracterización podía efectuarse por métodos de centrifugación preparativos. A la fecha estos métodos se han simplificado, al desarrollarse sistemas cromatográficos de afinidad -sobre soportes de poliacrilamida acomplexada con verde de malaquita o con rojo fenol- que permiten separar selectivamente fracciones de un determinado genoma enriquecidas en secuencias con predominio en pares GC o AT (Bünemann et al., 1978).

En el área de la sistemática bioquímica, las técnicas de ultracentrifugación analítica han sido intensamente empleadas, en particular con el propósito de efectuar comparaciones entre ADNs de roedores, debido a la gran variación registrada a nivel específico, tanto respecto a la presencia como a las características de los ADN sat.

d. Reasociación del ADN

Según fuera mencionado con anterioridad, el ADN puede restaurar su estructura bicatenaria luego de haber sido totalmente desnaturado. Esta propiedad se basa en el carácter complementario de las cadenas polinucleotídicas. La reacción de reasociación del ADN depende de varios factores, entre otros la concentración de las cadenas desnaturadas, la concentración del catión en el medio y la temperatura de incubación a la que se produce la reacción.

Esta propiedad del ADN fue descubierta por Marmur y Lane (1960), quienes demostraron en forma experimental la naturaleza complementaria de las cadenas polinucleotídicas, presentes en ADNs previamente desnaturados. En sus experimentos, estos autores emplearon criterios funcionales para evaluar la restauración del estado bicatenario en muestras de ADN desnaturado. La pauta funcional empleada era la capacidad transformante de las moléculas -renaturadas- al ser agregadas a cultivos bacterianos deficientes en determinados genes.

La comprensión detallada del proceso de reasociación se logró en base a los estudios cinéticos realizados, entre otros, por Waring y Britten (1965), Subirana y Doty (1966), Subirana (1966), Britten y Kohne (1968), Wetmur y Davidson (1968), Britten y Davidson, (1971), Britten et al. (1974). Estos estudios permitieron establecer, por un lado las bases metodológicas de los análisis de cinética de reasociación del ADN y, por otro, demostrar la compleja organización de los genomas eucariotas.

Aquellos aportes demostraron que el ADN de los organismos superiores está organizado en familias de secuencias nucleotídicas con diferente grado de repetición. Si bien las secuencias de copia única constituyen, en general, el componente mayoritario -alrededor del 60 % del genoma haploide-, el ADN repetido y el altamente repetido representan también una fracción importante del genoma.

Dentro de las familias de secuencias del ADN, las denominadas de copia única incluyen las secuencias codogénicas o exones, las secuencias intervinientes, separadoras o intrones, así como también las secuencias flanqueantes. Algunas de éstas pueden tener funciones reguladoras, como los intensificadores ("enhancers") o

los silenciadores ("silencers") que modulan la expresión génica. Dado que sólo una reducida proporción de las secuencias de copia única son transcritas y traducidas a proteínas, es probable que buena parte de ellas se encuentren relacionadas con procesos regulatorios, aunque en la actualidad se disponga de relativamente poca información al respecto. Entre las secuencias de repetición intermedia se incluyen, entre otras, los genes de las histonas y los del ARN ribosomal. En las secuencias de ADN altamente repetido, en cambio, no ha sido posible la detección de secuencias con función conocida, ni en términos de expresión ni en términos de regulación. El por qué de estas secuencias es tema de intenso debate. Este tipo de ADN ha sido denominado en formas muy diversas por distintos autores. Ohno (1970) por ejemplo, lo califica como ADN "basura", descartando toda posible función del mismo; Flavell (1980, 1982) lo denomina ADN secundario y considera de gran importancia su estudio, dados los posibles papeles que podría desempeñar en varios procesos, ya sean éstos de especiación o evolutivos en general. Por su parte, autores como Doolittle y Sapienza (1980) y Orgel y Crick (1980) asignan al ADN altamente repetido funciones que regularían su propia replicación y lo califican, antropocéntricamente, de ADN "egoísta"

Si bien la función del ADN altamente repetido no resulta aún del todo clara, Bennett (1982) relaciona la presencia de este tipo de secuencias (detectable citológicamente como heterocromatina constitutiva generadora de bandas C) con características adaptativas en ciertos vegetales.

La posición cromosómica de las secuencias altamente repetidas, reconocibles como bandas C o bien por técnicas de hibridación "in situ" -si se dispone de ADN de este tipo aislado- tiende a localizarse en general en zonas involucradas en reordenamientos cromosómicos (v.g. zonas pericentroméricas, telo o subteloméricas). Esta observación podría sugerir dos alternativas: por un lado, que estas secuencias sean el resultado de amplificaciones posteriores a los eventos de reordenamiento o bien que su presencia en determinados sitios cromosómicos determine la producción de ciertos reordenamientos. Estas alternativas permitirían relacionar las secuencias altamente repetidas y los reordenamientos cromosómicos. No obs-

tante, sin entrar en campos hipotéticos y sobre la base de descripciones observacionales, podría asegurarse que estas secuencias juegan un papel importante en cuanto a la plasticidad cromosómica.

El empleo de los datos de cinética de reasociación aportó nuevos parámetros comparativos en numerosos grupos taxonómicos, entre ellos el de los roedores. Este método como los antes mencionados puede incluirse entre los que hemos denominado estadísticos y estáticos. No obstante y sobre las mismas bases metodológicas de los estudios cinéticos, se desarrollaron ulteriores modificaciones que permitieron comparaciones dinámicas entre los ADNs de diferentes especies, sin por ello dejar de permitir comparaciones estadísticas.

Los estudios de homologías de ADN nacieron en la década del 60, cuando Doty y colaboradores (1960), basándose en los experimentos de Marmur y Lane (1960) ya mencionados, examinaron el comportamiento hidrodinámico de moléculas de ADN "híbridas", en gradientes neutros de CsCl, cuyas cadenas polinucleotídicas provenían de ADNs de diferentes especies. Posteriormente Mac Carty (1963) desarrolló una metodología para analizar el grado de homología en ADNs de organismos superiores, mediante la fijación de ADN desnaturalizado a un soporte sólido (agar) al que se permite reasociar con ADN desnaturalizado heterólogo, marcado radiactivamente. Esta técnica fue luego desplazada por otras de mayor eficiencia, pero basadas en los mismos principios.

Los estudios de homologías de ADN se vieron modificados a partir del descubrimiento de que los genomas eucariotas presentan una compleja organización, conteniendo familias de secuencias con grado de repetición variable, así como secuencias de copia única. Este último tipo de secuencias se comenzó a usar en estudios de homologías, por estimarse que estaba más sometido a presiones selectivas intensas. Si bien estas consideraciones acerca del ADN repetido han sido aceptadas en forma casi unánime, se ha demostrado que determinadas secuencias de ADN altamente repetido también presentan un alto grado de conservación.

Los estudios sistemático-evolutivos efectuados en base a comparaciones de homologías entre ADNs heterólogos -de copia única- han aportado información de importancia en el reestablecimiento de fi-

logenias de varios grupos taxonómicos, por ejemplo primates (Sibley & Ahlquist, 1984), roedores (Brownell, 1983) y aves ratites (Sibley & Ahlquist, 1981).

e. Análisis de restricción

Las endonucleasas de restricción -enzimas capaces de reconocer y clivar determinadas secuencias nucleotídicas en el ADN- constituyen herramientas que han posibilitado, en buena medida, el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante. Dicha capacidad enzimática ha puesto también al servicio de la Sistemática Bioquímica un nuevo criterio de aplicación en taxonomía.

En el caso de genomas pequeños (v.g. virales, mitocondriales o bien ADNs de plásmidos) la digestión con enzimas de restricción genera un número relativamente pequeño de fragmentos específicos. Estos fragmentos generan patrones de bandas característicos, al ser separados electroforéticamente. La comparación de estos patrones puede emplearse para establecer el grado de relación entre dos o más ADNs. En el caso de los ADNs eucariotas, los patrones de digestión suelen ser demasiado complejos como para posibilitar la comparación directa, sobre un fondo continuo de fragmentos no resueltos.

El empleo de estas enzimas ha permitido demostrar la organización jerárquica de las secuencias de repetición presentes en la mayoría de los ADN sat estudiados (Botchan, 1974; Southern, 1975a; Roizes, 1976; Carlson & Brutlag, 1977; Endow, 1977; Horz & Zachau, 1977). El uso de estas enzimas constituye, hasta el presente, el único medio de encarar estudios sobre las estructuras jerárquicas en los ADN sat. Por otro lado, la presencia de satélites crípticos puede ser puesta de manifiesto mediante esta metodología (Roizes, 1974).

Hasta este punto de la exposición se han comentado sólo parte de las metodologías de aplicación en Sistemática Bioquímica que emplean el ADN como herramienta de estudio. Ello obedece a que se ha centrado la atención en aquellas metodologías utilizadas en el presente trabajo, omitiendo ex profeso otras muchas, como aquéllas aplicadas en el estudio del ADN mitocondrial -de especial interés

en estudios de polimorfismos poblacionales, sistemática subespecífica y herencia matriarcal- o en el análisis de secuencias presentes en el cromosoma Y -que abren nuevas perspectivas en los estudios de herencia patriarcal-.

## LOS ROEDORES CRICETIDOS DEL GENERO CALOMYS

Las siguientes consideraciones sobre la familia Cricetidae, su posible origen y antigüedad, tienen por objeto presentar y ubicar sistemáticamente al género Calomys. Asimismo se hará referencia a la importancia evolutiva de este género dentro de la subfamilia Sigmodontinae, a los antecedentes taxonómicos, cariosistémicos y alozímicos -que han posibilitado la reubicación sistemática de varias especies del género- y a la importancia sanitaria que revisitan las entidades estudiadas.

Las especies Calomys musculinus (Thomas, 1916) y Calomys laucha (Olfers, 1818), empleadas como modelos experimentales en el presente trabajo, presentan una marcada similitud en cuanto a su aspecto general (Figuras 2 y 3). Ambas presentan el pelaje de longitud mediana, relativamente suave, con manchas blancas postauriculares grandes bien delimitadas. En estas especies no se detectan caracteres morfológicos especializados, relacionables con un tipo de vida determinado. Un aspecto que presenta variaciones apreciables entre los representantes del género Calomys es el tamaño corporal. Las especies que nos ocupan, juntamente con Calomys humelincki, pertenecen a las denominadas "formas chicas", con valores ponderales de alrededor de 20 gramos -en el estado adulto-, en tanto que las "formas grandes" -que incluyen a C. calidus, C. callosus y C. venustus- presentan valores de peso corporal de alrededor de 60 gramos (Figura 4)- en el mismo estado.

Calomys musculinus presenta una amplia distribución en nuestro país. Se han capturado miembros de la especie en: Jujuy (localidad topotípica Maimará), Salta, Tucumán, Catamarca, Mendoza, Córdoba, San Luis y Buenos Aires (Honacki y col., 1982). En fechas recientes el área de distribución conocida se ha ampliado, al capturarse individuos de la especie en Chaco y Chubut (Puerto Madryn) (Merani, comunicación personal). La especie Calomys laucha presenta también una amplia distribución: Paraguay (localidad topotípica Asunción), sur de Brasil, sur de Bolivia, Uruguay y centro de Argentina (Pcias. de Córdoba y Buenos Aires) (Honacki, op. cit.).



Figura 2. Fotografías de especímenes de Calomys musculinus . Superior adultos, inferior hembra con su cría.



Figura 3. Fotografía de especímenes de Calomys laucha. Superior ejemplares adultos, Inferior, adultos y juveniles.



Figura 4. Fotografía de ejemplares de tres especies del género Calomys. El ejemplar de mayor tamaño pertenece a la especie C. calidus. Los ejemplares de las especies C. musculinus (Centro) y C. laucha (derecha) presentan tamaños corporales semejantes entre sí y comparativamente mucho menores que el de la primera especie.

### Consideraciones sobre la familia Cricetidae

La fauna teriológica sudamericana presenta como componente mayoritario, en términos de número de especies, a los miembros del orden Rodentia. Este grupo comprende alrededor del 43 % del número total de especies vivientes. A su vez, en este orden se incluyen representantes de tres taxones: Sciuromorpha, Caviomorpha y Cricetidae. La familia Cricetidae presenta el número mayor de especies (alrededor de 249 agrupadas en 51 géneros) constituyendo así aproximadamente el 22 % de las especies de mamíferos y el 55 % de las especies de roedores sudamericanos (Reig, 1981, 1984).

En la actualidad se acepta que los miembros de la familia Cricetidae, con preponderante distribución sudamericana, forman parte de la subfamilia Sigmodontinae, en tanto que aquellos con distribución mayoritaria en América del Norte pueden agruparse en la subfamilia Neotominae (Reig, 1981). Esta diferenciación no se basa únicamente en criterios zoogeográficos, sino en las claras diferencias anatómicas y morfológicas que presentan los miembros de una y otra subfamilia. Los miembros de la subfamilia Sigmodontinae exhiben caracteres con mayor grado de primitivismo, como la morfología báculo-peneana compleja (Hooper & Musser, 1964), la retención del número completo de las glándulas sexuales accesorias masculinas (Arata, 1964), como así también rasgos ancestrales de la anatomía estomacal (Carleton, 1973).

### Origen y antigüedad de los cricétidos sudamericanos

Tanto el origen como la antigüedad de los cricétidos sigmodontinos constituyen áreas de ardua discusión. Se comentarán brevemente las hipótesis vigentes.

Hibbard (1968) postuló que los cricétidos norte y sudamericanos podrían descender de un antecesor común, diferenciándose durante el Oligoceno o durante el Mioceno más antiguo. Este planteo hipotético es coincidente con investigaciones posteriores. Así los Neotominae podrían haberse diferenciado a partir de un antecesor durante el Mioceno más antiguo, el que a su vez podría haber derivado de cepas cricentinas del Oligoceno de Norte América (Clark et al., 1964; Alker, 1967) o de cepas cricetodontinas emigrantes de Eurasia

(Felbusch, 1967). Los Sigmodontinae, en tanto, podrían haberse diferenciado antes que los neotominos ya que los Oryzomyini -representantes más primitivos de los sigmodontinos- son más primitivos en anatomía dentaria que las formas miocenas antecesoras de los neotominos, compartiendo características evolutivas con cricetodontinos oligocenos de América del Norte y de Eurasia. Sobre la base de las diferencias morfológicas entre los neotominos y los sigmodontinos, así como por el mayor grado de primitivismo de estos últimos, Reig (1981) plantea como hipótesis más verosímil la que sostiene que los Sigmodontinae se diferenciaron directamente a partir de una cepa oligocena de cricetodontinos norteamericanos y que evolucionaron en aislamiento en América del Sur, una vez alcanzado el continente por medio de la dispersión pasiva, posiblemente a principios del Mioceno (Reig, 1972, 1975, 1978, 1980).

En contraposición a la "Hipótesis Antigua" (Reig, 1981) comentada en el párrafo anterior, se han planteado otras alternativas; según se verá aceptan como válido que los cricétidos constituyen un elemento joven en la fauna de América del Sur y que su ingreso se produjo por una ruta dispersiva terrestre desde América del Norte luego del establecimiento del puente panameño (límite Mio-Plioceno ca. 5 millones de años). La diferencia entre las hipótesis reside en la explicación de cómo se produjo la diversificación y divergencia taxonómica de estos inmigrantes recientes. Por un lado, Simpson (1969) y Vorontzov (1968) sugieren la diferenciación local rápida de una cepa invasora generalizada; por otro lado, Hooper (1948), Patterson y Pascual (1968) y Baskin (1978), sugieren que la mayoría de las formas ingresantes se originaron y diferenciaron en las regiones tropicales de América del Norte, invadiendo luego América del Sur como un grupo complejo y diversificado.

Sin embargo, el patrón de distribución de los cricétidos sudamericanos vivientes, junto al mayor grado de primitivismo general de los Sigmodontinae respecto de los Neotominae, podrían constituir argumentos de peso en favor de la "Hipótesis Antigua" planteada por Reig. Por otra parte, esto resulta consistente con el carácter primitivo de la tribu más generalizada de los Sigmodontinae (Oryzomyini) y su estrecha relación con los cricetodontinos.

### Importancia evolutiva del género Calomys

Reig (1981) planteó el empleo de la clasificación tribal de Muroidae, Neotominae como así también de Sigmodontinae. De acuerdo con su propuesta, la subfamilia Sigmodontinae estaría constituida por siete tribus: Oryzomyini, Ichthyomyini, Wiedomyini, Akodontini, Scapteromyini, Sigmodontini y Phyllotini. De éstas, tres son las que presentan mayor número de géneros: Oryzomyini (13), Akodontini (10) y Phyllotini (14), representando el 87 % de los sigmodontinos vivientes, sobre la base del número de especies. Estas tres tribus representan, además, tres grados evolutivos sucesivos, desde una situación primitiva selvática-insectívora hacia la forma de vida vegetariana y de praderas, habiendo ocurrido en cada grado una cladogénesis amplia y significativa (Reig, 1981). Los oryzominos constituyen las formas más primitivas, siendo probable que de ellos hayan derivado los akodontinos, en tanto que el origen de los filotinos podría relacionarse con formas ancestrales derivadas de proto-oryzominos o bien de proto-akodontinos, aspecto que queda aún por ser dilucidado, aunque Pearson y Patton (1976) consideran a los filotinos derivados de antecesores oryzominos basándose en comparaciones cariosistemáticas. Sobre la base de la morfología craneodentaria se considera que los filotinos constituyen las formas más especializadas dentro de los sigmodontinos.

El género Calomys Waterhouse, 1837 probablemente constituye el género filotino viviente más primitivo, dadas las características dentarias (en particular la presencia de molares braquiodontes con crestas) (Reig, 1984), así como por presentar cariotipos "primitivos" en algunas de sus especies (Pearson & Patton, 1976).

La importancia evolutiva del género Calomys resulta evidente. En efecto, la posibilidad de que constituya la forma más primitiva de la tribu más especializada lo ubica en una situación preferencial para encarar estudios evolutivos, ya sea con el propósito de establecer el posible ancestro -proto-oryzomino o proto-akodontino- del que derivaron los miembros de la tribu, así como en procura de analizar los mecanismos evolutivos potencialmente involucrados en el proceso cladogenético.

### Situación taxonómica del género Calomys

El género Calomys ha sido extensamente revisado por varios investigadores (Thomas, 1916; Tate, 1932 a,b; Ellerman, 1941; Cabrera, 1961; Hershkovitz, 1962; Honacki et al., 1982; Reig, 1984), no existiendo acuerdo con respecto al número de especies que lo componen. Debido a que el análisis minucioso de los aspectos taxonómicos del género exceden los objetivos del presente trabajo, comentaremos brevemente la posición de dos autores coetáneos que han tenido una fuerte influencia en los estudios de roedores en nuestro medio. Por un lado Cabrera (1961) reconoce diez especies y diecinueve entidades subespecíficas, en tanto que Hershkovitz (1962) sólo reconoce cuatro formas específicas: Calomys callosus, C. laucha, C. lepidus y C. sorellus, agrupando dentro de la primera mencionada aquellas subespecies con tamaño corporal relativamente grande en comparación con las subespecies incluidas en la segunda especie arriba mencionada.

El panorama de la taxonomía de los roedores sudamericanos dista de ser claro, agravándose la situación en los niveles infragenéricos. No obstante, la incorporación de estudios citogenéticos, bioquímicos y moleculares a los criterios taxonómicos tradicionales ha abierto nuevas perspectivas en el conocimiento sistemático de estos organismos.

### Estudios citogenéticos

A partir de la década del 60 la aplicación de métodos citogenéticos (análisis del número y morfología cromosómicos, establecimiento de cariotipos y aplicación de técnicas de bandeado cromosómico) ha permitido, en nuestro medio, aclarar problemas taxonómicos. El uso de estos métodos ha sido de especial importancia en el caso particular de los roedores debido a la gran variabilidad cariotípica que exhiben.

Massoia y Fornes (1965) y Massoia y col. (1968) sugieren que las subespecies Calomys laucha laucha y C. laucha musculus debían ostentar rango de especie plena sobre la base de las diferencias cariológicas, anatómicas (morfología craneana y peneana) y métricas. Hasta ese momento tales entidades habían sido incluidas en la mis-

ma especie dada su gran semejanza fenotípica. Sin embargo, desde el punto de vista cariológico las diferencias son marcadas. Calomys musculus presenta un número diploide ( $2n$ ) de 38 cromosomas (Masoia y col., 1968; Forcone y col., 1980) en tanto que C. laucha presenta un  $2n$  de 64 (Gardenal y col., 1977a). Por otra parte, la cantidad de heterocromatina, detectable como bandas C es notablemente diferente en ambas especies. Calomys musculus presenta abundantes bandas C pericentroméricas, en tanto que en C. laucha son apenas perceptibles (Vitullo, comunicación personal).

Basándose en caracteres cariológicos, métricos y descriptivos, Contreras y Roig (1976) y Contreras y Rossi (1980) reubicaron la subespecie Calomys laucha cordovens como C. musculus cordovens.

De acuerdo con los datos cariológicos obtenidos de roedores capturados en zonas próximas a la localidad topotípica de Calomys venustus calidus, Vitullo y col. (1984) proponen elevar a esta subespecie al rango de especie plena, bajo el nombre de Calomys calidus. Tal reubicación sería sustentada por la clara diferencia cariotípica entre C. calidus, con valor  $2n = 48$  (Vitullo y col., 1984) y Calomys venustus, con  $2n = 56$ , capturados en Cosquín y analizados por Gardenal y col. (1977). Debe aclararse que Gardenal refiere los roedores capturados en Cosquín a la especie C. callosus, basándose en el criterio de Hershkovitz (1962) quien declaró en sinonimia a C. venustus con C. callosus. Sin embargo, Pearson y Patton (1976) dan a conocer un cariotipo de  $2n = 36$  en ejemplares capturados en Paraguay, en proximidades de la localidad topotípica de C. callosus; esta situación permitiría reestablecer la especie C. venustus para los roedores analizados por Gardenal y col. (op. cit.).

La Tabla I resume algunas de las especies y subespecies aceptadas por Cabrera (1961) en correspondencia con aquellas consideradas por Hershkovitz (1962), su número diploide y el estado taxonómico actualmente aceptado.

El estudio detallado del número y morfología cromosómicos ha permitido a Pearson y Patton (1976) plantear las posibles relaciones evolutivas tanto dentro de los miembros de la tribu Phyllotini en general como entre los miembros del género Calomys en particular.

TABLA I

ESPECIES Y SUBESPECIES RECONOCIDAS POR CABRERA (1961)	ESPECIES RECONOCIDAS POR HERSHKOVITZ (1962)	2n	DENOMINACION VIGENTE	REFERENCIA
<u>C. laucha cordovensis</u>	<u>C. laucha</u>	38	<u>C. musculus cordovensis</u>	Contreras y Rossi, 1980
<u>C. laucha laucha</u>	<u>C. laucha</u>	62 64	<u>C. laucha</u> <u>C. laucha</u>	Massoia y col., 1968 Gardenal y col., 1977
<u>C. laucha musculus</u>	<u>C. laucha</u>	38	<u>C. musculus</u>	Massoia y col., 1968
		38	<u>C. musculus</u>	Forcone y col., 1980
	<u>C. laucha</u>	60	<u>C. humeillincki</u>	Pérez Zapata y col., 1987
<u>C. callosus callosus</u>	<u>C. callosus</u>	36	<u>C. callosus</u>	Pearson & Patton, 1976
<u>C. fecundus</u>	<u>C. callosus</u>	50	<u>C. fecundus</u>	Pearson & Patton, 1976
<u>C. venustus calidus</u>	<u>C. callosus</u>	48	<u>C. calidus</u>	Vitullo y col., 1984
<u>C. venustus venustus</u>	<u>C. callosus</u>	54 56	<u>C. venustus</u> * <u>C. venustus</u> *	H. de Catalfo y col., 1974 Lisanti y col., 1976
<u>C. lepidus</u>	<u>C. lepidus</u>	36	<u>C. lepidus</u>	Pearson & Patton, 1976
<u>C. sorellus</u>	<u>C. sorellus</u>	64	<u>C. sorellus</u>	Pearson & Patton, 1976

\* Vitullo y col. (1984) sugieren que los organismos analizados cariológicamente por H. de Catalfo y col. (1974) y Lisanti y col. (1976) pertenecen a la especie Calomys venustus y no a la especie C. callosus como los anteriores autores consideran.

### Estudios alozímicos

La electroforesis sobre soportes sólidos (particularmente almidón) y la posterior detección, por medio de reacciones específicas, han permitido poner de manifiesto variantes alélicas de un gran número de enzimas. Esta metodología se aplica al análisis intraespecífico y al estudio de la dinámica poblacional de numerosas especies. Por otro lado, su empleo puede poner de manifiesto diferencias interespecíficas, en particular si las especies analizadas guardan estrechas relaciones de parentesco.

En 1980 Gardenal y colaboradores presentaron un estudio del polimorfismo proteico en una población de la especie Calomys musculinus, demostrando que 10 de los 15 loci génicos analizados presentaban polimorfismo (66%) y que, en promedio, la heterocigocidad media era elevada ( $h = 0,20$ ). Asimismo Gardenal y col. (1977b) establecieron que tres especies del género Calomys (C. musculinus, C. laucha y C. callosus) presentan patrones alozímicos específicos de especie, aportando un nuevo parámetro de comparación taxonómica. En 1985, el mismo grupo de investigadores estableció que la proximidad evolutiva, sobre la base de semejanzas y diferencias de los patrones alozímicos, era mayor entre C. laucha y C. callosus ( $I = 0,70$ ;  $D = 0,35$ ) que entre C. musculinus y C. laucha ( $I = 0,66$ ;  $D = 0,41$ ) y que entre C. callosus y C. musculinus ( $I = 0,62$ ;  $D = 0,48$ ). Es preciso señalar que la especie C. callosus a la que hacen referencia los autores podría corresponder a C. venustus de acuerdo con lo sugerido por Vitullo y col. (1984), ya comentado en el ítem anterior.

El análisis combinado de los datos emergentes de diferentes metodologías, citogenética, polimorfismos proteicos y características de los ADNs, juntamente con los datos morfológicos disponibles, permitirían aclarar y definir la situación sistemática del género.

### Importancia sanitaria y económica del género

Los roedores cricétidos en general y las especies del género Calomys en particular, constituyen modelos de gran interés para encarar estudios sistemático-evolutivos debido, en parte, a los motivos comentados previamente. No obstante, el énfasis con que se abordó desde sus comienzos el análisis de diversos aspectos de

la biología de las especies de Calomys, reside en su importancia sanitaria.

El Mal de los Rastrojos o Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) constituye un flagelo que afecta a la población agrícola humana de gran parte de la provincia de Buenos Aires. En 1959, Parodi y colaboradores sugirieron una posible vinculación entre los roedores que habitan las zonas de cultivo y la enfermedad. Posteriormente, Sabattini y colaboradores (1967, 1970, 1977) demostraron que miembros de la especie C. musculinus eran reservorios naturales del Arenavirus: virus Junín, agente etiológico de la FHA. Johnson y colaboradores (1966) establecieron que C. callosus, por su parte, constituía el reservorio natural de otro Arenavirus, el virus Machupo, agente etiológico de la Fiebre Hemorrágica Boliviana.

Por otro lado, en zonas afectadas por tripanosomiasis se han detectado roedores cricétidos infectados naturalmente por el parásito Trypanosoma (Schizotripanum) cruzi (Albesa y col., 1975), en particular C. musculinus (Basso y col., 1977) y C. laucha (Moretti y col., 1980), sugiriéndose que estos roedores podrían constituir otros tantos reservorios de dicho parásito.

Una vez establecidas las vinculaciones entre el virus Junín y sus hospedadores, se intensificaron los estudios ecológicos, incluyendo dinámica de las poblaciones de roedores, condiciones de crecimiento y otros, con especial énfasis en las áreas de incidencia de la FHA (Massoia, 1961; Reig, 1964; Crespo, 1966; Crespo y col., 1970; de Villafaña, 1970, de Villafaña y col., 1977; Kravetz y col., 1981 a, b; de Villafaña, 1981; Hodara y col., 1984).

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

## 1. ANIMALES

Se extrajo ADN de individuos de las especies Calomys musculinus, Calomys calidus, Calomys laucha, Mus musculus, Akodon molinae y Oryzomys flavescens. Los especímenes de C. musculinus, M. musculus y A. molinae fueron suministrados por el bioterio del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE), donde las mencionadas especies se mantienen en condiciones de exocría. Los ejemplares de C. laucha procedieron de capturas realizadas en la provincia de Buenos Aires (localidad de Pila) por el grupo del Dr. Kravetz, quien los cedió gentilmente; los de la especie C. calidus y algunos de C. musculinus fueron suministrados por la Dra. Merani y provenían de la colonia mantenida en el bioterio de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), en tanto que los de O. flavescens procedieron de capturas realizadas en la provincia de Buenos Aires (localidad de Punta Lara) por personal del IMBICE.

## 2. ADN

### 2.1. EXTRACCION Y PURIFICACION

La extracción se realizó de acuerdo a la técnica de Marmur (1961) ligeramente modificada por Arrighi y col. (1970).y Britten y col. (1974).

#### A. Reactivos químicos

Todas las drogas empleadas fueron de calidad pro-análisis.

Solución de NaCl isotónica: NaCl 8 g/l

Solución de EDTA salino (EDTA-S): NaCl 0.15 M y Na<sub>2</sub>EDTA 0.1 M, pH 8.

Solución de dodecil sulfato de sodio (SDS): dodecil sulfato de sodio 25 % (p/v).

Fenol: fundir a 68°C fenol bidestilado y agregar 8-hidroxiquinolina a concentración final 0.1 % (p/v); extraer varias veces con un volumen igual de Tris.HCl 1.0 M (pH 8), seguido de Tris.HCl 0.1 M (pH 8) y 0.2 % (v/v) de 2-mercaptoetanol, hasta que el pH de la fase acuosa sea mayor a 7.6; almacenar esta solución de fenol bajo

buffer de equilibrio (Tris.HCl 0.1 M pH 8) a 4°C.

Perclorato de sodio 5 M.

Urea (sólida)

Mezcla de Sevag: cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 (v/v)

Etanol 95 % (v/v).

Solución de citrato salino concentrada (SSC 10X): NaCl 1.5 M y citrato trisódico 0.15 M, pH 7. A partir de esta solución se prepararon por dilución soluciones SSC 1X y SSC 0.1X

Solución de EDTA-Acetato (EDTA-A): Na<sub>2</sub>EDTA 0.001 M y Na Acetato 3 M.

Alcohol isopropílico.

### B. Enzimas

Solución de proteasa (Sigma P 5130) 10 mg/ml en SSC 0.1X (pre-tratada 2 hs a 37°C para destruir nucleasas contaminantes.

Solución de proteinasa K (Boehringer-Mannheim 161519) 10 mg/ml en SSC 0.1X.

Solución de ribonucleasa pancreática (Sigma R 4875) 2 mg/ml en SSC 0.1X (pretratada a 80°C 10 min para destruir otras nucleasas)

Solución de ribonucleasa T1 (Sigma R 9250) 10000 U/ml en SSC 0.1X

Solución de alfa amilasa (Sigma A 6380) 2 mg/ml en SSC 0.1X

### C. Procedimiento

El ADN se obtuvo de hígado, bazo, riñón y corazón de animales adultos sobreeterizados. Los órganos se extrajeron asépticamente y se lavaron con NaCl isotónico. Todo el material de cirugía, de vidrio y soluciones fueron previamente esterilizados por autoclave.

El procedimiento de extracción de ADN puede resumirse en los siguientes pasos:

i. Homogenización mecánica de los órganos con 10 ml de EDTA-S por gramo de tejido y solución de pronasa a concentración final 0.400 mg/ml. Incubación de la mezcla durante 1 h a 37°C. Agregado de SDS gota a gota hasta concentración final 1 % e incubación a 37°C hasta homogenización total. Agregado de perclorato de sodio a concentración final 1 M e incubación toda la noche a 37°C. Enfriamiento de la muestra a 4°C, adición de urea sólida hasta concentración final 7 M y agitación durante 30 min.

Esta primera etapa tiene por objeto la liberación de las células a partir de los tejidos, su lisis y la disociación de los complejos nucleoproteicos.

ii. Extracción de los ácidos nucleicos -por agitación durante 30 min a temperatura ambiente- con un volumen igual de una mezcla compuesta por partes iguales de fenol y mezcla de Sevag. Centrifugación a 10000 rpm durante 20 min (centrífuga Sorvall, rotor SS34) y recuperación de la fase acuosa viscosa. Repetición de las extracciones con mezcla de Sevag (sin fenol), hasta desaparición de material sólido en la interfase agua-solvente orgánico. Precipitación de ácidos nucleicos, en frío, con 2 volúmenes de etanol 95 %. Recolección de los mismos por enrollado en varilla de vidrio y lavado de las hebras enrolladas en etanol 70 %. Disolución en un volumen apropiado de SSC 0.1X.

iii. Eliminación de las macromoléculas contaminantes (ácidos ribonucleicos, proteínas y glúcidos). Ajuste de la solución anterior a SSC 1X (con SSC 10X) y agregado de ribonucleasa pancreática (concentración final 0.1 mg/ml), ribonucleasa T1 (concentración final 300 U/ml) y alfa amilasa (concentración final 0.1 mg/ml) seguido de incubación a 37°C durante 2 hs. Agregado de proteinasa K (concentración final 0.05 mg/ml) e incubación por 2 hs a 37°C. Extracción, precipitación, enrollado y disolución de los ácidos nucleicos como se indicara en apartado ii.

iv. Purificación final por agregado de EDTA-A (0.1 ml por cada 0.9 ml de solución de ADN y precipitación con alcohol isopropílico, gota a gota (0.54 ml por cada 1 ml de solución de ADN). Enrollado y redisolución en SSC 0.1X. Conservación de la solución a 4°C.

## 2.2. CRITERIO DE PUREZA

La pureza de una solución de ADN se controla por dos procedimientos.

i. Realización de un espectro en la región ultravioleta, desde 220 a 320 nm, en un espectrofotómetro Gilford 250 y observación de picos y valles característicos.

ii. Verificación del cumplimiento de las siguientes relaciones

de absorbencia:  $(A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320}) = 1,83 - 1,87$

$$(A_{260} - A_{320}) / (A_{230} - A_{320}) = 2,20 - 2,30$$

Estas relaciones disminuyen ante la presencia de contaminantes. Particularmente la primera disminuye ante la presencia de proteínas y/o fenol.

### 2.3. CUANTIFICACION

La concentración del ADN en solución se determinó espectrofotométricamente, considerando un coeficiente de extinción específico de 20 ( $l\ g^{-1}\ cm^{-1}$ ) a 260 nm. Una absorbencia igual a 1 corresponde a 0,05 mg/ml de ADN de cadena doble.

### 2.4. FRAGMENTACION

La experimentación en cinética de reasociación e hibridación en solución requieren el empleo de un ADN reducido a fragmentos relativamente cortos. Con el objeto de obtener fragmentos de una longitud de 400-600 pares de bases, el ADN se fragmentó con ondas de ultrasonido. Se utilizó un sonicador Heat Systems W 220 provisto de una micropunta.

La solución de ADN, a una concentración aproximada de 0,25 mg/ml en 0,3 M  $Na^+$ , se colocó en un tubo de polialómero mantenido en agua-hielo y se sometió a ciclos alternados de 10 segundos de sonicación y 1 min de descanso, durante un tiempo neto de sonicación de 5 min. La potencia aplicada se aumentó gradualmente hasta un máximo de 28-30 W.

### 2.5. DETERMINACION DEL TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS

Se efectuó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8 y 1,5 % (p/v). Como marcadores de peso molecular se usaron ADN de fago lambda digerido con HindIII y ADN del plásmido pBR 322 digerido con TaqI respectivamente. Las corridas electroforéticas se hicieron en buffer Tris-borato (TBE) 1X (0,089 M Tris-borato y 0,002 M

EDTA pH 8). Se aplicó una diferencia de potencial de 2 V/cm, durante 3 hs.

## 2.6. GELES DE AGAROSA ALCALINA

Se los utiliza como método para controlar la ausencia de material degradado -de bajo peso molecular- en las preparaciones de ADN.

Todos los materiales necesarios para esta técnica serán descritos en detalle en el apartado 6. El procedimiento seguido, en breve, fue el siguiente:

i. Se preparó agarosa al 1 % (p/v) en NaCl 0,050 M, 1 mM EDTA, se la fundió durante 2 min en horno de microondas, se la dejó enfriar hasta 50°C y se la volcó en el molde. Una vez gelificado se colocó el gel en la cuba de electroforesis, se cubrió con buffer de corrida (NaHO 0,030 M, 1 mM EDTA) y se lo dejó equilibrar durante 30 min.

ii. Se prepararon las muestras de ADN a sembrar en la siguiente solución: NaHO 0,050 M, 1 mM EDTA, 2,5 % Ficoll (Histopaque Sigma), 0,03 % Azul de Bromofenol. Se sembró 1 ug de ADN por camino.

iii. Condiciones de corrida: 30 min a V/cm y luego toda la noche a

iv. Se sacó el gel y se lo neutralizó en Tris.HCl 0,1 M, NaCl 0,3 M pH 7,5.

v. Se coloreó con bromuro de etidio 0,5 ug/ml y fotografió bajo luz ultravioleta.

### 3. ULTRACENTRIFUGACION ISOPICNICA EN GRADIENTES DE CLORURO DE CESIO

#### A. Equipo empleado

Se empleó una ultracentrífuga analítica Spinco, modelo E, provista de un sistema óptico de absorción con fuente de luz ultravioleta y filtro de cloro-bromo que permite el paso de luz de longitud de onda 260 nm.

Se trabajó con dos celdas, en un rotor An D. Se emplearon celdas estándar con pieza central Kel F. Puesto que se trabajó con dos celdas, para obtener fotografías separadas de cada una, en una de las celdas se incorporó una ventana en forma de cuña. De este modo el haz de luz que atraviesa la solución sale desviado con respecto al que pasa a través de la segunda celda. Para facilitar el registro fotográfico independiente del contenido de las celdas se utilizó un accesorio que interrumpe, en forma alternada, el haz de luz que las atraviesa.

Las fotografías se obtuvieron con 2 y 3 min de exposición. Se empleó Film Comercial Kodak 6127. Las fotografías se revelaron con PQ8 (Romek) durante 5 min; luego se las trató durante 15 a 20 min con fijador (Romfix) y se las lavó con agua destilada. Una vez secas, se obtuvieron los densitogramas correspondientes en un densitómetro Analytrol Beckman.

#### B. Preparación de las muestras

Se disolvieron 1,3 g de CsCl (Metallgesellschaft AG, Frankfurt, Alemania) en 1 ml de SSC 0,1X, obteniéndose una solución con índice de refracción 1,400 y densidad 1,707 g/cm<sup>3</sup>. Luego se agregó el ADN en cantidades de 0,0005 a 0,001 mg para el estándar y 0,002 a 0,004 mg para el problema. Sobre una alícuota de la solución resultante se midió el índice de refracción y mediante la relación entre índice de refracción y densidad (Ifft y col., 1961) se calculó la densidad inicial de la solución a centrifugar, con un error de  $\pm 0,001$  g/cm<sup>3</sup>.

Se eligió un ADN estándar que flotara en una posición alejada de aquélla en la que se ubicaría el ADN problema (la densidad de flotación de los ADNs de mamíferos oscila entre 1,70 y 1,71). Se utilizó ADN del bacteriofago SPO 1, cuya densidad de flotación es

alta,  $1,742 \pm 0,001 \text{ g/cm}^3$  (Mandel y col., 1968), debido al reemplazo de timina por 5-hidroximetiluracilo.

### C. Ejecución del experimento

Las celdas se llenaron siempre con el mismo volumen de solución y de modo que el espacio de aire ocupara sólo un 5 % de la altura de la celda. Este volumen es de 0,7 ml por celda.

Las centrifugaciones se efectuaron a 42040 rpm,  $25^{\circ}\text{C}$  y por un período de 22 a 24 hs. Se tomaron fotografías a las 3 hs de iniciada la corrida y al final de la misma. La fotografía de 3 hs permitió visualizar cualquier posible contaminación proteica del ADN, ya que a este tiempo y en las condiciones antes descritas, las proteínas flotan en una zona próxima al centro del gradiente.

