

## Tesis de Posgrado

# Purificación de taquizoitos de *Toxoplasma gondii*, clonado y caracterización de secuencias repetitivas del parásito

Blanco, Jorge Carlos Gustavo

1992

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:**

Blanco, Jorge Carlos Gustavo. (1992). Purificación de taquizoitos de *Toxoplasma gondii*, clonado y caracterización de secuencias repetitivas del parásito. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2496\\_Blanco.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2496_Blanco.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Blanco, Jorge Carlos Gustavo. "Purificación de taquizoitos de *Toxoplasma gondii*, clonado y caracterización de secuencias repetitivas del parásito". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1992.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2496\\_Blanco.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2496_Blanco.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**TESIS**

**PURIFICACION DE TAQUIZOITOS  
DE TOXOPLASMA GONDII**

**CLONADO Y CARACTERIZACION  
DE  
SECUENCIAS REPETITIVAS DEL  
PARASITO**

**AUTOR: LIC. JORGE C. G. BLANCO**

**DIRECTOR: DR. JUAN CARLOS GARBERI**

Tesis presentada para optar al título de:

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

*Tesis  
24/9/6  
ej. 3*

**A la memoria de Isabel**

Agradezco y además dedico esta tesis a mi familia que en todo momento me ayudo: A mi esposa, Claudia Martin; a mis padres, Marta y David; a Susana, Jorge, Lucas y Florencia.

Agradezco especialmente al Dr Juan Carlos Garberi, un gran amigo, por su apoyo incondicional y sus enseñanzas de todos estos años.

Tengo un agradecimiento especial para mis compañeros de trabajo, Sergio Angel, Viviana Pzsenny y Mariana Babor por toda la ayuda que me han prestado.

Me siento en deuda con el Dr. Jorge Zorzópulos, Mauricio Seigelchifer, Esteban Corley, Alejandro Ruiz Travisán y Gustavo Zomosa por todo el apoyo que me dieron en la última etapa de este trabajo.

Agradezco a los Dres. José La Torre, Héctor Targovnik, Luis Romano, José Burdman y la gente de su laboratorio por la ayuda que me brindaron.

Agradezco a Susana Blanco, Liliana Romanelli y Jorge Schuster por la impresión y a David Blanco por los dibujos de este trabajo.

Deseo agradecer por último a la Universidad de Buenos Aires y al Concejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina que me han permitido realizar este trabajo y a la Fundación CIMAE que me brindó el espacio físico.

## INDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	1
<b>INTRODUCCION</b>	3
<b>1 <i>Toxoplasma gondii</i></b>	3
1.1 Historia	3
1.2 Clasificación	3
1.3 Descripción	4
1.4 Ciclo de vida del parásito	6
1.4.1 Ciclo sexual o entero-epitelial	6
1.4.2 Ciclo asexual	8
1.5 Distribución	9
1.6 Huéspedes definitivos e intermediarios	10
<b>2 Toxoplasmosis</b>	11
2.1 Vías de infección	11
2.2 Infección en animales	12
2.3 Infección en Humanos	12
2.3.1 Toxoplasmosis congénita	13
2.3.2 Toxoplasmosis Adquirida	14
2.4 Diagnóstico de la Toxoplasmosis	15
2.4.1 Diagnóstico Indirecto	15
2.4.2 Métodos directos	17
2.4.2a Detección del parásito	18
2.4.2b Detección de Antígenos	18
2.4.2c Detección de ácidos nucleicos	18
2.5 Tratamiento de la toxoplasmosis	19
<b>3 Nuestro Estudio</b>	20
3.1 Purificación de taquizoitos de <i>Toxoplasma gondii</i>	20
3.2 El genoma de <i>Toxoplasma gondii</i>	20
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	23
<b>1 Parásitos</b>	23
1.1 La cepa RH de <i>Toxoplasma gondii</i>	23
1.2 Mantenimiento de la Cepa	23
<b>2 Purificación de los taquizoitos</b>	24
2.1 Técnica de centrifugación	24
2.1.1 Centrifugación Zonal	24
2.2 Gradiente de sacarosa	25
2.2.1 Análisis de las condiciones	25
2.2.2 Condiciones óptimas de purificación	26
2.2.2.a Primer gradiente	26
2.2.2.b Segundo gradiente	26

2.3	Análisis de la purificación	28
2.3.1	Análisis microscópico	28
2.3.2	Análisis de viabilidad	28
2.3.3	Análisis del rendimiento	28
<b>3</b>	<b>Extracción de ácidos nucleicos</b>	<b>29</b>
3.1	Extracción de ADN de parásitos	29
3.1.1	Lisado de los taquizoitos	29
3.1.2	Desproteínización	29
3.1.3	Tratamiento con ARNasa	32
3.1.4	Precipitación del ADN	32
3.1.5	Lavado del ADN	33
3.1.6	Deshidratación de la muestra	33
3.2	Purificación de ADN murino	34
3.3	Cuantificación del ADN	34
3.4	Purificación de ARN total de taquizoitos	35
3.5	Cuantificación de ARN total	36
<b>4</b>	<b>Análisis electroforético</b>	<b>36</b>
4.1	Enzimas de restricción	37
4.1.1	Reacción de restricción	38
4.2	Electroforesis en gel de Agarosa	38
4.2.1	Preparación del gel	39
4.2.2	Condiciones de la electroforesis	40
4.2.2a	Geles de ADN	40
4.2.2b	Geles de ARN	41
4.2.3	Fotografía del gel	41
<b>5</b>	<b>Técnicas de hibridización molecular</b>	<b>41</b>
5.1	Análisis por Dot Blot	42
5.1.1	Preparación del filtro	42
5.1.2	Dot blot con muestras crudas	42
5.1.3	Dot blot de ADN purificado	43
5.1.4	Dot blot de ARN	43
5.2	Técnica de Southern Blot	43
5.2.1	Tratamiento del gel	44
5.2.2	Transferencia	44
5.3	Marcación de ADN	46
5.3.1	Marcación del ADN genómico	46
5.3.1a	Método de Nick Translation	46
5.3.1b	Reacción	46
5.3.2	Marcación de fragmentos de ADN	47
5.3.2a	Método de Random Primer	47
5.3.2b	Reacción	47
5.4	Purificación de las sondas marcadas	48
5.5	Hibridización	49
5.5.1	Soluciones utilizadas	50
5.5.2	Reacción	50
5.5.3	Exposición radiográfica	51
5.5.4	Cuantificación de la hibridización	51
<b>6</b>	<b>Clonado de Secuencias repetitivas de <i>Toxoplasma gondii</i></b>	<b>51</b>
6.1	Vector de clonado	52

6.1.1	El plásmido pUC18/19	52
6.1.2	Preparación del vector de clonado	54
6.2	Aislamiento de los fragmentos a clonar	54
6.3	Ligación fragmentos/vector	55
6.4	Células Competentes	56
6.4.1	Elección de las células a transformar	56
6.4.2	Tratamiento para competencia	56
6.4.2a	Medios y soluciones	56
6.4.2b	Protocolo de competencia	57
6.5	Transformación	59
6.5.1	Protocolo de transformación	59
6.6	Rastreo de la genoteca-Hibridización de colonias	60
6.6.1	Protocolo	60
6.6.2	Conservación de los clones bacterianos	61
6.7	Minipreparación de Plásmidos	61
6.7.1	Soluciones para la minipreparación	61
6.7.2	Protocolo de minipreparación	61
6.8	Maxipreparación de los plásmidos	62
6.8.1	Protocolo de Maxipreparación	62
6.8.2	Gradiente isopícnico de plásmidos	64
6.8.3	Diálisis de la preparación de plásmidos	65
6.8.4	Electroelución de los fragmentos clonados	65
<b>7</b>	<b>Secuenciación</b>	<b>66</b>
7.1	Introducción	66
7.2	Biología del Fago M13	67
7.3	M13mp 18/19	67
7.4	Clonado en M13mp 18/19	68
7.4.1	Preparación de los vectores	68
7.4.2	Preparación de los fragmentos a subclonar	68
7.4.3	Ligación	69
7.4.4	Transformación	69
7.4.5	Aislamiento de ADN simple cadena	71
7.5	Reacción de secuenciación	71
7.5.1	Reacción de Hibridización Molde-Primer	72
7.5.2	Reacción de Marcación-Extensión	73
7.5.3	Reacción de terminación	74
7.6	Análisis electroforético de las secuencias	74
7.6.1	Preparación del gel	74

## **RESULTADOS** 76

<b>1</b>	<b>Introducción</b>	<b>76</b>
<b>2</b>	<b>Purificación</b>	<b>78</b>
2.1	Definición de parámetros	78
2.2	Análisis de la purificación	80
2.2.1	Análisis microscópico	80

2.2.2 Análisis por Dot Blot (1 <sup>er</sup> gradiente)	82
2.3 Formulación de un segundo gradiente	82
2.3.1 Análisis por Dot Blot (2 <sup>do</sup> gradiente)	84
2.4 Hibridización con ADN de la banda 2	85
2.5 Dot Blot con ADN de las diferentes bandas	85
2.6 Análisis del grado de purificación	86
2.7 Análisis de la viabilidad de los parásitos	88
2.8 Rendimiento de la purificación	88
2.9 Análisis electroforético del ADN	89
2.9.1 Comparación con el ADN del huésped	89
2.9.2 Análisis del ADN genómico de <i>T. gondii</i>	89
2.9.3 Análisis de la metilación	91
2.10 Purificación del ARN total del parásito	93
2.11 Detección de secuencias repetitivas	94
<b>3 Clonado de ADN repetitivo</b>	<b>94</b>
3.1 Selección de los recombinantes	94
3.2 Elección de los fragmentos altamente repetidos	96
3.3 Determinación del número de copias	97
3.4 Análisis de la especificidad	98
3.5 Dot Blot con ARN total de taquizoitos	99
3.6 Análisis de Southern blot de las sondas clonadas	100
3.7 Secuenciación	110
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>115</b>
<b>1 Purificación</b>	<b>115</b>
<b>2 Análisis parcial del genoma de <i>Toxoplasma gondii</i></b>	<b>117</b>
2.1 Grado de metilación del ADN del parásito	117
<b>3 Secuencias repetitivas</b>	<b>118</b>
3.1 El por que de la elección de las secuencias Hpa II	118
3.2 Southern Blots. Análisis de las secuencias clonadas	118
3.3 Número de repeticiones de secuencias clonadas	120
3.4 Modelo de la disposición de las secuencias	121
3.5 Clasificación de las secuencias repetitivas clonadas	123
3.6 Posible origen de estas secuencias	124
3.7 Implicancias posteriores de estas secuencias	127
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>128</b>



## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Acido desoxiribonucleico
<b>ADNasa</b>	Deoxiribonucleasa
<b>APS</b>	Persulfato de amonio
<b>ARN</b>	Acido ribonucleico
<b>ARNasa</b>	Ribonucleasa
<b>ARNr</b>	Acido ribonucleico ribosómico
<b>ATP</b>	Adenosina-5'-trifosfato
<b>BAP</b>	Fosfatasa alcalina bacteriana
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina
<b>ClCs</b>	Cloruro de Cesio
<b>cpm</b>	Cuentas por minuto
<b>csp</b>	Cantidad suficiente para
<b>dATP</b>	Deoxiadenosina-5'-trifosfato
<b>dCTP</b>	Deoxicitosina-5'-trifosfato
<b>dGTP</b>	Deoxiguanina-5'-trifosfato
<b>dTTP</b>	Deoxitimina -5'-trifosfato
<b>ddATP</b>	Dideoxiadenosina-5'-trifosfato
<b>ddCTP</b>	Dideoxicitosina-5'-trifosfato
<b>ddGTP</b>	Dideoxiguanina-5'-trifosfato
<b>ddTTP</b>	Dideoxitimina -5'-trifosfato
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>D.O.</b>	Densidad óptica
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Acido etilen diamina tetracetico(saldisódica)
<b>E.L.I.S.A.</b>	Enzyme linked immunosorbent assay
<b>hr</b>	Hora/s
<b>I.F.L</b>	Inmunofluorescencia indirecta
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D- tiogalactopiranosido
<b>I.S.A.G.A.</b>	Immunsorbent agglutination assay
<b>Kda</b>	Kilodaltons
<b>mA</b>	miliamperios
<b>min</b>	Minutos
<b>MOPS</b>	acido (3-[N- morpholino]propansulfónico
<b>MyM</b>	Materiales y Métodos
<b>NC</b>	Filtro de nitrocelulosa
<b>pb o Kpb</b>	pares de bases o kilopares de bases
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>PEG</b>	Polietilenglicol

<b>pg</b>	páginas
<b>PM</b>	Peso molecular o standart de peso molecular
<b>Pol I</b>	ADN Polimerasa de <i>E. coli</i>
<b>PPI</b>	Pirofosfato de sodio
<b>P/V</b>	Peso/Volumen
<b>RFLP</b>	Restriction fragments lengh polymorphism
<b>seg</b>	Segundo
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>TCA</b>	Acido tricloroacético
<b>TEMED</b>	N.N.N'.N'.tetrametil-etilendiamina
<b>TRIS</b>	Tris (hidroximetil) aminometano
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>U</b>	Unidad
<b>U.V.</b>	Luz ultravioletas
<b>V</b>	voltios
<b>V/V</b>	Volumen/volumen
<b>Vol</b>	Volumen
<b>HIV</b>	Virus de inmunodeficiencia adquirida
<b>X-gal</b>	5-bromo-4 cloro-3 indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

# INTRODUCCION

## 1. *Toxoplasma gondii*

### 1.1 Historia

*Toxoplasma gondii* fue aislado por primera vez por Nicholle y Manceaux en 1908 del roedor africano *Ctenodactylus gondii* (Nicholle y Manceau, 1908). Por su semejanza con los miembros del género *Leishmania* fue llamado tentativamente por ellos *Leishmania gondii*, pero posteriormente sobre la base de criterios morfológicos se lo sacó de este grupo y se lo denominó *Toxoplasma* debido a su forma arqueada (del griego "Toxon" = arco) (Nicholle y Manceau, 1909).

Recién en 1923 el parásito fue relacionado con patologías en humanos cuando Janku, un oftalmólogo checoslovaco pudo detectar quistes en la retina de un niño de 11 meses con hidrocefalia congénita (Janku, 1923).

En 1937, Sabin describió los primeros signos clínicos que acompañaban a la infección (Sabin y Olitski, 1937) y posteriormente en 1948, Sabin junto con Feldman describieron el primer método de detección de anticuerpos contra el parásito (Sabin y Feldman, 1948), utilizado aún en la actualidad.

En 1971, en trabajos realizados por el grupo de Hutchison (Hutchison y col., 1971, a y b) se logra por primera vez establecer el ciclo de vida completo del parásito.

Durante las últimas dos décadas se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de la biología de *Toxoplasma gondii* y por lo tanto en el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico de la toxoplasmosis.

### 1.2 Clasificación

*Toxoplasma gondii* es un protozoario que se encuentra clasificado dentro del subphylum *Apicomplexa* Levine 1970 (Levine, 1985)

por poseer una estructura característica denominada complejo apical. Este phylum comprende alrededor de 55 géneros distintos con más de 2000 especies.

Todos los miembros de este grupo son parásitos con un rango de huéspedes que abarca desde invertebrados hasta el hombre. Poseen un ciclo de vida con una fase asexual y otra sexual dándose en el género *Toxoplasma* cada uno en distintos huéspedes.

### 1.3 Descripción

El parásito en la etapa aguda de la toxoplasmosis se denomina taquizoito (**figura 1.A**) e invade la mayoría de los tipos celulares. Tiene una forma arqueada de aproximadamente 2 a 4  $\mu\text{m}$  de ancho por 4 a 7  $\mu\text{m}$  de largo. Su desplazamiento es el resultado aparente de sus movimientos de expansión y contracción provocados por fibras presentes en su citoesqueleto (Doran, 1973), ya que carece de toda estructura de locomoción como ser cilias, flagelos o pseudopodios (Manwell y Drobeck, 1953).

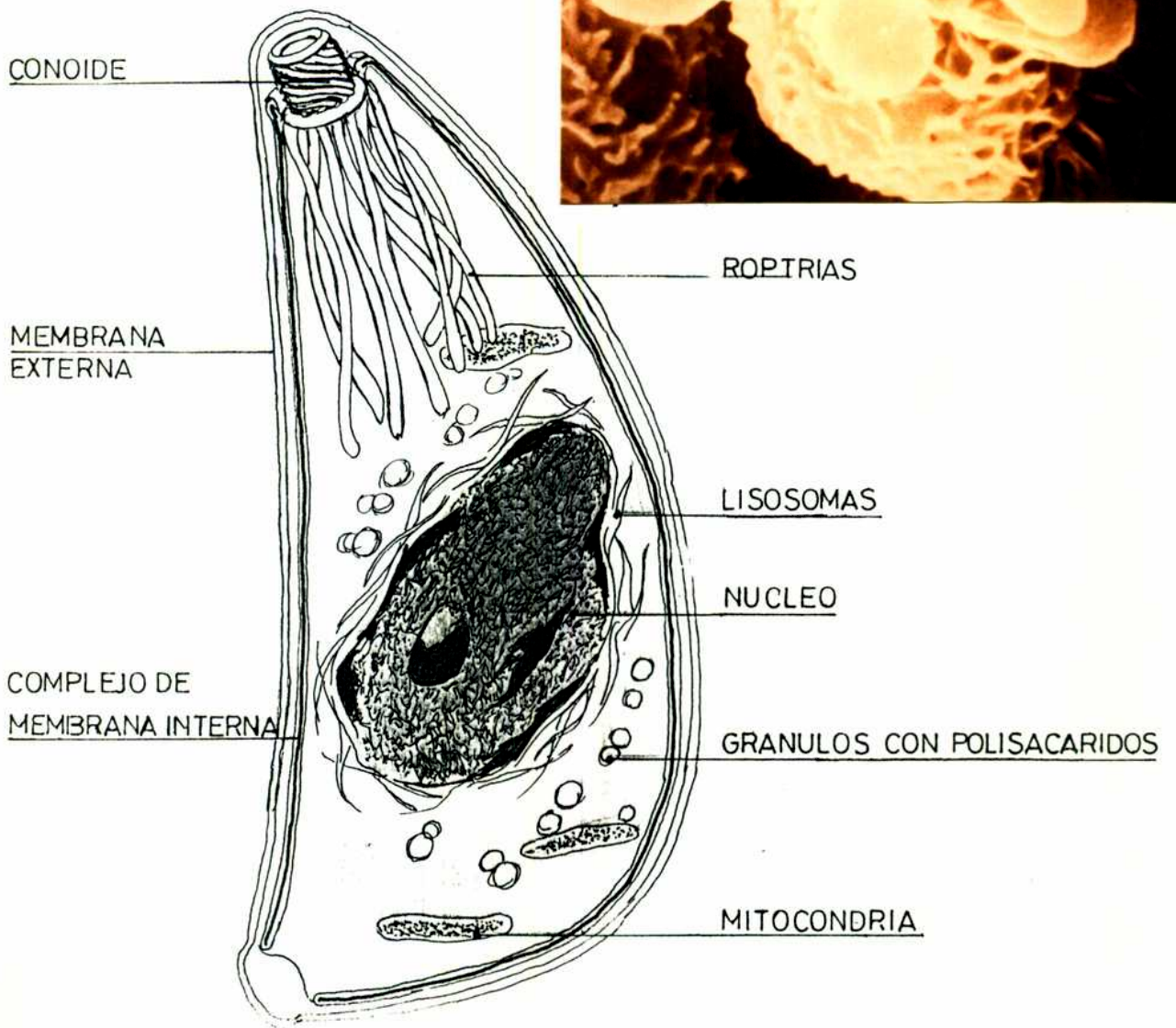
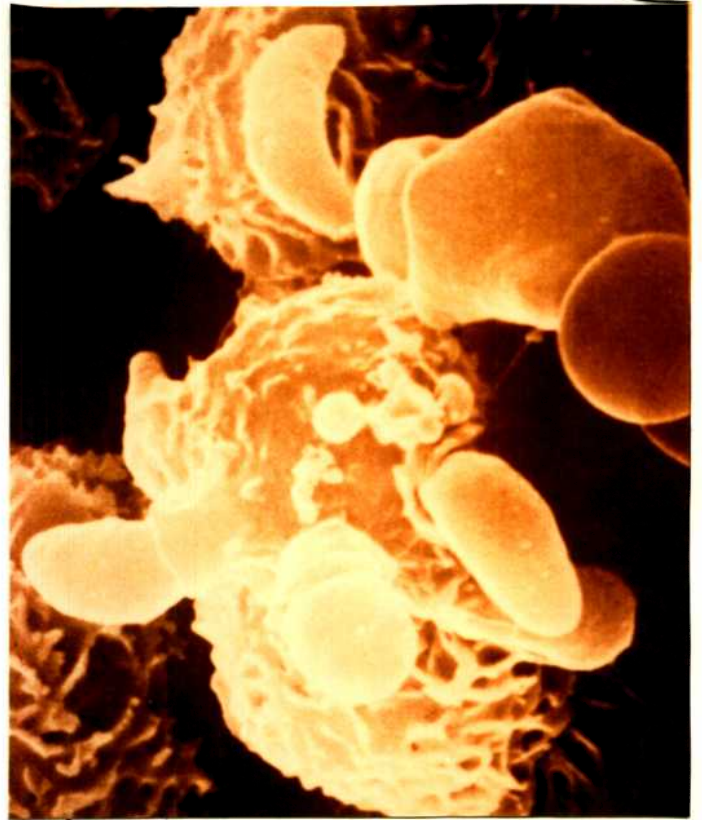
Está provisto de una membrana externa que lo recubre en su totalidad y una membrana interna que solo deja afuera el conoide (**figura 1.B**), organela que se encuentra en lo que podríamos denominar la parte anterior del parásito (Nichols y Chiappino, 1987). Esta estructura tiene movimientos propios, independientes del resto; puede proyectarse y retraerse, y hasta puede realizar movimientos de rotación con respecto al resto del cuerpo (Scholtyseck, 1973; Hammond, 1973). Se ha sugerido que los movimientos del conoide proveen la fuerza mecánica necesaria para permitir la entrada del parásito a la célula huésped (Lycke y col., 1975; Nichols y col., 1983).

Desde el conoide hacia atrás, en el interior del parásito, se encuentran una serie de microtúbulos que se disponen en forma helicoidal y casi sobre la superficie, siendo estos los responsables de la movilidad (Nichols y Chiappino, 1987).

Por detrás del conoide se encuentran unas estructuras denominadas roptrías (**figura 1.B**), estas aparecen siempre en número par (2 a 8) y se encuentran en relación con el aparato de Golgi. Su función más importante es asistir al parásito en la

figura 1:

A



B

penetración a la célula huésped produciendo para esto secreciones líticas (Nichols y col., 1983).

El núcleo celular se encuentra rodeado de una doble membrana con poros y ocupa la parte central del parásito. En el citoplasma se pueden visualizar con la ayuda del microscopio electrónico, el retículo endoplasmático rugoso, ribosomas libres, mitocondrias, cristales y vacuolas con glicógeno (**figura 1.B**).

#### **1.4 Ciclo de vida del parásito**

*Toxoplasma gondii* tiene un ciclo de vida que comprende tres diferentes estadios: el **taquizoito**, también denominado trofozoito o forma proliferativa; el **quiste intracelular**, en cuyo interior se encuentran los individuos denominados bradizoitos; y por último los **ooquistes**, productores de los esporozoitos. Estas 3 formas están comprendidas dentro de dos ciclos separados por distintos biotipos: Un ciclo sexual que se desarrolla únicamente en felinos, y uno asexual cuyos huéspedes son todos los mamíferos y las aves (Frenkel, 1973)(**figura 2**).

##### **1.4.1 Ciclo sexual o entero-epitelial**

Los huéspedes definitivos del parásito son los miembros de la familia *Felidae* debido a que solamente en éstos se realiza el ciclo sexual.

Cuando un gato ingiere las formas infectivas del parásito (ooquistes maduros proveniente del suelo o plantas, o quistes intracelulares provenientes de carnes parasitadas), sus estructuras de protección son destruidas por los jugos digestivos quedando disponibles las formas proliferativas (taquizoitos) que inmediatamente invaden las células del epitelio intestinal donde se multiplican. Al menos 5 generaciones de taquizoitos han sido descritas hasta que se produce la diferenciación sexual. Esta consiste en cambios morfológicos profundos, los cuales dan origen a microgametas (2 a 3  $\mu\text{m}$ ) y macrogametas (12  $\mu\text{m}$ ). Se ha demostrado experimentalmente por clonado de un solo taquizoito (Pfefferkorn



# CICLO DE TRANSMISION DE TOXOPLASMOSIS

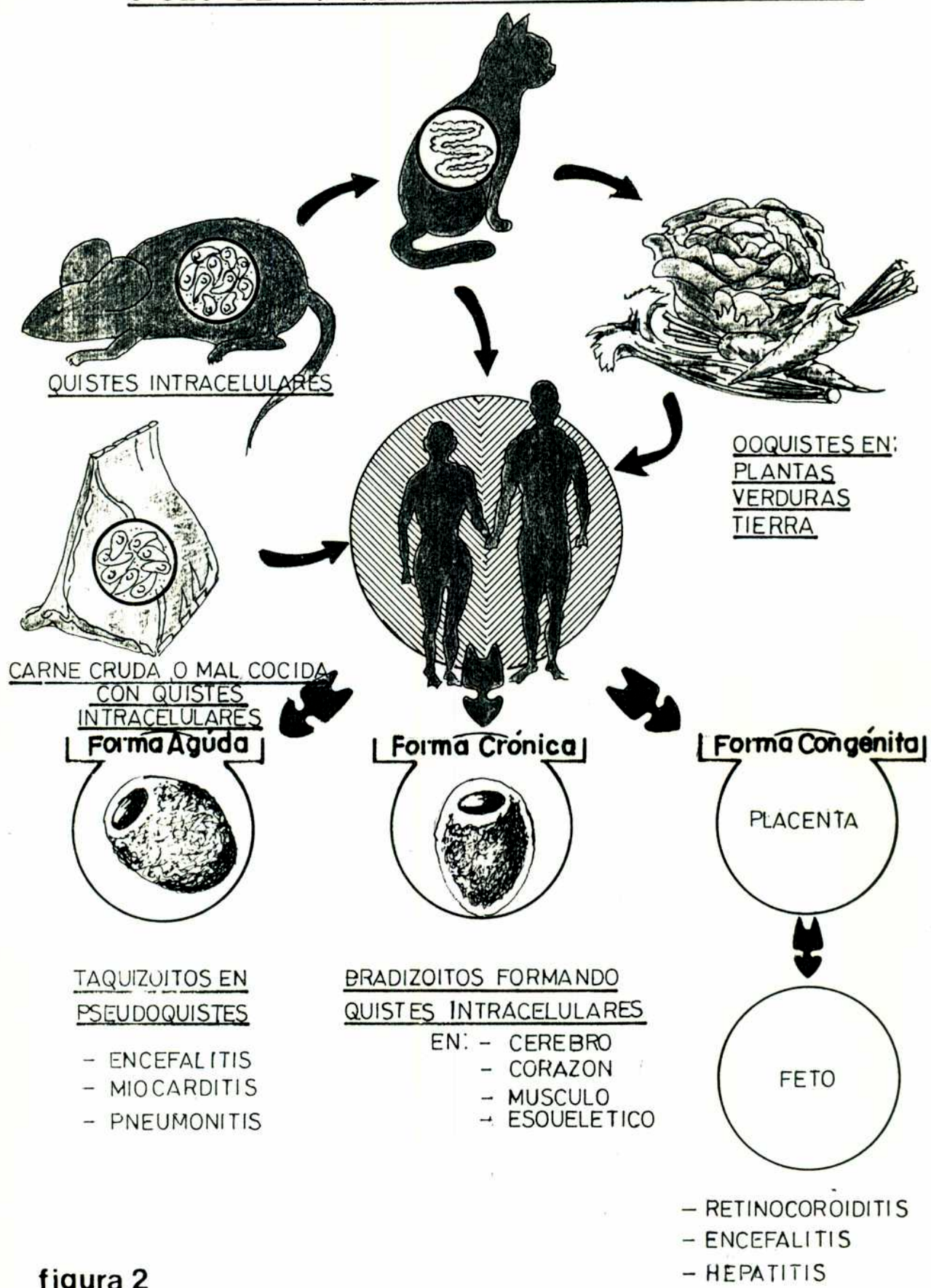


figura 2

y col.,1977) que cada uno de éstos posee toda la información genética necesaria para diferenciarse en macro o microgametas.

La fecundación de las macrogametas por las microgametas se produce en el intestino del gato dando lugar a una cigota de aproximadamente el tamaño de la macrogameta llamada ooquiste. Este es el único estadio diploide del ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*.

Estos ooquistes son liberados por millones (Dubey y col.,1988) diariamente en las heces de los gatos 3 a 10 días después de la ingestión de un ratón infectado, ó 20 a 30 días si la fuente de infección hubiera sido el ooquiste (Frenkel y col., 1970, Dubey y col., 1970).

Estos están recubiertos por una membrana resistente que les permite soportar la desecación, pero en determinadas condiciones de humedad y temperatura, estos ooquistes esporularán (proceso reduccional) dando lugar a 2 esporoquistes que contienen 4 esporozoitos cada uno (Dubey y col., 1970). La ingestión de estos por un nuevo huésped provoca la infección del mismo.

Es importante recalcar que si el organismo que ingirió estos ooquistes es nuevamente un felino, se podrá dar en éste tanto estadios sexuales como asexuales. En el caso de ser un huésped distinto sólo se darán los estadios asexuales.

#### **1.4.2 Ciclo asexual**

La primera forma asexual que aparece en la primoinfección es la de taquizoito o trofozoito. Cada taquizoito se replica en el interior de una célula del huésped por el mecanismo de endodiogenia (Goldman y col., 1957a; Goldman y col., 1958), dando lugar a dos células hijas idénticas. La división prosigue cada 4 a 6 horas pudiéndose encontrar hasta 16 parásitos dentro de una vacuola celular. De esta manera se pueden observar dentro de las células infectadas estructuras del tipo de rosetas que terminan rompiéndolas y produciendo la liberación de nuevos taquizoitos al exterior.

Este estadio del parásito es incapaz de sobrevivir a la desecación, congelamiento y descongelamiento o al pH propio de los jugos



gástricos (Jacob y col., 1960; Lund y col., 1961; Bommer y col., 1969), y por lo tanto debe mantenerse dentro de una célula para poder sobrevivir y reproducirse.

Una segunda forma del parásito es el quiste tisular o quiste intracelular (**figura 3**). Estos se encuentran restringidos dentro de una vacuola celular y están rodeados por una pared densa de deposiciones parasitarias y de la célula huésped. La aparición de estos quistes ha sido demostrada ya al octavo día de la infección (Lainson, 1958), y pueden persistir a lo largo de toda la vida del huésped (Remington y Cavanaugh, 1965).

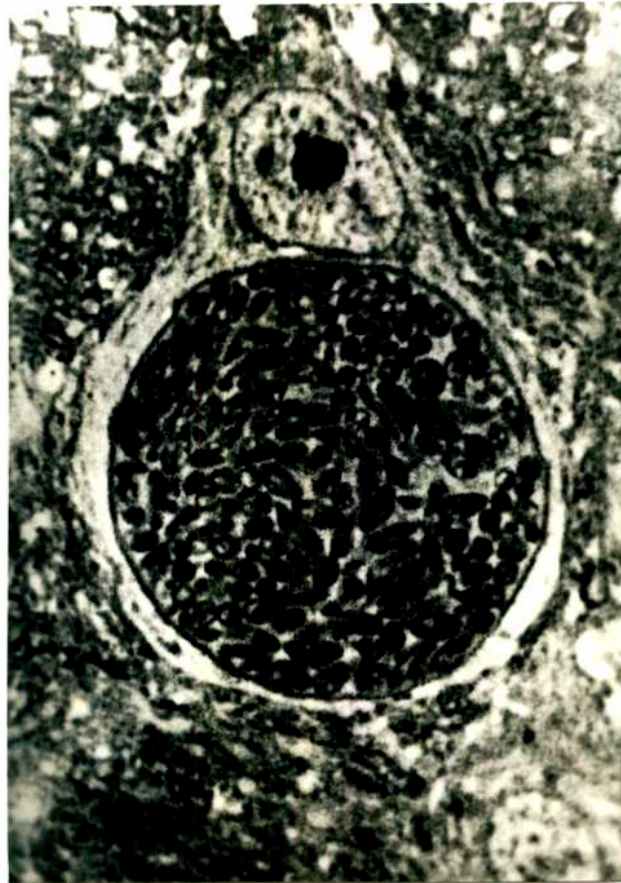
La división del parásito dentro del quiste también se realiza por endodiogenia pero en forma mucho más lenta de lo que lo hacían los taquizoitos, de manera tal que se ha dado en llamar a este estadio del parásito con el nombre de bradizoito.

Estos quistes pueden llegar al tamaño de los 100  $\mu\text{m}$ , conteniendo en su interior un gran número de parásitos (Remington y col., 1961). Esto produce un desplazamiento exagerado del núcleo celular a un polo, ocupando el quiste la mayor parte del volumen celular.

La ingestión de carnes o verduras conteniendo estos quistes intracelulares provoca la activación de los mismos por digestión de su pared, y desencadena una nueva infección por parte de los taquizoitos.

### **1.5 Distribución**

*Toxoplasma gondii* es un parásito distribuido mundialmente, aunque se lo encuentra más comunmente en zonas tropicales que en zonas árticas o áridas. Solo en unas pocas islas del Caribe en las cuales no hay felinos no se han detectado infecciones (Jones, 1979).



**Figura 3:** Quiste intracelular dentro de neurona intacta (1000X). Foto tomada de Sims et al., 1989.

### **1.6 Huéspedes definitivos e intermediarios**

Huéspedes definitivos son considerados aquellos en los cuales se produce el ciclo sexual del parásito; en este caso los miembros de la familia *Felidae*. El gato doméstico parece ser el huésped felino por excelencia, aunque también han sido liberados ooquistes por ocelotes, pumas y leopardos infectados experimentalmente.