Una vez obtenidas las fotografías al final de la centrifugación, se las reveló, fijó y se obtuvieron los correspondientes densitogramas.

### D. Expresión gráfica de los resultados

#### Obtención de parámetros típicos

Las densidades de flotación se calcularon sobre el registro densitométrico, utilizando como referencia la posición del ADN estándar. Sobre dicho registro se determinaron: la longitud de la celda, la posición de equilibrio de las bandas de ambos ADNs (marcador y desconocido) con respecto al tope de la celda y el factor de magnificación que afecta a las medidas anteriores. Conocido el factor de magnificación, las distancias se convirtieron en distancias reales dentro de la celda. Para convertirlas en distancias al centro de rotación, se les sumó la distancia que separa el extremo centrípeto de las celdas del eje de rotación. Obtenidas las distancias radiales y conociendo la velocidad de centrifugación en rad/seg, se estimó el valor de la densidad de flotación por medio de la ecuación de Meselson y col. (1957). El apéndice I contiene el cálculo detallado de la densidad de flotación del ADN de M. musculus.

## 4. DES NATURALIZACION TERMICA

### 4.1. PROCEDIMIENTO ANALITICO

#### A. Equipo empleado

Se utilizó un espectrofotómetro Gilford 250 con salida digital, provisto de un termoprogramador 2527 que permite seleccionar la velocidad de calentamiento de las muestras. Se registró secuencialmente el cambio de absorbencia de tres soluciones de ADN con respecto al solvente y, simultáneamente, la variación lineal de la temperatura en función del tiempo.

La termocubeta utilizada es un bloque de aluminio, calentado y enfriado por efecto Peltier, en el que están insertas las cuatro cubetas de cuarzo. La temperatura de las cubetas se controló a través de un termistor colocado dentro del bloque de aluminio.

#### B. Preparación de las muestras

El ADN, extraído según 2.1, se dializó contra SSC 1X o SSC 0,1X. Se emplearon soluciones de ADN con concentraciones variables entre 0,020 y 0,025 mg/ml. Las cubetas se cargaron con un volumen de 0,25 ml.

#### C. Ejecución del experimento

Una vez cargadas las muestras, se ajustó la temperatura de la termocubeta a 25°C y se leyó la absorbencia inicial de cada una de ellas a 260 nm. A continuación la temperatura se elevó de a 2°C hasta alcanzar 60°C y se registraron las correspondientes absorbencias para cada temperatura. A partir de los 60°C la temperatura se aumentó en forma automática, a razón de 0,5°C/min, hasta alcanzar los 98°C. Para las muestras disueltas en SSC 0,1X el calentamiento continuo se aplicó a partir de los 50°C. Se efectuaron lecturas de absorbencia cada 10 segundos.

#### D. Expresión gráfica de los resultados

Se adoptaron dos formas de graficación de los valores experimentales y la elección de una u otra dependió del posterior empleo de tales gráficos.

Una de las formas consiste en graficar la hipercromicidad ( $H = (A_T - A_{25^{\circ}C})/A_{25^{\circ}C}$ , siendo A la absorbencia a 260 nm) en función de la temperatura (T). Este criterio se adoptó en aquellos casos en que interesaba comparar el nivel de hipercromicidad alcanzado por muestras de ADN sometidas a un mismo tipo de ensayo pero bajo condiciones experimentales distintas (por ej., análisis por desnaturalización térmica de muestras equivalentes reasociadas a distintos

valores de  $Cot$  o de muestras con distinta termoestabilidad a las que se reasoció a un cierto valor de  $Cot$ ).

La otra forma de graficación  $-H\%$  en función de  $T$ - se elige cuando se comparan muestras de ADN nativo procedentes de organismos diferentes. En este caso se considera que los ADNs nativos presentan valores equivalentes de hipercromicidad. Esto permite la normalización de los perfiles (a 100%) y la comparación de las posibles inflexiones de los mismos.

La derivación analítica de los datos de desnaturalización térmica ( $dH/dT$  o  $dH\%/dT$ ), si bien no aporta información nueva tiene la virtud de resaltar ciertas características cualitativas del proceso, permitiendo asimismo cuantificar parámetros tales como temperatura media de desnaturalización térmica, o temperatura de "melting" ( $Tm_i$ ) de componentes individuales. Este análisis de los datos experimentales comprende por un lado la normalización de las curvas -para hacer el estudio comparativo- y por otro el suavizado de las mismas para minimizar el ruido introducido por el equipo durante el experimento. Los datos correspondientes a estos ensayos se analizaron por un programa de computación que se detalla en el Apéndice II.

#### E. Obtención de parámetros típicos

La temperatura media de desnaturalización térmica o temperatura de "melting" ( $Tm$ ) se define como la temperatura correspondiente a la mitad del incremento final en la hipercromicidad o en la hipercromicidad porcentual, según el caso. Por lo tanto, conocido el intervalo de temperatura en el que tuvo lugar la fusión del ADN, a la hipercromicidad correspondiente al final del intervalo se le restó la hipercromicidad correspondiente al principio del mismo. La temperatura correspondiente a una hipercromicidad igual a la suma de la hipercromicidad inicial más la mitad del incremento observado es la temperatura de "melting" o  $Tm$ . Este dato se obtiene de la curva integral.

Los  $Tm_i$  de componentes individuales se obtienen de las curvas derivadas, como las temperaturas correspondientes a picos u hombros en tales gráficos.

Marmur y Doty (1962) establecieron una relación lineal entre los

valores de  $T_m$  y el contenido molar porcentual de bases guanina más citosina (GC). Por medio de esta relación, conocidos los valores de  $T_m$  para los distintos ADN's o para diferentes componentes de un mismo ADN, se calcularon los correspondientes contenidos en GC según:

Muestras disueltas en	Relación
SSC 1X	$\% GC = (T_m - 69,3) \times 2,44$
SSC 0.1X	$\% GC = (T_m - 53,9) \times 2,44$

## 4.2. PROCEDIMIENTO PREPARATIVO

La desnaturalización térmica de una solución de ADN se puede realizar también en forma preparativa, por cromatografía en columna de hidroxapatita (HAP,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). Este procedimiento permite el aislamiento de ciertos componentes con diferente composición en GC, previamente observados en los perfiles derivados de desnaturalización térmica analítica.

La HAP (BioRad Labs) fracciona las moléculas de ADN de acuerdo a su estructura secundaria. El ADN de cadena simple eluye de la columna con buffer de fosfatos (BF) de concentración menor (0,12 M) que el ADN de cadena doble (0,40 M) (Bernardi, 1965).

La columna empleada para la cromatografía es similar a la utilizada por Miyazawa y Thomas (1965). Consiste en una columna de vidrio con camisa, lo que permite su termostatación por circulación de agua. El lecho de HAP se sostiene dentro de la columna por un disco de teflón poroso que, a su vez, descansa sobre un embudo colector de teflón.

El modo operatorio es el siguiente:

i. Pesar la cantidad de HAP necesaria, de acuerdo a la cantidad de ADN que se va a sembrar. Según las especificaciones de los fabricantes, 0,3 g de HAP en polvo se convierten en 1 ml de HAP húmeda empaquetada que adsorben 0,100 mg de ADN.

ii. Lavar la HAP varias veces con BF 0,12 M.

iii. Adsorber la muestra de ADN a la HAP y trasvasarla a la columna.

iv. Incrementar gradualmente la temperatura de la columna. En el caso particular del aislamiento del componente termoestable de C. musculinus la temperatura se incrementó de a 5°C entre 25 y 90°C y luego de a 1°C entre 90 y 98°C. Luego de cada incremento de temperatura eluir con BF 0,12 M (un volumen igual al de HAP empaquetada) el ADN de cadena simple. Para lograr una mayor recuperación del ADN pueden efectuarse dos lavados de la columna para cada temperatura.

## 5. CINETICA DE REASOCIACION

### 5.1. GENERALIDADES

### A. El Parámetro Cot

La reasociación de dos cadenas complementarias de ADN sigue con buena aproximación una cinética de segundo orden (Wetmur y Davidson, 1968). El proceso puede ser descrito por la ecuación:

$$\frac{dC}{dt} = -kC^2$$

donde C es la concentración de ADN de cadena simple, t el tiempo y k la constante de velocidad. Integrando esta ecuación entre los límites de la concentración inicial de ADN ( $C_0$ ) al tiempo  $t = 0$  y la concentración (C) de ADN de cadena simple remanente luego de un tiempo t, se obtiene:

$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{1 + kC_0t}$$

Cuando se completa la mitad de la reacción,

$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{2} = \frac{1}{1 + kC_0t_{\frac{1}{2}}}$$

Por lo tanto,

$$C_0t_{\frac{1}{2}} = 1 / k$$

La reasociación de un ADN particular puede ser descrita por la constante de velocidad, k, o por su recíproca,  $C_0t_{\frac{1}{2}}$ , dado en moles de nucleótidos  $\times 10^{-1} \times \text{seg}$  (M seg). La expresión coloquial "Cot" se usa a menudo para describir el progreso de la reacción de reasociación y del mismo modo, al valor requerido para que se complete la mitad de la reasociación se lo llama " $C_0t_{\frac{1}{2}}$ " (Cot medio). El parámetro Cot permite comparar reacciones llevadas a cabo con concentraciones diferentes de ADN y/o durante distintos períodos de tiempo y combinar los resultados obtenidos en una única representación gráfica.

En la práctica Cot se estima del modo siguiente (Britten y col., 1974):

$$Cot = A_{260 \text{ nm}} (\text{del ADN de cadena simple}) \times t (\text{hs}) / 2$$

Esta relación se emplea cuando la concentración de  $\text{Na}^+$  en el medio de incubación es 0,18 M, correspondiente a BF 0,12M.

### B. Condiciones de incubación

La velocidad de reasociación de un ADN depende de los siguientes factores: concentración catiónica del medio de incubación, pH, viscosidad, temperatura de incubación, longitud de los fragmentos de ADN, contenido de GC del ADN y tamaño de genoma del organismo del cual provie-

ne el ADN. Nos referiremos a continuación a los cinco primeros; la influencia del contenido de GC y del tamaño de genoma serán considerados en la presentación de los resultados.

#### i. Concentración catiónica del medio de incubación

Los cationes, al neutralizar la carga de los grupos fosfato del ADN, facilitan la reasociación de las cadenas separadas. A medida que se incrementa la concentración catiónica del medio de incubación la reacción ocurre más rápidamente. La incubación en  $\text{BF}_0,12 \text{ M}$  (concentración de  $\text{Na}^+ = 0,18 \text{ M}$ ) se elige como condición estándar. Cuando la reacción se lleva a cabo bajo condiciones salinas diferentes, el  $\text{Cot}$  observado está multiplicado por un factor de velocidad; al valor resultante se lo llama  $\text{Cot}$  equivalente o  $\text{CotE}$  ( $\text{CotE} = \text{factor de velocidad} \times \text{Cot}$ , siendo  $\text{Cot}$  el calculado como se mencionó en el apartado anterior). Además de la condición estándar, en este trabajo se empleó  $\text{BF}_0,48 \text{ M}$ , cuyo factor de velocidad es 5,65 (Britten y col., 1974).

#### ii. pH del medio de incubación

A medida que el pH se hace suficientemente alcalino la velocidad de reasociación disminuye debido a la titulación de los protones ácidos de la timina y la guanina en el ADN desnaturalizado. En la práctica, para valores de pH comprendidos entre 5 y 9, la velocidad de reasociación resulta independiente del pH (Wetmur y Davidson, 1968). En este trabajo, los experimentos de reasociación se realizaron a pH 6,8.

#### iii. Viscosidad del medio de incubación

Wetmur y Davidson (1968) observaron que la velocidad de reasociación de un ADN fragmentado disminuye a medida que aumenta la viscosidad del medio de incubación por agregado de solutos de bajo peso molecular (sacarosa, glicerol, etilenglicol). Por el contrario, la velocidad de reasociación de un ADN fragmentado no varía significativamente por adición de solutos macromoleculares tales como ADN nativo (Subirana y Doty, 1966). Además, Laird (1971) demostró que con concentraciones de hasta 3 mg de ADN/ml no hay efecto detectable de la viscosidad (debi- da al ADN) sobre la velocidad de reacción. En este trabajo no se efectuaron correcciones por viscosidad puesto que en ningún caso la concentración de ADN excedió de 3,0 mg/ml.

#### iv. Temperatura de incubación

La temperatura condiciona tanto la velocidad del proceso de reaso-

ciación como la calidad de los pares formados. La velocidad es máxima en el intervalo entre 15 y 30°C por debajo del T<sub>m</sub> del ADN fragmentado (Marmur y col., 1963; Britten y Kohne, 1968). En cuanto a la calidad de los pares, la imperfección en el apareamiento de bases aumenta a medida que la temperatura de incubación se aleja de la temperatura de "melting" del ADN fragmentado. En este trabajo las reacciones de reasociación se realizaron a 60°C para las muestras en BF 0,12 M y a 68°C para las de 0,48 M. El T<sub>m</sub> del ADN fragmentado resultó entre 1 y 2°C menor que el del ADN nativo.

#### v. Longitud de los fragmentos de ADN

La constante de velocidad de reasociación (k) de un ADN fragmentado es proporcional a la raíz cuadrada de la longitud (L) de los fragmentos. Cuando es necesario convertir valores de Cot obtenidos a una cierta longitud de fragmentos en otra, se emplea la ecuación:

$$\text{Cot}_{L_1}^{\frac{1}{2}} = \text{Cot}_{L_2}^{\frac{1}{2}} (L_2/L_1)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{Lewin, 1980})$$

En este trabajo el tamaño molecular de las muestras de ADN se redujo por sonicación y la longitud promedio de los fragmentos obtenidos se estimó mediante electroforesis en geles de agarosa (apartados 2.4 y 2.5)

## 5.2. METODO DE HIPOCROMICIDAD OPTICA

### A. Ejecución del experimento

Las reacciones de reasociación se midieron espectrofotométricamente observando la disminución de A<sub>260 nm</sub> que se produce a medida que reasocia el ADN desnaturalizado. Se empleó un espectrofotómetro Gilford 250, descrito anteriormente.

Para valores de Cot comprendidos entre 10<sup>-3</sup> y 1 M seg las reasociaciones se realizaron directamente en la termocubeta del espectrofotómetro. Se emplearon soluciones de aproximadamente 0,010 mg de ADN / ml. Una vez colocada la muestra en la cubeta se la cubrió con una capa de parafina líquida para evitar la evaporación. La desnaturalización de las muestras se realizó en la misma termocubeta, a 98°C durante 10 min. Luego de la desnaturalización se bajó la temperatura hasta alcanzar la de incubación, haciendo circular agua helada por el circuito de refrigeración. El tiempo requerido para alcanzar la

temperatura de incubación osciló entre 65 y 70 seg. La incubación se siguió por un lapso de aproximadamente 9 hs, hasta alcanzar un Cot de 1 M seg.

#### B. Cuantificación del ADN reasociado

Para cada valor de Cot, el cálculo del porcentaje de reasociación se realizó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de reasociación} = \frac{A_0 - A_{\text{Cot}}}{A_{98} - A_{25}} \times 100, \text{ donde}$$

$A_0 = A_{260 \text{ nm}}$  del ADN cuando alcanza la temperatura de incubación, luego de haber sido desnaturalizado.

$A_{\text{Cot}} = A_{260 \text{ nm}}$  del ADN cuando ha alcanzado un cierto valor de Cot

$A_{98} = A_{260 \text{ nm}}$  del ADN luego de 10 min de desnaturalización

$A_{25} = A_{260 \text{ nm}}$  del ADN nativo, a 25°C.

### 5.3. METODO DE CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE HIDROXIAPATITA (HAP)

#### A. Ejecución del experimento

Las muestras de ADN a reasociar se envasaron en micropipetas de vidrio descartables de 0,02, 0,05 o 0,10 ml selladas por calor y se desnaturalizaron por ebullición durante 10 min. Luego se incubaron a la temperatura adecuada el tiempo correspondiente al Cot analizado. La reacción se detuvo por inmersión de las micropipetas en etanol-hielo seco y posterior dilución de las muestras en BF a concentración final 0,12 M.

El ADN reasociado se separó del ADN de cadena simple por cromatografía en columna de HAP. Las columnas se prepararon en pipetas Pasteur con lana de vidrio como soporte de la HAP. Se usó un lecho de HAP empaquetada de 1 ml (0,3 g de HAP) ya que cada muestra contenía unos 0,100 mg de ADN. Se trabajó con varias columnas simultáneamente, contenidas en un baño de acrílico termostatzado. Antes de adsorber las muestras a la HAP ésta se lavó 5 veces con BF 0,12 M a 60°C. Se sembraron las muestras y de cada columna se recogieron 6 fracciones de 1 ml, eluidas con BF 0,12 M y luego 4 fracciones de 1 ml eluidas con BF 0,40 M, todas a 60°C.

## B. Quantificación del ADN reasociado

La concentración de ADN en las distintas fracciones eluidas se determinó espectrofotométricamente. En las fracciones que contenían ADN no reasociado, la lectura de  $A_{260 \text{ nm}}$  se corrigió por hipercromicidad. La cantidad de ADN por fracción se calculó en base a las siguientes relaciones:

$$\text{ug ADN monocatenario} = \frac{A_{260 \text{ nm}} - A_{320 \text{ nm}}}{20 \times H} \times 10^3 \times \text{vol. eluido}$$

$$\text{ug ADN bicatenario} = \frac{A_{260 \text{ nm}} - A_{320 \text{ nm}}}{20} \times 10^3 \times \text{vol. eluido}$$

donde H es la hipercromicidad. El coeficiente de extinción específico es  $20 \text{ l g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y se emplearon cubetas de 1 cm de paso de luz.

### 5.4. EXPRESION GRAFICA DE LOS RESULTADOS. OBTENCION DE PARAMETROS TIPICOS (Común a ambos métodos)

Los resultados se expresan como porcentaje de reasociación:

$$\% R = \frac{\text{ug ADN bicatenario}}{\text{ug ADN total}} \times 100$$

en función de  $Cot$ . De esta forma se obtuvo la curva experimental de cinética de reasociación para todo el genoma. A partir de ésta se resuelve el número de componentes, su participación porcentual y el valor de  $Cot_{\frac{1}{2}}$  de cada componente. El número de copias presentes en los componentes repetidos se obtiene de la relación entre el  $Cot_{\frac{1}{2}}$  del componente de copia simple y el  $Cot_{\frac{1}{2}}$  de cada uno de los repetidos.

Los puntos experimentales se ajustan a una curva ideal de acuerdo al método propuesto por Ordahl (1977). Por este método la curva total se descompone en cinéticas parciales, expresando cada una de éstas la reacción que seguiría cada componente o familia de ADN si estuviese aislada. Los fundamentos del método de Ordahl y el programa de computación empleado para el análisis de los datos cinéticos se detallan en el Apéndice III.

## 6. CLIVAJE DE ADN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN (ER)

### 6.1. DIGESTION CON ER

Se clivaron muestras de ADN de las distintas especies en estudio con las siguientes endonucleasas de restricción: EcoRI, BamHI, HindIII, HaeIII, AluI, MspI, HpaII, DraI, HinfI, DdeI, RsaI y AvaII, obtenidas de BRL. En cada caso se respetaron las condiciones de reacción sugeridas por la firma suministrante. Todo el material utilizado en las restricciones fue previamente esterilizado. Generalmente se clivaron 1-2 ug de ADN en un volumen final de 20 ul. En ciertos casos se hizo una repurificación previa de los ADNs a ser clivados, reprecipitándolos con 2 volúmenes de etanol absoluto en presencia de  $(\text{NH}_4)\text{Ac}$  2,5 M. Las muestras se dejaron toda la noche a  $-20^\circ\text{C}$  y los ADNs se recuperaron por centrifugación 1,5 hs a 10000 rpm. El precipitado se secó por vacío y se redisolvió en un volumen adecuado de agua bidestilada o de buffer TE (Tris.HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,6). Cuando el volumen de reacción fue superior a 20 ul, las muestras digeridas se precipitaron y redisolvieron en un volumen menor. La precipitación se hizo con 2,5 volúmenes de etanol absoluto en presencia de NaAc 0,25 M, 0,025 M EDTA, pH 5,2.

Con el objeto de determinar la abundancia de sitios de restricción presentes en el ADN genómico, en determinados casos se efectuaron "cinéticas de restricción". Se clivaron 10 ug de ADN con las correspondientes unidades enzimáticas, en un volumen final de 100 ul. Se tomaron alícuotas de 20 ul cada una a los siguientes tiempos de reacción: 7,5, 15, 30, 60 y 120 min y se detuvo la reacción por agregado de EDTA 0,5 M, pH 7,5 a concentración final 10 mM y posterior congelamiento de la muestra hasta el momento de la electroforesis.

### 6.2. ELECTROFORESIS

La electroforesis en geles de agarosa de muestras de ADN clivadas con ER permite la separación por tamaño de los productos obtenidos. La velocidad con que las moléculas de ADN se mueven a través del gel

depende principalmente de su tamaño, siendo las más pequeñas las que poseen mayor movilidad.

La concentración de agarosa en el gel debe elegirse de acuerdo al intervalo de tamaños de moléculas a ser separadas. Por ejemplo, geles de agarosa al 0,3% separan moléculas de ADN lineal entre 5 y 60 kilobases (kb) en tanto que geles al 2% son más satisfactorios para resolver tamaños entre 0,1 y 3 kb.

Cuando es necesario estimar el tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos, se emplean marcadores de peso molecular -ADNs de plásmidos o bacteriófagos digeridos con ER- y se grafican las distancias migradas por los distintos fragmentos en función del logaritmo de los pesos moleculares. En un intervalo limitado de tamaños moleculares se obtiene una línea recta cuya pendiente cambia según la concentración de agarosa empleada en el gel (Maniatis y col., 1982). Los tamaños desconocidos se estiman por interpolación.

#### A. Equipo empleado

i. Aparato para electroforesis: consta de tres partes, cuba, molde y peine. El tamaño del molde y la cantidad y ancho de los dientes del peine dependen de las necesidades particulares. La cuba consta principalmente de dos reservorios profundos para el buffer, unidos por una sección central poco profunda donde se coloca el gel, que queda sumergido en el buffer durante la electroforesis. A este sistema se lo denomina gel submarino y la altura de líquido sobre el gel es de unos 3 o 4 mm.

ii. Fuente de poder: una fuente común que entregue hasta 500 V. Para obtener una resolución máxima de los fragmentos de ADN se aplica inicialmente una diferencia de potencial de 10 V/cm hasta que las muestras entran al gel (1-2 min) y luego 2 V/cm durante el tiempo necesario.

iii. Transiluminador: Spectroline Mod. TR 302. Deja pasar luz próxima a los 302 nm, lo que da máxima sensibilidad y mínimo foto-daño en el ADN.

iv. Cámara fotográfica: Praktica MTL 5B (Pentacon; Rep. Dem. Alemana) con lentilla de aproximación Cozo (Japón) N°1, 49 mm y filtro naranja Cozo (Japón) 056, 49 nm. La cámara se ubica a unos 30 cm sobre el gel. Se utiliza diafragma 5,6 y los tiempos son de 10, 15 y 30 segun-

dos. Se emplea película Panatomic X de Kodak, la cual se revela 3 min en revelador Dektol (1:4) y se fija 3-5 min en fijador Romfix (1:4).

#### B. Procedimiento

i. Pesar la agarosa (BioRad N<sup>o</sup> 162-0102) y agregar la cantidad necesaria de buffer TBE 1X (0,089 M Tris.Borato, 0,002 M EDTA, pH 8) con 0,5 ug/ml de Bromuro de Etidio. Fundir durante 2 min en horno de microondas.

ii. Dejarla enfriar a 50<sup>o</sup>C y volcarla en el molde en el que previamente ha sido ubicado el peine. Dejar gelificar 20 min y retirar el peine.

iii. Colocar el gel en la cuba y controlar que quede cubierto con el buffer de electroforesis (TBE 1X + 0,5 ug/ml de Bromuro de Etidio)

iv. Sembrar con micropipeta los ADN clivados, a los que se ha adicionado 3-4 ul de buffer de muestra (0,1 % (p/v) Orange G, 20 % Ficoll, 10 mM EDTA, pH 7).

v. Aplicar el voltaje anteriormente indicado durante el tiempo necesario para que el frente de corrida llegue al final del gel.

vi. Observar el gel en el transiluminador y fotografiar.

#### 6.3. ELUCION DE BANDAS DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA ("Freeze-Squeeze Method"; Gaastra y Jørgensen, 1984)

El procedimiento anteriormente descrito es esencialmente analítico, aunque puede usarse para recuperar, a partir del gel, pequeñas cantidades (menos de 1 ug) de un fragmento de ADN particular. Los pasos a seguir son los siguientes:

i. Colocar el gel sobre el transiluminador y cortar la banda con bisturí. Levantar el trocito de agarosa y colocarlo en 2,5 ml de NaAc 0,3 M pH 7,2. Dejar reposar 20 min. Volver a fotografiar el gel para comprobar que se ha sacado la banda.

ii. Agujerear la base de un tubo tipo Eppendorf de 0,4 ml y colocar lana de vidrio siliconada cubriendo el orificio. Colocar este tubo dentro de otro tubo Eppendorf de 1,5 ml.

iii. Colocar el trozo de gel sobre la lana de vidrio y llevar el sistema a  $-20^{\circ}\text{C}$  toda la noche para destruir la estructura del gel.

iv. Centrifugar el sistema en microcentrífuga durante 10 min. Esto permite transferir al buffer conteniendo el ADN desde el gel hacia el fondo del tubo exterior. Repetir la operación cuatro veces.

v. Medir el volumen de líquido drenado y hacer una primera extracción con fenol (equilibrado con Tris.HCl 0,1 M, pH=8) para remover restos de agarosa de la solución. Hacer una segunda extracción con mezcla de Sevag y una tercera con éter saturado con agua.

vi. Precipitar el ADN con 2 volúmenes de etanol absoluto en presencia de  $(\text{NH}_4)\text{Ac}$  2,5 M. Dejar a  $-20^{\circ}\text{C}$  toda la noche y centrifugar 1 h a 10000 rpm. Secar el precipitado por vacío y disolver en agua o en buffer TE.

vii. Usar una alícuota de la muestra para electroforesis y controlar la efectiva recuperación del material deseado.

## 7. ADSORCION DE ADN A MEMBRANAS

### 7.1. TECNICA DE TRANSFERENCIA DE SOUTHERN ("Southern blot"; Southern, 1975b)

El propósito de esta técnica es permitir la detección de secuencias específicas en el ADN genómico para su posterior caracterización. El procedimiento es el siguiente:

i. Digerir 1-2  $\mu\text{g}$  de ADN con una ER y separar los fragmentos obtenidos por electroforesis en gel de agarosa según se indicó anteriormente.

ii. Fotografiar el gel bajo luz UV.

iii. Depurar parcialmente el ADN con HCl 0,25 M. Colocar el gel en una caja plástica con 500 ml de la solución de HCl, a temperatura ambiente. Agitar suavemente durante 30 min. Este procedimiento depurina el ADN aproximadamente una vez cada 500 pares de bases, lo que facilita la posterior hidrólisis alcalina y transferencia del ADN de alto peso molecular. Transcurrido el tiempo de depuración

lavar el gel 2 veces con agua destilada.

iv. Desnaturalizar con solución de NaHO 0,15 M, NaCl 1,5M durante 1 h, agitando suavemente. Decantar la solución desnaturalizante y lavar 2 veces el gel con agua destilada. Neutralizar con solución de Tris.HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M, pH 7,2 durante 1 h.

v. Colocar el gel en el dispositivo de transferencia (Figura 5a) que se llena hasta sus 2/3 partes con SSC 20X. Previamente, la hoja de nitrocelulosa (NC; Millipore 0,45  $\mu$ m o Schleicher & Schuell BA 85, 0,45  $\mu$ m) ha sido humedecida en SSC 2X. Apoyar la membrana sobre el gel y cuidar que no queden burbujas de aire atrapadas. Cubrir la nitrocelulosa con 3-4 hojas de papel de filtro (Whatman 3MM) húmedo y otras 8-10 hojas secas. A continuación colocar una pila de 4-5 cm de toallas de papel, sobre éstas un vidrio y sobre el mismo un peso de 500 g. Dejar la transferencia a temperatura ambiente de 12 a 16 hs.

vi. Retirar con cuidado las toallas de papel y el papel de filtro y levantar la membrana, separándola del gel. Lavarla unos minutos en SSC 2X, colocarla en un sobre de papel de filtro y hornearla 2 hs a 80°C. Guardarla hasta el momento de realizar la hibridación.

vii. Humedecer el gel 30 min en agua con 1  $\mu$ g/ml de Bromuro de Etidio. Fotografiarlo en el transiluminador para controlar la transferencia.

## 7.2. TECNICA DE TRANSFERENCIA BIDIRECCIONAL (Figura 5b)

Esencialmente es similar a la anterior, excepto que aquí se hace transferencia del ADN hacia dos membranas colocadas encima y debajo del gel de agarosa. Esto da la posibilidad de disponer de dos copias idénticas del material digerido.

Para las transferencias bidireccionales se digieren de 2 a 4  $\mu$ g de ADN y la depuración y desnaturalización se efectúan como se detalló en 7.1. Para la neutralización, en este caso se emplea solución de  $(\text{NH}_4)\text{Ac}$  1 M, NaHO 0,02 M, durante 1 h.

Una vez neutralizado, se deposita el gel sobre una membrana de NC (previamente humedecida en  $(\text{NH}_4)\text{Ac}$  1 M) que a su vez descansa so-

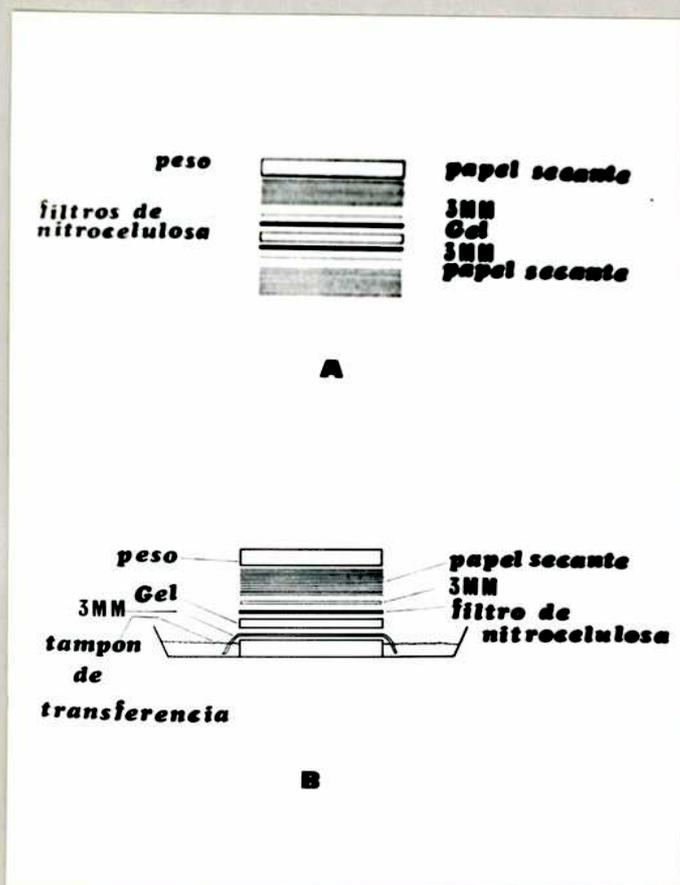


Figura 5. Dispositivo de transferencia a membranas de nitrocelulosa.

- a- transferencia bidireccional
- b- transferencia unidireccional

bre 3 hojas de papel Whatman 3MM húmedas, 8 hojas secas y 4 cm de papel secante. Sobre la cara superior del gel se coloca otra membrana de NC y sobre ésta las hojas de papel Whatman 3MM y la pila de papel secante. El resto del procedimiento es igual al anterior.

### 7.3. TECNICA DE "DOT BLOT" (Kafatos y col., 1979)

Posibilita la estimación semicuantitativa y simultánea de la abundancia relativa de determinadas secuencias en muestras múltiples de ADN. Si la hibridación de estas membranas se hace bajo condiciones progresivamente más estrictas, el método permite una evaluación semicuantitativa del grado de similitud entre secuencias homólogas. Este enfoque es aplicable a estudios de evolución a nivel de ácidos nucleicos.

Muestras de ADN de especies diferentes se cuantifican espectrofotométricamente y se diluyen para obtener alícuotas que contengan 1, 5, 10, 20, 40, 80, 160 y 230 ng de ADN en un mismo volumen de agua. Estas alícuotas se desnaturalizan a temperatura ambiente con NaOH (concentración final 0,5 M) durante 20 min. A continuación y sobre hielo, se neutralizan con Tris.HCl pH 7,5 (concentración final 0,5 M) y se llevan a SSC 10X (concentración final). Posteriormente se filtran sobre membranas de NC (humedecidas en SSC 10X) colocadas en un dispositivo de filtración múltiple, con presión negativa, del tipo "Hybri-dot" (BRL). Filtradas las muestras, la membrana se lava 5 min con SSC 3X y se seca 2 hs a 80°C.

### 8. MARCACION DE ADN "IN VITRO" CON ISOTOPOS RADIATIVOS (Método de "nick translation"; Balmain y Birnie, 1979)

La reacción consiste en reemplazar nucleótidos "fríos" por nucleótidos "marcados" dentro de una cadena de ADN en la que se introdujeron cortes ("nicks") por acción de la deoxirribonucleasa I. La ADN polimerasa I, de Escherichia coli, cataliza la adición de nucleótidos "marcados" al extremo 3' HO libre del corte. Al mismo tiempo, debido a la actividad exonucleasa 5'-3' de esta enzima, será elimi-

nado el nucleótido unido al extremo 5' PO<sub>4</sub> de dicho corte. El corrimiento del corte ("translation"), en dirección 3' dará por resultado la adición secuencial de nuevos nucleótidos de ADN mientras son removidos los preexistentes. Se puede llegar a reemplazar hasta un 50 % de los nucleótidos presentes en el ADN, obteniéndose una actividad específica uniforme a lo largo de la molécula.

### 8.1. MARCACION DE ADN CON <sup>3</sup>H

- i. Secar bajo atmósfera de nitrógeno, en tubo Eppendorf 30 ul de cada uno de los nucleótidos radiactivos: <sup>3</sup>H dTTP (NET 221X/NET 221H, New England Nuclear, actividad específica = 79 Ci/mmol) y <sup>3</sup>H dCTP (NET 369, New England Nuclear, actividad específica = 30,1 Ci/mmol). Esto equivale a 0,21 ug de <sup>3</sup>H dTTP y 0,54 ug de <sup>3</sup>H dCTP.
- ii. Redisolver los compuestos anteriores por el agregado de:
  - 5 ul de solución salina 10 X (Tris.HCl 1 M pH 7,8; MgCl<sub>2</sub> 0,75 M; 2-mercaptoetanol 0,5 M y seroalbúmina bovina (BSA) 5 mg/ml)
  - 8 ul de dGTP (2,032 ug)
  - 8 ul de dATP (2,144 ug)
  - volumen necesario de ADN como para 1 ug
  - volumen de H<sub>2</sub>O bidestilada para completar 45 ul
- iii. Iniciar la reacción por agregado de 5 ul de solución C del "nick translation reagent kit" (BRL 8160 SB) que contiene ADN pol I y ADNasa I. Mantener la mezcla a 15 °C durante 1 h.
- iv. Detener la reacción por agregado de 5 ul de EDTA 0,1 M, 5 ul de SDS 10 % (p/v) y 2 ul de tARN 10 mg/ml. Congelar la muestra a -20 °C.
- v. Purificar la muestra, eliminando nucleótidos no incorporados y oligonucleótidos, por cromatografía en columna de Sephadex G 50 (Pharmacia; rango de fraccionamiento PM 5000 - 30000). Emplear una columna construida con una pipeta Pasteur de 97 mm de longitud y 5,2 mm de diámetro que se carga con Sephadex G 50 hidratado en Tris.HCl 0,01 M pH 7,5, hasta una altura de 88 mm. Lavar con 10 volúmenes de columna, en alícuotas de 200 ul, con Tris.HCl 0,01 M pH 7,5. Cargar la muestra y lavar la columna con 25 fracciones de 200 ul cada una de Tris.HCl 0,01 M pH 7,5. Determinar en cada fracción las cuen-

tas por min (cpm) de material precipitable con ácido tricloroacético (TCA). En un ensayo típico, la mayor parte del ADN radiactivo se recupera en las fracciones 5, 6 y 7 y se obtienen actividades específicas que oscilan entre 1 y  $3 \times 10^6$  cpm/ug.

Las muestras de  $^3\text{H}$  ADN se emplearon para ensayos de hibridación "in situ" y de hibridación ADN/ADN en solución.

## 8.2. MARCACION DE ADN CON $^{32}\text{P}$

Es esencialmente igual al método anterior. El nucleótido radiactivo usado es  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$  dCTP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol, solución acuosa, New England Nuclear) y la cantidad de ADN marcado por ensayo es aproximadamente 0,5 ug.

i. Pipetear en un tubo Eppendorf estéril:

- 5 ul de buffer 10 X (Tris.HCl 0,5 M pH 7,8;  $\text{MgCl}_2$  0,05 M; 2-mercaptoetanol 0,1 M; BSA 0,1 mg/ml)
- 5 ul de solución 0.2 mM de cada uno de los nucleótidos no radiactivos, d GTP, d ATP y d TTP.
- 10 ul de  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$  d CTP
- 5 ul de solución C del "nick translation reagent kit" (BRL 8160 SB) (ADN pol I y ADNasa I)
- volumen de  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada estéril para completar 50 ul

ii. Incubar 1 h a  $15^\circ\text{C}$  y detener la reacción por agregado de 5 ul de EDTA 0,5 M.

iii. Proceder como se indicó anteriormente para purificar la muestra por cromatografía en columna de Sephadex G 50.

iv. Determinar la actividad específica.

## 9. HIBRIDACION DE SONDAS DE $^{32}\text{P}$ ADN SOBRE FRAGMENTOS DE ADN TRANSFERIDOS A MEMBRANAS

El  $^{32}\text{P}$  ADN es la sonda o "probe" cuyas secuencias específicas reasociarán con sus complementarias transferidas a una membrana, si es que allí las hubiera, permitiendo así localizar la posición de

las mismas. Esto posibilita la identificación de secuencias particulares en restricciones de ADN genómico eucariota.

El procedimiento de hibridación consta de las siguientes etapas:

i. Prehibridación de las membranas -que contienen los fragmentos transferidos- por incubación durante 2 a 4 hs, a 65°C, en alguna de las dos soluciones que se detallan a continuación:

- Solución BLOTTO (Bovine Lacto Transfer Technique Optimizer; Johnson et al., 1984): leche deshidratada no grasa (La Sereñísima) 0,25 % (p/v) en SSC 6 X
- Solución de prehibridación: SDS 0,5 % (p/v); solución Denhardt 5 X; ADN de esperma de salmón 100 ug/ml; EDTA 0,01 M en SSC 6 X.