Huéspedes intermediarios en los cuales se produce únicamente la multiplicación asexual de los parásitos parecen ser todos los animales de sangre caliente, es decir mamíferos, aves y marsupiales. Los animales poiquilotermos pueden también ser

infectados si su temperatura corporal se encuentra en niveles cercanos a los 37°C (Stone y Manwell, 1969).

## 2 Toxoplasmosis

### 2.1 Vías de infección

Como se dijo anteriormente las formas infectivas por naturaleza son tanto los ooquistes maduros como los quistes intracelulares. Un análisis de la seropositividad de animales domésticos (**tabla I**) permite pensar que una de las fuentes más importantes de contagio es la ingestión de carne mal cocida conteniendo quistes intracelulares y no el contacto con gatos.

Porcentaje de seropositivos		
Animal	rango	media
gato	5-33	19
perro	1-86	37
cerdo	2-51	24
oveja	5-56	29
vaca	0-50	16

**Tabla I:** Prevalencia de seropositividad para toxoplasmosis en animales domésticos ( adaptada de Levine, 1973)

Se considera la carne de cerdo como una de las vías de infección más común en humanos (Weinman y Chandler, 1956) junto con otras como las de cordero o vaca. Por otro lado, las verduras mal lavadas o cocidas que posean ooquistes maduros son otra fuente importante de infección.

Estudios realizados en la India entre grupos con distintos hábitos en la alimentación mostraron que la prevalencia de la toxoplasmosis, es semejante entre poblaciones vegetarianas y comedoras de carne (Rawal, 1959), lo cual no nos permite sacar conclusiones acerca de la fuente de infección más importante.

## 2.2 Infección en animales

La toxoplasmosis es causante de grandes pérdidas económicas debido a la gran mortalidad que produce en animales domésticos. Infecciones congénitas han sido demostradas en ratones, perros, gatos y especialmente en animales de granja (cerdos, ovejas, cabras y ganado bovino)(**Tabla I**). En estos últimos no esta clara la forma de infección, pero es lógico pensar que la fuente sean los ooquistes liberados por los gatos.

La forma congénita es en animales usualmente asintomáticas, pero en el caso de cabras, ovejas y cerdos, se producen infecciones neonatales y perinatales que son de mayor importancia. Entre los signos clínicos encontramos la muerte temprana del embrión, momificación del mismo, muerte y reabsorción, muerte y retención, aborto, nacimiento de crías débiles, etc; dependiendo en muchos casos del período en el cual se produjo la infección (Report of the WHO meeting of investigators, 1969; Remington y Desmond, 1983; Dubey y col., 1986a, Dubey y col., 1986b; Dubey, 1986; Dubey y Urban, 1990).

En el caso de la infección adquirida, el animal puede sufrir una diseminación que tiene como sintomatología clínica fiebre, anorexia, letargo, linfadenopatías, hepatoesplenomegalias, iritis, corioretinitis, cianosis y trastornos neurológicos.

## 2.3 Infección en Humanos

La cantidad de personas con títulos de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* (determinado por reacción de Sabin y Feldman) varía según los lugares y las edades (**tabla II**). En la provincia de Buenos Aires los valores oscilan entre el 50 y 60 % (Comunicación personal con Instituto Malbrán y datos obtenidos en nuestro laboratorio).

En el hombre los casos de toxoplasmosis pueden ser clasificados de acuerdo a si la infección ha sido congénita o adquirida.

Porcentaje de positividad		
Origen del Suero	6 meses-10 años	30-40 años
Austria	7	62
Salvador	40	93
Finlandia	7	35
Inglaterra (Gales)	8	25
Francia (Paris)	33	87
Tahiti	45	77
Trinidad	29	75
Estados Unidos	10-20	27-45
Panamá(Chorrera)	50	70-80
Israel		30
Holanda		58
España		26
Túnez		50

**Tabla II:** Prevalencia de anticuerpos en niños y adultos utilizando dye test. (Adaptada de Mc Culloch y Remington, 1975; Souza y col., 1988).

### 2.3.1 Toxoplasmosis congénita

La toxoplasmosis congénita es probablemente la forma más seria de la infección (Remington y Desmonds, 1976). Esta se produce debido a la primoinfección y posterior parasitemia en la mujer embarazada que en algunos casos determina el pasaje del parásito a través de la placenta (Desmond y Couvreur, 1979) y la infección del feto.

Dependiendo de la localización geográfica, la incidencia de toxoplasmosis congénita oscila entre 0,25 y 5 de cada 1000 nacidos vivos (Remington y Desmond, 1983). En los Estados Unidos, por ejemplo, nacen anualmente 3000 niños infectados con el parásito (Krick y Remington, 1978).

Según las estadísticas, el 34 % de las mujeres que adquieren la enfermedad durante el embarazo transmiten la infección a sus niños (Desmond y Couvreur, 1974). En este sentido, se ha visto que el pasaje del parásito a través de la placenta esta más favorecido en los últimos meses del embarazo que en los primeros aunque los trastornos producidos en el feto son más graves cuando el pasaje se produce en los primeros meses de la gestación (Dupouy-Camet y col., 1990).

Del total de niños infectados durante el embarazo, el 75 % no presentan la sintomatología de la enfermedad hasta el primer año de vida (Desmonts y Couvreur, 1974). Las patologías observadas incluyen grandes daños al sistema nervioso central evidenciados por trastornos neurológicos y oculares (Frenkel, 1974). Los problemas oculares registrados en el 90 % de los casos y en ambos ojos son la coroiditis y el estrabismo (Desmonts, 1973). En lo que respecta a los cuadros neurológicos encontramos la hidrocefalia, calcificaciones intracerebrales, microcefalia y convulsiones (Wilson y col., 1980).

El costo correspondiente al mantenimiento anual de las personas con secuelas de toxoplasmosis congénita en los EEUU se estima en los cientos de millones de dolares (Wilson y Remington, 1980).

### **2.3.2 Toxoplasmosis Adquirida**

En el caso de la infección adquirida la sintomatología varía dependiendo de si se está cursando un período agudo o crónico.

En los casos de una infección aguda, se registran linfadenopatías, pneumonitis, fiebre intermitente y rash, existiendo además evidencias de afecciones del sistema nervioso central. Estas afecciones son meningoencefalitis y daños oculares como retinitis y conjuntivitis. También puede haber esplenomegalia y hepatomegalia.

Las formas crónicas de la enfermedad van desde cefaleas y fiebre acompañada de dolores en las articulaciones y miembros, hasta afecciones a varios órganos como el corazón, bazo, hígado, sistema nervioso central y ojos (Frenkel, 1976).

Por otro lado, se ha visto que la toxoplasmosis está asociada a patologías inmunodeficientes como ser pacientes con linfomas de Hodgkin (Jacobs, 1967), mononucleosis infecciosa (Jacobs, 1967) o pacientes bajo los efectos de drogas inmunosupresoras como ser los individuos infectados (Wright y col., 1986; Brooks y Remington, 1986).

Sin embargo en los últimos años, desde la aparición del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la encefalitis toxoplásmica es la causa más común de encefalitis en los Estados Unidos

(McLeod y Remington, 1980; Gransden y Brown, 1983; Derawin y col., 1986) y una de las más comunes en la Argentina (Comunicación personal con pabellón de SIDA del Hospital Muñiz). Posiblemente la toxoplasmosis sea la infección oportunista que más afecta al sistema nervioso central (Luft y Remington, 1988; Potasman y col., 1988).

El análisis de gran cantidad de datos permite suponer que la encefalitis en enfermos de SIDA se debe principalmente a la reactivación de un foco de infección latente y no a la manifestación de una toxoplasmosis aguda o adquirida (Luft y col., 1984).

Los síntomas de la encefalitis toxoplásmica incluyen hemiplegia, hemiparesis, pérdida sensorial, diplopia, ceguera, cambios de personalidad y severos dolores de cabeza que no responden al tratamiento con analgésicos. Los síntomas generalizados son cansancio, confusión, letargo, desorientación y coma (Luft y Remington, 1988).

## **2.4 Diagnóstico de la Toxoplasmosis**

El diagnóstico clínico de la toxoplasmosis es difícil de establecer dada la diversidad de la sintomatología y la extrema latencia de muchas de sus formas.

A continuación se realiza una breve reseña acerca de los métodos más comunes de diagnóstico de laboratorio, los cuales hasta el momento son todos métodos indirectos. Con respecto a los métodos directos, están todos en pleno desarrollo, siendo muy prometedores.

### **2.4.1 Diagnóstico Indirecto**

Los métodos de rutina para el diagnóstico se fundamentan en la detección de la respuesta inmune humoral contra *Toxoplasma gondii*, utilizando para ello el contacto in vitro del suero a testear con antígenos toxoplásmicos.

Actualmente se han caracterizado utilizando anticuerpos monoclonales, y la técnica de Immunoblot una gran cantidad de antígenos tanto de membrana, como citoplasmáticos.

Entre los métodos de detección de anticuerpos específicos contra el parásito podemos citar:

**Test de Sabin Feldman o Dye test**, (Sabin y Feldman, 1948) es el método más antiguo pero aún utilizado como sistema de referencia por su especificidad y sensibilidad. Para la realización de esta técnica es indispensable disponer de taquizoitos vivos, sobre los cuales se testea el suero incógnita por una reacción de complemento. La respuesta detectada por este método es muy precoz (de 8 a 20 días post infección), ya que permite la detección de IgGs séricas producidas al comienzo de la proliferación de los taquizoitos contra antígenos de su membrana.

**Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**, reacción clásica de gran valor en el diagnóstico de la toxoplasmosis (Goldman, 1957). Para ella, parásitos fijados en un porta-objeto de vidrio, son puestos en contacto con el suero problema diluido. Los anticuerpos específicos serán detectados por un segundo anticuerpo anti-inmunoglobulinas humanas totales, IgG o IgM unidos a isotiocianato de fluoresceína.

**Hemoaglutinación indirecta (HAI)**, técnica basada en la sensibilización de glóbulos rojos con antígenos del parásito. Este conjunto se pone en contacto con el suero incógnita produciendo en los casos positivos la aglutinación de los glóbulos rojos. Por medio de este sistema es posible detectar la presencia de IgG específicas pero también se puede conocer indirectamente la reactividad con IgM por tratamiento del suero con 2-mercaptoetanol.

**Agglutinación directa (AD)**, reacción descrita en 1959 por Fulton y Turk. En ésta, parásitos formolados puestos en contacto con una dilución de suero inmune evidencia la formación de un halo uniforme en un pocillo de plástico. Esta reacción detecta la existencia de anticuerpos dirigidos preferentemente hacia la membrana del parásito de tipo IgM o IgG. La alta sensibilidad de este método en el análisis de IgM, hace que éste sea el elegido en la detección de infecciones recientes.



**Reacciones inmunoenzimáticas (ELISA)** Este método empleado en la detección de otras patologías comenzó a emplearse en el diagnóstico de la toxoplasmosis en 1976 (Voller y col., 1976). En este caso la reactividad del suero incógnita es probada con antígenos parasitarios fijados a un soporte sólido. Así, los anticuerpos reaccionantes son detectados con un segundo anticuerpo contra inmunoglobulinas humanas (anti-IgG o anti IgM). Este, marcado con una enzima, desarrolla color con el agregado de su sustrato, y así la reacción puede ser cuantificada espectrofotométricamente. Esta reacción es muy sensible y puede detectar IgM muy temprano en la infección.

#### **IgM ImmunoSorbent Agglutination Assay (IgM ISAGA)**

Mediante esta técnica desarrollada en los últimos años se realiza el secuestro de IgM del suero problema por intermedio de anticuerpos específicos contra ellas pegados a un soporte sólido. El revelado posterior se realiza con el agregado del antígeno sensibilizado por la técnica de aglutinación (Desmonts y Remington, 1981).

Todas estas técnicas tienen su valor y también sus limitaciones, de manera que es siempre importante usarlas en combinación para que los resultados tengan un valor en el diagnóstico de la toxoplasmosis.

En todos los casos, la presencia de una toxoplasmosis aguda sólo puede ser asegurada por la realización de análisis con intervalos de tres semanas de manera tal de poder realizar una cinética de anticuerpos.

#### **2.4.2 Métodos directos**

El diagnóstico directo tiene como fin la detección del parásito o alguno de sus componentes en muestras biológicas (fluidos o material de biopsia). Técnicas basadas en el diagnóstico directo de la toxoplasmosis han comenzado a desarrollarse debido a la gran cantidad de casos de toxoplasmosis aguda en los cuales la serología

no ha dado respuestas concretas. Para ello podemos dividir las en tres grupos bien definidos:

#### **2.4.2a Detección del parásito**

Un método rápido de diagnóstico utilizado de rutina en casos de encefalitis toxoplásmica es la detección del parásito en extendidos coloreados (Wright-Giemsa) realizados con sedimentos de centrifugación de líquido cefaloraquídeo (Luft y Remington, 1988). Por otro lado en estos casos también se realiza la inoculación de animales de laboratorio o cultivos celulares con muestras biológicas (fluidos o material de biopsias) con el objeto de realizar el aislamiento del parásito (Luft y Remington, 1988).

#### **2.4.2b Detección de Antígenos**

En general estos métodos se basan en la detección por anticuerpos bien caracterizados de antígenos liberados por el taquizoito durante su proliferación (Isei y col., 1985; Asai y col., 1987; Hassl y col., 1987; Hassl y Aspöck, 1990).

#### **2.4.2c Detección de ácidos nucleicos**

En el caso de la detección de ácidos nucleicos, la técnica de hibridización es una de las herramientas nuevas aportadas por la biología molecular. En la última década se han clonado una serie de secuencias de ADN con el objeto de ser utilizadas en el diagnóstico de enfermedades infecciosas (Kingsbury, 1987). En el caso de la detección de parásitos se han clonado sondas de diferentes especies como ser *Plasmodium*, *Trypanosoma* y *Leishmania* (Barker, 1990).

En *Toxoplasma gondii* se han desarrollado sondas para la detección del material genético del parásito (Burg y col., 1989; Grover y col., 1990; Savva y col., 1990; Holliman y col., 1990; Weiss y col., 1991) utilizando para ello la sensible técnica de PCR (Mullis y Faloona, 1987). Esta técnica está siendo testada por estos grupos

obteniéndose resultados diversos, en especial en los casos más críticos como son las toxoplasmosis congénitas y cerebrales.

### **2.5 Tratamiento de la toxoplasmosis**

El tratamiento de la toxoplasmosis se realiza únicamente en aquellos casos en que se ha confirmado una infección aguda. En estos casos, el tratamiento variará dependiendo del grupo de riesgo al cual pertenezcan los individuos, a saber:

#### **Mujer durante el periodo de gestación:**

En el caso de las mujeres embarazadas, se prescribe 3 gr por día de Espiramicina durante 3 semanas. El tratamiento debe continuarse a lo largo del embarazo haciendo una interrupción de dos semanas entre cada cura.

#### **Niños con toxoplasmosis congénita**

El tratamiento se basa en la asociación de 0,5 mg/kg de Pirimetamina cada 2-4 días con 50-100 mg/kg de Sulfadiazina por día. Para contrarrestar el efecto tóxico de la Pirimetamina sobre las células de crecimiento rápido se deben aplicar cada 2 a 4 días inyecciones intramusculares de 5 mg de ácido fólico. El tratamiento dura 20 días. Entre dos curas, se hace un descanso de 30-45 días, en el cual se toma 100 mg/kg/día de Espiramicina. Pasado el año de vida, tiempo en el cual el sistema inmune del niño ya se encuentra desarrollado, el tratamiento es suspendido.

#### **Personas con procesos de inmunosupresión.**

En el caso de los individuos inmunosuprimidos el tratamiento es similar al anterior pero éste se prolonga durante más tiempo hasta que se produce la desaparición de los síntomas clínicos.

### **3 Nuestro Estudio**

#### **3.1 Purificación de taquizoitos de *Toxoplasma gondii***

Debido a que únicamente los procesos de respiración y una síntesis restringida de ácidos nucleicos (Remington y col., 1970; Perrotto y col., 1971) pueden ser realizados por el taquizoito fuera de la célula huésped, es indispensable para su cultivo un medio con células que le sirvan de sustrato para su reproducción.

Este condicionamiento para la obtención de los taquizoitos trae aparejado la contaminación con material celular lo cual entorpece gran cantidad de estudios sobre el parásito como así también el desarrollo de metodologías de diagnóstico.

Por su sencillez y rendimiento, el cultivo de taquizoitos dentro del peritoneo de ratones es utilizado como la fuente más frecuente para la obtención de parásitos. En las mejores condiciones de extracción se obtienen  $1 \times 10^8$  taquizoitos de cada ratón en un mililitro de líquido ascítico. En estas preparaciones, la concentración de células peritoneales (linfocitos, macrófagos, etc) es de aproximadamente  $5 \times 10^6$  por ml, lo cual está introduciendo un grado de contaminación a las preparaciones de taquizoitos del 5 %. Debido a la diferencia de tamaños entre los genomas se determina que prevalezca en estas preparaciones el material genético del ratón al del parásito.

Debido a que este alto grado de impurificación perjudica definitivamente todo tipo de análisis que se desee realizar con el material genético del parásito, fue indispensable desarrollar un método de purificación de los taquizoitos antes de realizar el aislamiento y estudio de su genoma.

#### **3.2 El genoma de *Toxoplasma gondii***

El estudio del genoma del parásito comenzó recién en 1984 con el trabajo de Cornelissen y colaboradores en el cual se analizó el contenido de ADN nuclear de una serie de especies de coccidios

por citofluorometría. Así, se determinó que el genoma haploide de los taquizoitos contenía 0.096 pg de ADN.

En el mismo año, se detectó la presencia de ADN circular con secuencias palindrómicas cruciformes en taquizoitos de *T. gondii* (Borst y col., 1984), y recién en 1988 se realizó el primer clonado de genes del parásito ( $\alpha$  y  $\beta$ - tubulina, Nagel y Boothroyd, 1988). A partir de ello se continuó con otros genes codificantes de antígenos de superficie o citoplasmáticos obtenidos de genotecas de expresión (Lawrence- Burg y col., 1988; Burg y col., 1989; Johnson y col., 1989; Prince y col., 1989; Cesbron-Delauw y col., 1989; Prince y col., 1990).

Sin embargo, hasta el momento no se había detectado en el parásito la presencia de secuencias de ADN repetitivas.

Estas secuencias se encuentran en vertebrados e invertebrados ocupando hasta el 30-40 % de sus genomas.

Las secuencias repetitivas han sido clasificadas en diferentes grupos según sus características propias como ser estructura, distribución y frecuencia de repetición. Así, encontramos como ejemplos secuencias de ADN satélite, minisatélite, genes repetidos en tandem, elementos transponibles, secuencias repetidas de origen retroviral, y pseudogenes y secuencias Alu de mamíferos, etc (Hardman, 1986).

La función que cumplen estas secuencias dentro del genoma es en muchos casos desconocida. A algunas clases como ser el ADN satélite del genoma de mamíferos se le atribuye un rol estructural (Brutlag, 1980) aunque también se le ha asignado un rol funcional en la línea germinal como por ejemplo en la regulación de la recombinación en la meiosis (John y Miklos, 1979). A otras como las secuencias ID de rata se las ha involucrado en la regulación génica (Milner y col., 1984). Por otro lado, los genes repetidos en tandem tienen como representantes en los genomas eucariotas los genes que codifican para ARN ribosomal 5S, histonas y ARNr.

El estudio de estas secuencias en el genoma de parásitos unicelulares ha sido ampliamente desarrollado, en general con fines diagnósticos utilizándolas en la detección de parásitos en muestras biológicas (Barker, 1989; Barker 1990). Así, han sido aisladas diferentes secuencias repetitivas de *Plasmodium* (Aslund y

col., 1985; Barker y col., 1986; Barker y col., 1989; Water y McCutchan, 1989; Holmberg y col., 1990) *Trypanosoma* (Sanchez y col., 1984; Gonzalez y col., 1984; Gibson y col., 1988; Winker y col., 1990); *Leishmania* (Barker, 1989), todas ellas con variados orígenes.

Nuestro laboratorio ha realizado en estos últimos años los primeros avances en el estudio del ADN repetitivo de *Toxoplasma gondii* (Garberi y col., 1990, Blanco y col., 1990; Angel y col. 1991a; Angel y col., 1991b, Blanco y col. 1992), junto con el laboratorio de Ambroise-Thomas del Departamento de Parasitología y Micología Médica y Molecular del CNRS URA 1344 de Grenoble, Francia (Cristina y col., 1991a y b).

En este trabajo se describen los resultados obtenidos en el clonado y posterior caracterización de dichas secuencias repetitivas, su comparación con las secuencias clonadas por el grupo francés, y una posible interpretación de la génesis de dichas secuencias basado en los datos experimentales obtenidos.

# MATERIALES Y METODOS

## 1. Parásitos

### 1.1 La cepa RH de *Toxoplasma gondii*

Esta cepa del parásito fue obtenida en un aislamiento clínico de un niño con encefalitis en EEUU en 1939 (Sabin, 1941). Representa por excelencia la etapa aguda de la enfermedad, y es la cepa utilizada mayoritariamente para estudios sobre el parásito. Además, esta provee el material antigénico para la realización de los test serológicos.

La cepa fue provista a nuestro laboratorio por el Departamento de Parasitología del Instituto Malbrán en 1988. Desde ese momento fue mantenida por pasajes sucesivos en ratones sin que se detectaran cambios significativos en su comportamiento.

### 1.2 Mantenimiento de la Cepa

La cepa RH de *Toxoplasma gondii* fue mantenida por pasajes sucesivos en la cavidad peritoneal de ratones Balb/c de ambos sexos. Los animales utilizados en los pasajes fueron siempre de por lo menos tres meses de vida.

Para esto, cada uno fue inoculado con  $10^6$  parásitos en 200  $\mu$ l de PBS 0,1 M ( fosfato 20 mM, NaCl 150 mM) pH 7,2. A los tres días post-infección los ratones fueron sacrificados y se extrajo el líquido ascítico contenido en su cavidad peritoneal (entre 0,5 y 1,5 ml).

Los parásitos fueron conservados en el mismo líquido ascítico a 4°C hasta 48 hr con el agregado de gentamina (80  $\mu$ g/ml) o en su defecto se realizaron tres lavados sucesivos con buffer PBS 0,1 M pH 7,2 centrifugando a 750xg durante 10 min antes de ser nuevamente inoculados.

La concentración de inoculación se ajustó por conteo en cámara de Neubauer y posteriormente se realizó la infección intraperitoneal.

En el caso de dejar los parásitos a 4°C en líquido ascítico, estos también fueron lavados antes de ser inoculados.

## **2. Purificación de los taquizoitos**

### **2.1 Técnica de Centrifugación**

Durante las últimas décadas, con el auge de los estudios de los componentes celulares, se ha desarrollado ampliamente la técnica de centrifugación.

Esta permite mediante la aplicación de un campo gravitacional, la migración de los componentes de una preparación a lo largo de un fluido en forma diferencial.

El aumento en la sofisticación de esta técnica se debió principalmente al desarrollo de ultracentrífugas y rotores que permiten el aumento de los campos gravitatorios aplicados.

#### **2.1.1 Centrifugación Zonal**

La separación de componentes de una preparación por sedimentación de las mismos formando una banda discreta en una solución es el llamado método de centrifugación zonal. Esta técnica permite la separación de partículas basándose en las diferencias en la velocidad de sedimentación que tienen las mismas debidas a variaciones de forma, tamaño y densidad.

El soporte en el cual se realiza el gradiente de densidad debe ser una solución de un compuesto inerte de una densidad levemente menor al de las partículas a separar. Es así que las partículas de la muestra se encontrarán sedimentando durante toda la experiencia pero a diferentes velocidades.

En todo gradiente de centrifugación zonal, las condiciones son críticas, pues componentes que se separan a un determinado tiempo, pueden mezclarse en el fondo del tubo en un tiempo posterior.



## 2.2 Gradiente de sacarosa

El método elegido para realizar la purificación fue la centrifugación zonal en gradientes de sacarosa, probando distintas velocidades y concentraciones en gradientes tanto continuos como discontinuos.'

### 2.2.1 Análisis de las condiciones

En todos los casos, la sacarosa (Carlo Erba, Milán) en la concentración adecuada (expresada en % P/V) fue disuelta en buffer CBS que contenía:

**CBS:**

Fosfato de Sodio	20 mM	pH 7.2
Cloruro de Sodio	150 mM	
Cloruro de calcio	1 mM	

Las centrifugaciones fueron realizadas en ultracentrífuga Beckman L2-65B, aplicando para ellas condiciones de vacío y temperatura de 4°C. Todos los tubos utilizados fueron Ultra Clear™ de nitrato de celulosa, de 5 ml (nº cat 305050) o 34 ml (nº cat 302236).

En el siguiente cuadro se muestran las diferentes condiciones empleadas según el número de parásitos a procesar:

Tipo	volumen tubo	nº de taquizoitos	vol umen muestra
<b>miniprep.</b>	5 ml	$3 \times 10^8$	300 µl
<b>maxiprep.</b>	34 ml	$> 10^9$	3 ml

Las primeras centrifugaciones "piloto" con el fin de poner a punto las variables del método, utilizaron las condiciones de minipreparaciones. Cuando se determinaron los parámetros de la purificación, estos fueron utilizados en maxipreparaciones.

Para la realización de los distintos gradientes, los parásitos extraídos de la cavidad peritoneal de animales infectados fueron previamente lavados 3 veces en buffer CBS frío y posteriormente su número se ajustó por conteo en cámara de Neubauer. Estos fueron sembrados en el tope del gradiente y sobre ellos se depositó una capa de glicerina líquida a fin de evitar el derrame de los mismos.

Concluida la centrifugación, se realizó en cada caso una visualización macroscópica del tubo de manera tal de determinar las bandas visibles.

Los gradientes fueron desarmados por punción de la parte inferior de cada tubo para el análisis de las fracciones o por punción bajo la banda requerida. Las fracciones obtenidas fueron rápidamente lavadas con CBS y posteriormente estas fueron guardadas a 4°C para su análisis.

### **2.2.2 Condiciones óptimas de purificación**

#### **2.2.2.a Primer gradiente(figura 4)**

De rutina, para la purificación de una preparación de parásitos, se realizó un primer gradiente en las condiciones descritas anteriormente para maxipreparaciones. Para esto se realizó un gradiente de sedimentación discontinuo formado por capas sucesivas de 10 ml de sacarosa de 60 - 50 - 40 % en buffer CBS.

La centrifugación se desarrolló utilizando un rotor denominado SW25.1 con "swinging buckets". Las condiciones de centrifugación óptimas fueron:

<b>Tiempo de centrifugación:</b>	30 minutos
<b>Velocidad de centrifugación:</b>	10.000 x g
<b>Temperatura:</b>	4°C

En todos los casos las centrifugaciones fueron realizadas aplicando vacío en la cámara del rotor.

#### **2.2.2.b Segundo gradiente (figura 4)**

Para la obtención de un grado mayor de purificación de la banda de taquizoitos, se realizó en todos los casos una segunda centrifugación de los parásitos.

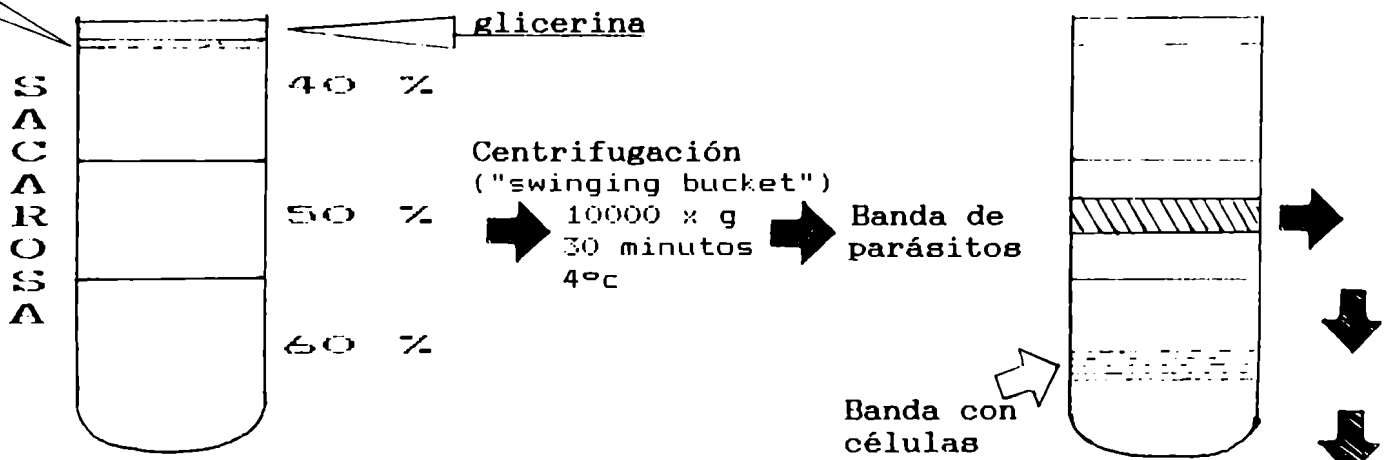
Así, la banda de taquizoitos del primer gradiente fue repartida en tres tubos de minipreparación preformados, poniendo en cada tubo 1,3 ml de cada una de las soluciones (60 - 50 - 40 % de sacarosa).

# Purificación de taquizoitos

## 1er Gradiente

(Vol. 34 ml)

$5 \times 10^9$  taquizoitos (en 3 ml de buffer CBS)



## 2do gradiente

(Vol. 1 ml)

3 lavados con buffer CBS

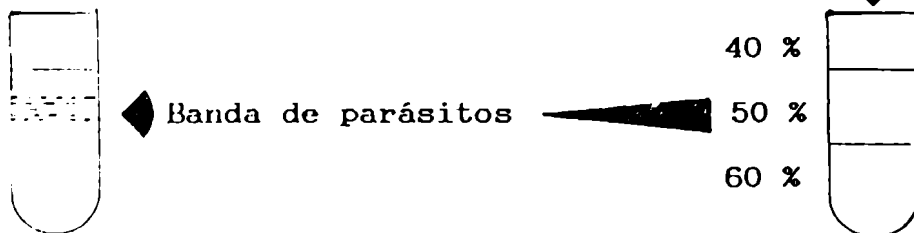


figura 4

Las condiciones utilizadas en esta purificación fueron las mismas utilizadas en el primer gradiente.

### **2.3 Análisis de la purificación**

#### **2.3.1 Análisis microscópico**

Posteriormente al lavado intensivo de cada una de las bandas obtenidas del gradiente, estas fueron observadas al microscopio (Leitz Labolux, 400 X) luego de realizar un teñido de los extendidos con May grundwalt giemsa. De esta manera, se pudo hacer un conteo estimativo del número de parásitos por célula huésped

#### **2.3.2 Análisis de viabilidad**

Para conocer la viabilidad de los parásitos luego de la purificación, se procedió a la inoculación intraperitoneal de un lote de 10 ratones de la cepa Balb/c con  $10^6$  parásitos cada uno. Estos parásitos habían sido previamente lavados con el fin de extraer la sacarosa y posteriormente contados en cámara de Neubauer.

Se utilizó como control un lote de 5 ratones a los cuales se los inoculó con una solución proveniente del lavado de una alícuota de 50  $\mu$ l de solución de sacarosa 50 % P/V (zona donde bandean los parásitos luego del procedimiento).

Los ratones fueron mantenidos bajo observación y antes de su muerte, se les extrajo líquido ascítico para su análisis.

#### **2.3.3 Análisis del rendimiento**

Para determinar el grado de recuperación de los parásitos luego de cada una de las purificaciones, se realizó el conteo de los mismos extraídos de la banda 2 de cada gradiente. Para esto, los parásitos fueron lavados y posteriormente se pasaron a través de una aguja de 30G<sup>1/2</sup> de manera de evitar la formación de cúmulos.

### 3 Extracción de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos, tanto el ácido deoxiribonucleico (ADN) como el ácido ribonucleico (ARN) son moléculas poliméricas de alto peso molecular, cargadas negativamente, altamente solubles en solventes polares. Estas moléculas se encuentran en una gran proporción dentro de las células pero para su manipuleo deben ser purificadas de sus contaminantes por métodos bien definidos.

#### 3.1 Extracción de ADN de parásitos (figura 5)

##### 3.1.1 Lisado de los taquizoitos

Los taquizoitos puros contenidos en pellets (aproximadamente  $10^9$  parásitos en cada uno) fueron lisados con el agregado del siguiente buffer:

Tris-HCl	10 mM pH 8
EDTA	10 mM
SDS	1 % P/V

A la mezcla se le agregó la enzima Pronasa E (Sigma, St. Louis, MO, tipo XXV) en una concentración final de 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y se incubó a 37° C durante 3 hr.

##### 3.1.2 Desproteínización

El material resultante del paso anterior, fue extraído con el agregado de partes iguales de fenol equilibrado.

Para esto el fenol previamente destilado fue extraído varias veces con buffer Tris-HCl 1M pH 7,4 hasta equilibrar su pH. Posteriormente se le agregó m-cresol,  $\beta$ -mercaptoetanol y 8-hidroxiquinolina como antioxidantes (Davis y col 1986).