Una solución Denhardt 100 X contiene: seroalbúmina bovina 0,2 % (p/v) (fracción V, Sigma); polivinilpirrolidona (PVP-360, Sigma) 2 % (p/v); Ficoll 400 (Pharmacia) 2 % (p/v)

La solución madre de ADN de esperma de salmón es de 2 mg/ml. Una vez preparada se sonica (longitud promedio de los fragmentos, 600 pb), se desnaturaliza a 100 °C 10 min y se enfría en hielo. Este ADN se emplea como ADN no homólogo para saturar los sitios de unión no usados en la nitrocelulosa. Cuando la prehibridación se hace en solución de BLOTTO, la leche es fuente de proteínas y ácidos nucleicos para bloquear reacciones no específicas.

ii. Hibridación con la sonda radiactivamente marcada con  $\alpha$  <sup>32</sup>P d CTP (alrededor de 500 pg). Para la detección de secuencias de copia única en ADN genómico la actividad específica de la sonda no debe ser menor de  $1 \times 10^8$  cpm/ug. Para detección de secuencias repetidas puede ser menor. La hibridación puede hacerse en una caja plástica con tapa o en bolsas plásticas selladas. La sonda se desnaturaliza a 100 °C 5 min y se enfría en hielo. Se agrega a la mezcla de hibridación, que es la misma que la de prehibridación.

iii. Colocar las membranas en esta mezcla e incubar a 65 °C con agitación suave, el tiempo necesario (puede oscilar entre 12 y 48 hs). Este tiempo dependerá de la actividad específica de la sonda y de que se trate de secuencias de copia única o repetidas. La velocidad de hibridación puede incrementarse por agregado de sulfato de dextrán a la mezcla de hibridación.

iv. Lavar las membranas en las condiciones de concentración salina y temperatura que correspondan de acuerdo al grado de homología entre la sonda y la muestra de ADN. Si la homología es baja, los lavados se llevarán a cabo en condiciones menos estrictas (alta concentración salina y baja temperatura). Si el porcentaje de homología es alto, las condiciones de lavado serán estrictas (baja concentración salina y alta temperatura). Para cada ensayo se indicarán las condiciones de lavado utilizadas.

v. Exponer las membranas sobre placas autorradiográficas (Kodak X-OMAT K) dentro de un "cassette" para rayos X; marcar el film en tres lugares, por lo menos, de manera que pueda superponerse apropiadamente a la membrana. Ocasionalmente puede usarse una pantalla intensificadora (por ejemplo de tungstato de calcio) que aumenta la eficiencia de detección, dado que la radiación emitida no absorbida por la placa autorradiográfica es absorbida por un compuesto fluorescente de la pantalla intensificadora, que reemite la energía como luz. De este modo, se aprovecha más la radiación emitida y se expone el film por una combinación de autorradiografía directa e indirecta. Debe tenerse en cuenta que para usar pantalla intensificadora la exposición se hará a  $-70^{\circ}\text{C}$ . El tiempo de exposición dependerá de la actividad específica de la sonda y del tipo de ensayo realizado (hibridación de ADN repetido o de copia simple).

vi. Revelar las placas en revelador Dektol puro durante 3 min y fijar 3 min en fijador Kodafix 1:3. Lavar con agua destilada.

#### 10. HIBRIDACION "IN SITU" (Harper & Saunders, 1981)

Se usaron preparaciones cromosómicas obtenidas de médula ósea. Para digerir el ARN, los preparados se trataron 60 min a  $37^{\circ}\text{C}$  con ARNasa (Sigma) 100 ug/ml en SSC 2 X. La desnaturalización del ADN cromosómico se llevó a cabo sumergiendo los preparados durante 2 min a  $70^{\circ}\text{C}$  en 50 % formamida y SSC 2 X. La deshidratación de los mismos se logró por sucesivos lavados en alcohol de concentración creciente (70, 80, 90 y 100 %).

Por otro lado se preparó la solución de hibridación, que contiene: 10 ul de tARN (5 mg/ml), 20 ul de SSC 20 X, 100 ul de formamida,

1 ug de ADN radiactivo y 70 ul de H<sub>2</sub>O bidestilada. Para desnaturar el ADN sonda se calentó esta solución a 70 °C 5 min, seguido de un enfriamiento rápido.

Cada preparado cromosómico recibió 20 ul de la mezcla anterior, cubriendo la misma con cubreobjeto y sellando los bordes con cemento de goma.

La incubación -hibridación propiamente dicha- se realizó en cámaras húmedas a 37 °C durante 12-16 hs y se calculó el Cot equivalente alcanzado. Luego de la reacción de hibridación los preparados se lavaron tres veces con SSC 2 X - formamida 50 %, a 39 °C, cinco veces con SSC 2 X a 39 °C y se deshidrataron en etanol.

Para obtener la autorradiografía los preparados se cubrieron con "stripping film" AR 10 de Kodak y se expusieron durante tiempos variables a 4 °C. Finalizado el tiempo de exposición se revelaron con revelador D 19, se fijaron y colorearon a través del film con Giemsa 5 % pH 6,8.

## 11. HIBRIDACION ADN - ADN EN SOLUCION

### A. Aislamiento de ADN de copia única

i. Reducir la longitud de 2 a 10 mg de ADN (ADN trazador) a fragmentos de 400 a 500 pb. Separar la muestra en dos partes (2/3 y 1/3). Precipitar con tres volúmenes de etanol 70 %. Dejar a -20 °C toda la noche, separar y recuperar el ADN por centrifugación. Disolver 1/3 en H<sub>2</sub>O bidestilada y medir la concentración por lectura de  $\Lambda_{260 \text{ nm}}$ . Los 2/3 restantes se disuelven en buffer de hibridación (ácido piperazín-N,N'-bis 2-etano-sulfónico (PIPES ; Sigma P-6757) 10 mM; NaCl 1 M; formamida 50 %) a una concentración de 8-10 mg/ml (ADN conductor).

ii. Sobre una alícuota de la muestra disuelta en H<sub>2</sub>O determinar el tamaño de los fragmentos por electroforesis en gel de agarosa.

iii. Llevar la muestra disuelta en H<sub>2</sub>O a BP 0,12 M pH 6,8 y desnaturar por ebullición 10 min. Reasociar a Cot = 800, detener la reasociación por dilución con BP 0,12 M helado y separar el material monocatenario del bicatenario por cromatografía en columna de HAP.

iv. Dializar contra  $H_2O$  bidestilada las fracciones eluidas con BP 0,12 M (material monocatenario) y precipitar el ADN con 2 volúmenes de etanol absoluto en presencia de NaCl 0,1 M. Dejar a  $-20^{\circ}C$  toda la noche y recuperar el ADN por centrifugación. Disolver en  $H_2O$  y determinar la concentración. Llevar a BP 0,48 M, desnaturalizar y reasociar a  $Cot = 15000$ . Detener la reacción diluyendo con agua helada hasta que la concentración de BP alcance 0,12 M. Separar el ADN monocatenario del bicatenario por cromatografía en HAP.

v. Conservar el ADN bicatenario. Dializar contra  $H_2O$ , concentrar por precipitación y centrifugación. Disolver en  $H_2O$  bidestilada.

vi. Marcar con  $^3H$ dCTP y  $^3H$ dTTP 2 ug del ADN trazador de copia simple, por la técnica de "nick translation".

#### B. Reacción de hibridación

i. Mezclar ADN radiactivo de copia única (trazador) con ADN total homólogo o heterólogo (ADN conductor) en proporción 1:5000 (trazador:conductor). Llevar la mezcla a formamida 50 %, PIPES 10 mM y NaCl 0,6 M (factor de reasociación = 4,9; Britten et al., 1974). Tomar una alícuota de la mezcla y medir la actividad específica precipitando con TCA 10 % en presencia de un "carrier" (tARN o albúmina sérica bovina). Filtrar a través de filtro de fibra de vidrio o Millipore 0,45  $\mu m$ . Secar. Leer en contador de centelleo con solución de tolueno-omnifluor.

ii. Envasar la mezcla de hibridación en tubo capilar siliconado (pipetas descartables de 50-100  $\mu l$  de capacidad). Sellar los extremos del capilar a la llama de mechero. Desnaturalizar el ADN incubando a  $70^{\circ}C$  durante 10 min. Reasociar hasta un valor de  $Cot$  equivalente a 15000 incubando a  $42^{\circ}C$ . Detener la reacción sumergiendo el capilar en agua helada. Recuperar la muestra diluyéndola en BP 0,12 M. Adsorber sobre columna de HAP mantenida a  $60^{\circ}C$  y equilibrada con BP 0,12 M.

iii. Eluir el ADN no hibridado, lavando la HAP con seis volúmenes de BP 0,12 M, a  $60^{\circ}C$ . Medir la cantidad de  $^3H$ -ADN de cada fracción precipitándolo con TCA 10 %, en presencia de "carrier".

iv. Determinar la estabilidad térmica del ADN híbrido, lavando con dos volúmenes de columna, a distintas temperaturas, con BP 0,12 M. Comenzar a  $60^{\circ}C$  y elevar la temperatura de a  $5^{\circ}C$  hasta  $95^{\circ}C$ .

Antes de eluir, permitir que se alcance el equilibrio térmico a la temperatura deseada. Precipitar cada fracción eluida con TCA 10 % en presencia de "carrier". Filtrar y contar en contador de centelleo.

## R E S U L T A D O S

Los resultados expuestos en este trabajo se subdividen en tres Capítulos, en los que se detallan las características fisicoquímicas y moleculares del ADN de dos especies del género Calomys y las posibles relaciones de homología con ADNs de especies de cricétidos filogenéticamente relacionadas. El contenido de cada Capítulo se indica a continuación:

Capítulo I: Caracterización fisicoquímica y molecular del ADN de las especies Calomys musculinus y C. laucha

Capítulo II: Análisis molecular de un componente termoestable presente en el ADN de Calomys musculinus

Capítulo III: Estudio de homología entre ADNs de especies pertenecientes a diferentes géneros de cricétidos con distribución argentina

## CAPITULO I

Todos los métodos empleados en este capítulo pertenecen a los que anteriormente se definieron como estáticos y estadísticos. Los parámetros analizados, inherentes al ADN de cada organismo, han permitido evaluar las similitudes y diferencias entre las especies estudiadas.

### 1. Extracción y purificación de ADN

La obtención del ADN se basó, en líneas generales, en el método de Marmur (1961). No obstante, se incluyeron dos modificaciones descritas por Arrighi y col. (1970): la primera consiste en el agregado de fenol a la mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico, durante la extracción inicial de los ácidos nucleicos; la segunda tiende a la obtención de ADN con mayor grado de pureza, mediante el empleo de enzimas para la eliminación de ARNs, polisacáridos y proteínas contaminantes. Posteriormente, de acuerdo con Britten et al. (1974), se introdujo una tercera modificación: previo a la extracción de los ácidos nucleicos con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, se adicionó a las muestras urea sólida (hasta concentración final 7 M), para promover la disociación de los complejos nucleoproteicos.

El procedimiento empleado permitió obtener entre 600 y 800 ug de ADN / g de tejido húmedo. No se detectaron diferencias entre los rendimientos obtenidos con una y otra especie.

### 2. Ultracentrifugación analítica

La densidad de flotación de un ADN en un gradiente de cloruro de cesio es directamente proporcional a su contenido en guanina más citosina (Sueoka, 1959; Marmur & Doty, 1959; Rolfe & Meselson, 1959).

Se sometieron a centrifugación isopícnica en gradientes de densidad de cloruro de cesio, a pH neutro, cuatro preparaciones de ADN de Mus musculus, cinco de Calomys laucha y siete de C. musculinus.

En la Figura 6 se muestra el trazado densitométrico correspon-

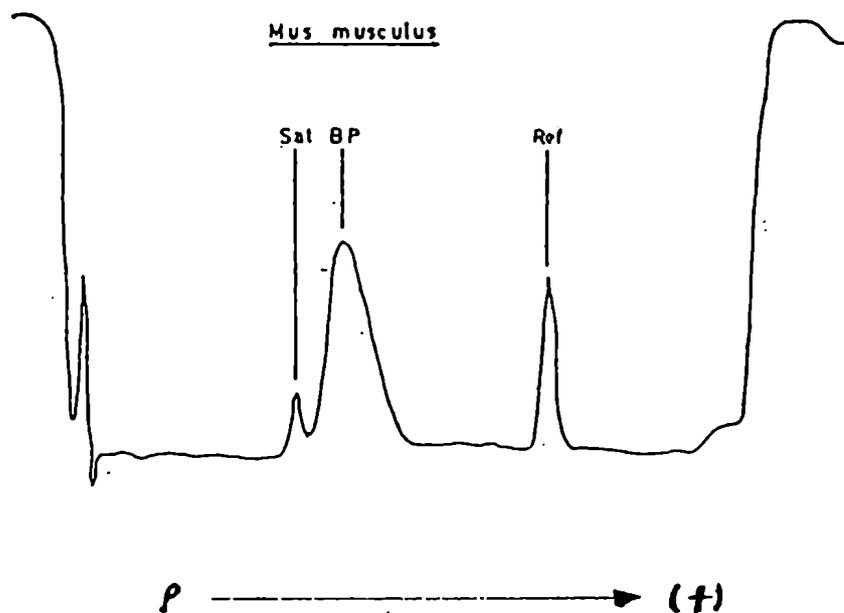


Figura 6. Centrifugación isopícnica del ADN de M. musculus en gradiente de CsCl (ultracentrifugación analítica).

La densidad de flotación ( $\rho$ ) estimada para la banda principal (BP) en este densitograma es  $1,701 \text{ g/cm}^3$  y para la banda satélite (Sat)  $1,690 \text{ g/cm}^3$ . Se utilizó como estándar el ADN del bacteriófago SPO 1 (Ref) cuya densidad de flotación es  $1,742 \text{ g/cm}^3$  (Mandel et al., 1968).

diente a una de las centrifugaciones realizadas con ADN de Mus musculus. El ADN de este roedor, ampliamente estudiado en diferentes laboratorios, permitió disponer de un patrón y de un control de la metodología empleada. En todas las centrifugaciones analíticas de este ADN la fracción correspondiente al ADN sat se diferenció claramente del ADN mayoritario que constituye la banda principal. Los resultados presentados en la TABLA II concuerdan con los obtenidos por otros autores (Kit, 1961; Arrighi et al., 1970; McConaughy & McCarthy, 1970; Cuny et al., 1981).

En la Figura 7 se presentan los densitogramas correspondientes a la centrifugación de una muestra de ADN de cada una de las especies de Calomys analizadas. Los valores promedio de densidad de flotación y contenido molar porcentual de GC se muestran en la TABLA III.

Ninguno de los trazados densitométricos correspondientes a los ADNs de las especies estudiadas mostraron bandas u hombros atribuibles a ADN satélite, presentando en ambos casos perfiles homogéneos. Sin embargo, la posible presencia de ADN sat críptico queda aún por ser comprobada, pudiendo emplearse para tales fines métodos de centrifugación en gradientes neutros de  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$  con el complejo del ADN con metales como  $\text{Hg}^{++}$  o  $\text{Ag}^+$ , o bien mediante el análisis de patrones de restricción generados por diferentes endonucleasas.

La presencia de ADNs satélites es muy frecuente en roedores pertenecientes a la familia Muridae (McConaughy & McCarthy, 1970), mientras que en los cricétidos sudamericanos tales componentes satelitarios no han sido detectados, salvo en un único caso. Así, en un estudio efectuado sobre el ADN de cuatro especies de akodontinos, Vidal Rioja y col. (1979) presentaron perfiles de sedimentación con un marcado grado de homogenidad para las cuatro especies analizadas (Akodon molinae, A. azarae, A. dolores y Bolomys obscurus). Por otra parte, Vidal Rioja y col. (1987a) en un análisis de ADN de tres orizominos, demostraron la presencia de ADN sat en la especie Oryzomys flavescens. En este caso el componente secundario -enriquecido en AT- se evidenció como un hombro en los perfiles densitométricos obtenidos por ultracentrifugación analítica en gradientes neutros

TABLA II

Referencia	Densidad de flotación (g/cm <sup>3</sup> )		GC %	
	BP	Sat	BP	Sat
Este trabajo	1,701	1,690	41,8	30,6
Kit (1961)	1,701	1,690	41,8	30,6
Arrighi et al. (1970)	1,6998	1,6898	40,6	30,4
Mc Conaughy & Mc Carthy (1970)	1,701	1,690	41,8	30,6
Cuny et al. (1981)	1,7008	1,6915	41,6	32,1

Valores de densidad de flotación y contenido molar porcentual de GC para ADN de Mus musculus.

Estos valores se calcularon a partir de las correspondientes densidades de flotación mediante la ecuación (Schildkraut et al., 1962):

$$\rho = 1,660 + 0,098 (GC)$$

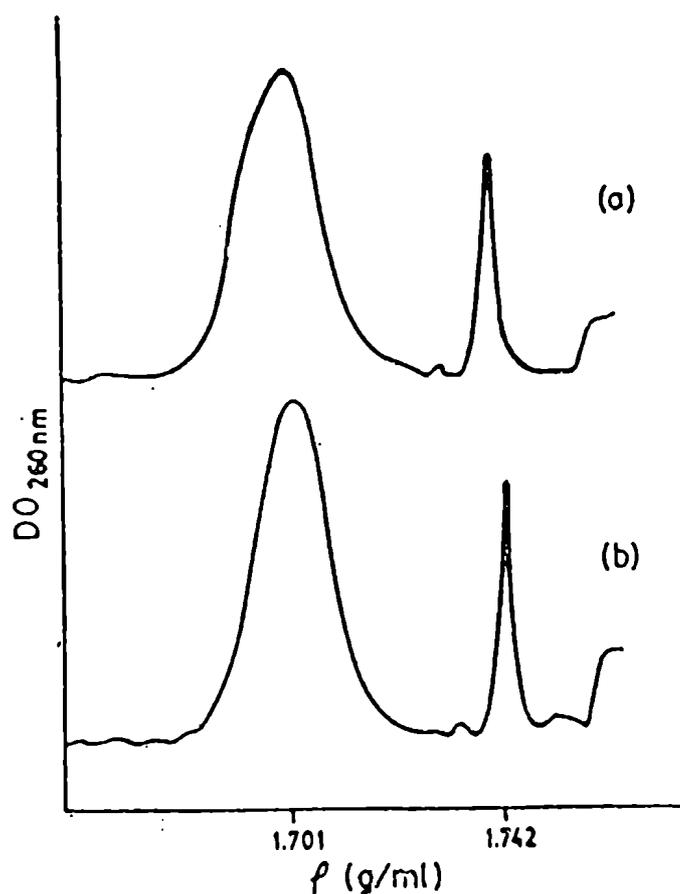


Figura 7. Centrifugación isopícnica de ADNs de C. laucha (a) y C. musculus (b) en gradientes de CsCl (ultracentrifugación analítica).

Las densidades de flotación estimadas a partir de los densitogramas mostrados en la figura son  $1,701 \text{ g/cm}^3$  para ambos ADNs. Se utilizó el mismo estándar que en la figura anterior.

de CsCl; la confirmación de la existencia de este componente se logró aprovechando la capacidad de rápida reasociación que presentan las secuencias repetidas constituyentes de los ADN's satélites. El método se basa en la desnaturalización térmica del ADN, su reasociación a tiempo corto y la posterior ultracentrifugación de las muestras reasociadas.

Como se mencionara en la Introducción, los ADN's eucarióticos pueden presentar perfiles de sedimentación relativamente complejos, debido a la presencia de secuencias con alto grado de repetición, constituyentes del ADN satélite. La variación en la concentración molar de pares GC para estos ADN's es, en cambio, muy restringida. De acuerdo con los datos presentados en la TABLA III los valores de densidad de flotación de los ADN's de las dos especies analizadas son idénticos, así como los valores de los contenidos porcentuales en GC inferidos a partir de aquellos.

### 3. Desnaturalización térmica de ADN

Marmur y Doty (1959) demostraron que la composición en bases de un ADN está relacionada con su temperatura media de desnaturalización térmica. Cuando una solución de ADN se calienta tiene lugar una transición desde el estado de doble hélice ordenada al estado desordenado con las cadenas desapareadas ovilladas al azar. Esto produce cambios en las propiedades físicas de la molécula, tales como un incremento de su coeficiente de extinción -efecto hipercrómico-. Esta propiedad permite la medición espectrofotométrica del proceso de desnaturalización térmica, proporcionando un método conveniente para determinar la composición en bases del material en estudio. Permite también la detección de componentes con mayor o menor grado de termoestabilidad, eventualmente relacionables con secuencias repetidas enriquecidas en pares GC o AT.

Durante el desarrollo del presente trabajo, esta metodología fue puesta a punto mediante el empleo del polinucleótido sintético poli-dAT (Sigma Chem. Co) y de ADN de la especie Mus musculus. Las características de ambas macromoléculas han sido intensamente estudiadas, disponiéndose de los parámetros de desnaturalización térmica, lo que facilita su empleo como control y referencia meto-

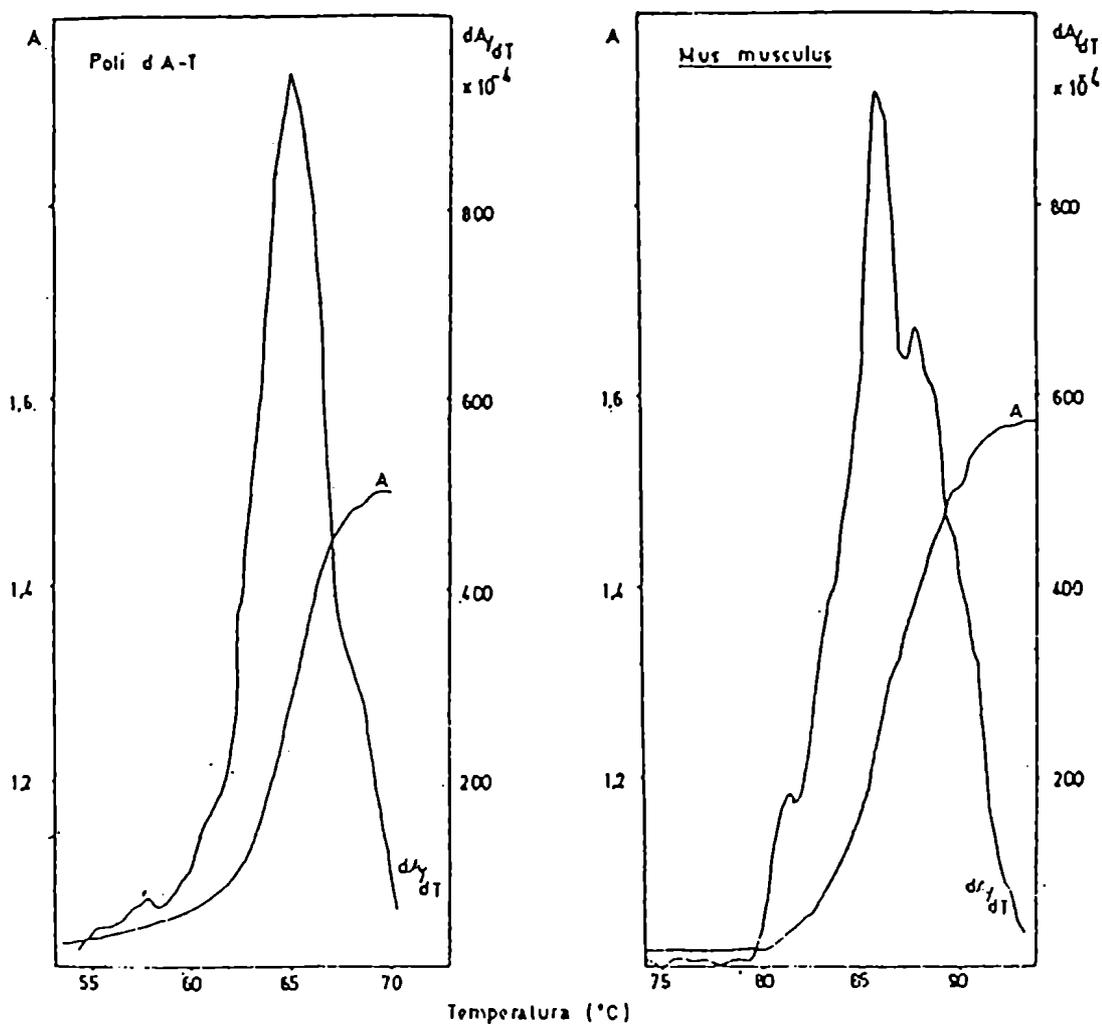
TABLA III

<u>Especie</u>	Densidad de flotación (g/cm <sup>3</sup> )	GC %
<u>C. musculus</u>	1,701	41,8
<u>C. laucha</u>	1,701	41,8

Valores de densidad de flotación y contenido molar porcentual de GC para ADNs de C. musculus y C. laucha.

dológicos.

El fenómeno de desnaturalización térmica ha sido interpretado como un proceso de tipo cooperativo que promedia las variaciones en la composición de bases a lo largo de las cadenas y responde a la composición media de la molécula (Marmur & Doty, 1959). Como se muestra en la Figura 8 el polinucleótido sintético poli-dAT se desnaturaliza en un rango estrecho de temperatura presentando, por otro lado, un valor de  $T_m$  bajo (TABLA IV). La ausencia de pares GC en este polinucleótido artificial determina las características mencionadas. Los análisis de desnaturalización térmica de ADNs procarióticos, como el de Escherichia coli, ponen de manifiesto perfiles monofásicos, como el del polinucleótido poli-dAT, aunque el valor de  $T_m$  para el ADN bacteriano es de  $90,4^{\circ}\text{C}$  (52 % GC). En este caso, con respecto al contenido medio de GC, sólo se distingue una única población de moléculas. En el ADN de algunos organismos eucariotas, como por ejemplo el del protozooario Crithidia fasciculata (Mandel & Marmur, 1968), en los que existen dos distribuciones de moléculas con diferente contenido de GC, la curva de desnaturalización térmica, contrariamente a lo que ocurre con E. coli, muestra una transición bimodal. El ADN de Mus musculus, en cambio, representaría una situación intermedia entre las dos mencionadas anteriormente. La Figura 8 muestra los gráficos experimental y derivado de un ensayo de desnaturalización térmica del ADN de este roedor. En el gráfico experimental -obtenido por la representación directa de los valores de hipercromicidad en función de la temperatura- puede observarse una ligera inflexión entre  $80$  y  $83^{\circ}\text{C}$ , lo que correspondería a un componente minoritario del ADN total, supuestamente el ADN sat, como lo sugirieron McConaughy y McCarthy (1970). Estos autores consideran que la transición térmica con valor modal o  $T_{m_i}$  (temperatura media de desnaturalización térmica individual) de  $79,2^{\circ}\text{C}$  corresponde al ADN sat de M. musculus. Por otro lado, el gráfico de los valores numéricamente derivados, pone de manifiesto un pico próximo a los  $82^{\circ}\text{C}$ , que correspondería a la inflexión mencionada. La transición térmica detectable entre  $86$  y  $88^{\circ}\text{C}$  podría atribuirse a un subconjunto de secuencias de ADN de repetición intermedia, enriquecidas en pares GC. Esta observación concuerda plenamente



**Figura 8.** Gráficos de los datos experimentales de desnaturalización térmica y curvas obtenidas por derivación numérica de aquéllos, para el polinucleótido sintético poli d AT y para el ADN de M. musculus.

Ambos ensayos se realizaron en SSC 1X. En ordenadas se representa absorbencia (A) y derivada de la absorbencia respecto a la temperatura ( $dA/dT$ ); en abscisas se representa temperatura en  $^{\circ}$ C.

TABLA IV

	$T_m$ ( $^{\circ}C$ )	GC %
poli d AT (5)	$64,6 \pm 0,5$	—
<u>M. musculus</u> (4)	$86,2 \pm 0,7$	$41,2 \pm 1,7$

Valores promedio de  $T_m$  y contenido molar porcentual de GC para el polinucleótido sintético poli d AT y ADN de M. musculus.

Los valores promedio van acompañados de la correspondiente desviación estándar ( $\sigma_{n-1}$ ). Los números entre paréntesis indican la cantidad de determinaciones efectuadas.

te con los resultados presentados por Mayfield (1977) quien sugiere que la falta de detección de un componente liviano o pesado por ultracentrifugación analítica en CsCl se debe a una menor sensibilidad de este último método. El análisis de desnaturalización térmica de alta resolución permite la identificación de bloques de ADN repetido aún cuando éstos se encuentren dispersos dentro del genoma. Esta falta de agrupamiento determinaría la imposibilidad de su detección en centrifugación isopícnica.

Los gráficos experimentales y derivados de los ensayos de desnaturalización térmica de los ADNs de las especies Calomys musculinus y C. laucha se muestran en la Figura 9. La curva de C. laucha es francamente homogénea en tanto que la de C. musculinus exhibe un perfil bifásico, con un componente minoritario más rico en GC. Inicialmente, los estudios de desnaturalización térmica se llevaron a cabo en SSC 1X ( $\text{Na}^+ = 0,195 \text{ M}$ ) y bajo estas condiciones los valores de  $T_m$ , calculados a partir de las curvas experimentales, fueron de  $86,2^\circ\text{C}$ , para las dos especies de roedores estudiados (TABLA V). En las mismas condiciones, el componente menor presente en el ADN de C. musculinus desnaturaliza a  $94-95^\circ\text{C}$ . Con el objeto de evitar posibles artificios metodológicos, atribuibles en parte a evaporación del solvente, se repitieron los experimentos con muestras de ADN disueltas en SSC 0,1X. La disminución de la concentración catiónica ( $\text{Na}^+ = 0,0195 \text{ M}$ ) determina que el valor de  $T_m$  se reduzca en  $15,4^\circ\text{C}$  (Mandel y Marmur, 1968). La detección de un componente con  $T_{m_i} = 80,5^\circ\text{C}$  permitió confirmar las observaciones efectuadas previamente en el ADN de C. musculinus. Asimismo, en esta condición salina, los valores de  $T_m$  y por tanto los de contenido molar porcentual de GC que de ellos derivan coinciden para los ADNs de las dos especies (TABLA V).

La caracterización molecular del componente minoritario termoes- table presente en el ADN de Calomys musculinus se expondrá en el Capítulo II del presente trabajo.

#### 4. Cinética de reasociación

La construcción de una curva de reasociación, o "curva de Cot", que describa la cinética de renaturalización de un ADN depende de la disponibilidad de métodos adecuados para detectar la formación

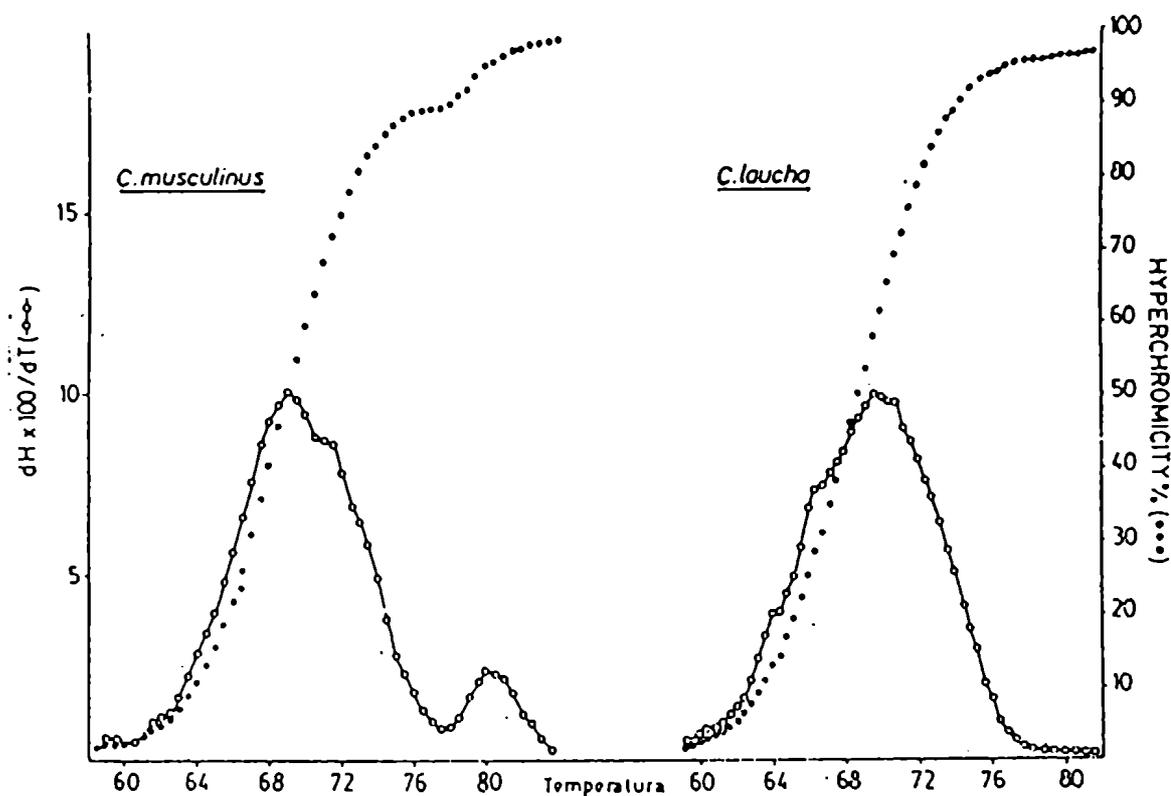


Figura 9. Gráficos de los datos experimentales de desnaturalización térmica y curvas obtenidas por derivación numérica de aquéllos, para los ADNs de C. musculus y C. laucha.

Los ensayos se realizaron en SSC 0,1X. En ordenadas se expresa hipercromicidad porcentual (H%) y derivada de la hipercromicidad respecto a la temperatura (dH/dT); en abscisas se representa temperatura (°C).

TABLA V

Especie	SSC 1X		SSC 0,1X	
	T <sub>m</sub> (°C)	GC %	T <sub>m</sub> (°C)	GC %
<u>C. musculus</u> (3)	86,2 ± 0,8	41,2 ± 2	71,1 ± 1,2	42,0 ± 2,9
<u>C. laucha</u> (5)	86,2 ± 0,3	41,2 ± 0,6	71,0 ± 1,2	41,7 ± 3

Valores promedio de T<sub>m</sub> y contenido molar porcentual de GC para ADNs de ambas especies de Calomys.

Los números entre paréntesis indican la cantidad de determinaciones efectuadas

de segmentos bicatenarios, entre secuencias complementarias, a lo largo de un amplio intervalo de valores de Cot. A partir de tal curva es posible caracterizar al ADN con respecto a la presencia de secuencias de copia única y repetidas y estimar el grado de reiteración de estas últimas. También permite estimar el tamaño del genoma del organismo del cual proviene el ADN, por comparación con un estándar apropiado.

En la actualidad se dispone de numerosas metodologías para evaluar la extensión de la reasociación. Sin embargo, sólo dos de éstas han sido más ampliamente utilizadas. Por un lado, la cromatografía en columnas de hidroxapatita (HAP) permite la separación de ADN monocatenario -no reasociado- así como de ADN bicatenario y ofrece la posibilidad de disponer de material de ambos tipos para su ulterior análisis. Por otro, la digestión con nucleasa S1 de las fracciones reasociadas permite eliminar secuencias no reasociadas, lo que facilita la cuantificación del ADN cuya estructura bicatenaria haya sido restaurada.

En el presente trabajo se empleó la técnica de separación por cromatografía en columnas de HAP para medir la cinética de reasociación del ADN de las especies Calomys musculinus y C. laucha; se analizó también el ADN de Mus musculus, mediante la misma técnica con el objeto de disponer de un patrón metodológico, ya que el material genético de este roedor ha sido caracterizado por diversos autores.

El ADN de las tres especies fue fragmentado por ultrasonido bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. El tamaño promedio de los fragmentos obtenidos se estimó por medio de electroforesis en geles de agarosa. Si bien los ADNs fragmentados exhibieron una marcada diversidad de tamaños en los geles de agarosa, para estimar la longitud promedio de los fragmentos se consideró como distancia migrada a las zonas de mayor concentración de ADN en el gel. La estimación de la longitud promedio de estos fragmentos -en pares de bases (pb)- se efectuó por comparación con ADNs marcadores ( $\lambda$ /Hind III y  $\phi$ X174/Hae III). Los valores de longitud promedio se presentan en la TABLA VI.

En la Figura 10 se muestran las curvas de cinética de reasocia-

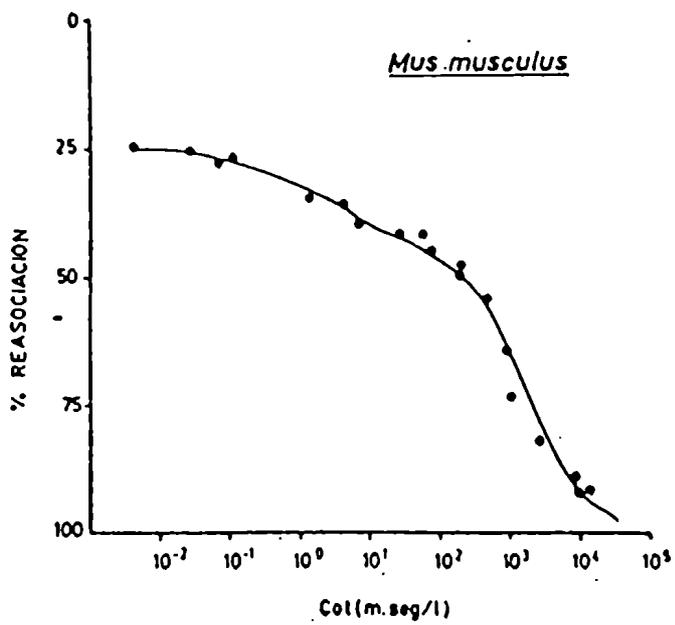
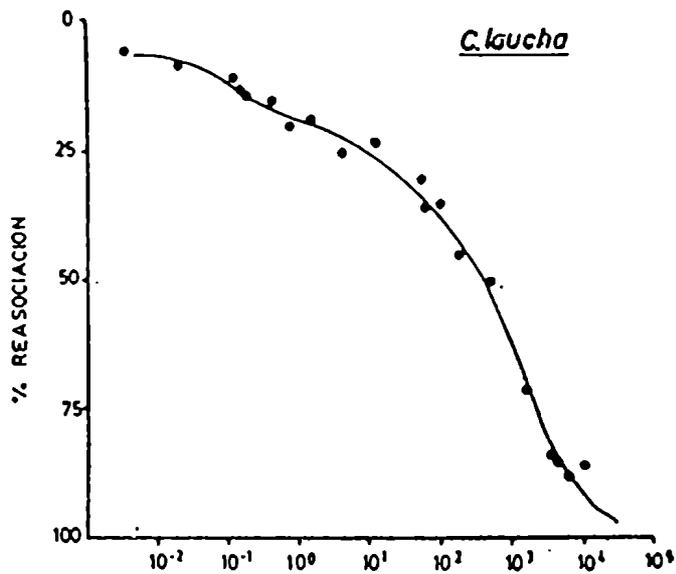
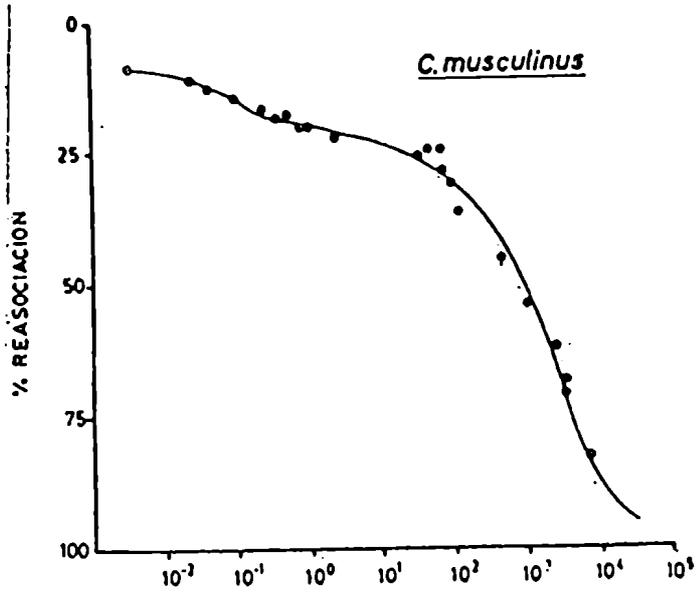


Figura 10. Cinéticas de reasociación de los ADNs de C. musculinus, C. laucha y M. musculus.

En ordenadas se representa el porcentaje de reasociación (%R) y en abscisas Cot en moles de nucleótido/litro y por segundo (m x seg/l).

TABLA VI

<u>Especie</u>	Longitud promedio de los fragmentos (pb)
<u>M. musculus</u>	400
<u>C. musculus</u>	470
<u>C. laucha</u>	570

Valores promedio de tamaño de los fragmentos de ADN empleados en los ensayos de cinética de reasociación. La determinación de estos tamaños se realizó por electroforesis en gels de agarosa al 1,5% y se consideró como distancia migrada por la muestra a la zona de mayor concentración de ADN (mayor coloración con bromuro de etidio).

ción correspondientes a C. musculinus, M. musculus y C. laucha, expresadas como se indicó en Materiales y Métodos. Los puntos representan valores experimentales y las curvas de ajuste se obtuvieron según el método propuesto por Ordahl (1977). A diferencia de lo que ocurre con los ADNs procarióticos que presentan curvas de reasociación simples, constituidas por un único componente cinético, los ADNs eucarióticos presentan curvas de reasociación complejas. Tal complejidad está estrechamente relacionada con la presencia de secuencias con diferente grado de repetición, además de las de copia única. Por otro lado, las curvas de cinética de reasociación de los ADNs procarióticos se extienden a lo largo de un reducido intervalo de valores de Cot, en tanto que las de los eucarióticos se extienden sobre intervalos que abarcan entre 6 y 7 órdenes de magnitud. Los valores descriptos en la TABLA VII demuestran que los ADNs estudiados por nosotros no escapan a esta regla.