Luego de la extracción con fenol, la fase acuosa conteniendo el ADN fue extraída sucesivamente con fenol/cloroformo/isoamílico

**Purificación de ADN total de taquizoitos**

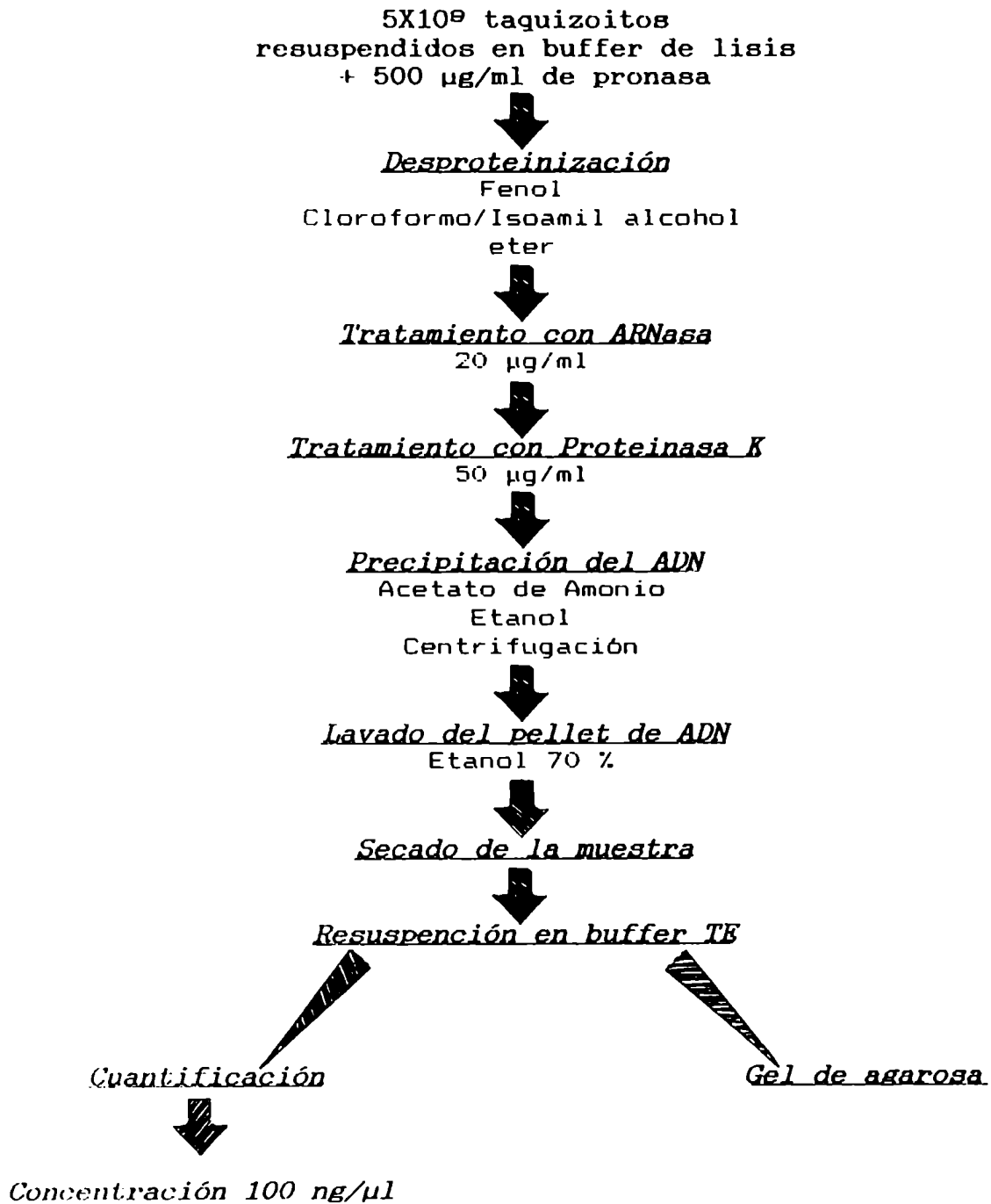


figura 5

25/24/1, cloroformo/isoamílico 24/1 y por último se concluyó con dos extracciones con eter de manera tal de evitar la contaminación con restos de solventes orgánicos.

Todos los solventes utilizados en este paso fueron Carlo Erba, Milán, Italia.

### **3.1.3 Tratamiento con ARNasa**

Con el objeto de eliminar el ARN de la muestra, a cada preparación se le agregó 20 µg/ml de ARNasa A (Sigma, St. Louis, MO) y se incubó durante 1 hr a 37°C. Pasado este tiempo se agregó a la mezcla 50 µg/ml de Proteinasa K (BRL, Gaithersburg, MD) y se la incubó durante 3 hr a 56°C. Esta solución fue extraída nuevamente con fenol, fenol/ cloroformo/ isoamílico 25/24/1, y eter siguiendo las mismas condiciones descritas anteriormente en el punto 3.1.2.

### **3.1.4 Precipitación del ADN**

La precipitación del ADN se realizó con el fin de concentrar la muestra o cambiarla de buffer luego de reacciones enzimáticas. La precipitación de los ácidos nucleicos se llevaron a cabo con agregado de sales más alcoholes. En el caso del ADN, hay una variedad de sales y alcoholes utilizados para la precipitación a saber:

#### **Sales en las concentraciones utilizadas:**

Cloruro de sodio	conc. final: 0.1 M.
Acetato de sodio	conc. final: 0.3 M.
Acetato de amonio	conc. final: 2.5 M

#### **Alcoholes :**

Etanol	conc. final 70 %.
Isopropanol	conc. final 50 %.

En todos los casos la precipitación se realizó con el agregado de la sal hasta llegar a la concentración indicada y posteriormente se agregó el alcohol elegido.

En el caso de la precipitación con acetato de amonio, se realizó una centrifugación a 16.000 x g durante 15 min antes del agregado del alcohol. Esto permitió la precipitación de proteínas, quedando el ADN en el sobrenadante al que posteriormente se precipitó (Crouse y Amorese, 1987).

Cuando la precipitación se realizó tanto con acetato de sodio como con cloruro de sodio, el material luego del agregado del etanol, se incubó a -20°C durante toda la noche, o a -70°C durante 3 hs. Cuando se realizó con acetato de amonio, se dejó solamente 10 min a temperatura ambiente.

En todos los casos, luego de la incubación, las preparaciones se centrifugaron a 12.000 x g durante 40 min o si el precipitado fue muy visible se lo extrajo del tubo con la punta un tip estéril.

### **3.1.5 Lavado del ADN**

Independientemente de la precipitación elegida, el ADN obtenido se lavó con 70 % de etanol para extraer las sales remanentes del procedimiento anterior.

### **3.1.6 Deshidratación de la muestra**

Con el fin de evitar la contaminación del material con trazas de etanol que puede entorpecer posteriores procedimientos, se realizó el secado total del material. Esto posibilitó además, la posterior rehidratación en el buffer apropiado en forma rápida, obteniendo una solución homogénea fácilmente cuantificable. Para esto bastó con dejar el tubo con el material abierto dentro de una estufa de 37° C durante media hora.

El material seco fue resuspendido en un volumen apropiado de buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM). Para su rápida homogeneización se colocó en algunos casos en un baño térmico a 37°C con agitación.



La integridad de la preparación fue verificada por electorforésis en geles de agarosa y la concentración medida fotométricamente.

### 3.2 Purificación de ADN murino

Con el objeto de obtener ADN para utilizar como control en el análisis de la purificación, ratones de la cepa Balb/c de tres meses fueron sacrificados y disecados para la extracción del hígado. Este fue procesado inmediatamente o en su defecto almacenado en freezer de -70°C hasta su posterior uso.

Para la extracción, el hígado fue pulverizado con la ayuda de un mortero y con el agregado de nitrógeno líquido. Una vez evaporado el nitrógeno se agregó a la muestra 10 ml de buffer TSE frío.

#### TSE:

Tris-HCl	10 mM pH 7.4
NaCl	150 mM
EDTA	25 mM
SDS	1 % P/V.

La desproteización y la extracción del ARN de la muestra se realizó siguiendo los pasos utilizados para los parásitos (puntos 3.1.2/3/4/5 y 6).

### 3.3 Cuantificación del ADN

La cuantificación de toda muestra de ADN genómico se realizó fotométricamente midiendo absorvancia de la muestra a 258 nm. Para esto se colocaron 5 µl de cada preparación en 995 µl de agua; se homogeneizó y se leyó. El blanco del espectrofotómetro se realizó con 1 ml de agua.

Para la determinación de la concentración se siguió la siguiente relación:

$$1 \text{ unidad de absorvancia} = 50 \mu\text{g} / \text{ml de ADN}$$

Para determinar el grado de purificación de la muestra, ésta fue medida también a 230 y 280 nm, longitudes de onda en las cuales absorben los contaminantes más comunes de estas preparaciones.

Posteriormente se verificó que las siguientes relaciones superaran los valores límites:

260 / 280. > de 1.5

260 / 230. > de 2.3

En todos los casos en que se obtuvo valores menores que los indicados se procedió a la repurificación del material.

La concentración del ADN de todas las preparaciones fue ajustada a 100 ng/ $\mu$ l.

### 3.4 Purificación de ARN total de taquizoitos

Para la purificación de ARN total se partió de pellets que contenían  $1 \times 10^9$  taquizoitos previamente purificados, conservados en freezer de  $-70^{\circ}\text{C}$ . Estos fueron colocados en tubos de polipropileno con tapa a rosca e inmediatamente resuspendidos en 4 ml de buffer GIT.

#### **GIT:**

Isotiocianato de Guanidina	4 M
Acetato de sodio	150 mM pH 6
$\beta$ -mercaptoetanol	1 % V/V

Cada preparación fue homogeneizada por pasaje por "ultraturrex" durante 15 seg a velocidad media. Posteriormente, tubos de 5 ml se llenaron con 1,7 ml de solución de cloruro de cesio

#### **Buffer con CsCl:**

cloruro de cesio	5.7 M
acetato de sodio	150 mM pH 6

y posteriormente se sembró igual volumen de la muestra.

La mezcla se centrifugó en rotor SW55 durante 21 hr a 35.000 rpm manteniendo la temperatura de centrifugación a  $20^{\circ}\text{C}$ .

Una vez concluida la centrifugación se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 300  $\mu$ l de acetato de sodio 0,3M pH 6. La precipitación del ARN se realizó agregando al volumen

anterior 750  $\mu$ l de etanol e incubando a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 10 min luego de lo cual se centrifugó durante 10 min en microcentrífuga a velocidad máxima. El pellet resultante se lavó con etanol 80 % y luego se secó totalmente mediante vacío.

El ARN se resuspendió en agua libre de ARNsas y se guardó a  $-70^{\circ}\text{C}$  en el caso de usarse en un corto período de tiempo, o se precipitó con 0,3 M de acetato de sodio / etanol y se guardó a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su conservación varios meses.

### **3.5 Cuantificación de ARN total**

Se procedió de la misma manera que con las muestras de ADN salvo que se utilizó la siguiente relación para establecer la concentración de la muestra:

$$1 \text{ unidad de absorvancia} = 40 \mu\text{g} / \text{ml de ARN}$$

## **4 Análisis electroforético**

Se designa con el término electorforésis al movimiento de las moléculas cargadas al ser afectadas por la acción de un campo eléctrico.

Durante una electroforésis, el movimiento o migración de las partículas dependerá de características propias como ser, carga, tamaño y forma. En el caso de la electorforésis en geles, se utiliza el mismo principio, con la diferencia que el gel forma una malla polimérica que restringe de manera diferente la migración de las distintas moléculas.

En el caso del análisis de ácidos nucleicos, la electorforésis en gel ha tenido una gran utilidad. Las moléculas de ADN y ARN están cargadas negativamente, y en un campo eléctrico migran a través del gel a velocidades que dependen de su tamaño. Los pequeños fragmentos migran más rápidamente que los grandes; la distancia de migración de los fragmentos en el gel es inversamente proporcional al logaritmo de sus pesos moleculares (Aaij y Borst,

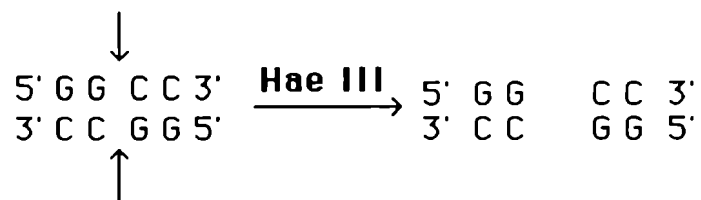
1972). De esta manera esta técnica puede usarse analíticamente para determinar el tamaño de distintos fragmentos de ADN mediante la calibración del gel con marcadores de peso molecular; o en forma preparativa para la purificación y aislamiento de un determinado fragmento.

Para realizar el análisis electroforético del ADN, este debe ser cortado en fragmentos de distintos tamaños. La segmentación del ADN para su análisis es realizada por las enzimas de restricción.

#### 4.1 Enzimas de restricción

Las enzimas de restricción son proteínas bacterianas que tienen la capacidad de cortar la doble cadena de ADN en sitios específicos dados por una determinada secuencia.

Dentro de esta secuencia de corte, la enzima puede clivar dejando extremos totalmente romos en el ADN como es el ejemplo de la enzima Hae III



o dejando extremos denominados cohesivos como en el caso de la enzima Eco RI



La cantidad de veces en que una determinada enzima corta un ADN depende de la frecuencia con que se encuentre el sitio de corte para esta enzima.

Por otro lado, se define 1 U de actividad para una determinada enzima a la cantidad de ésta necesaria para cortar totalmente un ADN conocido (generalmente del fago  $\lambda$ ) en 1 hr a 37<sup>o</sup> C.

#### **4.1.1 Reacción de restricción**

Para la realización del corte de un ADN con una enzima de restricción hay parámetros ya establecidos por el fabricante como ser temperatura y buffer de reacción, mientras que otros deben ser determinados en cada reacción como ser:

##### **-Volumen de la reacción**

Debido a que el stock de una determinada enzima de restricción se encuentra en una solución de mantenimiento que tiene 50 % de glicerol, la reacción de restricción tendrá un porcentaje de glicerol aportado por la enzima. Este porcentaje en la reacción no debe superar el 5 % para que la enzima corte efectivamente.

Por otro lado, la concentración del ADN en una restricción no puede superar el límite de los 100 ng/ $\mu$ l.

##### **-Unidades de enzima a utilizar**

Para determinar la cantidad de enzima a utilizar en cada caso, se deben realizar pruebas piloto para optimizar las restricciones totales. Estas se realizan variando la cantidad de U y el tiempo de reacción.

En general para la digestión total de ADN genómico, se utilizó 4 U de enzima por cada  $\mu$ g de ADN, y se dejó cortando durante toda la noche a la temperatura óptima de la enzima. Posteriormente el corte se chequeó ya sea por electroforesis (4.2) o por Southern Blot (5.2).

#### **4.2 Electorforésis en gel de Agarosa**

Este soporte de electorforésis permite realizar la separación de fragmentos de ADN obtenidos por restricción enzimática o ARN.

### 4.2.1 Preparación del gel

El tamaño de poro en un gel de agarosa, está dado por la concentración de ésta en la solución de preparación del gel. De esta manera, con la variación de la concentración de agarosa se variará el rango de separación de la electroforésis (Maniatis y col. 1982).

Agarosa 0.6% = rango 20 a 1 Kpb

Agarosa 0.7 % = rango 10 a 0.8 Kpb

Agarosa 0.9 % = rango 7 a 0.5 Kpb

En caso de geles de ARN, se usó siempre agarosa 1 %.

Las electorforésis fueron llevadas a cabo en una cuba horizontal (BRL, modelo H5), la cual tiene una distancia entre polos de 36 cm.

Los geles fueron realizados en un tamaño de 14 X 11 cm con un espesor de aproximadamente 0,7 cm. La agarosa utilizada para la realización del gel fue siempre altamente purificada ("Ultra Pure", BRL, Gaithersburg, MD) mientras que los buffers usados fueron los siguientes:

#### **Buffer TBE (para electroforésis de ADN)**

Tris	50 mM
Borato de Sodio	50 mM
EDTA	2 mM

#### **Buffer MOPS-Formaldehido (para electroforésis de ARN)**

MOPS (pH 5-7)	20 mM
acetato de sodio	5 mM
EDTA	1 mM
Formaldehido	0.66 M

### **Buffer de siembra 6 X (para ADN)**

Tris-HCl pH 8	10 mM
EDTA pH 8	1 mM
Glicerol	50 % V/V
A z u l	d e 0.1 % P/V
bromofenol	
Xilen cianol	0.1 % P/V

### **Buffer de siembra 1 X (para ARN)**

Formamida	720 $\mu$ l
Formaldehido (37%)	260 $\mu$ l
MOPS (10 X)	160 $\mu$ l
glicerol (80%)	100 $\mu$ l
Azul Bromofenol (Sn Sat)	80 $\mu$ l
Agua	180 $\mu$ l

## **4.2.2 Condiciones de la electorforésis**

### **4.2.2a Geles de ADN**

En el caso en que se quiso verificar el estado de un determinado ADN aislado o el corte con una enzima de restricción, las muestras fueron corridas en este sistema a 50-100 V durante aproximadamente 1 hr.

Por otro lado, cuando el gel fue utilizado para realizar un Southern Blot, la electorforésis se llevó a cabo durante toda la noche (16 hr) a aproximadamente 20 V.

Todas las electorforésis se realizaron con la siembra y migración paralela de una mezcla de fragmentos de restricción con pesos moleculares conocidos (BRL, Gaithersburg, MD). En nuestro caso, los ADN elegidos fueron

- ADN del Fago  $\lambda$  cortado por la enzima Hind III.
- ADN del fago  $\phi$  X174 RF cortado por la enzima Hae III.

Para la visualización del gel, este fue incubado durante 15 min en una solución de bromuro de etidio 0,5  $\mu$ g/ml, posteriormente

lavado con agua destilada 10 min y observado a través de la iluminación con luz ultravioleta ( $\lambda = 312$  nm).

Se realizó una curva en papel semilogarítmico graficando los pesos moleculares de los patrones en función de la distancia de migración de manera de obtener los pesos moleculares de los fragmentos de interés.

#### **4.2.2b Geles de ARN**

Las muestras conteniendo en cada caso aproximadamente entre 10 y 15  $\mu\text{g}$  de ARN total fueron resuspendidas en 20  $\mu\text{l}$  de buffer de siembra para ARN y calentadas a 95<sup>o</sup> C durante 2 min. Los geles fueron corridos durante dos o tres hr a 200 V (hasta que el colorante llegó a 3/4 del gel). Posteriormente el gel fue teñido con bromuro de etidio en iguales condiciones que para ADN. En este caso fueron utilizados como marcadores de peso molecular las especies de ARNr 28 y 18 S (aproximadamente 5 y 2 Kb respectivamente).

#### **4.2.3 Fotografía de los geles**

Todos los geles fueron fotografiados utilizando una película AGFA PAN APX 25, utilizando un lente protector naranja y lentillas de acercamiento.

### **5 Técnicas de hibridización**

El principio de hibridización se basa en la propiedad de reasociación que tienen dos hebras de ácidos nucleicos de secuencias complementarias. Marcando una de estas hebras es posible evidenciar su cadena complementaria dentro de un ADN más complejo. La detección de la cadena complementaria a la sonda puede ser testeada de manera cuantitativa, utilizando la técnica de "Dot Blot", o de manera cualitativa usando la técnica de "Southern Blot"



## **5.1 Análisis por Dot Blot**

La técnica de Dot Blot permite la siembra directa sobre NC de una serie de muestras de manera ordenada, para posteriormente cuantificar el contenido en éstas de una determinada secuencia por comparación entre distintas diluciones de concentración conocida. Para la realización de esta técnica se utilizó el aparato HYBRI.DOT™ de BRL de 96 pozos. Para la succión de las muestras se utilizó una bomba de vacío eléctrica del tipo standard.

### **5.1.1 Preparación del filtro**

Todos los filtros utilizados fueron de nitrocelulosa (NC, 0,45  $\mu\text{m}$ ; msi, Westborough, MA) los cuales fueron previamente sumergidos en solución 2 X SSC (1 X SSC es 0,15 M NaCl, 0,15 M Citrato de sodio) durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente estos se dejaron secar a temperatura ambiente.

### **5.1.2 Dot Blot con muestras crudas**

En el caso en que se realizó el análisis de las distintas fracciones del gradiente, cada una de estas fue lavada y resuspendida en 50  $\mu\text{l}$  de PBS. El material fue directamente sembrado sobre la NC montada en el aparato, y posteriormente cada pozo sembrado fue lavado con 50  $\mu\text{l}$  adicionales de PBS.

Una vez que se desensambló el aparato, el filtro se dejó secar y luego fue apoyado sobre filtros Whatman 3MM humedecidos con las siguientes soluciones los tiempos indicados:

- Solución de lisis (SDS 10 %) durante 5 min.
- Solución de desnaturalización (NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M) durante 15 min.
- Solución de neutralización (Tris-HCl 0,5 M pH 7,5; NaCl 1,5M) durante 15 min.

Posteriormente cada filtro fue horneado durante 2 hr a 80° C para fijar el ADN irreversiblemente.

### **5.1.3 Dot blot de ADN purificado**

En todos los casos en que se realizó el análisis del ADN (genómico o plasmídico), los Dot Blot se realizaron siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente con las siguientes modificaciones:

- Para la unificación de las concentraciones en estos ensayos se realizó la cuantificación de la muestras madres de ADN como se detalla en el punto 3.3 antes descrito.
- Se realizaron diluciones seriadas al medio de cada una de las muestras en agua (volumen de cada dilución 50 µl). Todas las diluciones fueron incubadas durante 5 min a 100°C para desnaturalizar la muestra, y rápidamente fueron puestas en hielo.
- Se sembraron las muestras en un dispositivo similar al descrito anteriormente en el punto 5.1.2 y posteriormente fueron lavados todos los pozos con 100 µl de buffer TE.

Luego del desensamblaje del sistema, el filtro fue secado y horneado a 80°C durante 2 hr.

### **5.1.4 Dot Blot de ARN**

Para el sembrado de muestras de ARN total se utilizó exactamente el mismo mecanismo que para el ADN con la diferencia que la muestra no fue calentada previamente. Una vez lavados los pozos, el filtro se dejó secar y se horneó durante 2 hr a 80°C.

## **5.2 Análisis por Southern Blot.**

La técnica de Southern Blot (Southern, 1975) es utilizada para transferir ADN desde su posición en un gel de agarosa corrido previamente, a un filtro de nitrocelulosa (NC) (**figura 6**).

Este ADN una vez corrido debe desnaturalizarse para quedar atrapado en la membrana de NC. Por esta razón, el gel debe ser tratado previamente a la transferencia.

### **5.2.1 Tratamiento del gel (figura 6, A)**

Para permitir la transferencia homogénea de los fragmentos de distinto peso molecular, estos son despurinizados previamente sumergiendo al gel en una solución de HCl 0,25 M durante 15 min (Wahl y col., 1979).

La desnaturalización del ADN se realizó incubando el gel con agitación moderada en NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M. dos veces de 30 min cada vez. Se verificó el resultado observando el gel bajo luz ultravioleta.

Posteriormente el gel se lavó con agua destilada y luego se incubó con agitación suave en un buffer que contiene acetato de amonio 1 M, NaOH 20 mM (buffer de transferencia) dos veces durante 30 min cada uno, para lograr la neutralización del gel.

### **5.2.2 Transferencia(figura 6.B)**

En la transferencia, el gel es colocado en forma invertida (con los lugares de siembra hacia abajo) sobre una banda de papel Whatman 3 MM de su mismo ancho sobre una plataforma. Esta plataforma de 3 cm de altura se coloca en el interior de una bandeja con buffer de transferencia, de manera que sus extremos queden sumergidos dentro del buffer.

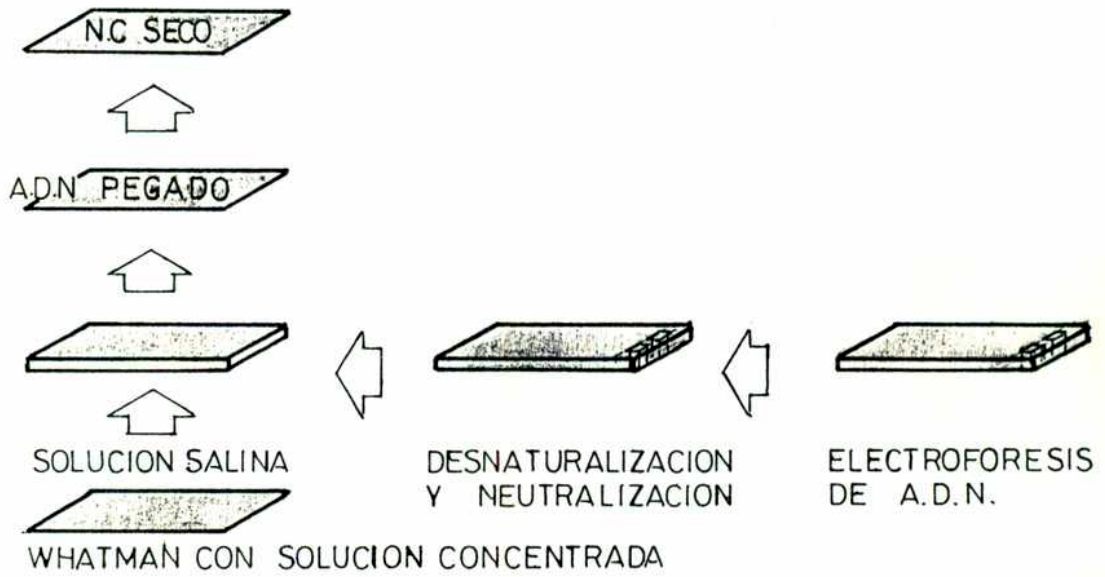
Sobre el gel se coloca la NC, evitando más de un contacto, y una vez alineado correctamente se pasa sobre el filtro una pipeta de manera de extraer las burbujas que puedan quedar entre ambos.

Posteriormente se colocan sucesivamente sobre la NC 3 hojas de papel Whatman 3MM del mismo tamaño del gel humedecidos con la solución de transferencia; una pila de 10 cm de altura de papel absorbente seco y por último un vidrio sobre el cual se coloca un peso de aproximadamente 250gr.

De esta manera se crea un flujo de buffer entre la bandeja (conectada por el papel Whatman 3 MM) y los papeles secos que lo

## TRANSFERENCIA DE SOUTHERN

(A)



(B)

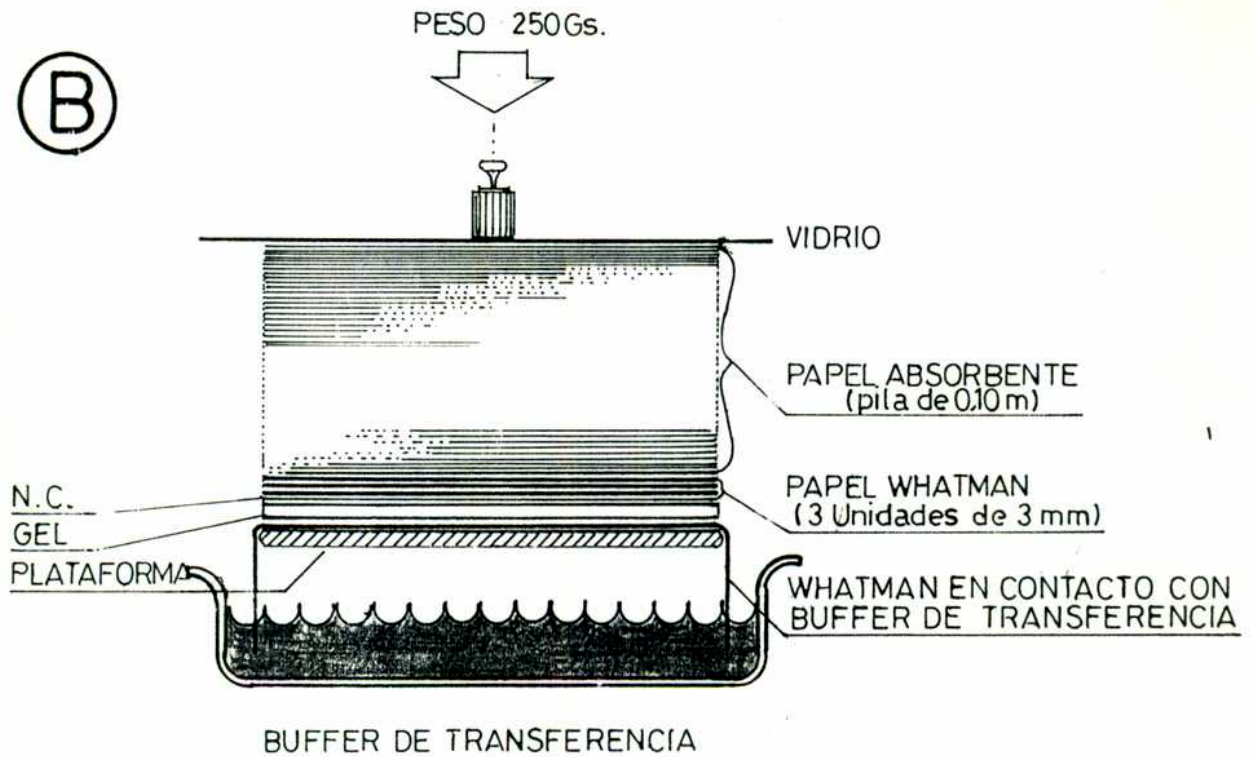


figura 6

absorben, pasando por el gel y arrastrando el ADN sobre la NC. La transferencia se deja transcurrir durante toda la noche.

Al otro día el sistema se desmonta; la NC se pone sobre un papel Whatman 3 MM a secar y posteriormente se coloca entre dos papeles Whatman a 80°C durante 2 hr.

### **5.3 Marcación de ADN**

Con el fin de ser utilizado como sonda en las reacciones de hibridización, el ADN puede ser marcado con deoxinucleótidos ya sean radio o químicamente marcados utilizando en todos los casos reacciones enzimáticas.

#### **5.3.1 Marcación del ADN genómico**

En el caso que se realizaron marcaciones de ADN de alto peso molecular (ADN genómico) la reacción de marcación elegida fue la de "Nick Translation" (Maniatis y col, 1982).

##### **5.3.1a Método de Nick Translation**

La reacción de "Nick Translation" se basa en la utilización de cantidades controladas de una endodeoxiribonucleasa, la ADNasa I, sobre el ADN a marcar, con el objeto de realizar pequeñas degradaciones en sus cadenas. Estas mellas en el ADN dejan oxidrilos 3' libres, los cuales le permitirán a la Pol I comenzar a polimerizar, reemplazando los nucleótidos fríos de la cadena por los mismos marcados.

##### **5.3.1b Reacción**

La reacción enzimática fue llevada a cabo en un volumen final de 50 µl (Kit de "Nick-Translation", BRL), a 15°C, durante 1 hr. Las concentraciones finales de los componentes en la reacción fueron:

ADN a marcar	1 $\mu$ g.
Tris-HCl pH 7.5	50 mM.
MgCl <sub>2</sub>	5 mM.
$\beta$ -mercaptoetanol	0.1 mM.
B.SA	10 $\mu$ g.
dNTP fríos	20 $\mu$ M de c/u.
dCTP a <sup>32</sup> P	50 $\mu$ ci.
ADNasa I	200 pg.
ADN Pol. I	2 U.

La reacción fue detenida con el agregado de 50  $\mu$ l de EDTA 0,5 M. El dCTP a <sup>32</sup>P utilizado para las marcaciones fue provistos por Dupont NEN, Boston, MA en la forma de una solución acuosa con una actividad específica de 3000 ci/mmol.

### **5.3.2 Marcación de fragmentos de ADN**

La reacción de Random Primer fue usada en todo momento en que se deseó marcar fragmentos electroeluidos de geles de agarosa o plásmidos linealizados con el corte con una enzima de restricción.

#### **5.3.2a Método de Random Primer**

Este método se basa en la marcación de un determinado fragmento utilizando la enzima Klenow para la incorporación de los deoxinucleótidos marcados (Feinberg y Vogelstein, 1984). Para ello iniciadores de la reacción (oligodeoxinucleótidos, hexámeros de composición azarosa) son hibridizados en solución con los fragmentos desnaturalizados de ADN a marcar. A partir de ellos, la enzima polimerizará incorporando los nucleótidos marcados del medio.

#### **5.3.2 b Reacción**

La reacción enzimática fue llevada a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ l (Kit de "Random Primer", BRL), a temperatura ambiente, durante 3 hr.

Las concentraciones finales de los componentes en la reacción fueron:

ADN a marcar	25 ng.
Hepes pH 6.8	200 mM
Tris-HCl	50 mM.
MgCl <sub>2</sub>	50 mM.
β-mercaptoetanol	10 mM.
B.S.A	20 μg.
Iniciadores	9 μg
dNTP fríos	40 μM de c/u.
dCTP a <sup>32</sup> P	50 μci.
Klenow	3 U.

La reacción fue detenida con el agregado de 50 μl de EDTA 0,2 M pH 7,5.

El dCTP a <sup>32</sup>P utilizado para las marcaciones fue provistos por Dupont NEN, Boston, MA en la forma de una solución acuosa con una actividad específica de 3000 ci/mmol.

#### 5.4 Purificación de las sondas marcadas

Para separar el ADN marcado de los nucleótidos libres, se realizó una cromatografía a través de una columna de 7 cm (0,5 cm de diámetro) de Sephadex G-50 fino (Pharmacia Chemicals, Uppsala, Suecia). Esta fue equilibrada previamente con 35 μl de una solución 10 mg/ml de esperma de salmón (sal de Na, tipo III, Sigma) y posteriormente la columna fue lavada con 7 ml de TE.

El producto de las marcaciones (100 μl) se sembró en la columna, y fracciones de 50 μl se obtuvieron por elución con TE. Todas las fracciones fueron puestas a contar en un contador de centelleo líquido aprovechando la capacidad del <sup>32</sup>P de ser medido por "efecto Cherenkov".

Las fracciones de elución pertenecientes al primer pico de radioactividad (sonda marcada) fueron pooleadas, y posteriormente una alícuota correspondiente al 5 % de este pool fue utilizada para

obtener las cuentas totales y la actividad específica de la marcación mediante el siguiente protocolo:

- 1) La alícuota fue llevada a 1 ml con agua. Se sembró 10  $\mu$ l de esta dilución en un disco (2,5 cm de diámetro) de papel de fibra de vidrio (Whatman GF/C).
- 2) Se lavó el filtro 3 veces con 50 ml de una solución fría conteniendo 10 % (P/V) de TCA con 1 % (P/V) de PPI.
- 3) Se lavó una vez con 50 ml de etanol 95 %, y luego se puso a secar bajo lámpara de calor. Una vez seco se contó la radioactividad del filtro en contador de centelleo líquido esta vez con solución centelladora.

De esta manera se obtuvo que

$$\text{N}^{\circ} \text{ de cuentas/min obtenidas} \times 2000 = \text{N}^{\circ} \text{ de cuentas totales}$$

Debido a que la cantidad de ADN usado en las marcaciones por el método de "Nick Translation" fue de 1  $\mu$ g, la actividad específica por  $\mu$ g fue igual al n<sup>o</sup> de cuentas totales.