En nuestro caso hemos considerado cuatro componentes cinéticos; para el componente inicial -de reasociación muy rápida- el parámetro  $k$  (constante de velocidad de la reacción) no pudo ser evaluado; éste es el componente denominado muy rápido, que reasocia completamente a un valor de Cot menor de  $10^{-2}$ . Este componente inicial, para el ADN de M. musculus constituye un elevado porcentaje del genoma haploide; en dicho componente se encontrarían incluidas las secuencias palindrómicas, el ADN satélite y secuencias con alto grado de repetición.

Los resultados obtenidos con la cinética de reasociación de M. musculus están, en general, en buena concordancia con los datos previamente publicados. La principal diferencia reside en el hecho que aquí se identificaron cuatro componentes, mientras otros reportan cinco. Esta diferencia puede resultar del hecho que las secuencias de ADN "fold back" y satélite de M. musculus, informadas como componentes separados, estén probablemente incluidas en nuestro componente muy rápido (Cot  $10^{-2}$ ) (Cech & Hearst, 1976).

El componente de reasociación muy rápida constituye en las especies Calomys musculinus y C. laucha un 9 y un 6 % del genoma haploide, respectivamente, valores notoriamente inferiores a los observados en M. musculus. La diferencia entre ambas especies de Ca-

TABLA VII

Componentes cinéticos del ADN	% del Genoma			Constante de velocidad k ( $M^{-1} \text{seg}^{-1}$ )			Número de copias		
	Mm	Cm	Cl	Mm	Cm	Cl	Mm	Cm	Cl
	Muy rápido (Cot $< 10^{-2}$ )	25	9	6					
Rápido (Cot $10^{-2}-10^0$ )	6,5	12	14	7,0	10,7	8,0	11700	24000	11600
Lento (Cot $10^0 - 10^2$ )	13	10	17	0,16	0,03	0,05	267	67	72
Copia única (Cot $> 10^2$ )	56	69	63	$6,0 \times 10^{-4}$	$4,5 \times 10^{-4}$	$6,9 \times 10^{-4}$	1	1	1

Resultados de las cinéticas de reasociación de ADNs de M. musculus y de ambas especies de Calomys.

El valor de Cot  $\frac{1}{2}$  de cada componente cinético es igual a la inversa de k. El número de copias para cada componente se estimó a partir de la relación entre el Cot  $\frac{1}{2}$  del componente de copia única y el Cot  $\frac{1}{2}$  de cada uno de los componentes repetidos.

lomys podría atribuirse a que este componente incluye a la fracción termoestable en el caso de C. musculinus.

Los componentes de repetición intermedia: componente rápido ( $Cot\ 10^{-2} - 10^0$ ) y componente lento ( $Cot\ 10^0 - 10^2$ ), presentan algunas diferencias interespecíficas. En primer lugar, el número de copias existentes en el componente rápido de C. musculinus se encuentra duplicado con respecto a su equivalente de la especie C. laucha, aunque el valor de  $k$  (constante de velocidad de reacción) es similar en ambas especies. Si bien el número de copias para este componente en el ADN de M. musculus es aproximadamente igual al de C. laucha, su porcentaje es menor, alrededor de la mitad del presente en las otras especies.

El componente lento presenta un número de copias semejante en las especies de Calomys, aunque el porcentaje de esta fracción es mayor en C. laucha. Este mismo componente exhibe, en M. musculus, un porcentaje intermedio entre ambas especies de Calomys, siendo alrededor de cuatro veces mayor el número de copias.

El componente lento presenta un número de copias semejante para los tres roedores y resulta similar a la mayoría de los ADNs eucariotas descriptos.

Conocidas las características cinéticas de los tres ADNs en estudio, se analizaron los perfiles de desnaturalización térmica de muestras reasociadas a distintos valores de  $Cot$ . El objeto de este estudio fue comparar los productos de reasociación en diferentes estadios de la reacción. El método empleado permitió analizar si una determinada muestra reasociada a un valor de  $Cot$  dado, reestructuraba sus cadenas en forma preferencial en cuanto a su contenido en pares GC o AT, posibilitando ésto la detección de satélites crípticos si los hubiera. Por otro lado, podría evaluarse el grado de apareamientos incorrectos o "mismatch" presente en las distintas muestras reasociadas. La TABLA VIII presenta los valores de  $Cot$  a los que fueron reasociadas las muestras empleadas en este estudio.

La Figura 11 muestra los gráficos de las derivadas numéricas, obtenidas por tratamiento matemático de los datos experimentales de desnaturalización térmica de los ADNs reasociados a los valo-

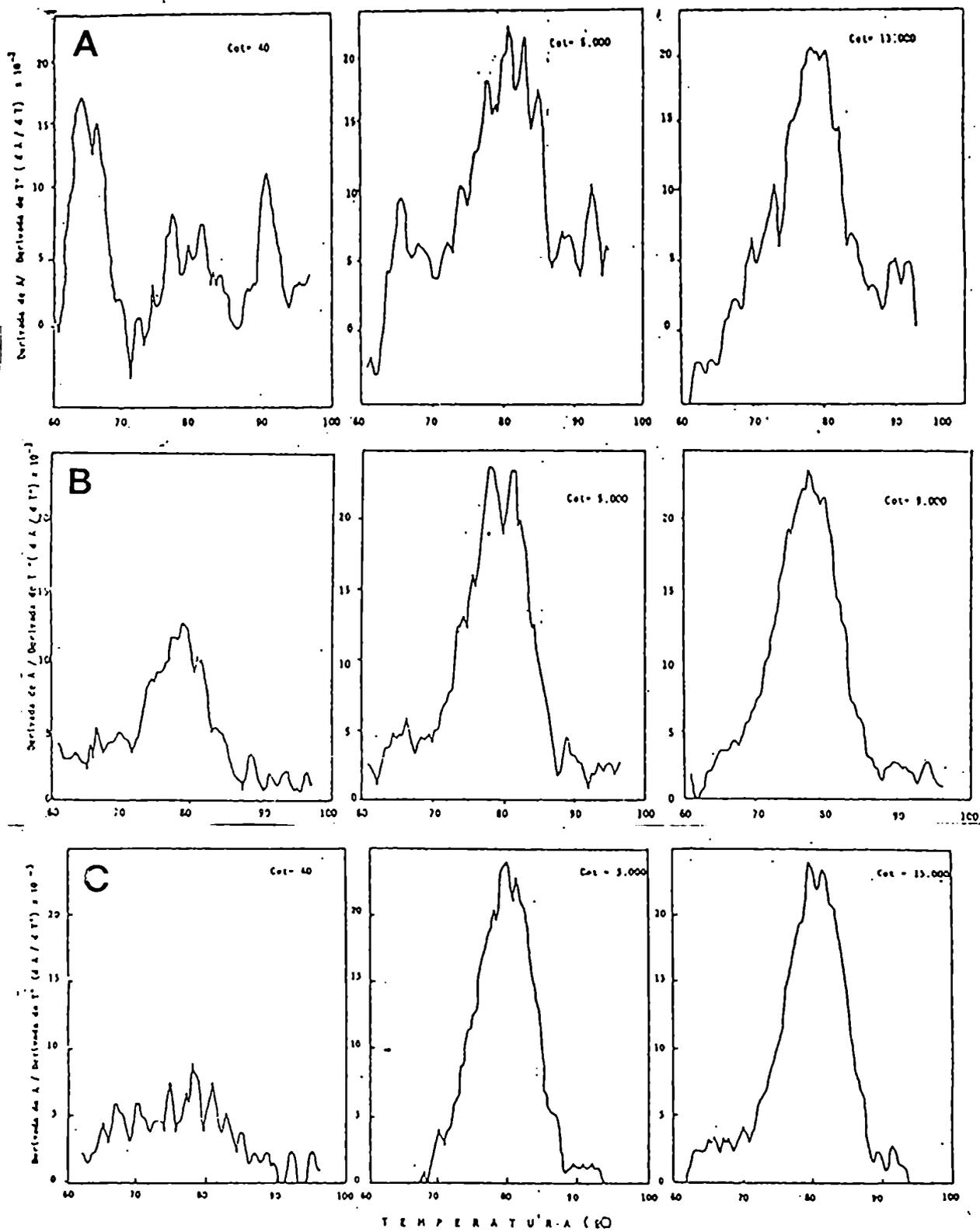


Figura 11. Gráficos de derivación numérica de datos experimentales de desnaturalización térmica de muestras de ADNs de C. musculus (A), C. laucha (B) y M. musculus (C) reasociadas a los valores de Cot indicados en cada cuadro.

En ordenadas se representa  $dH/dT$  y en abscisas temperatura ( $^{\circ}C$ )

res de Cot tabulados.

TABLA VIII

ESPECIE	Cot bajo	Cot medio	Cot alto
<u>Calomys musculus</u>	40	5.000	13.000
<u>Calomys laucha</u>	250	5.000	9.000
<u>Mus musculus</u>	40	5.000	15.000

Las tres muestras reasociadas al valor de Cot menor presentan un grado de apareamiento pobre. En el caso de los ADNs de Calomys musculus y Mus musculus, ambos reasociados a Cot 40, el primero muestra un notable apareamiento -posiblemente inespecífico- entre 60 y 70 °C, un componente bimodal entre 75 y 85 °C y un componente termoestable por encima de los 90 °C. El segundo presenta, en cambio, un perfil que si bien es heterogéneo no exhibe características salientes. La muestra de C. laucha -reasociada hasta Cot 250- exhibe un perfil relativamente homogéneo con un máximo próximo a los 80 °C. La diferencia entre esta última y las previamente mencionadas posiblemente resida en que la mayor homogeneidad de C. laucha sea el reflejo del mayor valor de Cot alcanzado.

Las muestras reasociadas a Cot 5.000 presentan perfiles con mayor grado de similitud entre sí; M. musculus es el que muestra la mayor homogeneidad, aunque presenta un pico próximo a 70 °C que podría corresponder al ADN satélite de esta especie. Ambas especies de Calomys presentan en común un componente principal con perfil bimodal, siendo marcadamente más heterogéneo el correspondiente a C. musculus. En esta especie puede verse asimismo un componente termoestable con moda próxima a 90 °C y uno de baja estabilidad térmica que desnaturaliza entre 60 y 70 °C.

En las muestras reasociadas a valores de Cot mayores, los perfiles exhiben un aspecto similar al obtenido durante la desnaturalización térmica de los ADNs nativos respectivos, salvo que el ADN de C. musculus presenta ciertas irregularidades, especialmente en las zonas de menor temperatura (entre 60 y 75 °C), siendo además

visible el componente termoestable próximo a los 90 °C. Debe destacarse la presencia de este componente tanto en los perfiles de desnaturalización térmica de muestras reasociadas a diferentes valores de Cot como en los correspondientes ensayos con ADN nativo.

Este tipo de ensayos permite observar marcadas diferencias entre los ADNs de los cricétidos analizados en cuanto a la heterogeneidad de los perfiles presentados, lo que sugiere que el ADN de C. musculinus presenta una organización molecular de las secuencias repetidas diferente a la del ADN de C. laucha.

##### 5. Patrones de restricción de ADN

El ADN de las especies estudiadas presenta tanto secuencias de copia única como secuencias repetidas, como fuera demostrado por los estudios de cinética de reasociación expuestos en el párrafo anterior. Esta característica la comparte con todos los ADNs eucarióticos estudiados hasta el presente existiendo, sin embargo, diferencias específicas con respecto a las proporciones de los distintos tipos de secuencias (repetidas y copia única), así como también diferencias en cuanto al número de copias de las secuencias repetidas y a la complejidad de cada componente cinético.

Las endonucleasas de restricción constituyen herramientas valiosas para el análisis de secuencias repetidas de ADN, independientemente de que constituyan o no ADN satélite.

Dado que las secuencias de copia única presentan sitios de restricción distribuidos preponderantemente al azar, el clivaje de un ADN con estas endonucleasas y la posterior separación electroforética de los fragmentos genera un continuo de bandas no resueltas -en número de un millón o más- para un organismo eucariota. El ADN repetido, en cambio, puede presentar sitios de restricción equiespaciados o espaciados en forma regular y por lo tanto genera bandas discretas, superpuestas al perfil continuo de las secuencias de copia única, cuando se lo somete al tratamiento mencionado.

Considerando que el clivaje de secuencias repetidas genera patrones de bandas fácilmente detectables, éstos podrían reflejar la pérdida o ganancia de sitios de restricción y la posterior amplificación de las secuencias portadoras de tales sitios acaecida

durante el proceso evolutivo. Estos patrones pueden constituir "huellas digitales" o "fingerprints" característicos del ADN de una determinada especie. Este tipo de análisis constituye un parámetro adicional con posible aplicación en sistemática bioquímica.

Con el fin de detectar posibles diferencias entre los ADNs de las especies Calomys musculus y C. laucha, en cuanto a frecuencia de sitios de clivaje, se digirieron muestras de ADN genómico de las mencionadas especies con doce endonucleasas de restricción. Las enzimas usadas y sus correspondientes secuencias de reconocimiento se presentan a continuación:

Enzima	Secuencia
Dra I	TTT/AAA
Eco RI	G/AATTC
Bam HI	G/GATCC
Hind III	A/AGCTT
Dde I	C/TNAG
Hinf I	G/ANTC
Hae III	GG/CC
Hpa II	C/CGG
Msp I	C/CGG y C/mCGG
Alu I	AG/CT
Taq I	T/CGA
Hha I	GCG/C

La separación electroforética de los fragmentos permitió visualizar los patrones de restricción de los ADNs de estas especies. Las Figuras 12, 13 y 14 muestran las fotografías de los gels obtenidos. Como puede verse, cada enzima produce un patrón de restricción característico de cada ADN. Además, debe destacarse que todos los patrones se caracterizan por la presencia de un número reducido de bandas. Estas bandas pueden considerarse secuencias repetidas o por lo menos secuencias de igual tamaño flanqueadas por un sitio de reconocimiento determinado. La fluorescencia intensa de las bandas, debida a la concentración relativamente al-



Figura 12

Fotografía izquierda. Gel de agarosa 0,8 %.

- a. ADN de C. musculus digerido con Eco RI;
- b. ADN de C. laucha digerido con Eco RI;
- c. ADN de fago  $\lambda$  digerido con Hind III;
- d. ADN de C. musculus digerido con Hind III;
- e. ADN de C. laucha digerido con Hind III.

Fotografía derecha. Gel de agarosa 0,8 %.

- a. ADN de fago  $\lambda$  digerido con Hind III;
- b. ADN de C. musculus digerido con Dra I;
- c. ADN de C. laucha digerido con Dra I;

Gel de agarosa 1,5 %.

- d. ADN de pBR 322 digerido con Taq I;
- e. ADN de C. musculus digerido con Hha I;
- f. ADN de C. laucha digerido con Hha I.

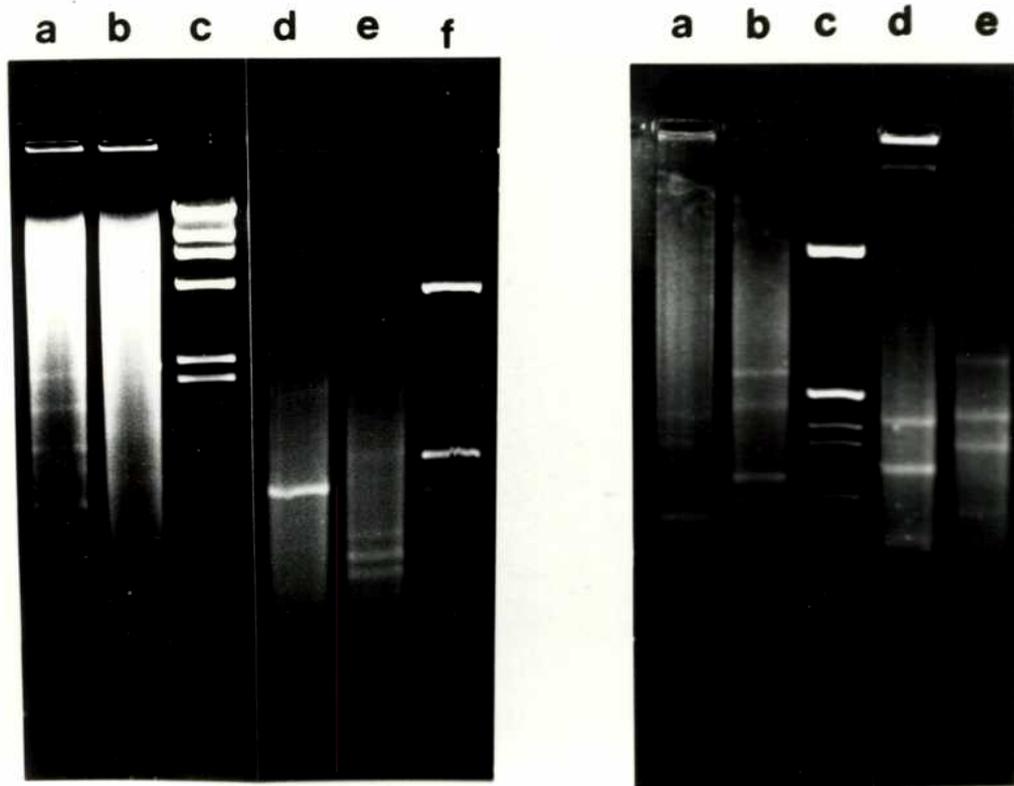


Figura 13.

Fotografía izquierda. Gel de agarosa 0,8%.

- a. ADN de C. musculus digerido con TaqI;
  - b. ADN de C. laucha digerido con TaqI;
  - c. ADN de fago  $\lambda$  digerido con HindIII;
- Gel de agarosa 1,5%
- d. ADN de C. musculus digerido con AluI;
  - e. ADN de C. laucha digerido con AluI;
  - f. ADN de pBR322 digerido con HinfI.

Fotografía derecha. Gel de agarosa 1,5%.

- a. ADN de C. musculus digerido con DdeI;
- b. ADN de C. laucha digerido con DdeI;
- c. ADN de pBR322 digerido con HinfI;
- d. ADN de C. musculus digerido con HinfI
- e. ADN de C. laucha digerido con HinfI.

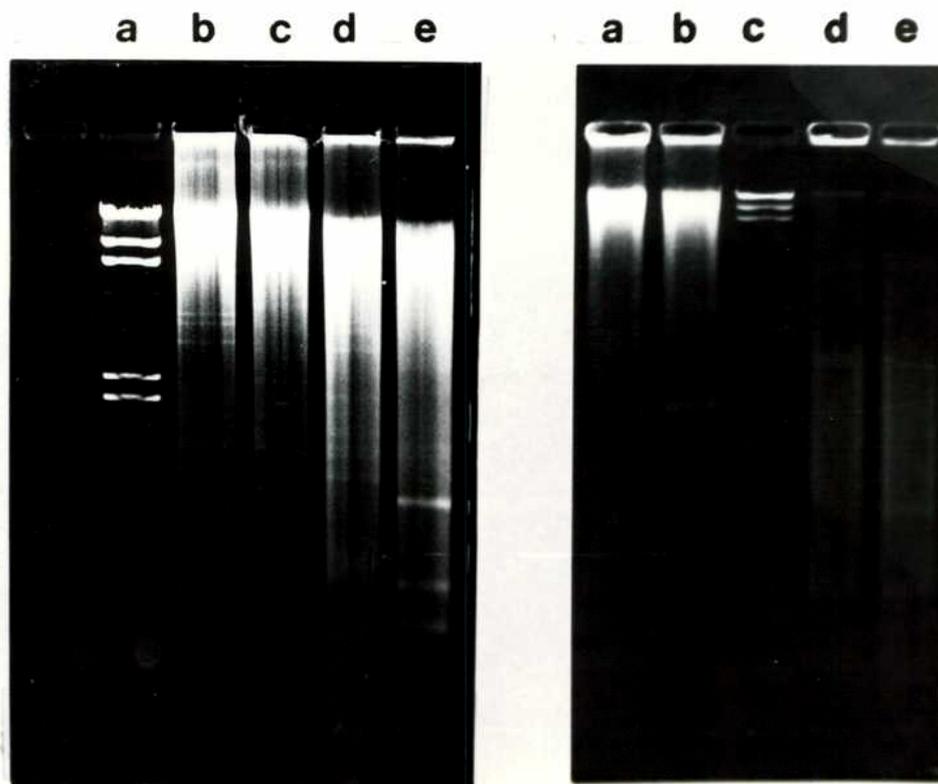


Figura 14

Fotografía izquierda. Geles de agarosa 0,8 %.

- a. ADN de fago  $\lambda$  digerido con Hind III;
- b. ADN de C. musculus digerido con Hpa II;
- c. ADN de C. laucha digerido con Hpa II;
- d. ADN de C. musculus digerido con Msp I;
- e. ADN de C. laucha digerido con Msp I.

Fotografía derecha. Geles de agarosa 0,8 %.

- a. ADN de C. musculus digerido con Bam HI;
- b. ADN de C. laucha digerido con Bam HI;
- c. ADN de fago  $\lambda$  digerido con Hind III;
- d. ADN de C. musculus digerido con Hae III;
- e. ADN de C. laucha digerido con Hae III.

ta de ADN en las mismas, facilitó su detección sobre la fluorescencia de fondo -producto del clivaje de secuencias con bajo grado de repetición o de copia única-.

Los ensayos de restricción permitieron demostrar que ninguna de las doce enzimas empleadas generó patrones iguales entre las especies de Calomys estudiadas, presentando cada uno de los ADNs genómicos características de bandeos propias.

Además de los patrones diferenciales detectados sobre los ADNs en estudio, ciertas características de algunas de las endonucleasas empleadas permiten inferir otras diferencias en el material genético de estos roedores. La comparación de los patrones de restricción generados por los isoesquizómeros Hpa II y Msp I permite comprobar una marcada diferencia interespecífica en cuanto a la presencia de 5-metilcitosina en posición proximal al sitio de corte (C/mCGG). En tanto que Hpa II (C/CGG) genera sobre el ADN de C. laucha un chorreado continuo, Msp I pone de manifiesto la presencia de tres bandas nítidas de 1100, 560 y 370 pb. Por otro lado, ambas enzimas generan sobre el ADN de C. musculinus tres bandas tenues en la zona de 3000 pb. Esta situación sugiere que el ADN de C. laucha presenta un grado mayor de metilación que el de la otra especie.

La semejanza de los patrones generados por las endonucleasas Eco RI y Dra I sobre el ADN de C. laucha permite suponer que los sitios de reconocimiento para las mismas se localizan muy próximos entre sí y que tal proximidad es constante en los diferentes sitios reconocidos.

## CAPITULO II

En el Capítulo anterior se detallaron algunas características fisicoquímicas del ADN de las especies Calomys musculinus y Calomys laucha. Una de las características distintivas en los ADNs de estas especies es la presencia, en el ADN de C. musculinus, de un componente cuya particularidad es la elevada estabilidad térmica. Este material fue inicialmente detectado por medio de estudios de desnaturalización térmica de muestras de ADN nativo. Posteriormente, en ensayos de desnaturalización térmica de tres muestras de ADN reasociadas a diferentes valores de Cot, también se observó la presencia de un componente de marcada termoestabilidad. Estas observaciones permitieron inferir que las secuencias constituyentes del componente termoestable presentaban un alto grado de repetición, puesto que reasociaban a valores de Cot relativamente bajos (Cot 40).

Como se mencionara anteriormente, la estabilidad térmica de un determinado ADN se encuentra directamente relacionada con su contenido porcentual en bases GC. El valor de  $T_m$  de este componente, determinado en SSC 1 X, es de  $94,0^{\circ}\text{C}$  y el contenido porcentual en GC, inferido a partir de aquél, es de 60,3%. Por otro lado, el contenido en GC es directamente proporcional a la densidad de flotación de un ADN. Si el componente termoestable detectado en el ADN de C. musculinus debiera su termorresistencia a un enriquecimiento en pares GC se podría esperar que los perfiles de ultracentrifugación isopícnica acusaran la presencia de un ADN sat "pesado" -rico en GC-. El valor de densidad de flotación de este componente sería de alrededor de 1,720 g/ml, de acuerdo con la ecuación de Schildkraut et al. (1962). Sin embargo, los perfiles de sedimentación del ADN de C. musculinus no pusieron de manifiesto ni picos ni hombros secundarios discretos (Figura 7), caracterizándose en cambio por una marcada homogeneidad. Las consideraciones anteriores se basan en aceptar que sólo un enriquecimiento en un determinado par de bases (AT o GC) conduce a la detección de ADN satélite. Sin embargo existen otros factores involucrados en la resolución de un componente satelitario que pueden dificultar tal

observación. Como se mencionara previamente, Mayfield (1977) sugiere que un factor importante en la detección de secuencias repetidas depende de la organización de las mismas dentro del genoma. Así, las secuencias repetidas dispuestas en tándem -tal como las presentes en el ADN satélite de Mus musculus- son fácilmente visualizables, en tanto que la observación de repetitivos dispersos puede ser dificultosa. Otro aspecto a tener en cuenta es el porcentaje de genoma que tales secuencias representan.

Debido a las peculiaridades exhibidas por el componente termolabile de C. musculus y con el objeto de aportar información adicional a la caracterización del material genético de esta especie, se desarrolló un análisis molecular de tal componente termolabile.

El estudio que se detallará a continuación, una vez aislado el componente, tuvo por objeto responder a los siguientes interrogantes:

- a. Estarán repetidas las secuencias constituyentes ?
- b. Estará presente en especies relacionadas ?
- c. Constituirá una población de secuencias repetidas dispuestas en tándem o integrará una población de repetitivos dispersos ?
- d. Las secuencias constituyentes estarán enriquecidas en pares GC ?
- e. Podría ser la metilación una característica de las secuencias presentes en este componente ?
- f. Existirán, en las secuencias componentes, estructuras que involucren segmentos monocatenarios -"stem-loop"- o estructuras de tipo ADN-Z ?
- g. Se localizan estas secuencias sobre todos los cromosomas del complemento ?
- h. La localización cromosómica es difusa o preferencial -telomérica o centromérica- ?

Las respuestas a estas preguntas aportarán una serie de datos que facilitarán la interpretación de nuevos elementos de juicio que puedan surgir de estudios posteriores. El clonado y posterior secuenciación de este llamativo componente del ADN de C. musculus permitirán disponer de elementos experimentales adicionales

que lleven a comprender la estructura y posible función del mismo.

#### Aislamiento del componente termoestable

Los experimentos de desnaturalización térmica analítica permitieron la detección de un componente termoestable en el ADN de C. musculus. Con el objeto de aislarlo en cantidades suficientes para su posterior análisis, se empleó un método preparativo basado también en la desnaturalización térmica y además en la propiedad de la hidroxapatita de fraccionar moléculas de ADN de acuerdo a su estructura secundaria.

La técnica de elución térmica posibilitó la separación de fracciones de ADN con diferente grado de termoestabilidad. La Figura 15 muestra un gráfico de barras en el que se describen los valores de absorbencia -medida a 260 nm- de las fracciones de ADN de C. musculus eluidas a diferentes temperaturas. En el mismo gráfico se puede observar además que en la fracción correspondiente a los 94 °C -señalada con una flecha en la figura- eluye mayor cantidad de material que en las fracciones adyacentes. Este resultado permite suponer que la fracción de ADN que eluye a 94 °C está enriquecida en el componente termoestable detectado por el método analítico.

La suma de los valores de absorbencia permitió la construcción de una curva acumulativa (Figura 16), a partir de la cual se estimó el valor de T<sub>m</sub> para el ADN total. Este valor resultó de 85,8 °C, concordante con el obtenido por el método analítico.

Por otro lado, la cuantificación porcentual del componente termoestable -que abarcaría las fracciones eluidas entre 93 y 99 °C inclusive- indicaría que éste constituye aproximadamente un 10 % del ADN total. El valor calculado a partir de los gráficos de desnaturalización térmica analítica sugiere que el componente representaría el 9,8 % del ADN total.

Este material -aislado por la técnica de elución térmica- es el empleado en los estudios que se detallan a continuación.

#### Cinética de reasociación del componente termoestable

Las muestras eluidas a 60, 85 y 94 °C, señaladas con flechas en

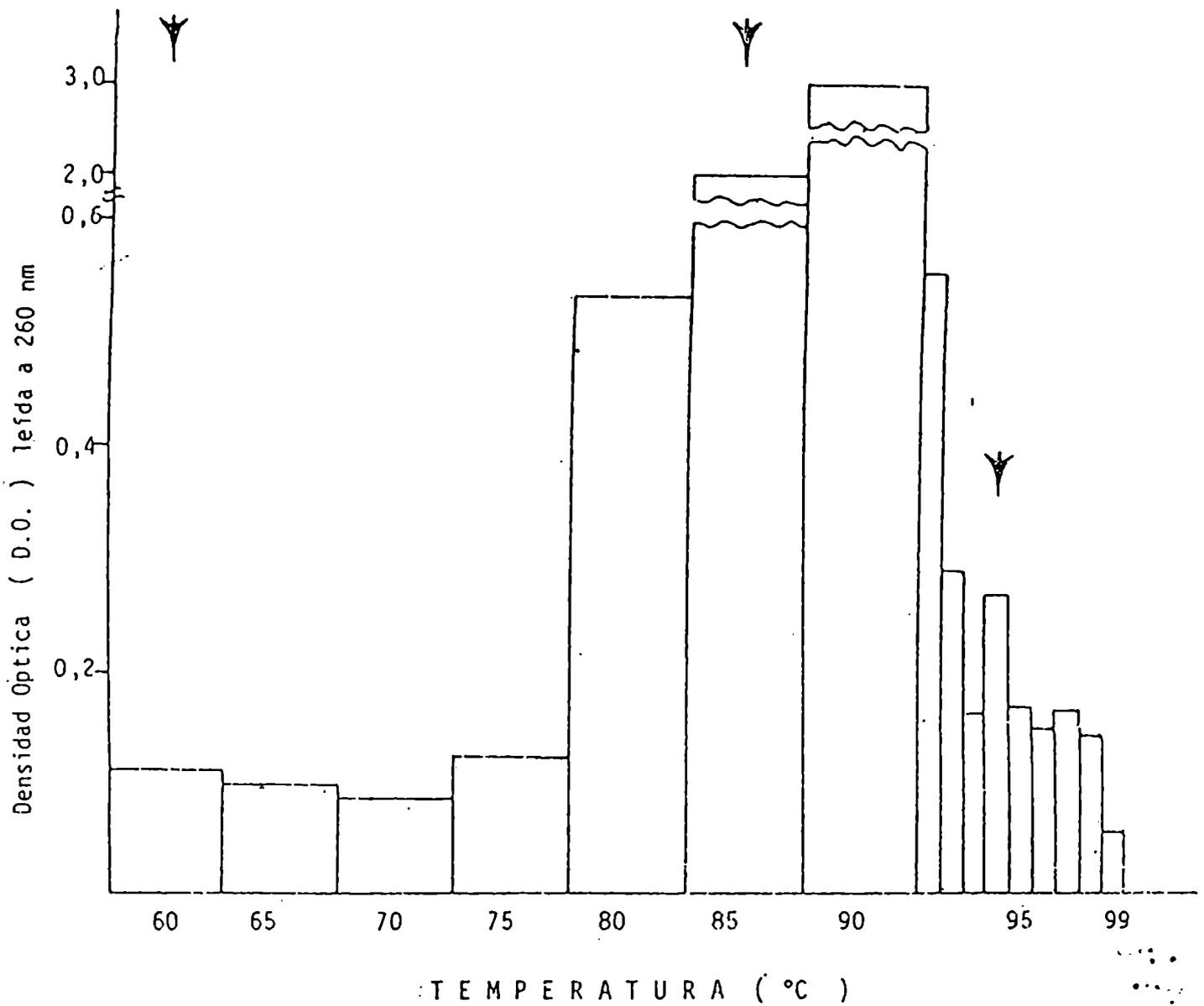


Figura 15. Gráfico de barras del ensayo de elución térmica del ADN de C. musculus.

Las flechas indican las fracciones seleccionadas para estudios de cinética de reasociación (f 60, f 85 y f 94).

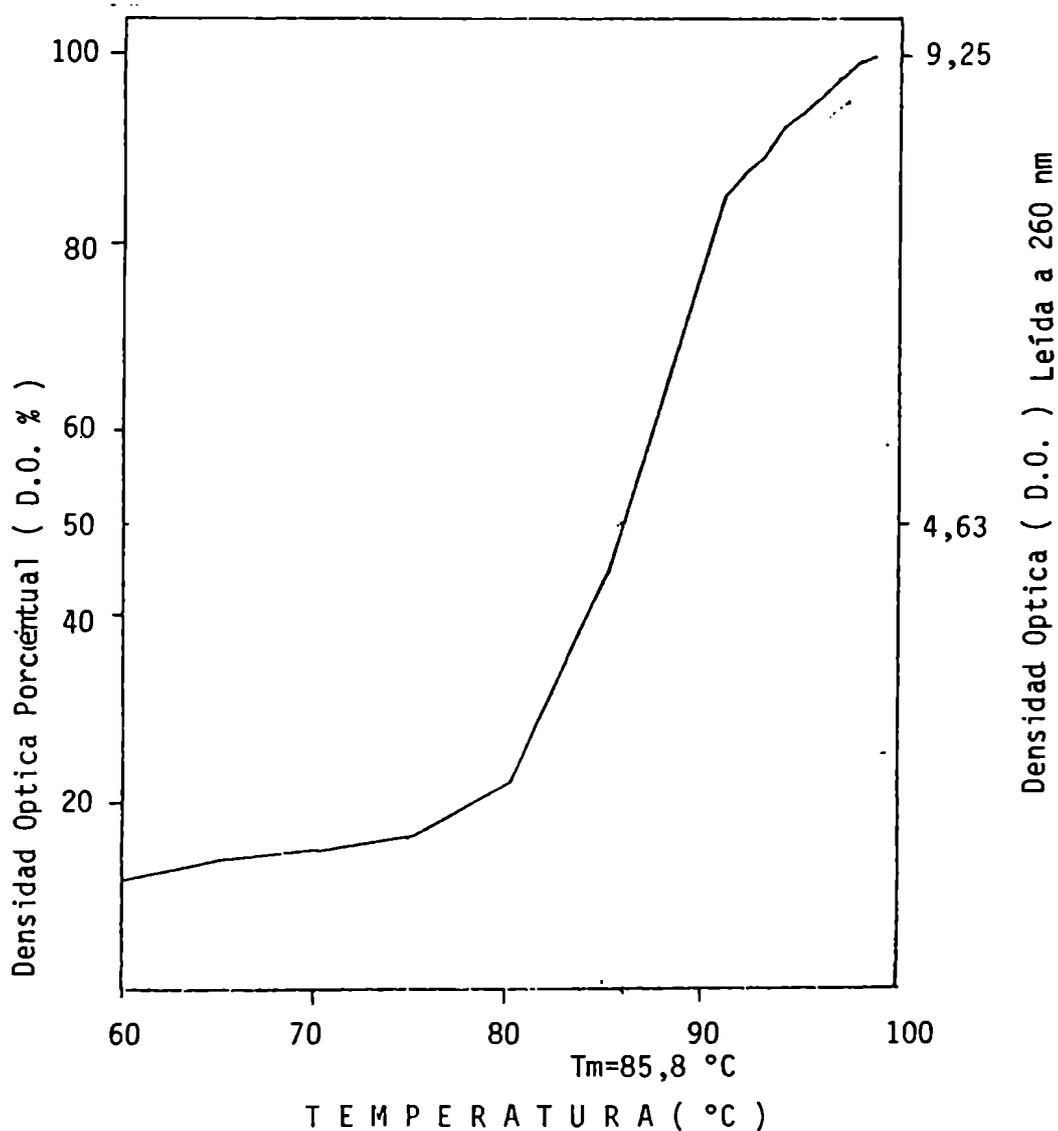


Figura 16. Curva acumulativa con la suma de los valores de absor-bencia correspondientes al ensayo de la Figura 15.

A partir de esta curva se estimó el valor de  $T_m$  para el ADN total.

la figura (f 60, f 85 y f 94, respectivamente), luego de haber sido dializadas contra BF 0,12 M se sometieron a ensayos de cinética de reasociación en espectrofotómetro. Este estudio tuvo por objeto la comparación cualitativa de los niveles de reasociación alcanzados por muestras con diferente grado de termoestabilidad y en particular, la comparación de f 85 -constituyente del ADN de banda principal- con f 94 -integrante del componente termoestable.

La Figura 17 muestra el gráfico de las cinéticas de reasociación de las tres fracciones mencionadas. Los ensayos se continuaron hasta alcanzar un valor de Cot de 0,3 M seg. Los valores de reasociación alcanzados para Cot =  $10^{-1}$  M seg fueron 2,2; 6,3 y 12,0 % para f 60, f 85 y f 94 respectivamente.

Si bien los datos cinéticos sugieren claramente que el componente termoestable posee secuencias con mayor número de copias, para conocer cuál era la precisión de los apareamientos ocurridos a valores de Cot bajos, luego de reasociar f 60, f 85 y f 94 hasta Cot 0,3 M seg se las desnaturizó en espectrofotómetro. Los valores de Tm e hipercromicidad correspondientes a estos ensayos se presentan en la TABLA IX.

TABLA IX

FRACCION	T <sub>m</sub> (°C)	H (%)
f 60	76,0	4,9
f 85	74,0	8,0
f 94	78,5	18,1

Estos valores han sido calculados a partir de los datos experimentales de desnaturización térmica. Dado que el valor de Tm en BF 0,12 M (Na<sup>+</sup> = 0,18 M) para el ADN nativo de Calomys musculinus es 86,0 °C, el ΔTm con respecto a f 60, f 85 y f 94 es de 10, 12 y 7,5 °C respectivamente. Si bien el ΔTm está directamente relacionado con el grado de imprecisión del apareamiento de las secuencias reasociadas (Britten & Kohne, 1968) f 85 exhibe un valor mayor de ΔTm que el que podría correlacionarse con la asimetría de los perfiles de desnaturización experimentales (gráficos no mostrados). Por

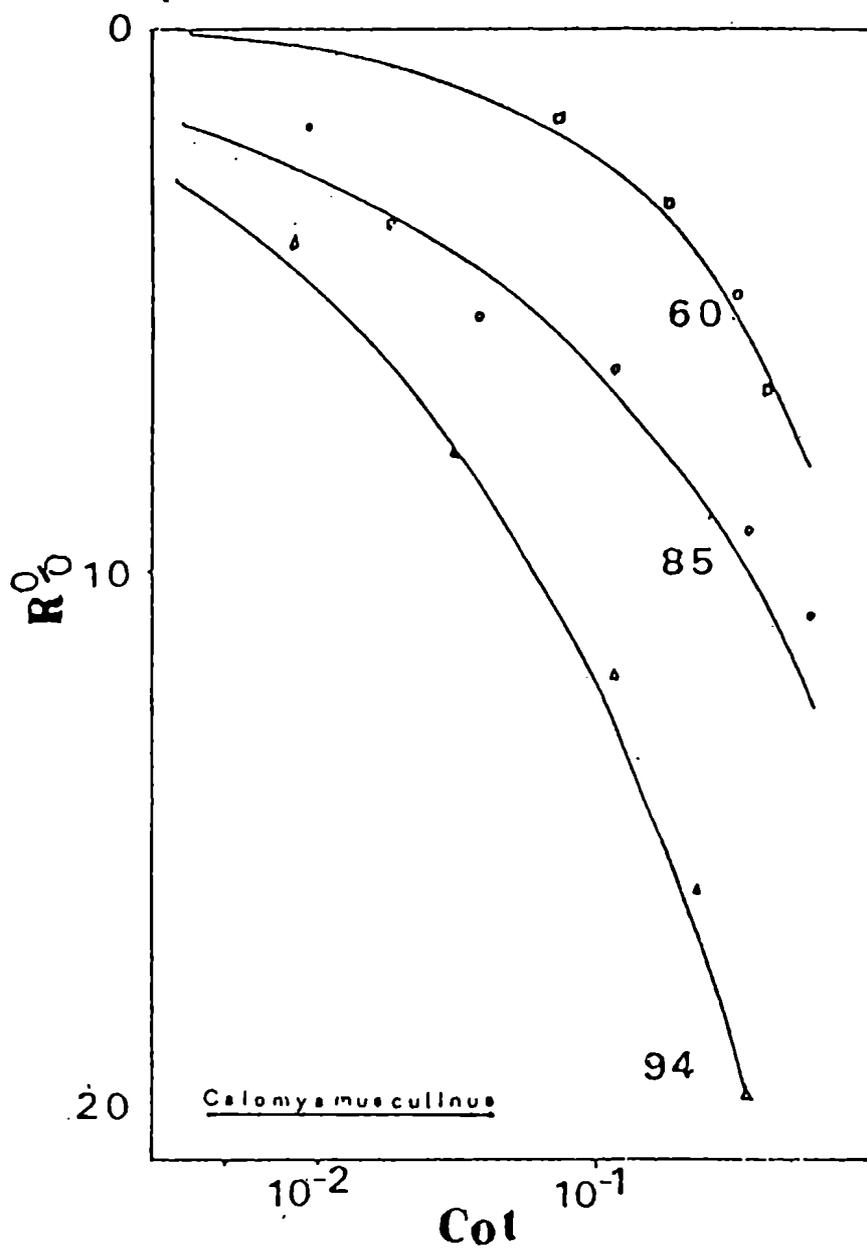


Figura 17. Cinética de reasociación en espectrofotómetro hasta Cot 0,3 M seg de las fracciones eluidas a 60, 85 y 94 °C (f 60, f 85 y f 94), señaladas con flechas en la Figura 15.

otro lado, los valores de hipercromicidad sugieren un nivel de reasociación mayor en f 94, intermedio en f 85 y menor en f 60, coincidiendo con los datos cinéticos.