En el caso de la reacción de "Random Primer", la actividad específica por  $\mu$ g fue

$$\begin{array}{l} \text{Actividad específica} \\ \text{de la sonda} \end{array} = \begin{array}{l} \text{Número de cuentas} \\ \text{totales} \end{array} \times 40$$

### 5.5 Hibridización

En la reacción de hibridización, donde una determinada secuencia es utilizada como sonda para detectar su secuencia complementaria, hay una serie de parámetros que definen la estringencia. Esta permite determinar el porcentaje de homología



mínimo de los fragmentos detectados por la sonda y es posible controlarla mediante las variables que definen la hibridización y los lavados posteriores.

En nuestro caso, se buscó un porcentaje de homología  $>$  al 90 %, y por lo tanto se utilizaron condiciones de alta estringencia en los lavados (0,1 X SSC, 60°C ).

### 5.5.1 Soluciones utilizadas

#### Solución Denhardt 100 X

Polivinilpirrolidona	2 %
BSA	2 %
Ficoll 400	2 %

#### Solución de Hibridización:

Sulfato de Dextrán	8 % P/V
Formamida (desionizada)	50 % V/V
Buffer SSC	4 X
Tris HCl pH 7.4	20 mM
Solución Denhardt	1 X
ADN de esperma de salmón	100 µg/ml

#### Solución de lavado I

Buffer SSC 5 X  
SDS 1 %

#### Solución de lavado II

Buffer SSC 0.1 X  
SDS 1 %

### 5.5.2 Reacción

Las reacciones de prehibridización e hibridización se llevaron a cabo en el mismo buffer dentro de un baño termostático con agitación orbital a 42°C.

Las NCs fueron incubadas dentro de recipientes plásticos con aproximadamente 1 ml de solución de hibridización cada 10 cm<sup>2</sup> de filtro a hibridizar.

La prehibridización se realizó durante 2 hr, luego de la cual se agregó en la misma solución la sonda marcada en una concentración de 10<sup>6</sup> cpm/ml. En todos los casos, la sonda fue previamente hervida durante 5 minutos de manera de disociar las

cadenas complementarias. La incubación con la sonda se realizó siempre ON.

Al otro día se retiró la solución de hibridización y se comenzó a realizar los lavados. En todos los casos se realizaron

- dos lavados de 15 min c/u con Solución de lavado I a temperatura ambiente

- dos lavados de 15 min c/u con Solución de lavado II a 60°C.

### **5.5.3 Exposición radiográfica**

Para obtener la imagen de la hibridización, placas radiográficas AGFA Curix RP1 fueron expuestas a estas membranas de NC las cuales eran previamente montadas sobre un papel de filtro y recubiertas por una película de celofán.

En todos los casos, la exposición se realizó entre placas intensificadoras a -70°C. El tiempo de exposición fue determinado en cada caso por la cantidad de radiación emitida por el filtro.

### **5.5.4 Cuantificación de la hibridización**

En el caso en que se necesitó conocer la cantidad de cuentas hibridizadas por diferentes muestras en el ensayo de "Dot Blot", el filtro fue cortado en trozos idénticos dentro de los cuales se encontraba el sitio de hibridización. Cada uno de los fragmentos de NC fueron puestos a contar dentro de un tubo con líquido de centelleo. En todos los casos los valores de una misma muestra fueron obtenidos de duplicados.

## **6. Clonado de Secuencias repetitivas de *Toxoplasma gondii***

Para profundizar en el estudio de una determinada porción del genoma de cualquier organismo, es indispensable separar esta

porción del resto. Mediante la técnica de clonado, se puede aislar un fragmento discreto de ADN de una población de genes, purificarlo a homogeneidad y amplificarlo, teniendo de esta manera suficiente material como para realizar todos los estudios químicos, genéticos o biológicos.

El proceso de clonado tiene como base reacciones enzimáticas bien caracterizadas llevadas a cabo por enzimas de restricción y de modificación, las cuales permiten cortar, copiar, degradar o unir moléculas discretas de ADN.

Así, estas moléculas son introducidas dentro de una célula bacteriana unidas a un ADN autoreplicante (plásmido o fago bacteriano), los cuales luego de varios ciclos de replicación producen gran cantidad de copias de la molécula híbrida.

## 6.1 Vector de clonado

Se conocen como vectores de clonado aquellos fragmentos de ADN bicatenarios autoreplicables (plásmidos o fagos) que poseen además secuencias de corte para un grupo de enzimas de restricción. Estos lugares de restricción se encuentran bien definidos dentro del mapa del vector y permiten introducir un fragmento exógeno de ADN para su clonado.

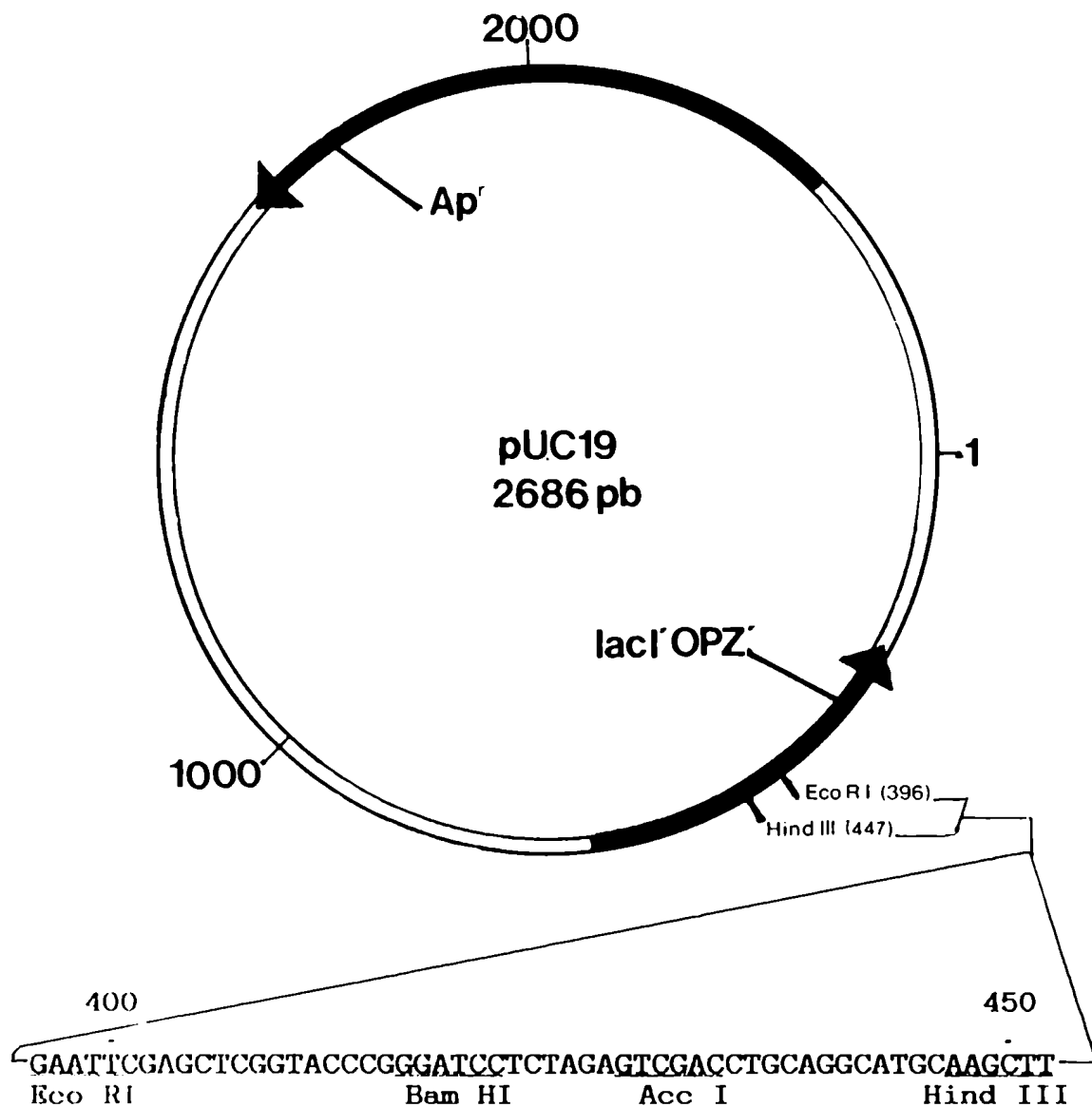
### 6.1.1 El plásmido pUC18/19

pUC18/19 (**figura 7**) son plásmidos de *E. coli* de 2686 pb, contruidos utilizando el fragmento PvuII/Eco RI del pBR322 (2197 pb). Este, contiene el gen que codifica para la  $\beta$ -Lactamasa (resistencia a ampicilina, Ap<sup>r</sup>) y su origen de replicación. Por otro lado el plásmido contiene el gen *lac Z* codificante para el  $\alpha$ -péptido de la  $\beta$ -galactosidasa en cuyo interior se encuentra el segmento para múltiples enzimas de restricción (Multiple Cloning site, polylinker) del fago M13 de la serie mp (**figura 7**).

Así, la inclusión dentro del polylinker de un fragmento de restricción provoca la interrupción del  $\alpha$ -péptido, produciendo colonias bacterianas incoloras en un medio conteniendo ampicilina

junto con IPTG y X-gal. Las colonias no recombinantes producirán bacterias de color azul debido a que el  $\alpha$ -péptido en estos casos es funcional.

pUC18 y pUC19 difieren entre sí en la orientación del polylinker con respecto al plásmido, estando en pUC18 el sitio Eco RI del polylinker próxima al origen del gen de la  $\beta$ -galactosidasa. En el caso de pUC19 es el sitio Hind III el que se encuentra cercano a ese origen.



**Figura 7:** Plásmido pUC19

### 6.1.2 Preparación del vector de clonado

Para realizar el clonado de los fragmentos repetitivos, se realizó la preparación del vector. Para ello 10 µg de pUC19 fueron cortados con la enzima Acc I, única compatible para la ligación con los extremos cohesivos de Hpa II en el polylinker de pUC19.



El corte fue posteriormente chequeado por electorforésis en gel de agarosa, y el resto precipitado con acetato de amonio/etanol. La preparación fue resuspendida en 20 µl de agua destilada estéril. Con el fin de evitar la religación del plásmido, se realizó el tratamiento con BAP, mediante el siguiente protocolo:

pUC linealizado	(0.5 20 ml
µg/ml)	
BAP (200 U/µl)	3 µl
Tris-HCl pH 8	10 mM

La reacción se llevó a cabo en 30 µl dejándola progresar durante 1 hr a 65°C. Pasado este tiempo, se procedió a detener la reacción haciendo extracciones con fenol, cloroformo y eter. El resultante de la misma fue precipitado, resuspendido en 10 µl de TE y cuantificado fotométricamente.

### 6.2 Aislamiento de los fragmentos a clonar

Una vez que se identificó y determinó el tamaño de los fragmentos que se deseaban clonar por análisis de Southern Blot realizados junto con marcadores de peso molecular, se procedió a su aislamiento.

Para esto se realizó un corte preparativo del ADN de taquizoitos previamente purificado con la enzima Hpa II. Aproximadamente 100 µg de ADN fueron digeridos con suficiente cantidad de enzima como para obtener el corte total del mismo. Para verificar este punto, se realizó el chequeo de la muestra por Southern Blot.

El gel preparativo fue realizado utilizando agarosa de bajo punto de fusión (Low Melting Point Agarose, Sigma). Para esto, se realizó en el gel un camino para el grueso de la muestra con un peine de 40 X 1 mm. Un camino convencional fue utilizado para sembrar los marcadores de peso molecular.

El total de la muestra fue sembrada y corrida a temperatura ambiente durante 6 hr a 25 V. Una vez concluida la corrida, el fragmento de gel conteniendo el marcador de peso molecular fue teñido con bromuro de etidio.

La porción del gel de agarosa correspondiente al rango de peso molecular entre 1,3 y 0,3 Kpb fue cortado sumergido en 2 ml de buffer TE el cual había sido precalentado en un baño termostático a 65°C. Se dejó que el fragmento de agarosa se fundiera y luego se realizaron dos extracciones fenólicas procurando que la temperatura se mantuviera en 65°C.

Posteriormente la muestra fue precipitada con etanol y el pellet resuspendido en 50 µl.

### **6.3 Ligación fragmentos/vector**

La T4 ADN ligasa es la enzima que cataliza la unión covalente entre los extremos de dos moléculas de ADN. Para la realización de la reacción es imprescindible conocer las condiciones óptimas, para obtener el mayor número de recombinantes.

En nuestro caso se realizaron dos diferentes ligaciones variando la relación molar de extremos inserto/vector (1/1 y 2/1). La reacción

de ligación se realizó en todos los casos en 20  $\mu$ l, mediante el siguiente protocolo

vector/inserto (total 200 ng)	2 $\mu$ l
Tris-HCl pH 7.6	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
PEG 8000	5 %
ATP	1 mM
DTT	1 mM
T4 ADN ligasa (1 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

La reacción se dejó progresar ON. a 16°C.

## 6.4 Células Competentes

Con el objeto de realizar la introducción de los plásmidos ligados dentro de las células de *E. coli* (transformación) es necesario someterlas a un tratamiento que las hace permeables a la entrada del ADN.

### 6.4.1 Elección de las células a transformar

Las células elegidas para realizar la transformación de los plásmidos recombinantes fueron *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$ F'.

Estas células en estado de competencia son óptimas para la realización de genotecas y especialmente para el clonado con plásmidos del tipo pUC o fagos como M13 de la serie mp. El genotipo de las células es el siguiente:

**DH5 $\alpha$ F' = F'  $\phi$ 80dlac M15 (lac ZYA-arg F) U169 recA1 endA  
hsd R17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) sup E44  $\lambda$  thi -1 gyr A rel A1.**

### 6.4.2 Tratamiento para competencia

#### 6.4.2a Medios y soluciones

Los medios y soluciones utilizados para crecer y realizar las células competentes fueron los siguiente:

**Medio LB: (medio de crecimiento)**

Triptona	1 % P/V
Extracto de levadura	0.5 % P/V
NaCl	1 % P/V
pH	7.5

En el caso en que se realizó medio sólido para la confección de placas de petri se adosó a esta mezcla 1,5 % de agar. Los medios de cultivo bacterianos, en todo los casos fueron autoclavados a 1,5 atm durante 15 min.

**Solución Tfb I:**

Acetato de Potasio	30 mM
Cloruro de potasio	100 mM
Cloruro de Calcio	10 mM
Cloruro de magnesio	50 mM
Glicerol	15 %

**Solución Tfb II:**

Buffer Pipes o Mops	10 mM
Cloruro de Calcio	75 mM
Cloruro de potasio	10 mM
Glicerol	15 %
pH	6.5

**6.4.2b Protocolo de competencia**

Un inóculo obtenido de una colonia de *E. coli* DH5 $\alpha$ F' fue crecido en 2 ml de medio LB, a 37°C con agitación durante toda la noche.

Al otro día, se inoculó un cultivo de 50 ml de LB dejándolo crecer durante 3 hr para luego centrifugarlos durante 5 min a 4000 rpm. El pellet de bacterias fue mantenido en hielo y resuspendido suavemente en buffer TfbI frío. Esta mezcla se dejó reposar a 0°C durante 5 min para luego ser nuevamente centrifugada en las mismas condiciones anteriores.



El pellet bacteriano en este caso se resuspendió en 2 ml de buffer TfbII frío y las células se incubaron durante 15 min a 0°C. La solución de células resultantes fue fraccionada en tubos eppendorf de a 250 µl. Estas fueron congeladas rápidamente en N<sub>2</sub> líquido y posteriormente almacenadas a -70°C hasta su uso.

## **6.5 Transformación**

El mecanismo de transformación en bacterias permite introducir un vector plasmídico en su interior, en donde se replicará junto con la bacteria.

### **6.5.1 Protocolo de transformación**

Las células competentes fueron descongeladas y posteriormente se colocaron en hielo durante 10 min, tiempo que se empleo para fraccionarlas de a 50 µl en tubos eppendorf previamente enfriados. A cada tubo se le agregó un volumen no mayor de 10 µl con aproximadamente 500 pg del ADN a transformar (plásmido ligado). En este punto se realizaron los controles de transformación los cuales fueron:

Control I pUC19,

Control II pUC19 cortado y ligado

Control III pUC 19 cortado, defosforilado y ligado

Control IV sin plásmido

Todos los tubos fueron llevados a 0°C durante 30 min, luego de los cuales se procedió a la realización de un shock térmico a 42°C durante 90 seg. Posteriormente, las células fueron colocadas en hielo durante 5 min.

A cada tubo se le agregó 1 ml de LB, y se incubaron con agitación durante 45 min a 37°C. Del contenido de cada tubo de transformación se plaqueo 100 µl en una placa de petri de 92 mm conteniendo 100 µg/ml de ampicilina (Sigma). Luego del secado de las placas, estas fueron incubadas ON. a 37°C.

Las placas conteniendo las células recombinantes fueron colocadas a 4°C hasta realizar el rastreo.

## 6.6 Rastreo de la genoteca-Hibridización de colonias

Con el objeto de identificar las colonias que contienen plásmidos recombinantes con fragmentos repetitivos de *T. gondii*, se realizó el rastreo de la genoteca utilizando la técnica de hibridización. Para esto fue utilizada una sonda preparada con ADN del parásito marcado radioactivamente por "Nick Translation" como se describió anteriormente en el punto 5.3.