En la Figura 18 se observan los perfiles de las derivadas numéricas de los datos experimentales de desnaturalización térmica. Puede observarse que tanto f 60 como f 85 denotan una marcada heterogeneidad y que la última pone de manifiesto una asimetría en la distribución que se refleja en un valor mayor de  $\Delta T_m$  al exhibido por f 60. El perfil correspondiente a f 94 muestra una relativa homogeneidad con respecto a las otras fracciones, destacándose además la presencia de componentes termoestables discretos. Esto sugiere que las secuencias de nucleótidos integrantes de esta fracción reasociaron con mayor precisión que las restantes.

#### Presencia del componente termoestable en especies relacionadas

Con el objeto de detectar la presencia de componentes parcial o totalmente homólogos al anteriormente mencionado, en ADNs de cricétidos filogenéticamente relacionados, se empleó la técnica de hibridación sobre puntos o "Dot Blot".

Se adsorbieron sobre filtros de nitrocelulosa (NC) cantidades crecientes de ADN total (entre 5 y 160 ng) de las especies filotinas pertenecientes al género Calomys: C. musculinus, C. laucha y C. calidus, de la especie akodontina perteneciente al género Akodon: A. molinae y de la oryzomina perteneciente al género Oryzomys: O. flavescens.

La Figura 19 muestra el autorradiograma obtenido luego de la hibridación de los ADNs adsorbidos a las membranas de NC con el  $^{32}\text{P}$  ADN termoestable de C. musculinus (fracción eluída a 94 °C). La intensa señal presente sobre todo el rango de cantidades de ADN de la especie homóloga y la ausencia casi total en los ADNs de las otras especies sugiere que este componente es específico de especie, ya que aún la forma considerada más próxima, C. laucha, carece del mismo. En los puntos correspondientes a 80 y 160 ng de ADN de las otras especies aparece una señal leve que podría constituir o bien reasociación inespecífica o cierto grado de homología, pero con secuencias de ADN que se hallarían en muy inferior número

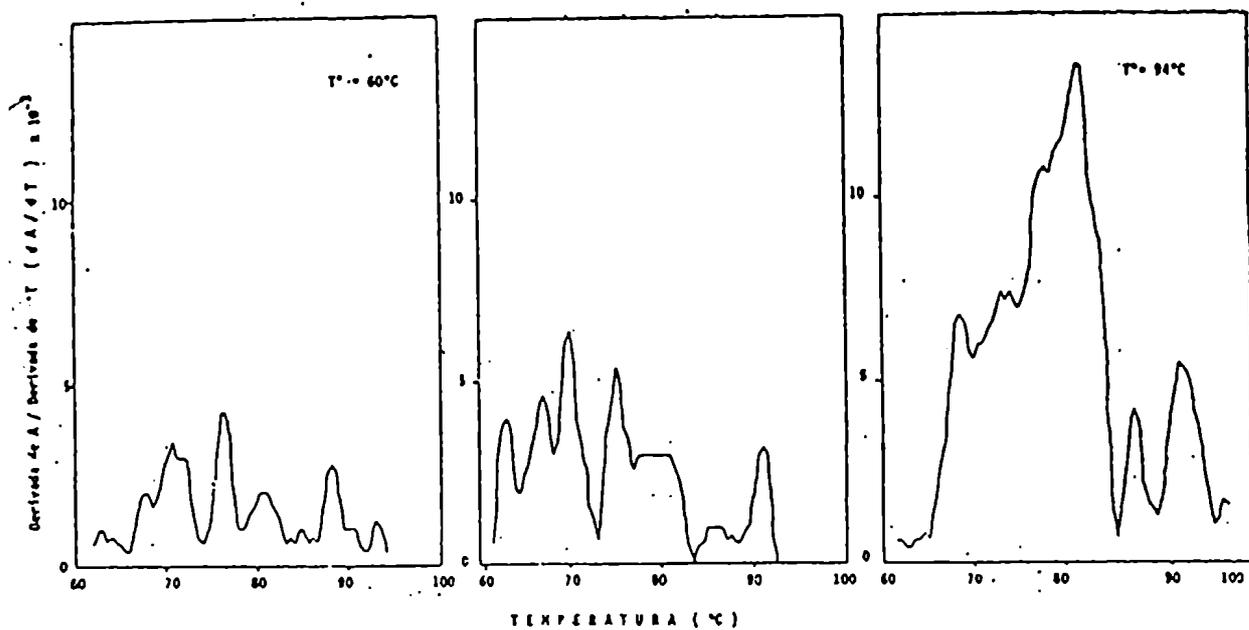


Figura 18. Perfiles de desnaturalización térmica -obtenidos por derivación numérica de los datos experimentales- de f 60, f 85 y f 94 reasociadas a Cot 0,3 M seg.

El solvente de las muestras es BP 0,12 M.

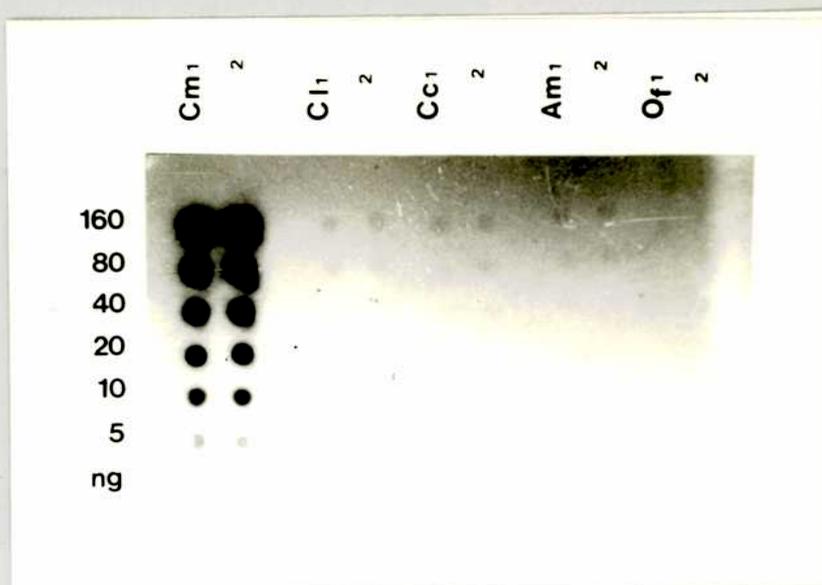


Figura 19. Autorradiograma obtenido luego de la hibridación de la fracción termoestable del ADN de C. musculus marcada con  $\alpha$   $^{32}$ P d CTP sobre cantidades crecientes de ADN de C. musculus (Cm), C. laucha (Cl), C. calidus (Cc), A. molinae (Am) y O. flavescens (Of).

Los números 1 y 2 corresponden a muestras independientes de la misma especie.

Condiciones de hibridación: en BLOTTO, a 60 °C, durante 16 h.

Lavados: hasta SSC 0,1 X, a 60 °C.

de copias que el que presenta el ADN de C. musculus. La comprobación de esta última alternativa conduciría a la demostración de una notable amplificación de secuencias en la especie mencionada.

#### Organización, riqueza en GC y metilación

Con el objeto de analizar estos aspectos del componente termoestable, el ADN de C. musculus se clivó con varias endonucleasas de restricción. Los fragmentos generados se separaron electroforéticamente, se transfirieron a membranas de NC e hibridaron con el componente termoestable marcado con  $^{32}\text{P}$  d CTP.

Las Figuras 20 y 21 muestran las fotografías de los geles y los autorradiogramas obtenidos luego de la hibridación con el componente termoestable usado como sonda. A partir de los patrones autorradiográficos obtenidos con tiempos de exposición cortos (panel central, Figura 20), se puede inferir que sólo las enzimas Hinf I y Alu I reconocen secuencias presentes en el componente termoestable. Esto se basa en la reducida señal detectable en las zonas de alto peso molecular en los caminos a y c. Las enzimas Dde I, Rsa I y Hae III, en tanto, reconocen secuencias menos frecuentes en el componente analizado, poniendo de manifiesto señales intensas próximas a los puntos de siembra aún cuando no es posible detectar fluorescencia en las correspondientes zonas del gel (panel izquierdo). Con tiempos de exposición mayores (panel derecho), las características mencionadas se confirman, demostrando que la enzima Alu I genera fragmentos de 1 a menos de 0,3 kb reconocibles por la sonda. Las otras tres enzimas generan fragmentos por encima de 0,4 kb para Dde I y Hae III y de 0,9 para Rsa I.

La Figura 21 -equivalente a la anterior- muestra los fragmentos de digestión generados por otras siete enzimas y los correspondientes autorradiogramas obtenidos luego de la hibridación con el componente en estudio. Con tiempos de exposición cortos (panel central) se detectaron señales restringidas a los puntos de siembra y zonas de alto peso molecular para cinco de las siete endonucleasas empleadas (camino b, c, d, e y f). El camino a -correspondiente a la endonucleasa Eco RI- muestra una señal continua desde 23 a 0,4 kb, exhibiendo una zona de mayor intensidad entre 0,8 y 3 kb. El cami-

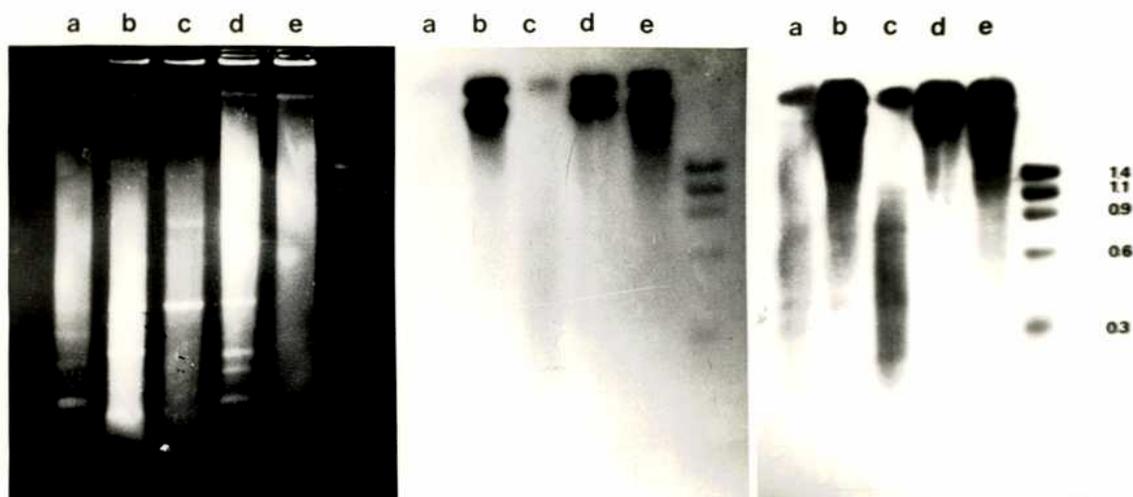


Figura 20. Gel de agarosa 2% (panel izquierdo) de ADN de C. musculus clivado con cinco endonucleasas de restricción. Autorradiogramas obtenidos con 12 h (panel central) y 36 h (panel derecho) de exposición luego de la hibridación de los filtros de nitrocelulosa con el componente termoestable usado como sonda. El ADN de C. musculus se clivó con Hinf I (a), Dde I (b), Alu I (c), Rsa I (d) y Hae III (e). Marcador de PM:  $\phi$ X 174/Hae III. Condiciones de hibridación y lavados iguales a las de la Figura 19.

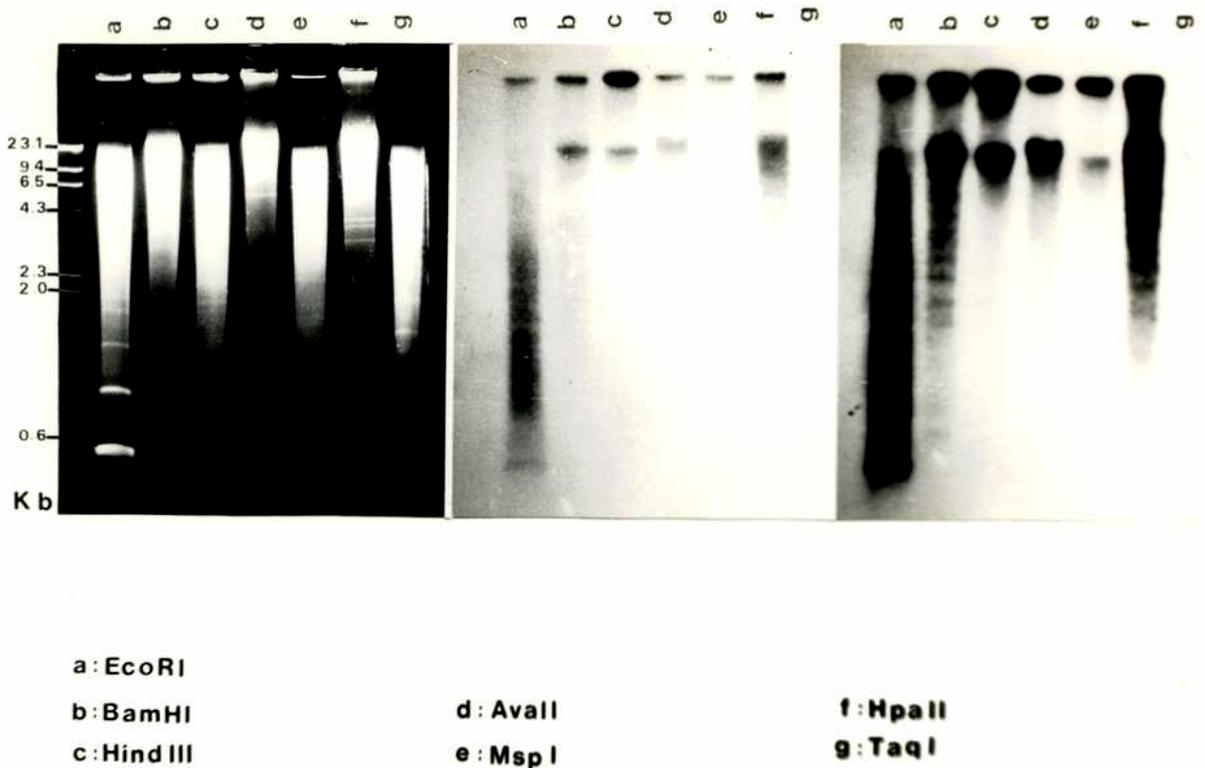


Figura 21. Gel de agarosa 1% (panel izquierdo) del ADN de C. musculus clivado con las enzimas de restricción mencionadas al pie de la foto. Autorradiogramas correspondientes obtenidos con 12 h (panel central) y 36 h (panel derecho) de exposición, luego de la hibridación con el componente termoestable de C. musculus usado como sonda.

En este caso se hizo transferencia bidireccional a filtros de nitrocelulosa.

Condiciones de hibridación y lavados iguales a las de la Figura 19.

no g -correspondiente a la enzima Taq I -no denota señal alguna. Para tiempos de exposición más prolongados se confirmaron los resultados anteriores, poniéndose además de manifiesto que en el camino de la enzima Bam HI (b) aparecen señales correspondientes a bandas no multiméricas. En los caminos c y d -Hind III y Ava II, respectivamente- sólo se detectan señales en zonas de alto peso molecular. Los isoesquizómeros Msp I y Hpa II (caminos e y f, respectivamente) ponen de manifiesto una marcada diferencia en cuanto a la frecuencia de citosina interna metilada en el componente en estudio, ya que en el camino de Hpa II (C/CGG) aparece una señal de mayor intensidad que en el de Msp I. La falta de señal en este camino podría atribuirse a la abundancia de sitios de reconocimiento para Msp I que llevaría a una marcada degradación del componente. Del mismo modo, la ausencia de señal en el camino g -correspondiente a Taq I (T/CGA) indicaría una elevada frecuencia de esta clase de sitios en el ADN en estudio.

Dado que en el camino correspondiente a Eco RI (Figura 21) aparece una señal definida en 370 pb se decidió comprobar si esa banda formaba parte del componente termoestable. Con este objeto se aisló esa banda a partir de un gel preparativo para marcarla y emplearla como sonda. Para este ensayo de hibridación se usó la segunda membrana correspondiente a la transferencia bidireccional de la Figura 21. Por otro lado se pretendía comprobar en el mismo ensayo si la ausencia de señal en el camino correspondiente a Taq I (Figura 21) se debía a un artificio metodológico (transferencia ineficaz). La Figura 22 muestra el gel y el autorradiograma correspondientes a este ensayo. Si el patrón de hibridación con la banda Eco RI coincidiera con el obtenido con el componente termoestable podría suponerse que tal banda constituía una parte integrante del mismo. Los resultados experimentales permitieron por un lado descartar tal posibilidad y, por otro lado, hicieron evidente que la banda de 370 pb forma parte de un repetitivo en tándem con multímeros desde 370 a 6000 pb (camino a). En tercer lugar se demostró que la transferencia fue eficaz ya que el camino correspondiente a Taq I presenta una intensa señal con multímeros similares a los de Eco RI. Esto sugiere que los sitios Taq I y Eco RI

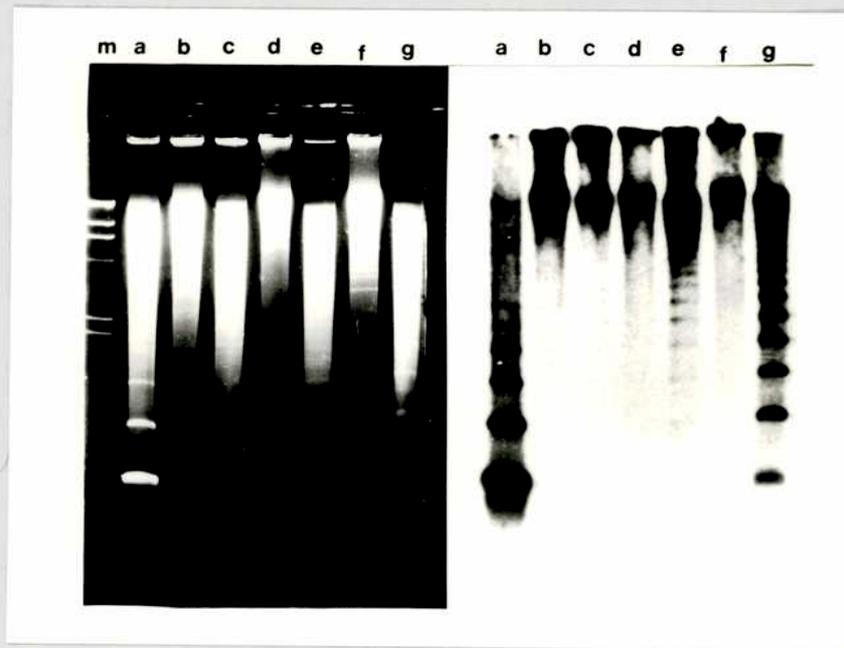


Figura 22. El mismo gel de agarosa 1% (panel izquierdo) que se muestra en la Figura 21. Autorradiograma (panel derecho) obtenido luego de la hibridación con el fragmento de restricción de 370 pb generado por Eco RI en el ADN de C. musculus (flecha), aislado del gel y marcado con  $\alpha^{32}\text{P}$  d CTP.

En este ensayo se usó el segundo filtro obtenido por transferencia bidireccional.

Condiciones de hibridación y lavados iguales a las de la Figura 19.

Marcador: ADN de fago  $\lambda$  clivado con Hind III (23,1; 9,4; 6,7; 4,4; 2,3; 2,0 y 0,6 kpb).

se encuentran muy próximos entre sí, puesto que la ubicación de los multímeros generados por ambas enzimas es aproximadamente la misma. Por último, debe destacarse también la presencia de señales multiméricas entre 2 y 6 kb en el camino correspondiente a la enzima Msp I.

Para confirmar las observaciones mencionadas anteriormente con respecto a una elevada frecuencia de sitios de reconocimiento para Taq I y Msp I en el componente termoestable, se realizaron restricciones parciales del ADN de C. musculus con estas dos endonucleasas. La Figura 23 muestra los geles y los autorradiogramas correspondientes. Como puede apreciarse, en el ensayo de digestiones parciales de ADN de C. musculus con Taq I sólo aparece una señal claramente visible en el camino correspondiente a 7,5 min de incubación. A los 15 min esta señal se ha reducido en forma marcada, desapareciendo a los 30 min. A tiempos de incubación mayores la señal está ausente. Estos resultados permiten afirmar que las secuencias heterogéneas constituyentes del componente termoestable de C. musculus presentan una característica en común: elevada frecuencia de secuencias T/CGA, reconocibles por Taq I y proximidad de las mismas. Este hecho, sumado a la presencia de abundantes sitios de reconocimiento para Alu I (AG/CT) -que genera un patrón autorradiográfico con fragmentos entre 250 y 1000 pb (Figura 20, camino c)- permitirían postular la existencia de repetidos directos e invertidos ("inverted repeats") ya que las secuencias de reconocimiento de ambas enzimas son complementarias.

En el caso de la cinética de restricción del ADN de C. musculus con Msp I (Figura 23) la señal de hibridación disminuye a medida que aumentan los tiempos de incubación sugiriendo una elevada frecuencia de sitios de reconocimiento para esta enzima. Esto demuestra un marcado nivel de metilación en el componente termoestable de C. musculus.

Los patrones autorradiográficos resultantes del análisis con doce enzimas de restricción (Figuras 20 y 21) sugieren que este componente está constituido por una familia heterogénea de secuencias con un patrón de repetición disperso. Esta afirmación se basa en dos observaciones; en primer lugar, los patrones autorradio-

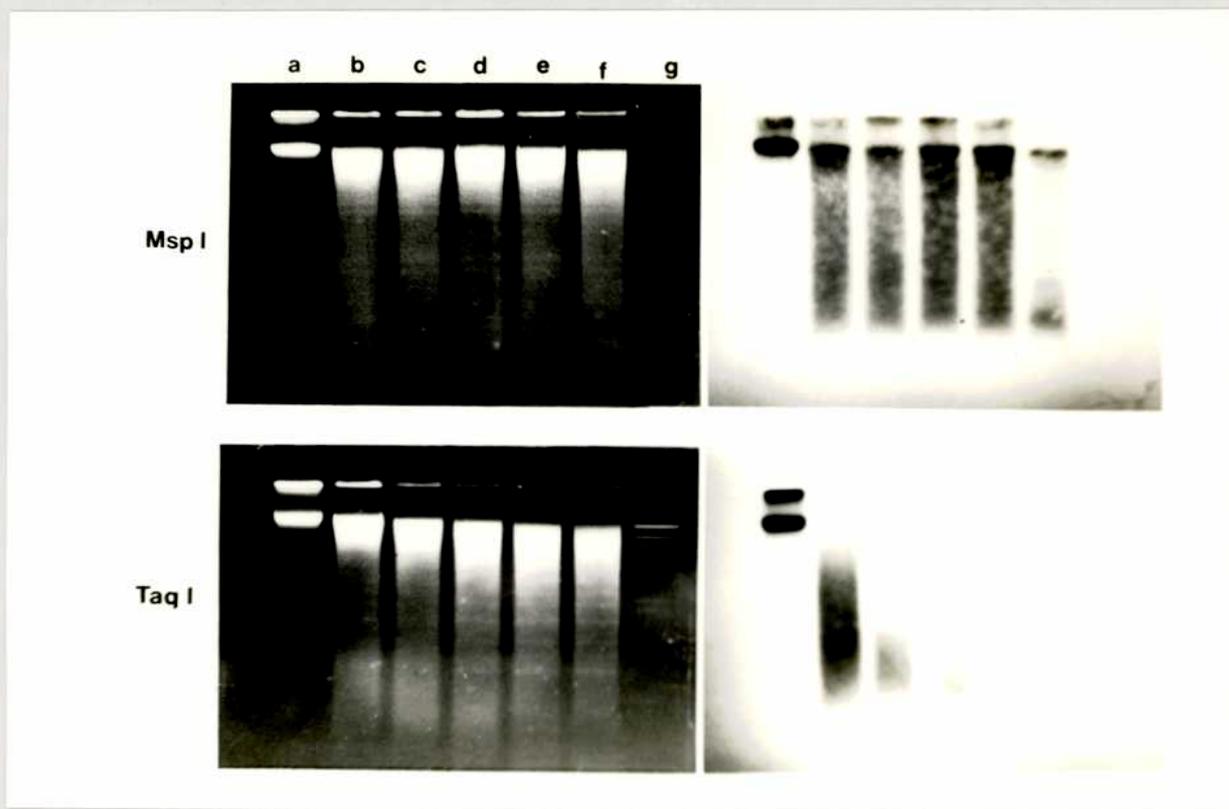


Figura 23.

Panel superior izquierdo. Gel de agarosa 1 % de ADN de C. musculus digerido parcialmente con Msp I; a: ADN sin clivar; b: incubado 7,5 min; c: 15 min; d: 30 min; e: 60 min; f: 120 min; g: Marcador ( $\lambda$ /Hind III).

Panel superior derecho. Autorradiograma obtenido luego de la hibridación con el componente termoestable de C. musculus.

Paneles inferiores izquierdo y derecho. Similares a los superiores pero con digestiones parciales realizadas con Taq I.

Condiciones de hibridación y lavados como en la Figura 19.

gráficos obtenidos con siete de las doce enzimas utilizadas presentan señales de tipo chorreado o "smear" en las que no se detectan bandas multiméricas; la segunda evidencia experimental proviene del análisis de restricciones parciales con dos endonucleasas cuyos sitios de reconocimiento son frecuentes en este componente; tampoco en este caso pudieron detectarse bandas multiméricas indicativas de organización de repetitivos en tándem.

Resumiendo lo dicho anteriormente, la fracción termoestable presenta sitios de reconocimiento para la enzimas:

Taq I (T/CGA)

Hinf I (G/ANTC)

Alu I (AG/CT)

Eco RI (G/AATTC)

Bam HI (G/GATTC)

Hpa II (C/CGG)

Msp I (C/CGG) y (C/mCGG)

lo que induciría a pensar que las secuencias integrantes de tal fracción no poseen un marcado enriquecimiento en GC. Por otro lado, una enzima como Hae III, cuya secuencia de reconocimiento es 100 % GC (GG/CC) no corta en forma apreciable el ADN genómico reconocible por la sonda.

#### Estructura del componente termoestable

Como se comentara anteriormente, la elevada frecuencia de sitios Taq I (T/CGA) y de sitios Alu I (AG/CT) permiten suponer que las secuencias presentes en el componente termoestable de C. musculus poseen zonas de tipo repetitivos invertidos. De acuerdo a que las secuencias invertidas sean adyacentes a las secuencias directas o estén separadas de aquéllas, podrán generar distinto tipo de estructuras luego de la desnaturalización y posterior reasociación, según el esquema de la Figura 24.

Para la reasociación de ADN a tiempo cero se pueden establecer dos tipos diferentes de estructuras que involucren -dentro de cada cadena- secuencias de tipo repetitivo invertido. La ausencia o presencia de estructuras de tipo tallo - rulo ("stem loop") estará determinada por la existencia de secuencias separadoras entre los

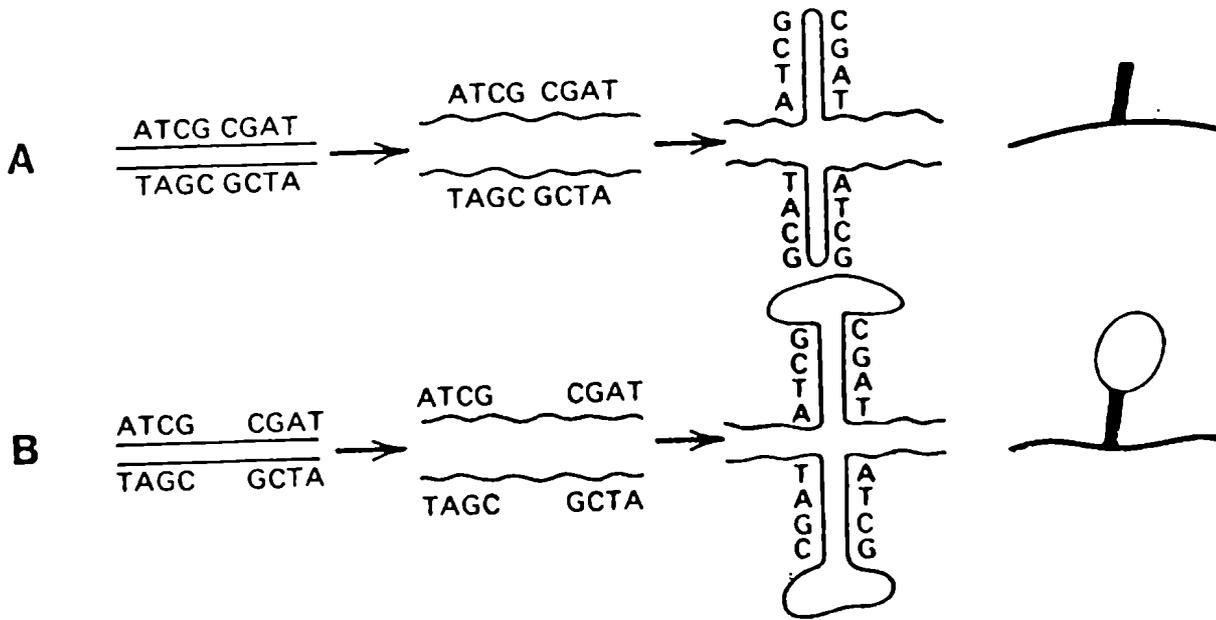


Figura 24

ESQUEMA: Modelo de renaturalización de fragmentos con secuencias directas e invertidas complementarias. A. Sin espaciadores entre las mismas. B. Con espaciadores (Tomado de Lewin, 1980).

repetitivos directos y los invertidos. En caso de ser estas secuencias adyacentes sólo se espera la formación de un tallo; en cambio, si las secuencias se encuentran separadas se esperará una estructura de tipo "stem loop". En este último caso el "loop" estará constituido por una única cadena polinucleotídica.

Con el objeto de analizar la formación de estas posibles estructuras se diseñaron una serie de experimentos basados en el empleo de nucleasa S1. Esta enzima nucleolítica, en condiciones adecuadas, actúa específicamente sobre segmentos monocatenarios de ADN, siendo además particularmente activa en las zonas de transición ADN B  $\longrightarrow$  Z. Inicialmente estos ensayos tendieron a detectar la presencia de estructuras de tipo tallo - rulo en el ADN nativo.

Como sustrato de S1 se empleó ADN de C. musculinus, previamente clivado con Hind III. Dado que el componente termoestable no presenta sitios de reconocimiento para esta enzima, su empleo permitió reducir el tamaño total del ADN, disminuyendo así posibles señales autorradiográficas inespecíficas. Se trataron 2 ug de ADN con 0,1, 1, 10 y 100 U/ml de S1. Para controlar la actividad enzimática se desnaturalizaron 2 ug de ADN de la misma especie a 100 °C durante 10 min y se dejó enfriar la muestra en el mismo baño; posteriormente se la trató con 100 U/ml de S1 a 37 °C durante 1 h.

La Figura 25 muestra el gel y el autorradiograma, luego de la hibridación con el componente termoestable marcado radiactivamente. De acuerdo con los patrones observados podemos considerar que esta metodología no permite detectar zonas monocatenarias ni regiones de transición ADN B  $\longrightarrow$  Z. Sin embargo no es posible descartar la existencia de estas estructuras hasta que no se empleen técnicas más sensibles (v.g. electroforesis en geles de poliacrilamida, electrotransferencia y posterior hibridación con la sonda de interés).

Un hecho a destacar es que en el camino correspondiente al control de actividad enzimática (camino f en la Figura 25), si bien en el gel se ve una digestión aparentemente total, en el autorradiograma aparece una señal muy intensa próxima al punto de siembra, a la misma altura que para las otras muestras, con un tamaño de fragmento próximo a los 23 kpb.

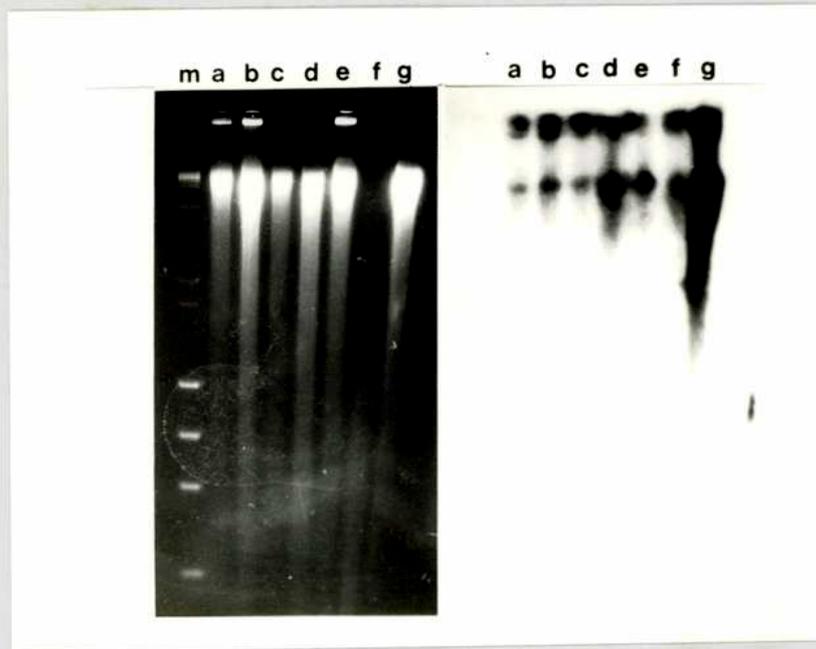


Figura 25.

Panel izquierdo. Gel de agarosa 1,5 % de ADN de C. musculus digerido con Hind III y tratado con diferentes concentraciones de nucleasa S 1:

a: 0,1 U/ml; b: 1 U/ml; c: 10 U/ml; d: 100 U/ml;  
e: sin S 1; f: ADN nativo desnaturalizado, tratado con 100 U/ml de S 1; g: ADN nativo tratado con 100 U/ml de S 1;

m: Marcador ( $\lambda$ /Hind III +  $\phi$ X 174/Hae III).

Panel derecho. Autorradiograma luego de la hibridación con el componente termoestable de C. musculus.

Condiciones de hibridación y lavados como en la Figura 19.

Esta observación planteó dos posibles alternativas:

a. el ADN termoestable no se desnaturaliza bajo las condiciones empleadas (100 °C, 10 min) o,

b. una vez desnaturalizado reasocia muy rápidamente, restaurando su condición bicatenaria.

Con el objeto de probar alguna de estas alternativas se desnaturalizaron a 100 °C, durante 10 min, cuatro muestras de 2 ug cada una. Una de ellas se congeló al concluir el tiempo de desnaturalización; las demás se incubaron 1, 5 y 30 min a 60 °C respectivamente y luego se congelaron. Posteriormente cada muestra se trató con 100 U/ml de nucleasa S1, durante 1 h a 37 °C. Los productos de las digestiones se separaron electroforéticamente en geles de agarosa y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Para la hibridación se usó como sonda el componente termoestable de C. musculinus. La Figura 26 muestra la electroforesis y el autorradiograma obtenidos. Se incluyeron en el mismo ensayo los tratamientos con concentraciones crecientes de S1 usando como sustrato ADN de C. musculinus clivado con Hind III.

Como puede observarse, el componente termoestable se desnaturaliza y reasocia a tiempos muy cortos, lo que confirma la segunda alternativa inicialmente planteada. A los 30 min de incubación se reestructura como un componente de gran tamaño, equivalente a fragmentos de unos 20 kpb.

Si bien el método empleado no es concluyente para descartar la existencia de estructuras de tipo "stem loop" -dada la imposibilidad de detectar productos de digestión de tamaño pequeño- permite demostrar que las secuencias integrantes del componente termoestable presentan una organización tal que al reasociar generan una estructura de gran tamaño aparente. Podría tratarse de una red compleja aunque resulta improbable por el corto tiempo de reasociación; es más factible pensar en una estructura en la que alternan secuencias repetidas invertidas con secuencias repetidas directas, sin separadores entre las mismas.

Por otro lado, la técnica empleada permitió confirmar el elevado grado de repetición de las secuencias integrantes del componente termoestable, previamente establecido por estudios de cinética

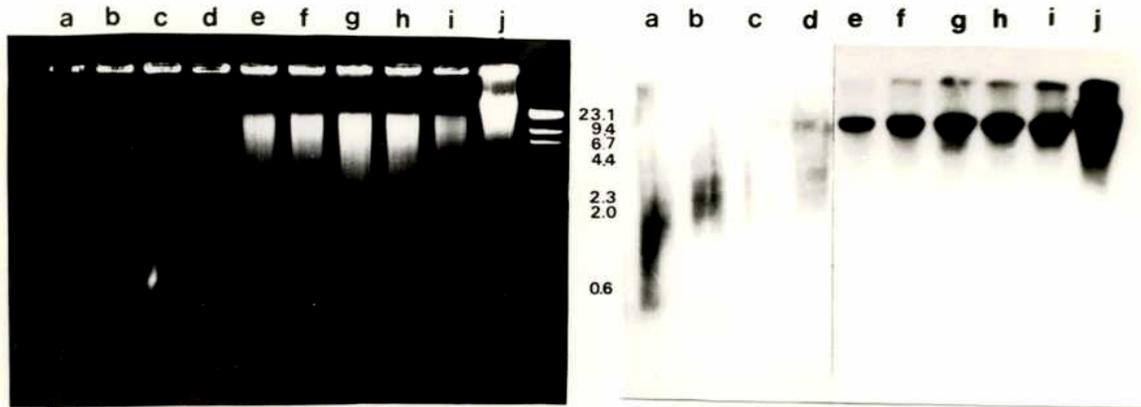


Figura 26.

Panel izquierdo. Gel de agarosa 1 % de ADN de C. musculus, analizado con nucleasa S1.

a, b, c, d: ADN desnaturalizado a 100 °C, 10 min e incubado a 60 °C distintos tiempos; a: sin incubar; b: 1 min; c: 5 min; d: 30 min.

e, f, g, h, i: ADN de C. musculus previamente clivado con Hind III y tratado luego con concentraciones crecientes de nucleasa S1; e: sin S1; f: 1 U/ml; g: 10 U/ml; h: 100 U/ml; i: 1000 U/ml.

j: ADN nativo.

Marcador: ADN de fago  $\lambda$  digerido con Hind III.

Panel derecho. Autorradiografía obtenida luego de hibridar con el componente termoestable.

Condiciones de hibridación y lavados como en la Figura 19.

de reasociación. Asimismo, la reestructuración de una "superestructura" de alto peso molecular aparente luego de la reasociación y tratamiento con nucleasa S1, es concordante con los resultados obtenidos durante los experimentos de desnaturalización térmica del componente termoestable, eluído a 94 °C, previamente reasociado hasta Cot 0,3 M seg (12 % de reasociación para Cot  $10^{-1}$  M seg).

#### Localización cromosómica del componente termoestable

La técnica de hibridación "in situ" permitió a Pardue y Gall (1970) localizar cromosómicamente el ADN satélite de M. musculus. Estos autores demostraron que las secuencias integrantes de esa fracción se ubican en la región centromérica de todos los cromosomas del complemento, siendo esta localización coincidente con la zona de heterocromatina constitutiva detectable por bandeo C.

En este trabajo, el empleo de la técnica de hibridación "in situ" tuvo por objeto poner de manifiesto la localización cromosómica de las secuencias componentes de la fracción termoestable de C. musculus. Las dos sondas usadas -fracción eluída a 94 °C y ADN altamente repetido (Cot 0,1 M seg) marcados con  $^3\text{Hd TTP}$  y  $^3\text{Hd CTP}$ - se hibridaron sobre cromosomas metafásicos de C. musculus (hibridación homóloga).

En la Figura 27 a se muestra el patrón de hibridación para el componente termoestable. Como puede observarse, hay una gran concentración de granos de plata en prácticamente todo el complemento cromosómico -con excepción de un par de metacéntricos pequeños (señalados con flechas)- y la localización de los mismos es netamente centromérica.

En la Figura 27 b la sonda empleada para la hibridación "in situ" fue ADN altamente repetido. En este caso, al igual que en el anterior, hay marcación específica en casi todos los cromosomas pero la localización es en algunos casos centromérica y en otros secundaria intercalar, en brazos cromosómicos. Dado que a este valor de Cot el componente termoestable es capaz de reasociar, la localización centromérica es compatible con la de la Figura 27 a, en tanto que la marcación dispersa podría corresponder a secuencias menos repetidas, presentes en la sonda como "secuencias con-

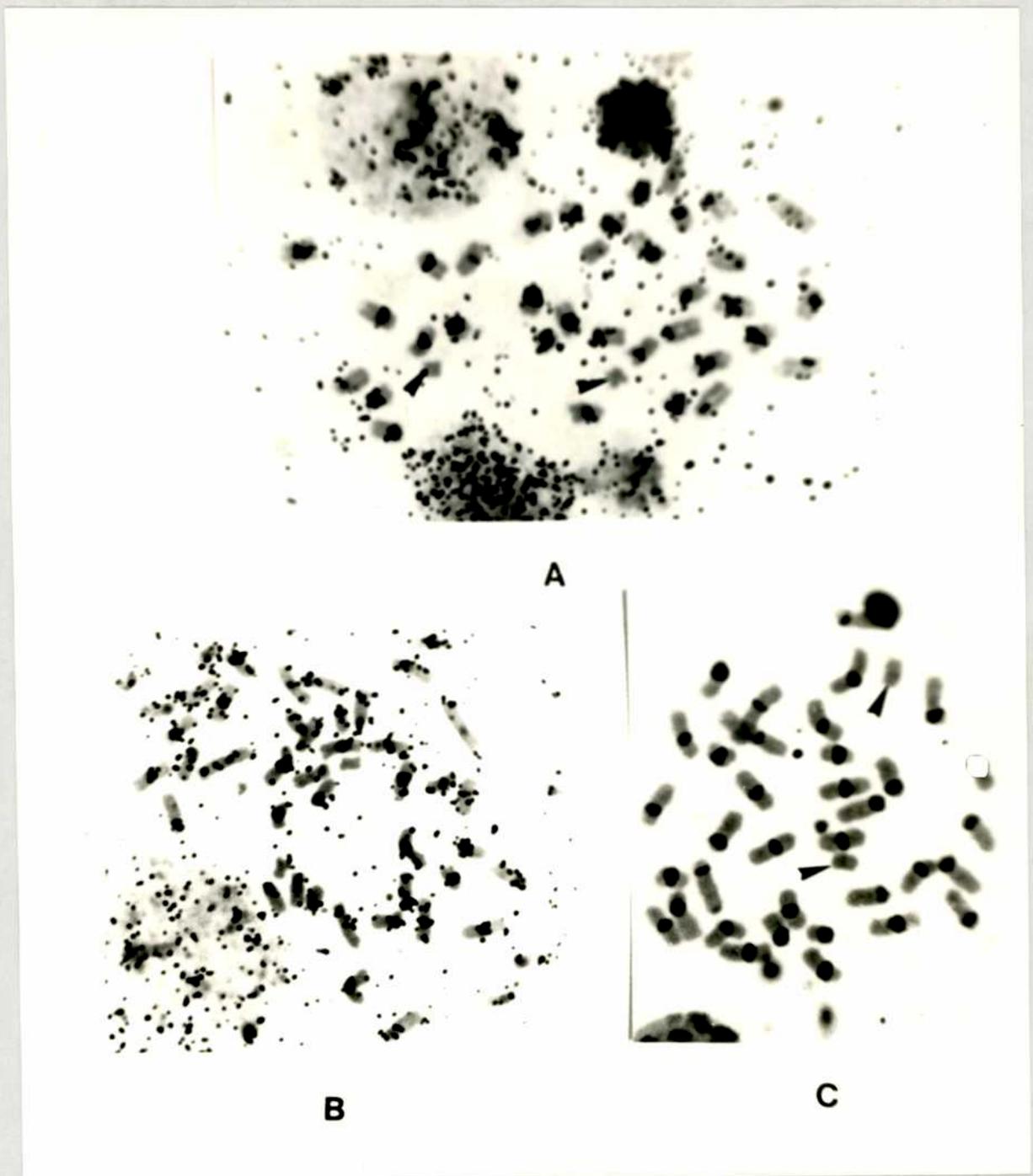


Figura 27. a. Hibridación "in situ" del  $^3\text{H}$ ADN termoestable de C. musculus sobre una metafase de C. musculus.  
b. Hibridación "in situ" de  $^3\text{H}$ ADN de C. musculus reasociado a Cot 0,1 Mseg sobre una metafase de C. musculus.  
c. Patrón de bandas C en una metafase de C. musculus.

taminantes".

La Figura 27 c muestra una metafase de C. musculus con bandeado C. Excepto un par de metacéntricos pequeños (señalados con flechas) todos los cromosomas presentan bandas C de ubicación centromérica, indicativos de presencia de heterocromatina constitutiva. Aunque no es posible afirmarlo, puede suponerse que el par de metacéntricos carentes de bandas C corresponde al carente de marcación en el ensayo de hibridación "in situ" con el componente termoestable (Figura 27a).

Si bien el componente en estudio no presenta algunas de las características habituales de los ADNs satélites -secuencias repetidas dispuestas en tándem, detección en gradientes de densidad- su distribución cromosómica permite suponer que se trate de un ADN satélite críptico. Por otra parte, la coincidencia entre los patrones de bandeo C y los de hibridación "in situ" con este componente sugieren que las secuencias integrantes del mismo forman parte de la heterocromatina constitutiva.

### CAPITULO III

En el primer capítulo se analizaron los resultados obtenidos durante la caracterización del ADN de las especies Calomys musculinus y Calomys laucha, poniéndose de manifiesto similitudes y diferencias en cuanto a las propiedades fisicoquímicas del mismo y a la organización del genoma de las dos especies comparadas. El segundo capítulo incluye la descripción de los resultados obtenidos en la caracterización molecular del componente termoestable presente en el ADN de C. musculinus. Las metodologías usadas en los dos capítulos pueden considerarse estadísticas y estáticas; los resultados presentados en el primer capítulo hicieron posible la comparación "por analogía" de los ADNs de las especies en estudio.

En el presente capítulo los estudios realizados trascienden a los miembros del género Calomys, abarcando a otras especies de roedores cricétidos filogenéticamente relacionadas. Los métodos empleados aquí pueden considerarse estadísticos y dinámicos y los resultados obtenidos permiten estimar niveles de homología entre las secuencias de ADN de las especies comparadas.

Las técnicas de hibridación ADN-ADN fueron desarrolladas a principios de la década del 60; desde entonces han sido ampliamente empleadas para investigar las posibles relaciones filogenéticas entre virus (Schildkraut et al., 1962), bacterias (McCarthy & Bolton, 1963), plantas (Bendich & McCarthy, 1970; Miksche & Hotta, 1973) y animales (Hoyer et al., 1965; Laird & McCarthy, 1968; Walker, 1968). Estos trabajos son de gran importancia tanto desde el punto de vista metodológico como conceptual y los resultados obtenidos reflejan fundamentalmente el grado de homología de las secuencias repetidas. En estos experimentos se empleaba ADN total tanto de la especie "trazadora" -marcada radiactivamente- como de la "conductora" -cuya homología con la anterior se deseaba establecer-; bajo las condiciones experimentales empleadas las reasociaciones heterólogas se producían esencialmente entre las secuencias repetidas presentes en los ADNs analizados (Shields & Strauss, 1974). En 1968 Britten y Kohne demostraron que el ADN eucariota se encuentra organizado en familias con diferente grado de repetición, más un componente de secuencias de copia

única y sugirieron que las secuencias repetidas presentan una mayor variabilidad que las secuencias de copia única - entre las cuales se encuentran las constituyentes de los genes estructurales. Sobre esta base -mayor variabilidad de las secuencias repetidas- los estudios tendientes a aclarar relaciones filogenéticas por técnicas de hibridación ADN-ADN se restringieron a comparar secuencias de copia única (Kohne et al., 1971; Hoyer et al., 1972).

Posteriormente, la disponibilidad de herramientas analíticas provenientes de las técnicas de ADN recombinante hizo que los evolucionistas moleculares volcaran nuevamente su atención sobre el ADN repetido. Si bien se consideraba que este ADN era sumamente variable bajo presiones selectivas fuertes (Britten & Kohne, 1968), posteriormente se comprobó que ciertas secuencias repetidas presentan un grado de conservación alto (Flavell et al., 1977; Peacock et al., 1978; Brykov et al., 1979; Fry & Salser, 1977; Gillespie et al., 1980; Gillespie et al., 1982). Por otro lado, la localización cromosómica de las secuencias repetidas -fundamentalmente centromérica o telomérica- llevó a considerarlas potencialmente involucradas en fenómenos de plasticidad cromosómica (Flavell, 1982), como posibles determinantes de la arquitectura nuclear (Manuelidis, 1982) o como probables responsables del establecimiento de barreras precigóticas en procesos de especiación (Fry & Salser, 1977).

Este capítulo trata del estudio de homologías entre ADNs de especies pertenecientes a diferentes géneros de cricétidos con distribución argentina. Con este objeto se extrajo ADN de cinco especies representantes de tres tribus de roedores cricétidos con diferente grado de especialización. Las tribus elegidas fueron: Oryzomyini -como la más primitiva- y dentro de ésta la especie Oryzomys flavescens, Akodontini -con un nivel de especialización intermedio- con la especie Akodon molinae y Phyllotini -con mayor nivel de especialización- y las especies Calomys musculinus, C. laucha y C. calidus.

Por otro lado, dado que estos roedores presentan números cromosómicos muy variables, se intentó comprobar la validez del modelo enunciado por Pearson y Patton (1976) y Gardner y Patton (1976). Estos autores postulan que en roedores cricétidos sudamericanos la transición desde estadios primitivos hacia estadios evolucionados se co-

rrelaciona con una reducción en el número diploide. Así, los experimentos diseñados para analizar el grado de homología entre ADNs repetidos permitieron también investigar la correlación entre número diploide y niveles de homología entre secuencias repetidas de las especies comparadas. La TABLA X resume algunas características cariológicas de los roedores analizados:

TABLA X

TRIBU	ESPECIE	2 n	BANDAS C
Phyllotini	<u>C. musculus</u>	38	+++++
	<u>C. laucha</u>	64	+
	<u>C. calidus</u>	48	++
Akodontini	<u>A. molinae</u>	42	+
Oryzomyini	<u>O. flavescens</u>	60	+++

El estudio se realizó empleando la técnica de hibridación sobre puntos ("Dot Blot", Kafatos et al., 1979). Muestras de ADN total de cada una de las cinco especies fueron adsorbidas a membranas de nitrocelulosa en cantidades de 1, 5, 10, 20, 40, 80, 160 y 230 ng. Posteriormente se hibridaron con sondas de ADN total de cada una de las cinco especies -en ensayos separados- marcadas con  $^{32}\text{P}$  d CTP. Es decir, los ADNs de las diferentes especies se hibridaron -en ensayos separados- con todas las sondas radiactivas -ADN+- de las especies analizadas. Las hibridaciones se llevaron a cabo en BLOTTO - SSC 6X y se incubaron a 60 °C durante 12-14 h. Los lavados se efectuaron hasta alcanzar una concentración salina relativamente estricta, SSC 1X, manteniéndose la temperatura de los mismos en 60 °C. Bajo las condiciones empleadas -concentración salina de los lavados, temperatura de incubación y cantidades de ADN adsorbido a las membranas- sólo cabe esperar la hibridación de secuencias repetidas. Las membranas hibridadas, luego de lavadas, se expusieron a placas radiográficas -16 h a temperatura ambiente- y posteriormente fueron cortadas para determinar la radiactividad incorporada en cada punto de

siembra por conteo de centelleo.

La Figura 28 muestra los autorradiogramas obtenidos. Los puntos constituyen la señal de hibridación entre el ADN fijado a las membranas y la sonda de ADN marcado radiactivamente (ADN+) de cada una de las especies. El empleo de cantidades crecientes de ADN adsorbido a las membranas (1 a 230 ng) permitió una visualización más clara de los resultados, haciendo posible no sólo el análisis cualitativo de los mismos sino también una evaluación estadística de los porcentajes de hibridación a partir de los valores de cuentas por minuto (cpm) presentes en cada uno de los puntos de siembra.

En todos los casos las hibridaciones homólogas -ADN fijado de cada especie hibridado con ADN+ de la misma especie- exhibieron las señales más intensas. El análisis cualitativo de los autorradiogramas permitió poner de manifiesto las siguientes observaciones:

- ADN+ de Calomys musculus: señal de hibridación intensa con el de C. laucha, algo menor con el de C. calidus y comparativamente mucho menor, e igual, con los de A. molinae y O. flavescens.
- ADN+ de Calomys laucha: señal intensa con el ADN de C. musculus, algo más tenue con el de C. calidus y comparativamente mucho menor con los de A. molinae y O. flavescens.
- ADN+ de Calomys calidus: señal de hibridación semejante con las otras dos especies de Calomys y comparativamente mucho menor con los de A. molinae y O. flavescens.
- ADN+ de Akodon molinae: señal de hibridación intensa con las tres especies de Calomys y más tenue con el ADN de O. flavescens.
- ADN+ de Oryzomys flavescens: señal de hibridación semejante con los tres ADNs de Calomys y más tenue con el ADN de A. molinae.

El análisis cualitativo de estos resultados pone de manifiesto una mayor homología entre las secuencias repetidas presentes en los genomas de las especies congénicas de Calomys, siendo más marcada entre C. musculus y C. laucha. Por otro lado, los re-

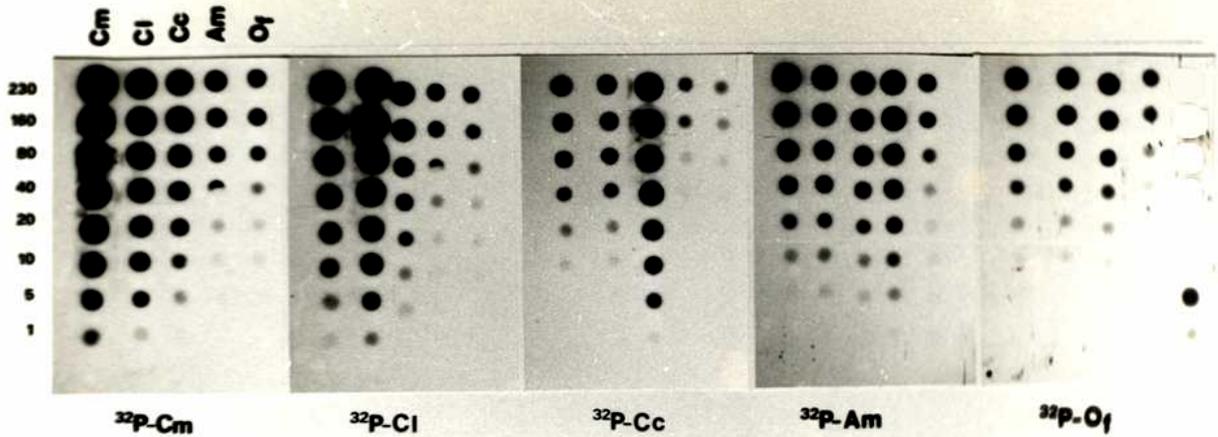


Figura 28. Autorradiografía de los ensayos de hibridación de las sondas de ADN total + de cada una de las cinco especies de roedores comparadas: C. musculus (Cm), C. laucha (Cl), C. calidus (Cc), A. molinae (Am) y O. flavescens (Of), sobre ADN genómico total homólogo y heterólogo.

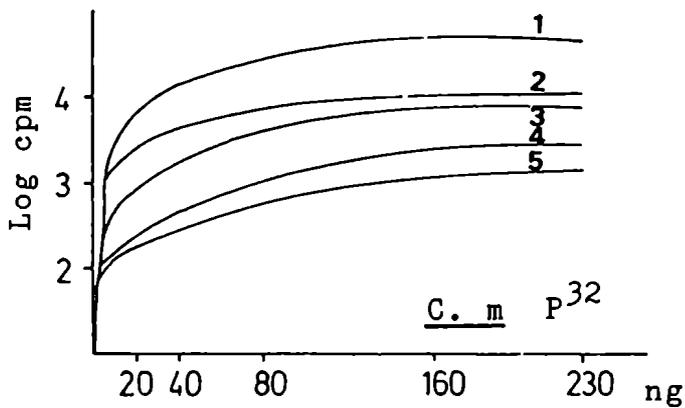
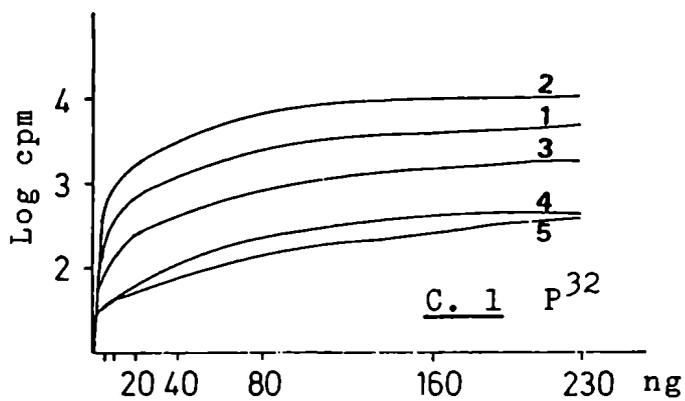
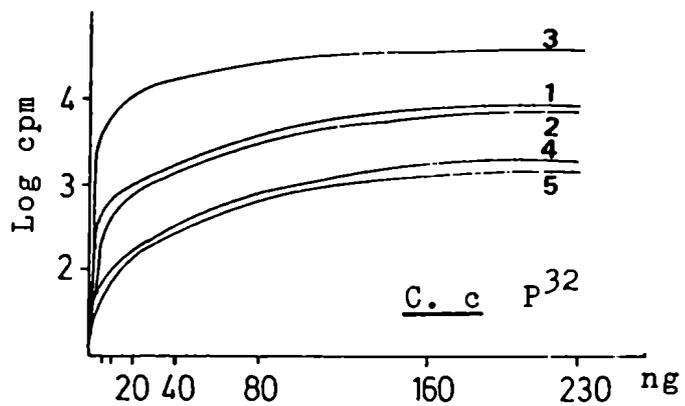
Las hibridaciones se llevaron a cabo en BLOTTO - SSC 6X y se incubaron a 60 °C durante 12-14 h. Los lavados se efectuaron hasta SSC 1X, a 60 °C. Las placas radiográficas se expusieron a temperatura ambiente durante 16 h.

sultados obtenidos en el ensayo en el que se empleó ADN+ de A. molinae son llamativos, ya que el grado de hibridación entre esta sonda y los ADNs de Calomys es particularmente intenso, en tanto que en los en que se emplearon los ADNs+ de los Calomys las señales producidas sobre el ADN fijado de A. molinae presentan una intensidad notablemente menor. Una situación semejante pudo observarse en los ensayos en los que se usaron sondas de los Calomys y material fijado de Oryzomys y los ensayos recíprocos, aunque en éstos las diferencias entre las hibridaciones no son tan marcadas como en el caso de Calomys x Akodon.

La cuantificación de las cpm incorporadas en cada punto de hibridación permitió por un lado la confección de curvas de incorporación de cpm en función de las cantidades de ADN adsorbido a la membrana (Figura 29) y por otro el análisis cuantitativo de los resultados. Para estimar el grado de homología, se consideró como el 100 % de homología a los valores de cpm de los puntos de hibridación homóloga -para cada una de las cantidades de ADN fijado- y a partir de estos valores se establecieron los porcentajes de hibridación de las otras especies (hibridaciones heterólogas).

La TABLA XI resume, bajo la forma de una matriz de datos, los resultados obtenidos durante los ensayos de hibridación sobre puntos. Los valores mostrados constituyen los promedios obtenidos a partir de los porcentajes de hibridación alcanzados para cada una de las ocho cantidades de ADN de cada especie. Se puede observar que, salvo en el caso de hibridaciones entre los ADNs de los Calomys, las hibridaciones recíprocas no son comparables (considerando como hibridaciones recíprocas a aquellas resultantes de sondear con ADN+ A sobre ADN fijado B y con ADN+ B sobre ADN fijado A). Esta falta de reciprocidad es mayor en los ensayos efectuados con los ADN+ de Calomys y el ADN fijado de A. molinae, en los que sólo se detecta un 2-3 % de hibridación. En cambio, en el ensayo con ADN+ de A. molinae sobre los ADNs fijados de Calomys, los niveles de hibridación son notablemente mayores -entre 62 y 65 %- . La falta de reciprocidad también fue advertida entre los ADNs de Calomys y el de Oryzomys flavescens, aunque en este

**A**



**B.**

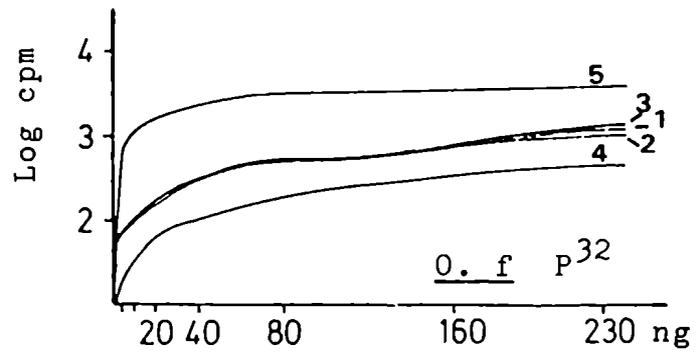
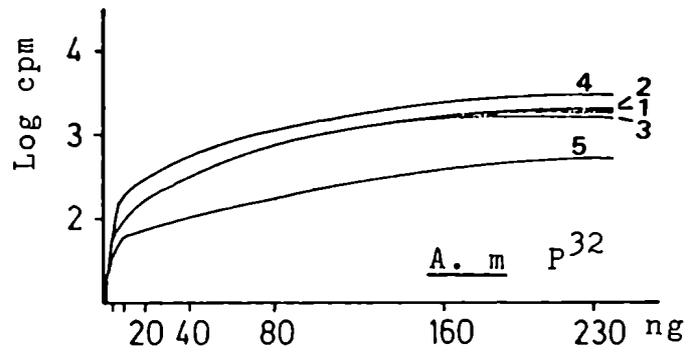


Figura 29: Gráficas de incorporación de epm en función de las cantidades de ADN adsorbido a las membranas. A.- Empleando como sonda los ADNs genómicos de cada una de las especies de Calomys. (C.m:1, C.l:2 y C.c:3). B.- Usando como sonda A.m:4 y O.f: 5. Los trazados de las curvas se identifican mediante el mismo código de números. Ambas figuras representan el log cpm en función de ng de ADN adsorbido.

TABLA XI

ADN <sup>32</sup>P dCTP

	<u>C. m</u>	<u>C. l</u>	<u>C. c</u>	<u>A. m</u>	<u>O. f</u>
<u>C. m</u>	100	41 ± 5,7	10 ± 5,5	61 ± 3,5	15 ± 8,7
<u>C. l</u>	33 ± 2,3	100 ± 3,4	12 ± 7,2	65 ± 7,2	14 ± 7,9
<u>C. c</u>	14 ± 4	13 ± 1,9	100	64 ± 3,9	15 ± 7,6
<u>A. m</u>	4 ± 1,2	4 ± 1,1	3 ± 1,3	100	6 ± 3,1
<u>O. f</u>	3 ± 0,5	4 ± 2,1	2 ± 0,8	20 ± 0,7	100

ADN adsorbido

El promedio y el error standard de cada comparación fue establecido a partir de los 8 valores de cada ensayo. (1 - 230 ng).

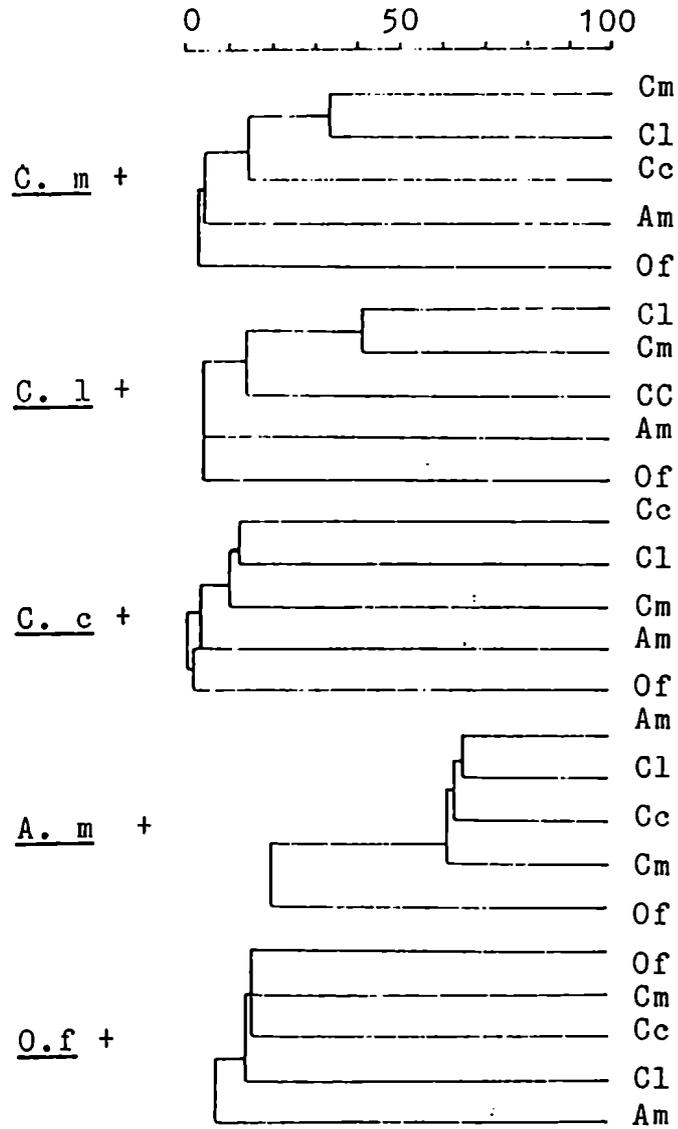
caso la situación no es tan marcada.

Este tipo de experimentos permitió evaluar el nivel de homología entre los ADNs repetidos de las cinco especies de cricétidos estudiadas. Dada la naturaleza de las secuencias analizadas, los resultados presentados no sólo reflejan el grado de homología en los ensayos heterólogos, sino también ponen de manifiesto posibles eventos de amplificación de secuencias acaecidos en algunos de los genomas estudiados. La falta de reciprocidad de los experimentos que involucran comparaciones supragenéricas sustentarían tal posibilidad.

La evaluación gráfica de los resultados cuantitativos se efectuó a partir de la construcción de dendrogramas. Las Figuras 30 A y B muestran las representaciones gráficas basadas en las comparaciones entre el ADN+ de una de las especies y los ADNs fijados de todas las especies consideradas -columnas de la matriz- (Fig. 30 parte A), así como considerando el ADN de una de las especies adsorbido a la membrana e hibridado con las cinco sondas de ADN+ -filas de la matriz- (Fig. 30 parte B). En ambos casos resulta evidente que las especies congénicas comparten mayor homología entre ellas que con los representantes de los otros géneros. Los mayores niveles de homología entre los ADNs de Calomys y el de Akodon molinae, cuando éste se emplea como sonda, sugieren una homología diferencial surgida durante eventos de amplificación de secuencias en el ADN de Calomys, a partir de secuencias existentes en el genoma de los akodontinos, en particular en el de A. molinae.

Con el objeto de evaluar en forma global los resultados de hibridación, los valores presentados en la matriz de datos (TABLA XI) fueron promediados, unificando así los valores porcentuales de los ensayos y sus recíprocos ( $((\% \text{ ADN+ A x ADN B}) + (\% \text{ ADN A x ADN+ B}))/2$ ). Los valores de la tabla recalculados se evaluaron de acuerdo al método de ligamiento promedio (Crisci, 1983) y la Figura 31 muestra el dendrograma obtenido. Del mismo resulta una mayor homología entre las secuencias repetidas de Calomys musculinus y C. laucha, C. calidus y Akodon molinae y, alejado de estos grupos Oryzomys flavescens.

A



**B**

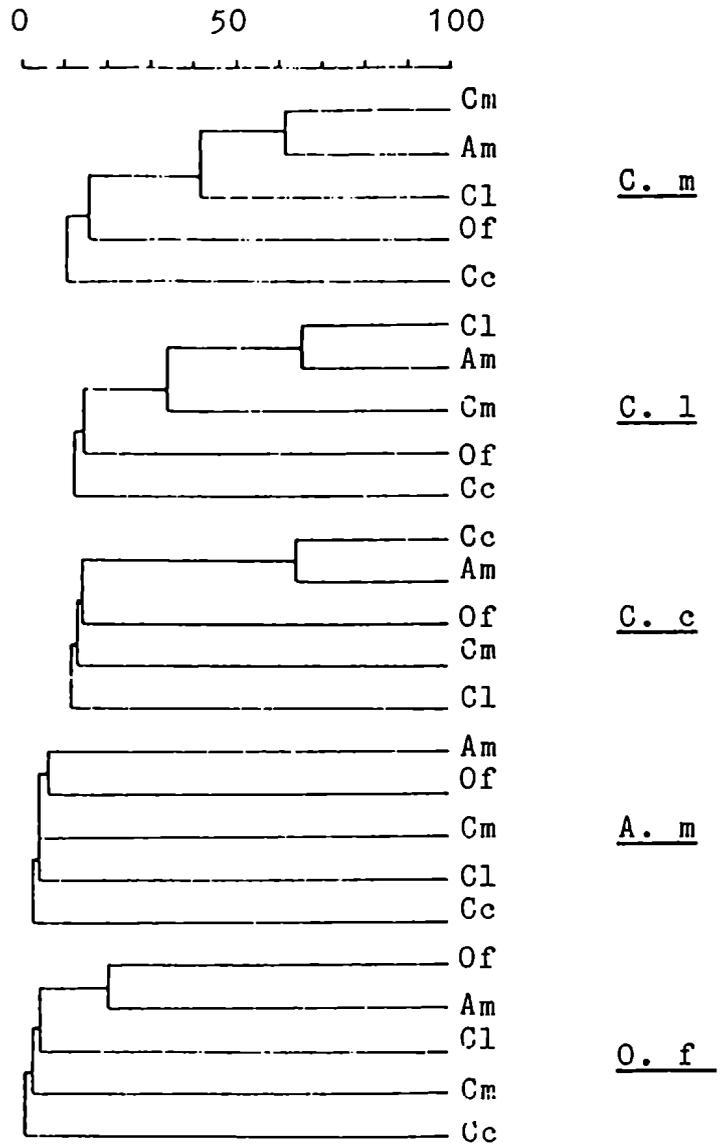


Figura 30: Representación gráfica de los porcentajes de hibridación de nitrocelulosa, con sondas de ADN genómico de cada una de las cinco especies marcadas con  $^{32}\text{P}$  dCTP. A.- Considerando los porcentajes de hibridación generadas por cada una de las sondas, C. m +, C. l +, C. c +, A. m +, O. f +. B.- Análisis considerando el ADN de cada una de las cinco especies hibridado con todas las sondas. La barra superior indica el % de hibridación (0 - 100 %).

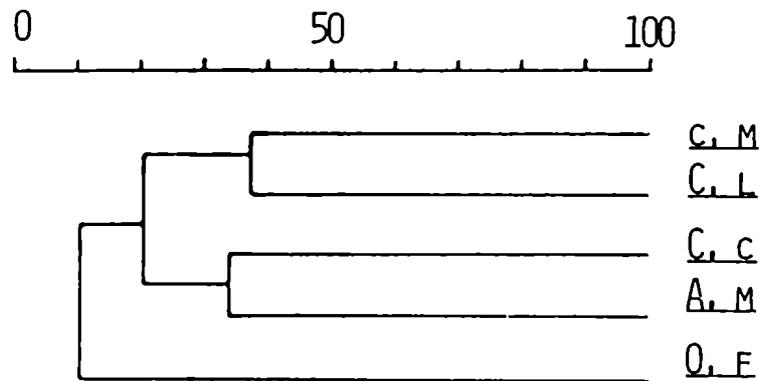


Figura 31: Representación gráfica de los resultados de hibridación analizados por el método de ligamiento promedio. La barra superior indica el grado de hibridación (entre 0 y 100 %).

Los datos presentados no permiten correlacionar el número diploide ( $2n$ ) ni la abundancia relativa de heterocromatina constitutiva -detectable por bandeo C- con el nivel de homología de las secuencias repetidas. El mayor grado de homología entre secuencias repetidas se detectó entre los ADNs de Calomys musculinus y C. laucha; la primera especie posee un  $2n = 38$  y bandas C muy abundantes en tanto que la segunda presenta un  $2n = 64$  y bandas C muy escasas. La homología entre Calomys calidus y cualquiera de las otras especies de Calomys es menor que la exhibida entre aquéllas; C. calidus presenta un  $2n = 48$  y bandas C que podrían considerarse intermedias entre C. laucha y C. musculinus.

Como se mencionó anteriormente, la técnica de hibridación "in situ" permite la localización cromosómica de determinadas secuencias en estudio. La aplicación de esta metodología permitió la comparación cualitativa de los resultados obtenidos en los experimentos de hibridación sobre filtro de los ADN+ de Calomys musculinus y Akodon molinae con los de hibridación "in situ" en los que se emplearon como sonda ADN reasociados hasta  $Cot = 0,1$  M seg de ambas especies marcados radiactivamente. Los ensayos efectuados incluyeron hibridaciones homólogas como control ( $Am^+ \times Am$  y  $Cm^+ \times Cm$ ), además de las heterólogas ( $Cm \times Am^+$  y  $Am \times Cm^+$ ). La evaluación cualitativa de la concentración de granos de plata sobre las preparaciones metafásicas permite establecer valores de hibridación diferenciales. La Figura 32 muestra los patrones de hibridación "in situ" homólogos (controles) y heterólogos. Si bien puede apreciarse que en los ensayos heterólogos los cromosomas muestran una considerable concentración de granos de plata, en las metafases de C. musculinus hibridadas con ADN repetido de A. molinae esta acumulación es particularmente importante, con localización centromérica o pericentromérica, coincidente con la observada en ensayos homólogos. En hibridaciones de ADN+ de C. musculinus sobre metafases de A. molinae la concentración de granos de plata es menor a la del ensayo homólogo ( $Am \times Am^+$ ) y la distribución es dispersa en ambas. Dada la naturaleza de estos ensayos, no resulta posible comparar los datos cuantitativos obtenidos por hibridación sobre filtros con los cualitativos aquí

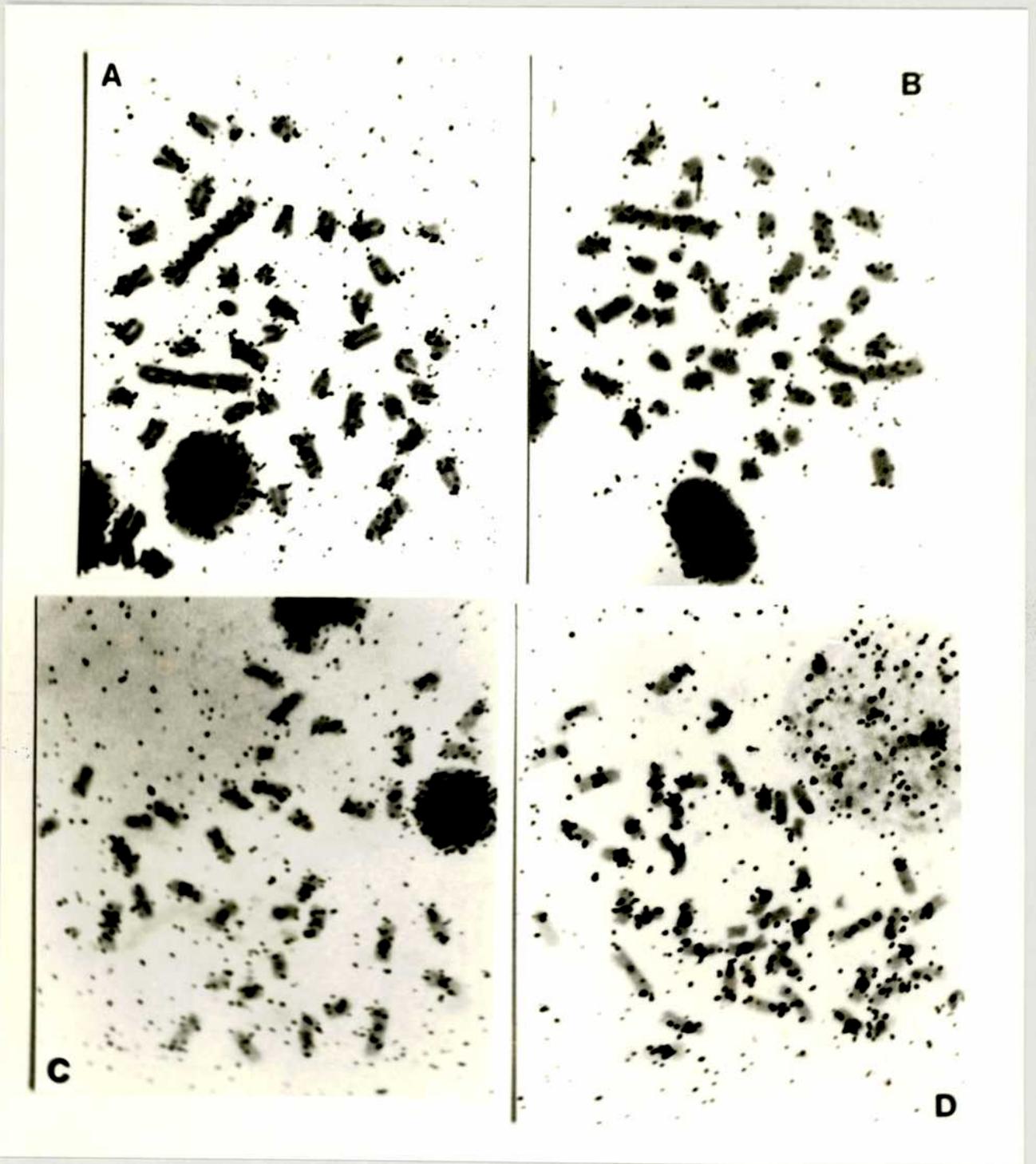


Figura 32: Hibridaciones "in situ" sobre metafases de las especies Calomys musculus y Akodon molinae. Como sonda se emplearon fracciones altamente repetidas de ADN (Cot  $10^{-1}$  M.seg), de ambas especies. A. metafases de A. molinae hibridadas con ADN  $^3\text{H}$  homólogo. B. A. molinae hibridado con ADN  $^3\text{H}$  heterólogo (C. musculus). C. C. musculus hibridado con A. molinae  $^3\text{H}$ . D. C. musculus hibridado con C. musculus  $^3\text{H}$ .

presentados; sin embargo, puede destacarse que ambas especies comparten cierto grado de homología y que si bien las secuencias de ADN repetido presentes en C. musculus se encuentran agrupadas en zonas centroméricas y pericentroméricas, en Akodon molinae la distribución es dispersa sobre los brazos de numerosos cromosomas.

Sibley y Ahlquist (1981) establecieron las relaciones filogenéticas entre especies de aves ratites sobre la base de hibridaciones de ADNs de copia única, efectuadas en solución y el posterior análisis de la estabilidad térmica de los híbridos formados. Estos autores comentan en el mencionado trabajo que los resultados obtenidos con secuencias de copia única son concordantes con los logrados por el análisis de secuencias repetidas de los mismos organismos. Sobre esta base y con el objeto de efectuar una comparación similar, se realizaron ensayos de hibridación de secuencias de copia única en solución. En éstos se incluyeron ADNs de por lo menos una de las especies de cada tribu analizadas por hibridación sobre filtros. Como sonda trazadora se usó ADN de copia única de una especie diferente de las utilizadas previamente: Akodon xanthorhynchus. Las especies comparadas en este ensayo son las siguientes:

TRIBU	ESPECIE
Oryzomyini	<u>Oryzomys flavescens</u>
Akodontini	<u>Akodon xanthorhynchus</u> <u>Akodon molinae</u> <u>Bolomys obscurus</u>
Phyllotini	<u>Calomys musculus</u>

La elección del ADN trazador mencionado residió en el interés de comparar el grado de homología con un organismo diferente de los incluidos en los ensayos previos y próximo taxonómicamente a Akodon molinae. Este análisis -mediado por una referencia "externa" o "outgroup"- permitiría inferir las posibles relaciones filogenéticas, basadas en las homologías de secuencias de copia úni-

ca, entre las especies cuyos ADN fueron analizados.

Para los ensayos de hibridación en solución se mezclaron en relación 1:5000 ADN trazador:ADN conductor, tanto de la especie homóloga como de las heterólogas. Estas muestras, luego de disociadas y reasociadas hasta  $Cot = 15000 M \text{ seg}$  fueron sometidas a desnaturalización térmica en columnas de hidroxiapatita. Las fracciones eluidas a cada temperatura (desde 60 hasta 95 °C, con incrementos de 5 °C cada vez) fueron analizadas por conteo de centelleo líquido, permitiendo la construcción de curvas acumulativas (% cpm en función de T °C), a partir de las cuales puede obtenerse el  $\Delta T_m$ , uno de los parámetros necesarios para estimar grado de homología. La determinación de  $\Delta T_m$  requiere que se disponga de la curva de estabilidad térmica del ensayo homólogo, en este caso A. xanthorhynus x A. xanthorhynus, cuyo valor de  $T_m$  corresponderá al 100 % de homología. Los  $\Delta T_m$  se calculan como la diferencia entre el  $T_m$  homólogo y cada uno de los heterólogos. Bonner et al. (1973) demostraron que -en híbridos heterólogos- una disminución de  $T_m$  de 1 °C indica un 1 % de sustitución de nucleótidos. La Figura 33 muestra las curvas acumulativas de porcentaje de cpm eluidas en función de la temperatura para los cuatro ensayos heterólogos, incluyéndose en cada uno la curva correspondiente al ensayo homólogo. En la TABLA XII se resumen los valores de  $T_m$  y  $\Delta T_m$  así como los de porcentaje de sustitución de nucleótidos para cada especie comparada:

TABLA XII

ESPECIE	$T_m$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)	% DE SUSTITUCION DE NUCLEOTIDOS
<u>Akodon xanthorhynus</u>	72,0	—	—
<u>Akodon molinae</u>	71,5	0,5	0,5
<u>Bolomys obscurus</u>	71,0	1,0	1,0
<u>Oryzomys flavescens</u>	70,0	2,0	2,0
<u>Calomys musculinus</u>	69,5	2,5	2,5

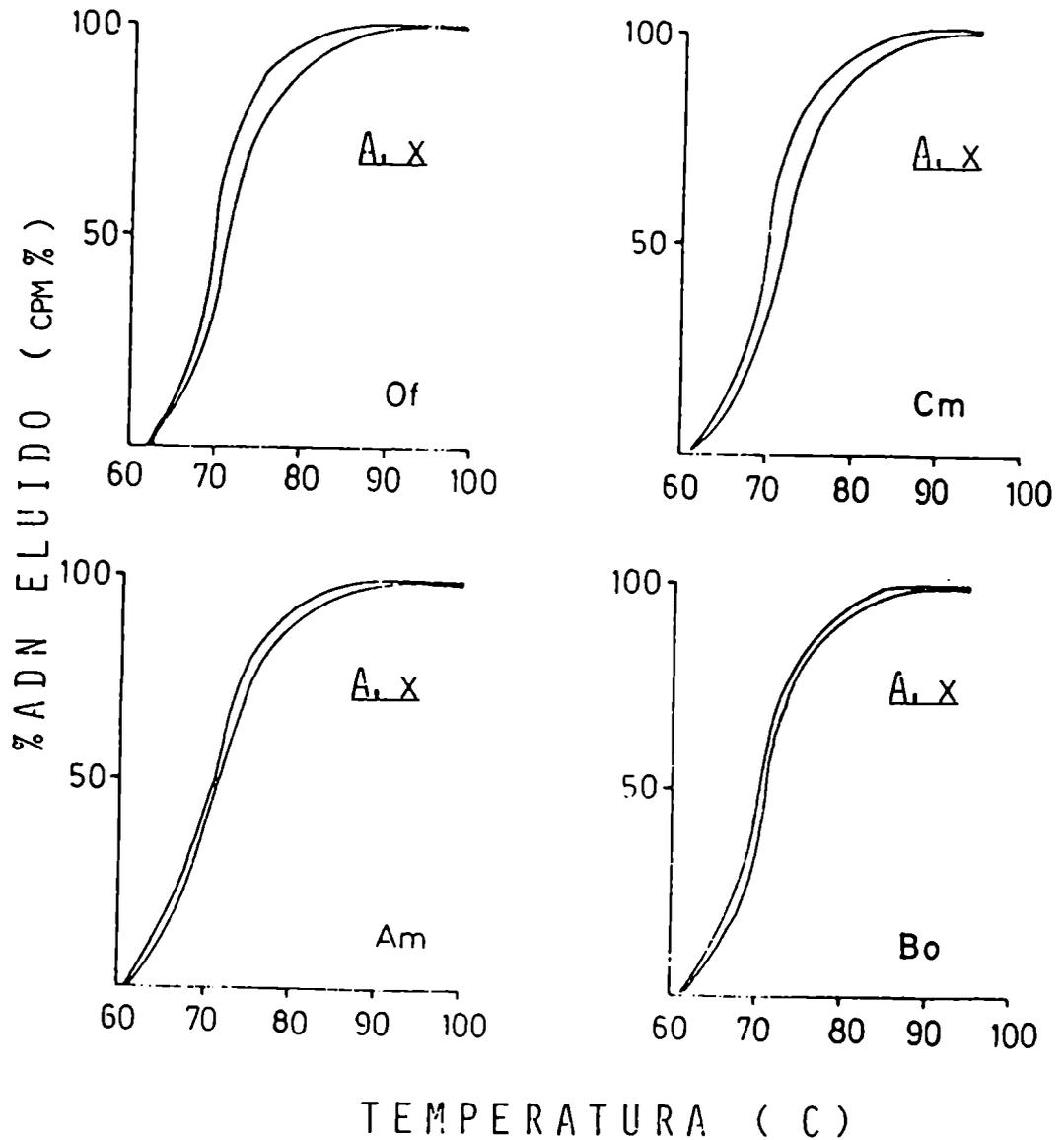


Figura 33: Curvas de desnaturalización de los heteroduplex interespecíficos formados entre el ADN de copia única de Akodon xanthorhinus y las especies Bolomys obscurus, A. molinae, Oryzomys flavescens y Calomys musculus. En cada uno de los gráficos se incluye la curva de desnaturalización del homoduplex (referencia).

Estos resultados sugieren una mayor homología -en términos de secuencias de ADN de copia única- entre las especies congénicas de Akodon, en segundo lugar con la especie B. obscurus -también akodontina-, en tercer lugar con el oryzomino O. flavescens y finalmente con el filotino C. musculus.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto por un lado la notable conservación de secuencias de copia única entre los cricétidos analizados y por otro la falta de coincidencia entre los patrones de homología de ADN de copia única y de ADN repetido. Los niveles de homología entre las secuencias de copia única -con respecto al "outgroup"- sugieren que A. molinae y O. flavescens estarían más próximos que C. musculus. La marcada estabilidad térmica de los híbridos refleja una elevada homología de las secuencias estudiadas, situación que pone de manifiesto que los cricétidos americanos son un grupo joven y que los tiempos de divergencia de las diferentes tribus son cortos -en términos geológicos-, de aproximadamente 6 a 8 millones de años.

D I S C U S S I O N

## CAPITULO I

Los resultados obtenidos durante la caracterización del ADN de las especies Calomys musculinus y Calomys laucha ponen de manifiesto ciertas similitudes y diferencias en el material genético de ambas especies.

El empleo de técnicas de ultracentrifugación analítica en gradientes neutros de CsCl permitió demostrar que los ADNs estudiados presentan igual densidad de flotación ( $1,701 \text{ g/cm}^3$ ) y por lo tanto igual contenido en G+C (42%). Por otro lado, los perfiles de sedimentación (Figura 7) exhiben una marcada homogeneidad, no pudiendo detectarse ni picos ni hombros secundarios atribuibles a ADNs satélites.

Sin embargo, por el momento no es posible descartar la presencia en el material genético de estas especies de ADNs satélites crípticos. Estos ADN sat se caracterizan por presentar secuencias agrupadas con contenido molar porcentual de bases semejante al de la banda principal y representar una reducida proporción del ADN total, 5% como máximo (Arrighi, 1970). El empleo de metodologías de centrifugación más sensibles, basadas en el empleo de sustancias complejantes capaces de unirse en forma selectiva a secuencias ligeramente enriquecidas en uno u otro par de bases, permitiría confirmar o no la presencia de ADN sat crípticos. Entre estas técnicas podrían citarse el empleo de iones de metales pesados como  $\text{Ag}^+$  y  $\text{Hg}^{++}$  (Skinner & Beattie, 1973), de antibióticos como actinomicina D, netropsina o distamicina o de colorantes como el Hoechst 33258 (Manuelidis, 1977). En caso de existir ADN sat crípticos, los complejos formados por las secuencias satelitarias con los ligandos presentarán valores diferenciales de densidad de flotación con respecto a los de las bandas principales, posibilitando de esta manera la detección de tales secuencias satelitarias.

Los estudios de centrifugación realizados con ADNs de otros roedores cricétidos -filogenéticamente relacionados con los estudiados en este trabajo- demostraron por un lado, que el ADN de cuatro especies de akodontinos (pertenecientes a los géneros Ako-

don y Bolomys) tienen valores de densidad de flotación muy semejantes, de alrededor de  $1,700 \text{ g/cm}^3$ , contenido porcentual en G+C de 41% y perfiles de sedimentación unimodales y homogéneos (Vidal Rioja et al., 1979), características compatibles con las observadas en el ADN de las especies de Calomys aquí analizadas. Por otro lado, los estudios realizados con ADN de roedores oryzominos pertenecientes al género Oryzomys (Vidal Rioja et al., 1987) permitieron demostrar la existencia de un componente satelitario liviano (rico en A+T), en tanto que los valores de densidad de flotación y contenido de G+C de la banda principal coincidieron con los obtenidos para Calomys y los mencionados para los akodontinos. Estudios realizados con ADN de roedores cricétidos de América del Norte demostraron que de veinte especies analizadas, sólo tres presentan ADN sat: Neotoma albigula, Cletherionomys mukuje y Arborimus longicaudatus. Los valores de densidad de flotación de los satélites de las dos primeras especies mencionadas son coincidentes ( $1,683 \text{ g/cm}^3$ ), en tanto que la tercera presenta tanto un satélite liviano ( $1,688 \text{ g/cm}^3$ ) como uno pesado ( $1,715 \text{ g/cm}^3$ ) (Arrighi, 1970).

Sobre la base de los datos presentados podría considerarse que los cricétidos en general no se caracterizan por la presencia de componentes satelitarios detectables por la metodología de centrifugación isopícnica en gradientes neutros de CsCl.

Mediante los ensayos de desnaturalización térmica pudo establecerse que el valor de  $T_m$  de los ADNs de las especies de Calomys estudiadas es de  $86,2^\circ\text{C}$  (en SSC 1 X) y el contenido en G+C -calculado a partir de este valor- es de 42%. No obstante esta similitud en cuanto al parámetro mencionado, pudo detectarse una clara diferencia entre ambos ADNs. El material genético de Calomys musculinus presenta un componente termoestable con  $T_{m_1}$  de  $94^\circ\text{C}$  (SSC 1 X) o  $79^\circ\text{C}$  (SSC 0,1 X) respectivamente, que constituye alrededor del 10% del ADN total de esta especie. En cambio, el perfil de desnaturalización térmica del ADN de Calomys laucha es homogéneo, no pudiéndose detectar subtransiciones térmicas ni componentes con mayor o menor grado de termoestabilidad que la del componente principal. El análisis molecular del componente termoestable de C. musculinus se discutirá en el Capítulo II.

Si bien Guttman et al. (1977) han demostrado la coincidencia entre los trazados densitométricos obtenidos por ultracentrifugación en gradientes de densidad de CsCl y los perfiles obtenidos por derivación numérica de los datos experimentales de desnaturalización térmica, estos autores sugieren que el último método es más sensible que el primero y que permite poner de manifiesto distintos componentes de un mismo ADN. Por otro lado Mayfield (1977) sugiere que la mayor sensibilidad de detección lograda con los métodos de derivación numérica de los datos de desnaturalización térmica reside en la posibilidad de detectar familias de secuencias con grado intermedio de repetición que puedan o no estar agrupadas. Esto permitiría explicar la clara diferencia observada entre los perfiles densitométricos de centrifugación y los perfiles de desnaturalización térmica del ADN de Calomys musculinus y sugeriría que el componente termoestable de esta especie está constituido por secuencias repetidas no organizadas en grupos -"clusters"-, sino dispersas en el genoma.

Los estudios realizados por Vidal Rioja et al. (1979, 1987a) empleando métodos de desnaturalización térmica, con ADNs de especies de akodontinos y oryzominos permitieron demostrar que los miembros de la primera tribu mencionada presentan perfiles homogéneos de desnaturalización, en tanto que los de la segunda tribu se caracterizan por una marcada complejidad. Por otro lado, en estos últimos se detectaron picos correspondientes a un ADN sat liviano, observado en ultracentrifugaciones analíticas.

El estudio de las cinéticas de reasociación de los ADNs de las especies de Calomys analizadas demostró que, al igual que todos los eucariotas estudiados hasta el presente, el genoma se organiza en familias de secuencias repetidas más un componente de copia única. La cantidad total de secuencias repetidas en los ADNs de los mamíferos varía entre 20 y 50 % del genoma haploide (Santiago & Rake, 1973; Rake, 1974; Vallejo-Roman et al., 1975; Wiley & Yunis, 1975; Strauss, 1976; Ginatulina et al., 1980; Lypunova et al., 1980).

En las especies que nos ocupan, las secuencias de reasociación muy rápida ( $Cot < 10^{-2}$ ) representan el 9 y el 6 % del genoma haploi-

de de Calomys musculus y C. laucha, respectivamente, valores concordantes con los establecidos por Ginatulina et al. (1980) para ADNs de cinco especies de cricétidos del viejo mundo; estos autores reportaron valores comprendidos entre 4 y 7% del genoma haploide para esta fracción. El componente rápido constituye en C. musculus y C. laucha el 12 y el 14%, respectivamente, encontrándose representado en la primera especie por 24000 copias y por 12000 en la segunda. El componente lento, en tanto, constituye un 10 y un 17% del genoma haploide de C. musculus y C. laucha respectivamente, siendo el número de copias en una y otra especie de 67 y 75. Los componentes de copia única difieren tanto en el porcentaje como en el valor de  $Cot \frac{1}{2}$  alcanzado por esta fracción; por un lado C. musculus presenta un valor de  $Cot \frac{1}{2}$  de 2200, en tanto que C. laucha un  $Cot \frac{1}{2}$  de 1500. Esta situación sugiere por un lado que las secuencias de copia única de la primera especie presentan una mayor complejidad y por otro que el tamaño del genoma para la misma es mayor que para C. laucha.

La localización del ADN altamente repetido en la heterocromatina constitutiva ha permitido a varios autores sugerir una fuerte correlación entre ambos (Jones, 1970; Pardue & Gall, 1970; Hennig et al., 1970; Corneo et al., 1971). Sin embargo, otros autores como Ginatulina et al. (1980) mediante la comparación de los parámetros cinéticos y las características cariológicas -bandeo C en particular- han descrito excepciones para la correlación planteada. Estos autores demuestran que si bien el cricétido Tscherskia tritori, cuyo complemento cromosómico presenta abundantes bandas C, exhibe un alto porcentaje (20% del genoma haploide) de secuencias de reasociación muy rápida ( $Cot < 10^{-2}$ ), otro cricétido -Cricetus cricetus- que también exhibe un alto contenido de bandas C, no presenta un alto porcentaje de secuencias de reasociación muy rápida. En nuestro caso, Calomys musculus muestra un contenido elevado de heterocromatina constitutiva -detectable por bandeo C- y alrededor del 9% del genoma haploide está constituido por secuencias altamente repetidas ( $Cot < 10^{-2}$ ). C. laucha, en cambio, presenta cantidades mínimas de bandas C y un porcentaje de secuencias altamente repetidas (6% del genoma haploide) ligeramente inferior al

de C. musculus. La situación presentada por ambas especies de Calomys coincidiría con la postulada por Ginatulina et al. en cuanto a la falta de correlación entre los contenidos en heterocromatina detectable por bandeo C y las proporciones de secuencias altamente repetidas presentes en los genomas haploides de las especies analizadas.

Los patrones de restricción aportaron nuevas diferencias entre los ADNs estudiados. De las doce endonucleasas de restricción empleadas, ninguna de ellas generó patrones de clivaje semejantes sobre los ADNs de Calomys musculus y C. laucha. Los patrones se caracterizan en general por la presencia de un número reducido de bandas, las que por su lado exhiben una intensa fluorescencia, que indicaría la presencia de secuencias repetidas o al menos de secuencias con igual longitud flanqueadas por los mismos sitios de restricción.

A partir de los patrones generados por los isoesquizómeros Msp I y Hpa II pudo establecerse que el nivel de metilación es mayor en el ADN de C. laucha. Por otro lado, la similitud de los patrones generados por las endonucleasas Eco RI (G/AATTC) y Dra I (TTT/AAA) sobre el ADN de C. laucha sugeriría que los sitios para una y otra endonucleasa se encuentran muy próximos entre sí.

Si bien las especies estudiadas en este trabajo fueron consideradas hasta mediados de la década del 60 como formas subespecíficas debido a su gran semejanza morfológica, resulta llamativo que presenten características citogenéticas y moleculares -en cuanto a su ADN- tan dispares. Los cricétidos sudamericanos constituyen un grupo taxonómico joven en la historia evolutiva del continente (Reig, 1980), pudiendo considerarse que aún están experimentando un intenso proceso de radiación adaptativa, situación que permitiría explicar las marcadas diferencias cariológicas observadas en el grupo. Tales diferencias, a su vez, podrían haber surgido por cambios en el material genético, en particular de las secuencias de ADN repetido. La posibilidad de confirmar estos planteos dependerá, en parte, de la inclusión de mayor número de especies en los estudios de caracterización de ADN así como del enfoque del problema desde otras áreas de la Biología.

Algunas de las metodologías empleadas en este trabajo han permitido poner de manifiesto claras diferencias entre los ADNs de las especies estudiadas. Tanto la desnaturalización térmica como los análisis de restricción permiten la identificación inequívoca de los ADNs de una y otra especie. Los análisis con endonucleasas de restricción constituyen una herramienta de gran poder definitivo con aplicación sistemático-bioquímica. Su poder resolutivo así como su bajo costo relativo hacen de esta metodología un medio muy adecuado para aclarar situaciones taxonómicas complejas, en particular en grupos como el de los roedores.

## CAPITULO II

El componente termoestable presente en el ADN de Calomys musculus constituye alrededor de un 10 % del ADN total de esta especie. Los métodos de desnaturalización térmica analítico y preparativo fueron coincidentes en la cuantificación del mismo.

Los estudios de cinética de reasociación de las fracciones e-luídas a 60, 85 y 94 °C (f 60, f 85 y f 94, respectivamente) permitieron establecer cualitativamente que las secuencias presentes en la fracción termoestable -f 94- muestran un mayor grado de repetición que las presentes en las otras fracciones comparadas, cuando se analizaron hasta un valor de Cot bajo (0,3 M seg).

La desnaturalización térmica de las tres fracciones (f 60, f 85 y f 94) permitió demostrar por un lado el mayor nivel de reasociación alcanzado por f 94 -en base al valor de hipercromicidad de la misma- y por otro lado comprobar que el apareamiento de las secuencias presentes en esta fracción es más preciso que en las otras, en base a los valores de  $\Delta T_m$  (Tabla IX ). Además, los perfiles de desnaturalización térmica obtenidos por derivación numérica ponen de manifiesto una mayor homogeneidad en el correspondiente a f 94 (Figura 18). En consecuencia, el valor relativamente alto de hipercromicidad, bajo de  $\Delta T_m$  y la marcada homogeneidad de los perfiles derivados resultan concordantes con los datos cinéticos y son indicativos de la presencia de secuencias con repetición elevada.

De acuerdo con los valores de  $T_m$  del componente termoestable (f 94), se infiere un contenido molar porcentual de G + C de 62 %, valor que permitiría estimar una densidad de flotación de 1,721 g/cm<sup>3</sup> en gradientes neutros de CsCl. No obstante, los perfiles de sedimentación en tales gradientes son homogéneos, presentando un trazado unimodal con un máximo correspondiente a una densidad de 1,701 g/cm<sup>3</sup> (42 % G + C). Por otro lado, f 94 reasociada hasta Cot 0,3 M seg y luego desnaturalizada térmicamente, presentó un valor de  $T_m$  de 79 °C, en tanto que el ADN total de esta especie, luego de ser reasociado hasta Cot 13000 y desnaturalizado térmicamente, presenta un  $T_m$  de 82 °C. La comparación de ambos valores permite

suponer que la fracción aislada no presenta un nivel de enriquecimiento en pares G+C superior al ADN presente en la banda principal. Estos resultados sugieren que la termoestabilidad del componente no refleja un enriquecimiento en pares G+C, pudiendo relacionarse esta característica térmica con aspectos estructurales de las secuencias presentes en la fracción en estudio.

El análisis de hibridación sobre puntos con ADNs de especies de cricétidos filogenéticamente relacionados demostró que f94 -empleada como sonda- sólo genera señal positiva, para todas las cantidades de ADN probadas, sobre el ADN homólogo (Calomys musculinus). Si bien el número de especies comparadas es muy reducido, en el análisis se incluye el ADN de C. laucha, que fuera considerada hasta hace poco tiempo como perteneciente a la misma especie que C. musculinus (Cabrera, 1961; Hershkovitz, 1962). Bajo las condiciones empleadas no resulta posible afirmar que las secuencias componentes de f94 no se encuentren presentes -en muy bajo número de copias- en los ADNs heterólogos. En cambio, los resultados sí indican que este componente constituye una amplificación especie-específica del ADN de C. musculinus.

La detección de secuencias de reconocimiento para doce enzimas de restricción demostró que las secuencias presentes en f94 son reconocidas por las endonucleasas Taq I, Alu I, Hinf I, Eco RI, Bam HI, Msp I y Hpa II. Las enzimas Dde I, Rsa I y Hae III presentan menos frecuencia de sitios de reconocimiento en las secuencias integrantes de f94 que las mencionadas en primer término, en tanto que Hind III y Ava II aparentemente no clivan el ADN de esta fracción.

Los patrones autorradiográficos correspondientes a las enzimas que cortan más intensamente las secuencias integrantes del componente termoestable se caracterizan por presentar chorreados o "smears", salvo Bam HI que genera sistemas de bandas no multiméricas, sugiriendo que las secuencias presentes en f94 no se encuentran organizadas en repetitivos en "tándem", pudiendo constituir una población con marcada heterogeneidad. Sin embargo, todas las secuencias constituyentes presentan una característica en común: muy alta frecuencia de sitios de reconocimiento para la enzima

Taq I (T/CGA) como quedó demostrado por los análisis de restricción parcial (Figura 23). Esta característica asociada con la alta frecuencia de sitios de reconocimiento para Alu I (AG/CT) -complementaria de la secuencia de reconocimiento para Taq I- permitiría suponer que en esta fracción existen secuencias repetidas invertidas próximas a secuencias repetidas directas.

Por otro lado, el hecho de que las enzimas cuyos sitios de reconocimiento se encuentran con mayor frecuencia en el componente termoestable no poseen preponderancia en pares G+C y que, además, Hae III (GG/CC) no clive en forma frecuente las secuencias de f 94 refuerzan la suposición de que el componente termoestable no está particularmente enriquecido en pares GC.

El uso de los isoesquizómeros Hpa II y Msp I permitió demostrar que el componente termoestable de C. musculus se encuentra metilado. Los ensayos de restricción parcial pusieron además de manifiesto que el nivel de metilación es elevado.

La aparente falta de correlación entre la termoestabilidad de f 94 y su contenido en G+C hizo suponer la posible existencia de estructuras peculiares en las secuencias componentes, responsables de la termoestabilidad. Los ensayos efectuados con nucleasa S1 tuvieron por objeto, por un lado comprobar la existencia de estructuras "stem-loop" y por otro demostrar la posible existencia de zonas de transición ADN B→ADN Z. Pohl & Jobim (1972) demostraron que las secuencias de ADN con configuración Z, constituidas por nucleótidos Pu-Py alternantes, presentan una marcada termoestabilidad. La nucleasa S1 es particularmente activa sobre segmentos monocatenarios así como zonas de transición B→Z. Los patrones autorradiográficos obtenidos luego de la hibridación de f 94 sobre las digestiones del ADN de C. musculus con Taq I y Alu I plantearon la posibilidad de que existieran secuencias repetidas directas e inversas. Este tipo de organización puede o no incluir secuencias espaciadoras entre las mismas. En el primer caso, si se sometiera a ese ADN a desnaturalización y reasociación se esperaría la presencia de segmentos monocatenarios, que determinarían la presencia de rulos ("loops"); en el segundo, en cambio, sólo aparecerían estructuras de tipo tallo ("stem") (Lewin, 1980). El

tratamiento de estructuras del primer tipo con nucleasa S1 permitiría comprobar la presencia de las mismas, siendo ineficaz con estructuras del segundo modelo propuesto; por otro lado permitiría confirmar la presencia de ADN Z si alterara de alguna manera al ADN analizado. Los resultados obtenidos no posibilitaron la detección de estructuras de acuerdo a los modelos planteados. No obstante, dado que no se emplearon técnicas específicas -por ejemplo anticuerpos anti Z- resultaría prematuro descartar la existencia de secuencias con configuración Z, hecho que, eventualmente, podría analizarse en un futuro. Sin embargo, los ensayos efectuados permitieron observar una peculiaridad de este componente. El tratamiento con nucleasa S1 de muestras de ADN de C. musculus previamente desnaturalizado y reasociado a 60 °C durante tiempos cortos permitió comprobar que a los 30 min de incubación, las moléculas bicatenarias resistentes a la nucleasa reasocian en una estructura de alto peso molecular, próximo a los 20 kpb, hecho que confirma los resultados obtenidos en estudios de cinética de reasociación y de desnaturalización térmica para f94.

Finalmente, los ensayos de hibridación "in situ" permitieron comprobar la localización centromérica en todo el complemento cromosómico -excepto un par de metacéntricos pequeños- del componente termoestable en estudio. Este tipo de localización es comparable a la observada para el ADN sat de ratón (Mus musculus) por Pardue y Gall (1970) con la diferencia que en C. musculus no se han detectado componentes satélite en centrifugaciones en gradientes de CsCl.

Si bien los resultados discutidos en este capítulo aportan información con respecto a las características moleculares del ADN de la especie portadora del componente termoestable, abren nuevos interrogantes que podrán responderse en el futuro. Las técnicas de clonado y secuenciación permitirán explicar las causas determinantes de la termoestabilidad del componente, en tanto que la microscopía electrónica posibilitará descifrar la estructura del mismo.

### CAPITULO III

Los datos presentados en este capítulo han permitido establecer, por un lado que las secuencias repetidas presentes en los genomas de las especies estudiadas muestran cierto grado de conservación, que podemos considerar jerárquico dado que es más marcado a nivel intragenérico que a nivel intergenérico. Por otro lado, permiten suponer que durante el proceso de especiación pueden haberse producido eventos de amplificación de secuencias, situación reflejada en las hibridaciones recíprocas diferenciales, en particular entre los ADNs de Calomys y el de Akodon molinae. Los resultados obtenidos pueden interpretarse del siguiente modo: en el ADN de Akodon molinae hay secuencias -con niveles de repetición bajos- homólogas a secuencias presentes en la forma proto-akodontina de la cual han derivado. A partir de esta forma ancestral podría haberse diferenciado la especie proto-filotina ancestral en cuya línea de descendencia se ubican los actuales miembros del género Calomys. Los posibles eventos de amplificación acaecidos en esta línea de descendencia podrían haber incluido secuencias presentes en el proto-akodontino ancestral -y que también se encuentran presentes en la forma actual Akodon molinae-. En los experimentos realizados se adsorbieron a las membranas cantidades reducidas de ADN, constituyendo éste el factor limitante en la reacción de hibridación. Si una secuencia se encuentra presente en bajo número de copias en el ADN de Akodon molinae, pero está amplificada en el ADN de Calomys, la sonda radiactiva ADN+ de Akodon molinae detectará una señal intensa sobre los puntos de ADN de Calomys, en tanto que con la sonda ADN+ de Calomys la intensidad detectada será menor sobre los puntos de ADN de Akodon molinae.

Resultados comparables a los mencionados han sido descriptos en otros sistemas. Así, Eden et al. (1978) detectan amplificación de secuencias de ADN repetido en pollo y avestruz, en tanto que Vidal Rioja et al. (1982) señalan amplificación de secuencias entre especies taxonómicamente muy próximas -Akodon molinae y A. azarae-, al realizar comparaciones intragenéricas entre roedores

cricétidos del género Akodon.

Tanto los resultados presentados en este trabajo como los descritos en las publicaciones mencionadas podrían sustentar la "hipótesis de la biblioteca" ("library hypothesis") planteada por Fry y Salser (1977). Este modelo propone que los roedores en particular comparten una "biblioteca" de secuencias repetidas. Ciertos miembros de esta "biblioteca" pueden ser amplificados en cada especie, quedando otros presentes en bajo número de copias. De acuerdo con este modelo, los cambios evolutivos rápidos sufridos por las secuencias repetidas podrían ser principalmente de tipo cuantitativo. La aparición de una nueva familia con alto grado de repetición podría resultar de la amplificación de secuencias preexistentes en la "biblioteca" en bajo número de copias, a diferencia de la aparición "de novo" como fuera planteado por Southern (1970).

Por otro lado los resultados de hibridación sobre puntos han puesto de manifiesto una mayor homología entre las especies Calomys laucha y Calomys musculinus, pese a que dichas especies exhiben diferencias tanto en sus valores de  $2n - 64$  y  $38$  respectivamente- como en la cantidad de heterocromatina constitutiva detectable por bandeado C, muy reducida en C. laucha y abundante en C. musculinus. La otra especie de Calomys analizada, C. calidus presenta un nivel de homología menor con cada una de las especies de Calomys mencionadas. Dado que esta especie presenta un  $2n$  de  $48$  y abundancia intermedia de bandas C -en comparación con las especies arriba nombradas-, podría considerarse que no existe correlación entre el grado de conservación de secuencias repetidas y el número cromosómico o la abundancia de bandas C.

Los ensayos de hibridación "in situ" con ADNs repetidos de las especies Calomys musculinus y Akodon molinae si bien no permitieron relacionar los datos cualitativos obtenidos mediante esta técnica con los logrados por hibridación sobre puntos, permitieron comprobar que ambas especies conservan secuencias repetidas comunes, exhibiendo una y otra patrones de distribución cromosómicos característicos. Así, Calomys musculinus presenta una localización centromérica -tanto de secuencias homólogas como he-

terólogas- en tanto que la otra especie muestra una localización dispersa sobre los brazos de sus cromosomas.

Si bien la metodología de hibridación sobre puntos no permite discernir entre homología propiamente dicha y posibles amplificaciones de secuencias homólogas, posibilita comparaciones taxonómicas tanto a nivel infra como supragenérico.

Los experimentos de hibridación de secuencias de ADN de copia única -en solución- empleando como trazador una especie del género Akodon (A. xanthorhynus) permitieron demostrar que se han producido sustituciones de nucleótidos en porcentajes reducidos -de 0,5 a 2,5%- entre las especies comparadas. La baja proporción de cambio o sustituciones de nucleótidos puede relacionarse con la edad de las especies, a las que se considera como integrantes jóvenes de la fauna sudamericana (Reig, 1984). Los resultados obtenidos sugieren una mayor proximidad evolutiva entre las especies pertenecientes a la tribu akodontina, en segundo lugar entre éstas y la oryzomina considerada y finalmente con la especie filotina del género Calomys. Esta situación, a diferencia de lo establecido por Sibley y Ahlquist (1981), no reflejaría los patrones de homología obtenidos con secuencias repetidas, ya que de acuerdo con aquellos experimentos Akodon molinae estaría más próximo a los filotinos que a los oryzominos. Sin embargo, dado que las secuencias de copia única se encuentran sometidas a fuerzas selectivas más intensas, en tanto que las secuencias repetidas pueden fluctuar en número -vía amplificaciones o deleciones- las discrepancias observadas podrían adjudicarse a la diferente naturaleza de secuencias consideradas en uno y otro caso. Por otra parte, la diferencia entre los niveles de homología observados entre secuencias repetidas y de copia única podrían explicarse sobre la base de la Teoría del "resetting" genómico (Gillespie, 1982) que considera -para el caso de primates- que los procesos de especiación pueden estar acompañados de eventos de amplificación de secuencias repetidas. Una vez que las especies derivadas se estabilizan evolutivamente, podría disminuir el número de copias de estas secuencias. Dado que los cricétidos analizados pueden estar experimentando intensos procesos de radiación adaptati-

va, podría suceder que tal proceso se vea acompañado de grandes cambios en términos de sus secuencias repetidas, no así en las de copia única. No obstante, ambos tipos de secuencias pueden emplearse con fines taxonómicos; en particular las secuencias repetidas pueden aportar información de valor en comparaciones intra-genéricas, en las que las diferencias en términos de secuencias de copia única no existen o no pueden ser detectadas.

## CONCLUSIONES

A. El ADN de las especies analizadas en este trabajo presenta similitudes y diferencias.

1. Similitudes:

- a. Valor de densidad de flotación  $1,700 \text{ g/cm}^3$  y perfil de sedimentación homogéneo, no detectándose componentes secundarios atribuibles a ADN sat -al menos mediante la metodología empleada.
- b. Valor de  $T_m$  de  $86,2^\circ\text{C}$  en SSC 1X.
- c. Contenido porcentual en bases G+C (inferido a partir de los valores de densidad de flotación e independientemente a partir de los de  $T_m$ ) de 42 %.

2. Diferencias:

- a. Perfiles de desnaturalización térmica diferenciales. El ADN de C. laucha, al desnaturalizarse, exhibe un perfil homogéneo, no pudiendo detectarse componentes con mayor o menor termoestabilidad que el componente principal. C. musculinus, en cambio, presenta un componente termoestable con  $T_m$  de  $94^\circ\text{C}$  en SSC 1X.
- b. La organización de secuencias en el ADN es particular de cada especie analizada. Ambas exhiben diferencias tanto en la constante de velocidad de reacción (k) como en los porcentajes de cada componente genómico (muy rápido, rápido, lento y copia única).
- c. Los patrones de restricción generados por las doce endonucleasas empleadas son especie-específicos. En todos los casos dichos patrones se caracterizan por exhibir un número reducido de bandas intensas.

B. El componente termoestable presente en el ADN de Calomys musculinus exhibe las siguientes características:

- a. No es detectable en el ADN de C. laucha ni en otros tres cricétidos filogenéticamente relacionados.
- b. Constituye un 10 % del ADN total de la especie.

- c. Está compuesto por secuencias repetidas, como quedó demostrado por análisis cinéticos.
  - d. Las secuencias componentes presentan una organización dispersa, no detectándose bandas definidas ni patrones de restricción claros en los Southern blots ni en los ensayos de digestión parcial o en los de restricción completa. Estas observaciones permiten suponer que las secuencias componentes son heterogéneas.
  - e. Las secuencias integrantes del componente exhiben una característica común: elevada frecuencia de sitios de reconocimiento para la endonucleasa Taq I (T/CGA) y menor frecuencia para la enzima Alu I (A/GCT) -complementaria de la anterior-. Esta situación permitiría sugerir la presencia de repetidos directos e inversos en dichas secuencias.
  - f. Las secuencias presentes en el componente termoestable no son sensibles a la nucleasa S1. El empleo de S1 en muestras previamente desnaturalizadas y reasociadas a tiempos muy cortos, permitió demostrar que la reasociación de las secuencias lleva a la formación de "superestructuras" de alto peso molecular, aún a tiempos de reasociación muy cortos.
  - g. Sobre la base de los análisis de restricción podría afirmarse que las secuencias presentes en este componente no estarían particularmente enriquecidas en pares de bases G+C, pese a que el  $T_m$  del mismo es de  $94^{\circ}\text{C}$ .
  - h. Las secuencias involucradas presentan cierto grado de metilación, dado que los isoesquizómeros Hpa II y Msp I generan patrones de restricción diferenciales.
  - i. Estas secuencias exhiben una localización centromérica o pericentromérica sobre todos los cromosomas del complemento, excepto un par de metacéntricos pequeños.
- C. La búsqueda de homologías entre ADNs de especies filogenéticamente relacionadas llevó a las siguientes conclusiones:
- 1. Hibridaciones de secuencias repetidas sobre soporte sólido:
    - a. Mayor homología de secuencias entre los ADNs de las especies congénéricas de Calomys, siendo más alta entre C. mus-

culinus y C. laucha.

- b. Falta de correlación entre el nivel de homología de las secuencias repetidas y las características cromosómicas de número diploide y abundancia de heterocromatina constitutiva detectable por bandeó C.
- c. En ensayos supragenéricos se puso de manifiesto una marcada falta de reciprocidad, siendo esta situación más marcada en análisis que incluyeron ADN+ de Calomys y ADN de A. molinae y sus recíprocos. Si bien la situación observada en ensayos con ADN de Oryzomys flavescens y ADNs+ de filotinos resultó semejante a la anterior, las discrepancias en los ensayos recíprocos no fueron tan notables. Estas observaciones podrían sugerir eventos de amplificación de secuencias en los filotinos.
- d. Los ensayos de hibridación "in situ" con secuencias repetidas heterólogas permitieron demostrar cierto grado de conservación de secuencias y señalar la localización cromosómica de estas secuencias tanto en Calomys musculus como en Akodon molinae.

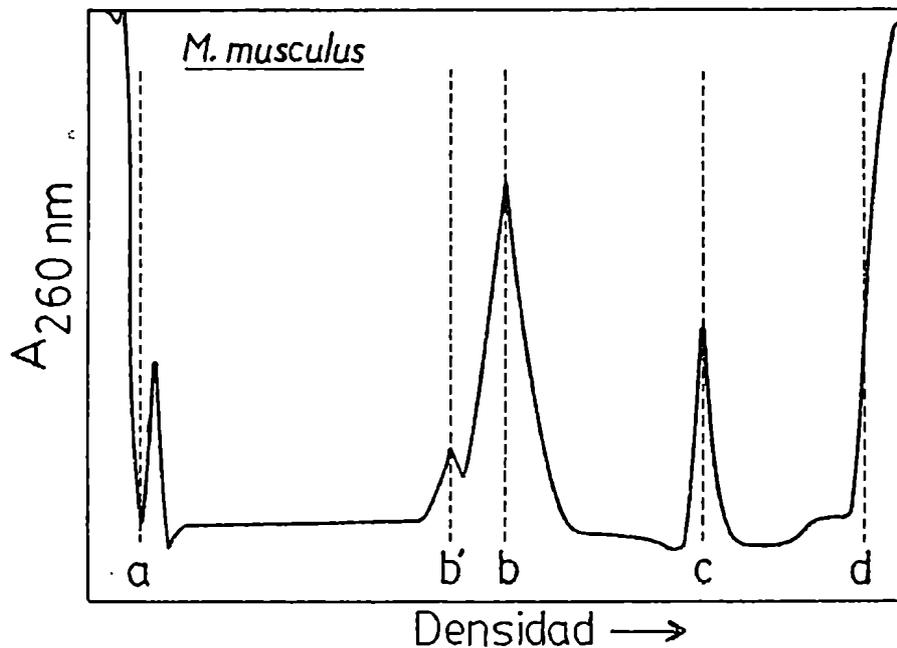
2. Hibridación de secuencias de copia única en solución:

- a. El análisis efectuado con cinco ADNs de cricétidos demostró una marcada estabilidad en cuanto a la sustitución de secuencias de nucleótidos. Las especies akodontinas presentaron un  $\Delta T_m$  entre 0,5 y 1,5 °C, Oryzomys flavescens 2 °C y Calomys musculus 2,5 °C con respecto al ensayo homólogo de Akodon xanthorhynchus, empleado como trazador.
- b. La falta de coincidencia entre los ensayos de hibridación empleando secuencias de copia única y repetidas podría reflejar los cambios "cuantitativos" que sufren estas últimas secuencias.

D. Los resultados presentados en este trabajo demuestran que la aplicación de técnicas moleculares para la caracterización y comparación de ADNs constituyen criterios de gran valor en estudios encuadrados en la sistemática-evolutiva.

## APENDICE I

### CALCULO DE DENSIDADES DE FLOTACION



A continuación se detalla el cálculo de la densidad de flotación del ADN de Mus musculus. El densitograma de la figura anterior corresponde, por razones de espacio, a un 77 % del original. Sobre el trazado densitométrico original se midieron las siguientes distancias (con calibre al 0,01 cm);

a-d (distancia desde el fondo al tope de la celda)	= 12,33 cm
a-b (distancia desde el pico de la banda principal del ADN problema al tope de la celda)	= 6,22 cm
a-b' (distancia desde el pico de la banda satélite del ADN problema al tope de la celda)	= 5,28 cm
a-c (distancia desde el pico de la banda del ADN estándar al tope de la celda)	= 9,58 cm

La celda de la ultracentrífuga tiene una longitud de 1,40 cm. Por lo tanto, la magnificación en el trazado densitométrico es de  $12,33/1,40 = 8,81 = M$ . Si dividimos cada una de las distancias anteriores por la magnificación obtenemos las distancias reales en el gradiente, desde cada banda de ADN al tope de la celda.

Para calcular las distancias desde cada banda al centro de rotación, a las medidas anteriores hay que sumarles la distancia que separa el tope de la celda del eje de rotación. Esta distancia es 5,71 cm, para el rotor utilizado. En consecuencia, las distancias radiales son:

$r_o$  (distancia desde el pico de la banda del ADN estándar al eje de rotación) =  $(a-c)/M + 5,71 = 9,58/8,81 + 5,71 = 6,80$  cm

$r_s$  (distancia desde el pico de la banda principal del ADN problema al eje de rotación) =  $(a-b)/M + 5,71 = 6,22/8,81 + 5,71 = 6,42$  cm

$r_{s'}$  (distancia desde el pico de la banda satélite del ADN problema al eje de rotación) =  $(a-b')/M + 5,71 = 5,28/8,81 + 5,71 = 6,31$  cm

Los valores obtenidos se incorporaron a la ecuación de Meselson et al. (1957) para el cálculo de densidad de flotación utilizando un ADN marcador de densidad conocida:

$$\rho_s = \rho_o + \frac{\omega^2}{2\beta} (r_s^2 - r_o^2) \text{ g/cm}^3$$

donde  $\rho_o$  es la densidad del marcador,  $\omega$  la velocidad angular en radianes/seg ( $\omega = 2\pi \text{ rpm}/60$ ) y  $\beta$  un factor que depende de la densidad del gradiente y de propiedades físicas del CsCl. Para densidades comprendidas entre 1,65 y 1,75 g/cm<sup>3</sup> el valor de  $\beta$  es  $1,19 \times 10^9$  y la ecuación anterior se convierte en

$$\rho_s = \rho_o + 4,202 \omega^2 (r_s^2 - r_o^2) 10^{-10} \text{ g/cm}^3$$

En nuestro caso la densidad del ADN marcador es 1,742 g/cm<sup>3</sup> y la velocidad empleada fue 42040 rpm (4403 rad/seg, para  $\pi = 3,142$ ). Por lo tanto,

$$\begin{aligned} \rho_s &= 1,742 + 4,202 \times 1,939 \times 10^7 (41,22 - 46,24) \times 10^{-10} = \\ &= 1,742 - 0,041 = 1,701 \text{ g/cm}^3 \end{aligned}$$

Del mismo modo,

$$\begin{aligned} \rho_{s'} &= 1,742 + 4,202 \times 1,939 \times 10^7 (39,82 - 46,24) \times 10^{-10} = \\ &= 1,742 - 0,052 = 1,690 \text{ g/cm}^3 \end{aligned}$$

Es decir que la densidad de flotación del ADN de la banda principal de M. musculus es 1,701 g/cm<sup>3</sup> y la del satélite es 1,690 g/cm<sup>3</sup>.

## APENDICE II

### DERIVACION NUMERICA DE LOS DATOS EXPERIMENTALES DE DESNATURALIZACION TERMICA

La Hipercromicidad es una función relativamente suave de la temperatura, pudiendo por lo tanto, ser adecuadamente aproximada -en rangos estrechos de temperatura- a la ecuación de segundo orden:

$$H = a + bT + cT^2 \quad (1)$$

donde H es la hipercromicidad observada a la temperatura T, a, b y c son los coeficientes que deben ser determinados a partir de tres o más observaciones. de H-T.

El método de derivación empleado tiene como requisito que los valores de y (Absorbencia, Hipercromicidad o Hipercromicidad Porcentual) deben corresponder a valores de x (T) equidistantes. Dada la naturaleza del equipo empleado no siempre esta condición puede ser satisfecha. No obstante, el empleo de técnicas analíticas de interpolación hacen posible la aplicación del mismo.

#### Descripción del método.

Se considera un intervalo de cinco valores sucesivos y equidistantes de T y sus correspondientes valores de ordenadas. Estos cinco pares de datos serán aproximados a una ecuación cuadrática (ec. 1). Convencionalmente se adjudican, a cada uno de los cinco valores considerados de T, la denominación : -2h; -h; 0; h; 2h, respectivamente.. De desea conocer el valor de la función derivada en el punto T=0, donde ella es igual a b. La distancia entre los valores contiguos es denominada h. Luego de calcular el primer valor de la derivada (correspondiente al tercer valor del intervalo, para la obtención del segundo punto de la derivada nos desplazamos una distancia h hacia la derecha por el eje de las abscisas, obteniendose así un nue

vo intervalo, con cuatro de cuyos puntos comunes con el anterior. De esta manera se podrá calcular la derivada de la función en el punto correspondiente a  $T=0$ .

Para determinar los coeficientes  $a$ ,  $b$  y  $c$  se emplea el método de los cuadrados mínimos, de acuerdo con el cual debemos calcular la magnitud mínima:

$$\sum_{k=-2}^{k+2} (y - y_k)^2$$

Utilizando la ecuación de la parábola esta suma puede escribirse en forma detallada, para ello introduciremos la notación  $y_{-2}$ ;  $y_{-1}$ ;  $y_0$ ;  $y_1$  e  $y_2$  que son los valores correspondientes a los valores de  $T$  :-2; -1; 0; 1 y 2-consideramos que la distancia entre los  $T$  es  $h=1$ . En tal caso:

$$\sum_{k=-2}^{k+2} (y - y_k)^2 = (a - 2b + 4c - y_{-2})^2 + (a - b + c - y_{-1})^2 + (a - y_0)^2 + (a + b + c - y_{+1})^2 + (a + 2b + 4c - y_{+2})^2.$$

El mínimo cuadrado de esta expresión según  $b$  surgirá de:

$$\frac{\partial}{\partial b} \sum (y - y_k)^2 = (-2(a - 2b + 4c - y_{-2}) - (a - b + c - y_{-1}) + (a + b + c - y_{+1}) + 2(a + 2b + 4c - y_{+2})) = 0.$$

De donde:

$$10b = -2y_{-2} - y_{-1} + y_{+1} + 2y_{+2}$$

$$b = \left( \frac{dy}{dt} \right)_{t=0} = \frac{-2y_{-2} - y_{-1} + y_{+1} + 2y_{+2}}{10}$$

Reordenando obtendremos:

$$f'(T) = \frac{-2(T-2h) - f(T-h) + f(T+h) + 2f(T+2h)}{10h}$$

siendo  $f(T)$  Absorbencia, Hiper Cromicidad o Hiper Cromicidad Porcentual, dependiendo de los valores de ordenada considerados, previo al inicio del procedimiento.  $f'(T)$  constituye la

derivada de Abs, H o H% respecto de la temperatura.

A continuación se presenta el listado del programa desarrollado para la obtención de la derivada numérica de los datos experimentales de desnaturalización térmica. El mismo fue desarrollado en lenguaje BASIC e implementado en una computadora Radio Shack III.

Datos ingresados: Pares x-y (T-Abs.)  
Temperatura máxima y el valor de Abs corresp.  
Temperatura mínima y el valor correspondiente de Abs.  
Corrección del graficador.

Datos emergentes: Hiper Cromicidad  
Hiper Cromicidad Porcentual  
Derivada de Hiper Cromicidad  
Derivada de Hiper Cromicidad Porcentual.

El programa incluye una subrutina de interpolación analítica de los datos.



```

9020 IF W# = CHR$(91) THEN R9 = 1: W# = CHR$(13): GOTO 9020
9020 PRINT CHR$(W) : IF ABS(FL) = WLZ THEN R9 = 0: ELSE IF FL < 0 AND W# =
9030 IF W# = " " THEN PRINT W# : WLZ = WLZ + 1: GOTO 90150
9030 IF W# = " " AND W# = 0 THEN R9 = 1: GOTO 90150
9030 IF W# = " " AND W# = " " AND W# = 0 AND W# = 0 THEN R9 = 1: GOTO 90150
9070 IF W# < CHR$(0) THEN S1 = 0: ELSE IF W# = 0 THEN S1 = 0: ELSE PRINT CHR$(24) : IF FL > 0 THEN 0:0: ELSE IF PEEN(16419) = 44 THEN R9 = 1
9090 IN$ = LEFT$(IN$, LEN(IN$) - 1)
9100 WLZ = WLZ + 1: POK(16419) = 132: GOTO 9000
9110 IF W# = CHR$(24) THEN PRINT STRINGS(WLZ, CHR$(24)) : GOTO 9000
9120 IF W# < CHR$(13) THEN 0: ELSE PRINT STRINGS(ABS(FL) - WLZ, 32) :
9130 PRINT CHR$(15) : W# = 23: NEXT: RETURN
9140 PRINT W# : IN$ = IN$ + W# : WLZ = WLZ + 1
9150 IF ABS(FL) = 1 THEN R9 = 0: ELSE R9 = 0
9000 R9 = PROCESO
9003 TL = TE
9005 F001 = IT0UVZ: X3(1) = ((X(1) - B) * 100) / (C - B) : NEXT I
9010 LPRINTLI$: LPRINT "X1" TAB(30) "X2" TAB(40) "X3" TAB(90) "F(X)" TAB(110) "TEMP" :
9020 NIZ = I
9025 IF NIZ < 5 THEN X1 = X(NIZ): X2 = (X1 - B) / B: X3 = X3(NIZ): FX = 0: GOTO 9050
9030 F1 = X3(NIZ - 4) : F2 = X3(NIZ - 3) : F3 = X3(NIZ - 2) : F4 = X3(NIZ - 1) : F5 = -2 * F1 - F2 + F3 + 2 * F4 :
9035 IF (C - B) = 0 THEN PRINT 0: ELSE TEMP MAX = TEMP MIN : : STOP
9040 X1 = X(NIZ): X2 = (X1 - B) / B: X3 = (X1 - B) * 100 / (C - B)
9045 IF NIZ > 5 THEN FX = 0
9050 LPRINT USING "##.###": X1 : : LPRINT TAB(30) " " : : LPRINT USING "##.###":
NTOUSING "##.###": FX : : LPRINT TAB(110) " " : : LPRINT USING "##.###": TL
9055 TL = TL + H
9060 NIZ = NIZ + 1
9070 IF NIZ > UVZ THEN GOTO 10000
9080 GOTO 9025
10000 LPRINTLI$
10010 PRINT 0:60, "OTRA CORRIDA AL PROGRAMA (S/N) " :
10020 OP$ = INKEY$
10030 IF OP$ = " " THEN 10000: ELSE IF OP$ < "S" AND OP$ < "N" THEN 10000: ELSE IF OP$ = "S" THEN RUN
10040 RUN: IMBICE/DAS"

```

### APENDICE III

#### AJUSTE DE LOS DATOS DE CINÉTICA DE REASOCIACION

La cinética de reasociación del ADN es una reacción de segundo orden, que puede ser descrita por la ecuación:

$$\%ADN \text{ reasociado a } Cot=x = 100 - \frac{100}{1 + k x} \quad (1)$$

siendo  $k$  el valor de la constante de velocidad de la reacción, este valor es la inversa del de  $Cot_{\frac{1}{2}}$  correspondiendo este al valor de  $Cot$  en el cual el 50% de las secuencias presentes se han reasociado-. Esta ecuación permite analizar ADN's cinéticamente simples (como los virales o bacterianos). Los genomas eucariotas, son cinéticamente complejos por presentar familias de secuencias con diferente grado de repetición además de secuencias de copia única. El análisis cinético de estos sistemas requiere el empleo de expresiones multicomponentes para aproximar los valores experimentales a curvas teoricas ideales.

La evaluación gráfica de los datos experimentales permite conocer el número de componentes cinéticos, el porcentaje que cada uno de estos componentes representa así como el valor de  $Cot_{\frac{1}{2}}$  de cada uno de los mismos.

La ecuación:

$$P^* = P_0 + P_1 - \frac{P_1}{1 + K_1 x} + \dots + P_n - \frac{P_n}{1 + K_n x} \quad (2)$$

permite evaluar la resultante de los aportes individuales de cada uno de los componente cinéticos detectados.  $P^*$  es el porcentaje de reasociación para un determinado valor de  $Cot (x)$ ,  $P_0$  el porcentaje de reasociación a  $t=0$ ,  $P_1, P_2, \dots, P_n$  el porcentaje de reasociación de los componentes 1, 2, ...,n y  $K_1, K_2, \dots, K_n$  las constantes de velocidad de los mismos.

Sustituyendo en la ec. 2 los valores de los parámetros establecidos por métodos gráficos y los valores de  $Cot$  ( $=x$  en la expresión) alcanzados en los ensayos experimentales, pueden obtenerse curvas ideales de aproximación. La comparación de los valores  $P^*$  ideales con los valores de  $P$  experimentales permite, mediante ensayos de prueba y error (mediante la variación de los parámetros estimados graficamente) lograr el mejor ajuste de los datos experimentales a curvas ideales.

Para facilitar el análisis se desarrollo un programa de computadora, en lenguaje BASIC,.

Datos ingresados: Pares de valores experimentales  $\%Reasoc./Cot$

Parametros  $P_0, P_1, P_2, \dots, P_n$

$K_1, K_2, \dots, K_n$

el programa evalua los valores generados -ideales- de  $\%Reasoc.$  con los datos experimentales, mediante un test de  $\chi^2$ . Luego de varios ensayos con ligeras variaciones en los parámetros, puede alcanzarse el mejor ajuste teórico de los datos experimentales.

A continuación se presenta el lista del programa desarrollado.

```

* NOMBRE DEL PROGRAMA CONVA DE AJUSTE DE CIR
20 CLEAR$=0
25 CLS:SUBE=###:NR:=DIML(15)
30 INPUT P1:P1
35 INPUT P2:P2
40 INPUT P3:P3
45 INPUT P4:P4
50 INPUT P5:P5
60 CLS
55 INPUT N1:N1
60 INPUT N2:N2
65 INPUT N3:N3
70 INPUT N4:N4
75 INPUT N5:N5
80 CLS
100 PRINT:EQ="( A ) INGRESO DE X ":PRINT:355,"( B ) INGRESO AUTOMATICO DE X "
105 NR:=1:THEN150 ELSEIFOP$<>"A"ANDOP$<>"B"THEN150 ELSEIFOP$="B"THENREX=1:GOTO190
110 LPRINTTAB(3) X "TAB(13) P1 "TAB(25) P2 "TAB(40) P3 "TAB(55) P4 "TAB(70) P5 "TAB(
115) NR:PRINTSTRING$(132,)--):RETURN
120 INPUT A "A":INPUT:OBSERVADO "100:NR:=1:PRINT:40,"NR0 "IN
125 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
130 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
135 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
140 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
145 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
150 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
155 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
160 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
165 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
170 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
175 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
180 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
185 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
190 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
195 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
200 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
205 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
210 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
215 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
220 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
225 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
230 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
235 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
240 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
245 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
250 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
255 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
260 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
265 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
270 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
275 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
280 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
285 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
290 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
295 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
300 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
305 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
310 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
315 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
320 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
325 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
330 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
335 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
340 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
345 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
350 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
355 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
360 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
365 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
370 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
375 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
380 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
385 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
390 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
395 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
400 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
405 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190
410 CLS:NR:=1:GOTO190 ELSEGUSUB216 :GOTO190

```

B I B L I O G R A F I A

- Albesa, I.; Basso, B.; Eraso, A.; Kravetz, F.; Moretti, E. (1975).  
Actas IV Jornadas Argentinas de Zoología. Corrientes  
UNNE: pag. 5.
- Alker, J. (1967). Review of the North America fossil cricetinae  
rodents (Muridae, Mammalia): pp: 1-301. University mi-  
crofilms Inc. Ann Arbor, Mich. Cita tomada de Reig,  
O. A. (1981).
- Ansevin, A. T. and Brown, B. W. (1971). Biochem. 10(7): 1133-1142.
- Ansevin, A. T.; Vizard, L.; Brown, B. W. (1976). Biopolymers 15:  
153-174.
- Ansevin, A.T.; Vizard, L.; Mandel, M.; Dean, D. H. (1983). BBA  
740: 127-133
- Arata, A.A. (1964). Bull. Florida State Mus. (Biol.) 9: 1-42.
- Arrighi, F.E.; Mandel, M.; Bergendahl, J. and Hsu, T.C. (1970).  
Biochem. Genet. 4: 367-376.
- Avery, D.T.; MacLeod, C.M. and McCarthy, M. (1944). Jour. Exp.  
Med. 74: 137-158.
- Balmain, A. and Birnie, G.D. (1979). BBA 561: 155-166.
- Baskin, J.A. (1978). Jour. of Mammalogy 59: 125-135.
- Basso, B.; Eraso, A.; Moretti, E.; Albesa, I.; Kravetz, F. (1977).  
Rev. Asoc. Arg. Microbiol. 9(1): 13-16.
- Bateson, W. (1913). Problems of Genetics. Oxford Univ. Press, London.
- Benett, M.D. (1982). In: Genome Evolution;pp: 239-263. (Dover, G.A.  
and Flavell, R.B., eds.). Academic Press, London.
- Bendich, A.J. and McCarthy, B.J. (1970). Genetics 65: 545-565.
- Bernardi, G. (1965). Nature (London) 206: 779.
- Bonner, T.L., Brenner, D.J., Neufeld, B.R., Britten, R.J. (1973).  
J.Mol. Biol. 81: 123-135.
- Botchan, M. (1974). Nature (London) 251: 288-292.
- Britten, R.J. and Kohne, D. E. (1968). Science 161: 529-540.
- Britten, R.J. and Davidson, E.H. (1971). Quart. Rev. Biol. 46:  
111-138.
- Britten, R.J.; Graham, O.E. and Neufeld, B.R. (1974). Methods in  
Enzymology XXXIII(B): 363-418. (Grossman, L. and Moldave,  
K. eds). Academic Press N.Y.

- Brownell, E. (1983). *Evolution* 37 (5): 1034-1051.
- Brykov, V.A.; Volfson, V.G. and Borob'ev, V.I. (1979). *Chromosoma* (Berl.) 74: 105-124.
- Bünemann, H. and Müller, W. (1978). *NAR* 5: 1059-1074.
- Cabrera, A. (1961). Catálogo de los mamíferos de América del Sur. *Rev. Mus. Arg. Cien. Nat. "Bernardino Rivadavia"*, 4: 1-732.
- Carleton, M. D. (1973). *Misc. Publ. Mus. Zool. Univ. Michigan* 146: 1-43.
- Carlson, M. and Brutlag, D. (1977). *Cell* 11: 371-381.
- Cech, T. R. and Hearst, J. C. (1976). *J.Mol. Biol.* 100: 227-256.
- Clark, J. B.; Dawson, M. R. and Wood, A. E. (1964). *Bull.Mus. Comp. Zool. Harvard* 131(2): 27-63. Cita tomada de Reig, O.A. (1981).
- Contreras, J.R. y Roig, V. G. (1976). *Neotrópica* 22 (67): 15-16.
- Contreras, J.R. y Rossi, M.I. (1980). *Hist. Nat.* 1(5): 17-28.
- Corneo, G.; Ginelli, E. and Polli, E. (1971). *BBA* 247: 528-534.
- Crespo, J. A. (1966). *Rev. Mus. Arg. Ciencias Nat. "Bernardino Rivadavia" (Ecología)* 1(3): 79-134.
- Crespo, J.A.; Sabattini, M.S.; Piantanida, M.J.; deVillafañe, G. (1970). Ministerio de Bienestar Social Sec. Est. de Salud Pública pág.: 1-45.
- Crisci, J.V. y Armengol, M. S. (1983). *Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Monografía 26 (Serie de Biología) OEA.*
- Cuny, G.; Soriano, P.; Macaya, G. and Bernardi, G. (1981). *Eur. J. Biochem.* 115: 227.
- Chargaff, E. (1950). *Experientia* 6: 201-209.
- de Villafañe, G. (1970). Tesis Doctoral. Univ. Nac. Córdoba.
- de Villafañe, G.; Kravetz, F.O.; Piantanida, M.J. y Crespo, J.A. (1973). *Physis* 32: 47-59.
- de Villafañe, G; Kravetz, F.O.; Donadío, O; Percich, R.; Knecher, L.; Torres, M.P. y Fernández, N. (1977). *Medicina (Bs. As.)* 37(3): 128-140.

- deVillafañe, G. (1981). *Hist. Nat.* 1(33): 237-256.
- Doolittle, W.F. and Sapienza, C. (1980). *Nature (London)* 284: 601-603.
- Doty, P.; Marmur, J.; Eigner, and Schildkraut, C. (1960). *P.N.A.S.* 46 (4): 461-476.
- Eden, F.C., Hendrick, J.P. (1978). *Biochem.* 17: 5838-5844.
- Ellerman, J.R. (1941). *The families and genera of living rodents.* *British Mus. Nat. Hist.* 2: 1-690.
- Endow, S. A. (1977). *J. Mol. Biol.* 114: 441-449.
- Felbusch, V. (1967). *Palaont. Z.* 41: 154-164. Cita tomada de Reig, O.A. (1981).
- Flavell, R.B.; Rimpau, J. and Smith, D. B. (1977). *Chromosoma (Berl.)* 63: 205-222.
- Flavell, R. B. (1980). *Ann. Rev. Plant. Physiology* 31: 569-596.
- Flavell, R. B. (1982). In: *Genome evolution: 301-323.* (Dover, G. A. and Flavell, R. B. eds). Academic Press, London.
- Forcone, A. E.; Luna, M. V.; Kravetz, F. O. y Lisanti, J. A. (1980). *Mendeliana* 4(2): 57-65.
- Fry, K. and Salser, W. (1977). *Cell* 12: 1069-1084.
- Gaastera, W. and Jorgensen, P.L. (1984). In: *Methods in Molecular Biology Vol. 2 "Nucleic Acids"*, J.M. Walker ed. pp:67-76. Humana Press. Clifton. N.J.
- Gabarro, J. (1978). *Analytical Biochemistry* 91: 309-322.
- García, B. A. y Gardenal, C. N. (1985). *Actas XVI Congreso Arg. Genet. - Rosario 1985 - pág. 21.*
- Gardenal, C. N.; Blanco, A.; Sabattini, M. S. (1977). *Physis* 36: 179-188.
- Gardenal, C. N.; Juárez, N. T.; Gutiérrez, M.; Sabattini, M. S. (1977). *Physis* 36: 169-178.
- Gardenal, C. N.; Sabattini, M. S.; Blanco A. (1980). *Biochem. Genet.* 18: 563-575.
- Gardner, A.L. and Patton, J. L. (1976). *Ocas. Pap. Mus. Zool. Louisiana State Univ.* 49: 1-48.
- Gillespie, D.; Pequignot, E. and Strayer, D. (1980). *Gene* 12: 103-111.

- Gillespie, D.; Donehower, L. and Strayer, D. (1982). In: Genome Evolution (Dover, G. A. and Flavell, R. B., eds) pp: 113-133. Academic Press, London.
- Ginatulina, L. K.; Ginatulin, A. A. and Vorontzov, N. N. (1980). Genetica 52/53: 127-138.
- Guttman, T.; Vitek, A. and Pivec, L. (1977). NAR 4 (2): 285-297.
- Harper, M. E. and Saunders, G. (1981). Chromosoma (Berl.) 83: 431.
- Hennig, W. and Walker, P. M. B. (1970). Nature (London) 225:915-918.
- Hershey, A. D. and Chase, M. (1952). J. General Physiol. 36(1): 39-56.
- Hershkovitz, P. H. (1962). Fieldiana, Zoologica 46: 1-524.
- Hibbard, C. W. (1968). Spec. Publ (2) Amer. Soc. Mammalogists. Cita tomada de Reig, O. A. (1981).
- Hodara, V. L.; Kajon, A. E.; Quintans, C.; Montoro, L. y Merani, M. S. (1984). Rev. Mus. Arg. Ciencias Nat. "Bernardino Rivadavia" (Zool) XIII (47): 453-459.
- Honacki, J. H. (1982). Mammal species of the world. Eds. Honacki, J.H.; Kinnan, K. E. and Koeppl, J. W.- Allen Press Inc. and the assoc. of System Collect. Lawrence, Kansas, USA.
- Hooper, E. T. (1948). Misc. Publ. Mus. Zool. Univ. Michigan 72: 1-28.
- Hooper, E. T. and Musser, G. G. (1964). Misc. Publ. Mus. Zool. Univ. Michigan 123: 1-57.
- Horz, W. and Sachau, H. G. (1977). Eur. J. Biochem. 73: 383-392.
- Hoyer, B. H.; Bolton, B. J., McCarthy and Roberts, R. B. (1965). In: Bryson V. and Vogel, H.J. (eds). Evolving genes and proteins. Rutgers Symposium. Academic Press, N.Y.
- Hoyer, B. H.; Van de Velde, N. W.; Goodman, M. and Roberts, R. B. (1972). J. Hum. Evol. 1: 645-649.
- Hurtado de Catalfo, M; Waimberg, R. (1974). Physis Sec. C 33: 215-219.
- Ifft, J. B.; Voct, D. H. and Vinograd, J. (1961). J. Phys. Chem. 65: 1138.

- Johnson, D. A.; Gautsch, J. W., Sportsman, J. R. and Elder, J. (1984).  
Gene Ana. Techniques 1(1): 3-8.
- Johnson, K. M.; Kuns, M. L.; Machenzie, R. B.; Webb, P. A. and  
Yunker, C. E. (1966). Am. J. Trop. Med. Hyg. 15: 103-106.
- Jones, K. W. (1970). Nature (London) 225: 912-915.
- Kafatos, F. C.; Jones, C. W. and Eftratiadis, A. (1979). NAR 7(6);  
1541-1552.
- Kit, S. (1961). J. Mol. Biol. 3:711.
- Kohne, D. E.; Chiscon, J. A. and Hoyer, B. H. (1971). Carnegie Inst.  
(Wash.) Yearbook 69: 488-501.
- Kravetz, F. O.,; Manjón, M. C.; Busch, M.; Percich, R; Marconi, P.;  
Torres, M. P. (1981 a). Ecología 6: 15-22
- Kravetz, F. O.; Busch, M.; Percich, R.; Manjón, M. C. y Marconi,  
P. (1981 b). Ecología 6: 35-44.
- Laird, C. D. and McCarthy, B.J. (1968). Genetics 60: 303-322.
- Laird, C. C. (1971). Chromosoma (Berl.)32: 378-406.
- Leve, P. A. and Bass, W. L. (1931). In: Chemical Catalog Co. New  
York.
- Lewin, B. (1980). Gene expression Vol. 2 (2nd. Ed). Ed. John Willey  
and Sons. N. Y.
- Lisanti, J. A.; Kravetz, F. O. y Ramírez, C.L.V. (1976). Physis  
35(C): 221-230.
- Lypunova, E. A.; Ginatulina, V.P.; Korablev, V.P.; Ginatulin, A.  
A. and Vorontzov, N.N. (1980. In: Animal genetics and  
evolution (Vorontzov, N.N. and van Brink Junk, J. M. eds.)  
The Hague pp:229-237.
- Mandel, M. and Marmur, J. (1968). Methods in Enzymol. XII (B) pp:  
195-206. (Grossman, L. and Moldave, K. eds.). Academic  
Press. N. Y.
- Mandel, M.; Schildkraut, C. L. and Marmur, J. (1968). In: Methods  
in Enzymol. XII (B).pp: 184-185. (Grossman, L. and Molda-  
ve, K. eds.) Academic Press, N. Y.
- Maniatis, T; Fritsch, E. R. and Sambrook, J. S. (1982). Cold Spring  
Harbor Laboratories. pp: 1-545.

- Manuelidis, L. (1977). Analytical Biochem. 78: 561-568.
- Manuelidis, L. (1982). In: Genome Evolution. pp: 263-286. (Dover, G.A. and Flavell, R. B. eds.). Academic Press, London.
- Marmur, J. and Doty, P. (1959). Nature 183: 1429-1431.
- Marmur, J. (1961). J. Mol. Biol. 3:208.
- Marmur, J. and Doty, P. (1962). J. Mol. Biol. 5: 109-118.
- Marmur, J. and Lane, D. (1960). P.N.A.S. 46(4): 453-461.
- Marmur, J.; Rowind, R. and Schildkraut, C.L. (1963). Progress in Nucl. Acid. Res. 1:233.
- Massoia, E. (1961). Publ. Mus. Municip. "Lorenzo Scaglia" 1(4): 115-143.
- Massoia, E.; Fornes, A. (1965). Com. Nac. Coord. Estudio Lucha FHA, Min. Bienest. Soc. y Min. Salud Pública de la Nación. pág. 1-29.
- Massoia, E.; Fornes, A.; Waimberg, R. y Fronza, T. (1968). Rev. Inv. Agrop. INTA Serie 1 (Biol. y Prod. Anim.) 5: 63-92.
- McCarthy, B.J. and Bolton, E.T. (1963). P.N.A.S. (USA) 50: 156-164.
- McConaughy, B. L. and McCarthy, B.J. (1970). Biochem. Genet. 4: 425-446.
- Meselson, M.; Stahl, F.W. and Vinograd, J. (1957). P.N.A.S. (USA) 43(7): 581-588.
- Meselson, M. and Stahl, F. W. (1958). P.N.A.S. (USA) 44(7): 671-682.
- Miescher, F (1871). On the chemical composition of pus cells. Hoppe-Seyler Med. Chem. Untersuch. 4: 441-460,
- Miksche, J.P. and Hotta, Y. (1973). Chromosoma (Berl.) 41: 29-36.
- Miyazawa, Y. and Thomas, C. A. (1965). J. Mol. Biol. 11: 223.
- Moretti, E. R.; Basso, B.; Albasa, I.; Eraso, A.J. y Kravetz, F. O. (1980). Medicina (Bs.As.) 40(1): 181-186.
- Mayfield, J.E. (1977). BBA 477: 97-101.
- Nutall, G. H. F. (1901). Proc. Roy. Soc. London 69: 150-153.

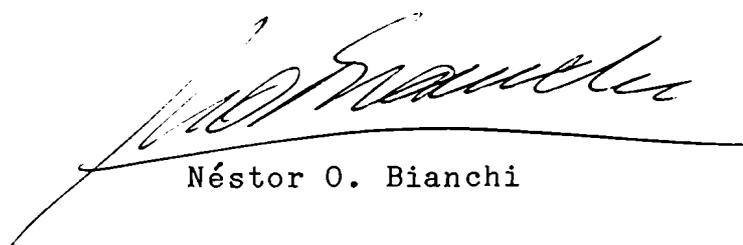
- Ohno, S. (1970). Evolution by gene duplication. Springer Verlag. Berlin.
- Ordahl, C.H. (1977). BBA 474: 17-29.
- Orgel, L.E. and Crick, F.H.C. (1980) Nature (London) 284: 604-607.
- Pardue, M.L. and Gall, J. G. (1970). Science 168: 1356-1358.
- Parodi, A. S.; de la Barrera, J. M.; Ruggiero, H. R.; Greenway, D.; Yerga, M.; Mettler, N. (1959). Prensa Médica Argentina 46:554.
- Patterson, B. and Pascual, R. (1968). Quart. Rev. Biol. 43: 409-451.
- Peacock, W. J.; Lohe, A. R.; Gerlach, W.L.; Dunsmuir, P.; Dennis, E. S. and Appels, R. (1978). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42: 1121-1135.
- Pearson, O. P. and Patton, J. L. (1976). J.Mamm. 57(2): 339-350.
- Pérez-Zapata, A.; Vitullo, A. D. and Reig, O. A. (1986). Acta Científica Venezolana (en prensa).
- Pivec, L.; Pivcová, H. and Sormová, Z. (1970). BBA 213: 343-351.
- Pohl, F.M. and Jovim. T.H. (1972). J. Mol. Biol. 67: 375-396.
- Rake, A.V. (1974). Biochem. Genet. 11: 261-277.
- Reig, O. A. (1964). Publ. Mus. Municip. Cien. Nat. "Lorenzo Scaglia" 1(6): 203-224.
- Reig, O. A. (1965). Physis 25(69): 205-211.
- Reig, O. A. (1972). Ph. D. Thesis. University College, London:1-451.
- Reig, O. A. (1975). Acta Científica Venezolana 26(1):7.
- Reig, O. A. (1978). Publ. Mus. Municip. Cien. Nat. "Lorenzo Scaglia" 2: 164-190.
- Reig, O. A. (1980). Distribution patterns and evolutionary history of high andean rodents. Depto. de Estudios Ambientales, Univ. Simón Bolívar, Caracas, Venezuela.
- Reig, O. A. (1981). Teoría del origen y desarrollo de la fauna de mamíferos de América del Sur. Monographiae Naturae. Mus. Munic. Cien. Nat. "Lorenzo Scaglia" 1: 1-161.
- Reig, O. A. (1984). Rev. Brasil. Genét., 7(2):333-365.
- Roizes, G. (1974). NAR 1:1099.
- Roizes, G. (1976). NAR 3: 2677-2696.
- Rolfe, R. and Meselson, M. (1959). P.N.A.S. (USA) 45:1039.
- Sabattini, M. S.; González, L. E. (1967). Rev. Soc. Arg. Biol. 43: 252.

- Sabattini, M. S.; Gonzáles de Ríos, L. E.; Díaz, G; Vega, V. R. (1977). *Medicina (Bs. As.)* 37 (3): 149-161.
- Sabattini, M. S.; Maiztegui, J. (1970). *Medicina (Bs. As.)* 30 (1): 8-14.
- Santiago, L. and Rake, A. V. (1973) *Biochem. Genet.* 9: 278-282.
- Schildkraut, C. L.; Marmur, J and Doty, P. (1962) *J. Mol. Biol.* 4: 430-443.
- Shields, G. and Strauss, N. A. (1974) *Evolution* 29: 159-166.
- Sibley, C. G. and Ahlquist, J. E. (1981). In: Scudder, G. G. and Reveal, J. L. Eds. *Proceedings of 2nd Internat. Cong. of System. Evol. Biol.* Hunt Inst. Bot. Docum. Pittsburg pp: 301-355.
- Sibley, C. G. and Ahlquist, J. E. (1984) *J. Mol. Evol.* 20: 2-15.
- Simpson, G. G. (1969) In: E. J. Fittkau et al. *Biogeography and Ecology in South America.* Dr. W. Junk N. V. Publ. The Hague: 879-909.
- Skinner, D. H. and Beattie, W. G. (1973) *P.N.A.S.(USA)* 70: 3108.
- Southern, E. M. (1970) *Nature (London)* 227: 794-798.
- Southern, E. M. (1975a) *J. Mol. Biol.* 94: 51-69.
- Southern, E. M. (1975b) *Anal. Biochem.* 62: 317-318.
- Strauss, N. A. (1976) In: *Handbook of Genetics* (R. C. King Ed.) Plenum Press N. Y.- London pp: 3-29.
- Subirana, J. A. and Doty, P. (1966) *Biopolymers* 4: 171-187.
- Subirana, J. A. (1966) *Biopolymers* 4: 189-200.
- Sueoka, N. ; Marmur, J. and Doty, P. (1959) *Nature (London)* 183: 1429.
- Tate, C. R. H. (1932a). *Amer. Mus. Nov.* 557: 1-5.
- Tate, C. R. H. (1932b) *Amer. Mus. Nov.* 541: 1-21.
- Thomas, O. (1916) *Ann. Mag. Nat. Hist. London* 8 (17): 182-187.
- Vallejo-Román, K. M.; Miroshnichenko, G. P. and Antonov, A. S. (1975) *Mol. Biol. (Moscow)* 9: 548-551.
- Vitullo, A. D.; Kajon, A. E.; Percich, R.; Zuleta, G. A.; Merani, M. S. y Kravetz, F. O. (1984) *Rev. Mus. Arg. Ciencias Nat. "Bernardino Rivadavia", Zool.* 13: 491-498.

- Vidal-Rioja, L. A.; Semorile, L. and Bianchi, N. O. (1979)  
Biochem. Genet. 17: 297-303.
- Vidal-Rioja, L. A.; Bianchi, N. O.; Catalá, A and Semorile, L.  
(1982) Canad. J. Genet. Cytol. 24: 601-609.
- Vidal-Rioja, L. A.; Corach, D. and Padrón, J. (1987a) Rev. Bras.  
Genet. (en prensa).
- Vidal-Rioja, L. A.; Semorile, L.; Bianchi, N. O. and Padrón, J.  
(1987b) Genetica (en prensa).
- Vorontzov, N. N. (1968). Cita tomada de Reig, O. A. (1981).
- Walker, P. M. B. (1971) Progress Biophys. Mol. Biol. 23: 145-190.
- Walker, P. M. B. (1968) Nature (London) 219: 228-233.
- Warning, M. J. and Britten, R. J. (1965) Carnegie Inst. (Wash.)  
Year Book 64: 316-321.
- Watson, J. D. and Crick, F. H. C. (1953a) Nature (London)  
171: 737-738.
- Watson, J. D. and Crick, F. H. C. (1953b) Nature (London)  
171: 964-969.
- Wetmur, J. G. and Davidson, N. (1968) J. Mol. Biol. 31: 349-370.
- Wiley, A. M. and Yunis, J. J. (1975) Expl. Cell Res. 91: 223-232.



Daniel Corach



Néstor O. Bianchi