### 6.6.1 Protocolo

Filtros de NC circulares de 90 mm de diámetro fueron colocados sobre las cajas de petri conteniendo las colonias bacterianas, de manera que todo el filtro entró en contacto con la superficie del agar. Este se dejó durante 1 minuto y luego se retiró, colocando un segundo filtro como duplicado. Una vez retirado este último, las placas de petri fueron reincubadas durante 4 hr a 37°C para restablecer las colonias.

Los filtros fueron secuencialmente apoyados durante 5 minutos sobre 3 filtros Whatman 3 MM humedecidos cada uno con

- I NaOH 0.5 M
- II NaCl 1.5 M, Tris-HCl 0.5 M pH 7.4
- III SSC 2X.

Los filtros se dejaron secar a temperatura ambiente sobre un papel Whatman seco y posteriormente fueron horneados durante 2 hr a 80°C. Para la hibridización de estos filtros se procedió siguiendo el protocolo antes descrito (5.5).

Las señales positivas detectadas en la autoradiografía fueron alineadas con las colonias respectivas en la caja de petri. Aquellas colonias que dieron señales claras en ambos filtros (original y duplicado) fueron repicadas y guardadas para su posterior análisis.

### 6.6.2 Conservación de los clones bacterianos

Los clones positivos fueron crecidos en medio LB con ampicilina (50 µg/ml) durante toda la noche a 37°C. Así, 500 µl de estos cultivos fueron colocados en tubos eppendorf a los cuales se le agregó 500 µl de LB conteniendo 30 % de glicerol. Las mezclas fueron rápidamente congeladas en N<sub>2</sub> líquido y almacenadas a -70°C

### 6.7 Minipreparación de Plásmidos

Este método, modificación del método de extracción alcalina (Birnboim y Doly, 1979) es de gran utilidad para la preparación de pequeñas cantidades de plásmido (aproximadamente 10 µg).

Las preparaciones así obtenidas, permiten el chequeo de un gran número de colonias transformantes en poco tiempo de trabajo, y además con un grado de purificación que permite el corte con enzimas de restricción.

#### 6.7.1 Soluciones para la minipreparación:

##### Buffer de lisis

Tris-HCl pH 8	25 mM
EDTA	10 mM
Glucosa	50 mM

##### Solución Alcalina:

NaOH	0.2 M
SDS	1 %

#### 6.7.2 Protocolo de minipreparación

Para la extracción de plásmidos, cultivos de 2 ml de medio LB conteniendo 100 µg/ml de ampicilina fueron crecidos ON a 37°C una vez inoculados con los diferentes clones bacterianos.

Al día siguiente, 1.5 ml de estos cultivos fueron centrifugados a 12.000 rpm durante 3 min de manera de obtener los pellets

bacterianos. Estos fueron resuspendidos con 100  $\mu$ l de buffer de lisis e incubados durante 30 min en hielo.

Pasado este tiempo, se le agregó a cada mezcla 200  $\mu$ l de solución alcalina la cual se homogeneizó con el resto de los componentes por inversión del tubo. Se dejó durante 5 min en hielo y luego se neutralizó con el agregado de 150  $\mu$ l de acetato de amonio 7.5 M pH 7.5. Se realizó una incubación de cada muestra durante 15 min en hielo, para luego centrifugar a máxima velocidad en microcentrífuga durante 15 min. El sobrenadante, conteniendo el plásmido fue precipitado por el agregado de etanol.

Por último, los pellet fueron lavados con etanol 70 % y luego de ser resuspendidos, fueron chequeados por electroforésis en agarosa.

## **6.8 Maxipreparación de los plásmidos**

Mediante este método es posible obtener grandes cantidades de plásmido altamente purificado para la realización de posteriores manipuleos.

### **6.8.1 Protocolo de Maxipreparación(figura 8)**

A partir de una colonia bacteriana se inoculó un cultivo de 10 ml de LB con ampicilina (100  $\mu$ g/ml), y se incubó ON a 37°C con agitación.

Al otro día, se traspasó los 10 ml a un erlenmeyer conteniendo 500 ml de LB/ampicilina y este nuevo cultivo se incubó hasta que su densidad óptica a 600 nm alcanzó las 0.8 unidades. En este momento se agregaron 5 ml de una solución 17 mg/ml de cloranfenicol (Sigma, disuelto en etanol) y se continuó la incubación durante toda la noche.

El cultivo fue al otro día centrifugado y el pellet bacteriano resuspendido suavemente en 10 ml de buffer de lisis (ver 6.7.1) con 20 mg/ml de lisosima (Sigma). La mezcla se incubó durante 30 min en hielo y luego se pasó a un tubo de centrífuga con tapa (Sorvall de 50 ml) en el que se agregaron 20 ml de solución alcalina (ver 6.7.1). Al cabo de 5 min en hielo la mezcla

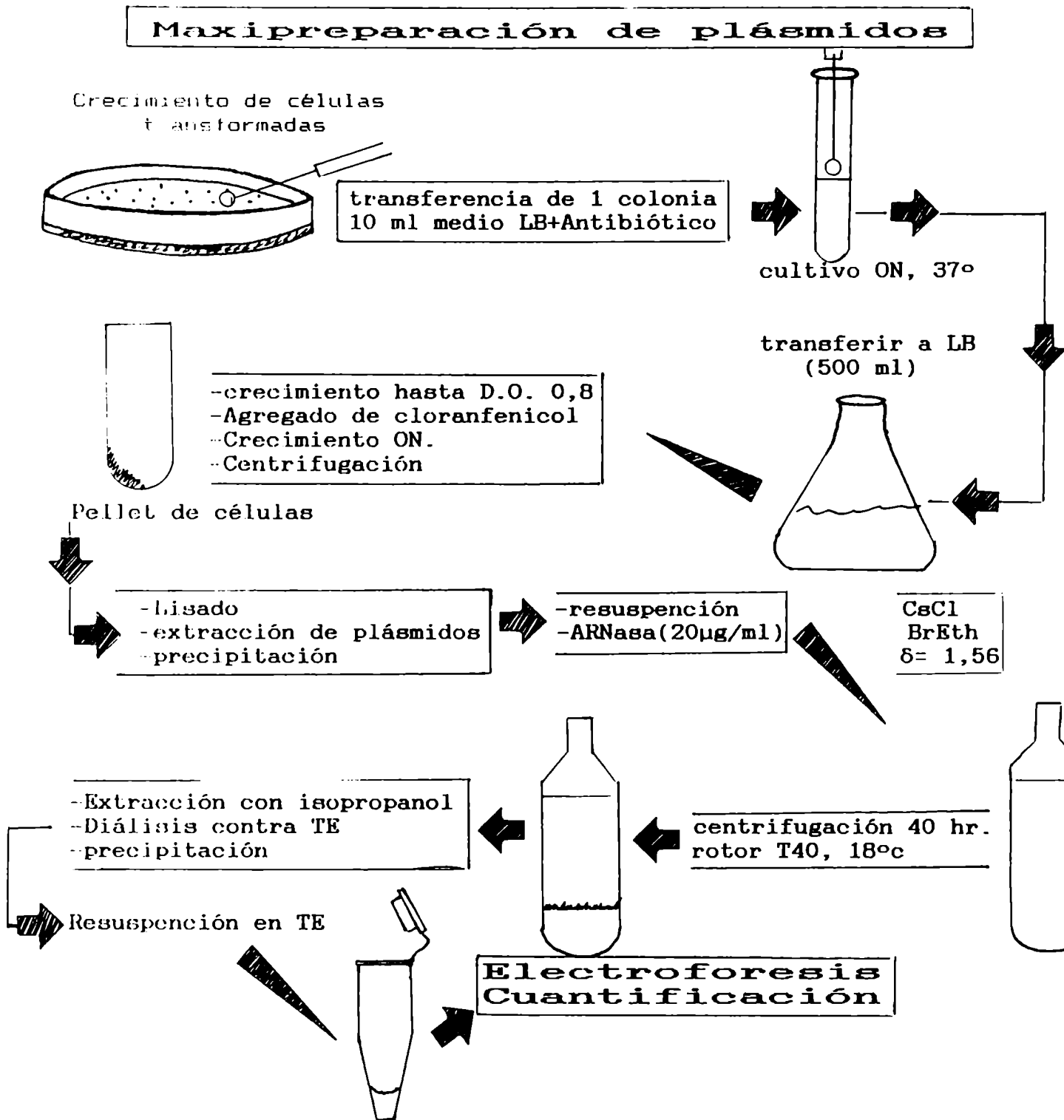


figura 8

se neutralizó con el agregado de 15 ml de acetato de sodio 3 M pH 4.7.

El resultante en cada tubo fue centrifugado durante 30 minutos a 11500 rpm en centrifuga Sorvall con rotor HB-4, para luego extraer los sobrenadantes. A éstos se les agregó la mitad de su volumen de acetato de amonio 7.5 M pH 7.5 y se los dejó en hielo durante 10 min. Pasado este tiempo se realizó una nueva centrifugación en la cual fue rescatado nuevamente el sobrenadante.

Todos los sobrenadantes pertenecientes a una misma preparación se juntaron y se procedió a la precipitación del plásmido por el agregado de 2.5 volúmenes de etanol. Los pellets fueron lavados con etanol 70 % y posteriormente resuspendidos en 7 ml de TE con el agregado de 35 µl de una solución 10 mg/ml de ARNasa A (Sigma). Se incubó a temperatura ambiente durante 15 min.

### 6.8.2 Gradiente isopícnico de plásmidos

Para realizar el gradiente se agregó a cada tubo de 7 ml con las preparaciones de plásmido

CsCl	8.95 gr.
Bromuro de etidio (10 mg/ml)	180 µl

verificando que la mezcla tuviera una densidad entre 1.56 y 1.57 gr/ml.

Cada una de las preparaciones fue centrifugada a 35000 rpm en rotor T40 durante 40 hr a 20°C de manera de evitar la precipitación del bromuro de etidio.

Posteriormente la banda de plásmido covalentemente cerrado (la banda de mayor densidad visualizada en el gradiente por transiluminación con lámpara UV) fue extraída por punción del tubo. A cada preparación de plásmido (aproximadamente 1 ml de solución de CsCl) se le agregó 3 ml de TE, y posteriormente se realizaron sucesivas extracciones con n-butanol hasta obtener la fase orgánica incolora.

### 6.8.3 Diálisis de la preparación de plásmidos

Para la realización de la diálisis de ADN plasmídico con el objeto de extraer el CsCl, se realizó previamente el tratamiento de los tubos de diálisis según el siguiente protocolo:

-Se hivió durante 1 minuto una tira (20 cm) de tubo de diálisis en una solución de

Carbonato ácido de 2 %	
Sodio	
EDTA pH 8	1 mM

Se permitió que la solución se enfríe y se enjuagó con agua destilada estéril haciéndole tres cambios.

Posteriormente el tubo se lavó 2 veces con etanol y luego con EDTA 1 mM pH 8.

La solución conteniendo los plásmidos se colocó dentro del tubo y se dializó exhaustivamente contra TE (tres cambios de 1 l cada uno). Posteriormente el volumen fue extraído del tubo y la cantidad de plásmido fue determinada por medición fotométrica a 260 nm.

### 6.8.4 Electroelución de los fragmentos clonados

Este método permite la purificación de los fragmentos clonados luego de ser escindidos del vector por restricción. Así, estos fragmentos fueron usados para su marcación o para el subclonado en el fago M13 para secuenciar.

Mediante el método de electroelución, los fragmentos separados electroforéticamente son extraídos de la matriz del gel y retenidos en una bolsa de diálisis, previamente tratada (ver 6.8.4).

#### **Protocolo de electroelución:**

Los plásmidos (20 µg) fueron clivados por enzimas de restricción del polylinker de pUC19, de manera tal de liberar los fragmentos. Posteriormente el resultado de la digestión fue precipitado, y resuspendido para la realización de la electorforésis.



Para esto, las preparaciones fueron sembradas en un gel de agarosa 1 %. En cada caso, fueron sembrados dos diferentes caminos: en uno se sembró el grueso de la muestra mientras que en el otro solamente el 10% de ésta. De esta manera puede ser localizado y extraído el fragmento deseado sin exponerlo a la luz UV.

El fragmento de gel correspondiente a la banda del inserto fue colocado en el interior de tubo de diálisis junto con 450 µl de buffer TBE 0.5 X. El tubo se cerró y sumergió dentro de la cuba de electorforésis de manera que éste quedo ubicado en forma perpendicular a la dirección de la corriente eléctrica.

Se aplicaron 200 voltios durante una hora y posteriormente se realizaron tres pulsos de 30 seg cada uno, invirtiendo la corriente. El contenido del tubo fue extraído y centrifugado durante 5 minu para precipitar cualquier resto de agarosa existente. El sobrenadante fue extraído y precipitado con acetato de amonio/etanol. El resultante de la extracción fue chequeado por electorforésis.

## **7 Secuenciación**

### **7.1 Introducción**

El método por el cual se puede determinar el orden y la composición de las bases en un determinado fragmento de ácido nucleico se lo denomina secuenciación.

Hasta el momento han sido descritas dos grandes técnicas de secuenciación para fragmentos de ADN (Maxam y Gilbert, 1977; Sanger y col, 1977).

En nuestro caso el método elegido ha sido el de Sanger, basado en la síntesis enzimática de una cadena complementaria de ADN a partir de una cadena molde. La síntesis de esta cadena es interrumpida por la incorporación de análogos de base denominados dideoxinucleótidos (ddXTP). Con la realización de cuatro reacciones de síntesis en paralelo conteniendo cada una de ellas uno de los cuatro dideoxinucleótidos (ddATP, ddCTP, ddGTP,

ddTTP) se generan 4 poblaciones de fragmentos. Los fragmentos pertenecientes a cada una de las reacciones, terminarán con un dideoxinucleótido específico.

Cuando cada una de estas preparaciones es fraccionada por tamaño en un gel de acrilamida de alta resolución, la secuencia del fragmento molde puede ser determinada conociendo el último nucleótido incorporado en cada una de las cadenas y leyendo el gel desde las cadenas mas pequeñas (en la parte baja del gel) hacia las más grandes (en el tope del gel).

Para la síntesis de estas cadenas, es fundamental disponer de la cadena de ADN molde (generalmente ADN simple cadena), la enzima para realizar la síntesis y además deoxinucleótidos y dideoxinucleótidos trifosfatos.

## **7.2 Biología del Fago M13**

El fago M13 es un colifago filamentosos que contiene en su interior una molécula circular de ADN simple cadena.

Durante la infección, esta cadena (+) es introducida en el interior de la bacteria y la cadena complementaria (cadena -) es sintetizada dando origen a la forma replicativa del fago (FR). Esta FR (ADN circular de cadena doble) es amplificada unas 200 veces y posteriormente se produce un switch por el cual se comienzan a sintetizar solamente cadenas (+) que se encapsidarán y darán origen a nuevos fagos. Estos, posteriormente saldrán de la bacteria sin producir su lisis, pero si alterando su tasa de crecimiento.

De esta manera, es utilizada la forma RF para producir el clonado del fragmento a secuenciar, el cual es introducido en la bacteria por simple transformación, aislando luego el fago del sobrenadante que posee en su interior las simples cadenas útiles para la realización de la reacción de secuenciación.

## **7.3 M13mp 18/19**

El desarrollo por Messing y colaboradores en 1977 del vector M13mp de clonado y secuenciación, facilitó la obtención de un molde simple cadena para la realización de la reacción.

Para esto fue agregado a su genoma el gen de la  $\beta$ -galactosidasa que contiene un polylinker o sitio para múltiples enzimas de restricción (el mismo añadido a pUC) cuya orientación diferencia al M13mp 18 del 19. Esta construcción permite utilizando las células correctas (por ejemplo *E. coli* DH5 $\alpha$ F') la elección de los recombinantes simplemente por una reacción colorimétrica en presencia de IPTG y X-gal.

#### **7.4 Clonado en M13mp 18/19**

Todos los fragmentos a secuenciar, fueron subclonados a partir de los fragmentos clonados en pUC19 en ambos fagos, M13mp 18 y mp 19, para lograr secuenciar totalmente los fragmentos mayores de 400 pb .

##### **7.4.1 Preparación de los vectores**

Se cortó 1  $\mu$ g de cada uno de los vectores con las enzimas apropiadas para la realización del subclonado. En los casos en que fue necesaria una doble restricción del vector, se realizó la precipitación del material entre ambas reacciones. El corte fue chequeado por electorforésis en gel de agarosa y el resto de cada una de las reacciones fue precipitado con acetato de amonio/etanol. Cada preparación fue resuspendida en 20  $\mu$ l de agua destilada estéril.

Con el fin de evitar la religación de los vectores se realizó en el tratamiento de los ADNs del fago cortado con BAP, siguiendo el protocolo antes descrito para el caso de pUC (6.1.2).

##### **7.4.2 Preparación de los fragmentos a subclonar**

Fragmentos obtenidos por corte de los plásmidos purificados en gradiente isopícnico (6.8.2), fueron purificados

electroforéticamente, aislados del gel (6.8.4) y posteriormente cuantificados.

### 7.4.3 Ligación

Para cada reacción de ligación, 10 ng de ADN del fago se mezcló con 100 ng de cada uno de los fragmentos (relación 2:1 inserto:vector), 1 U de T4 ADN ligasa y el buffer apropiado para la reacción (6.3) en un volumen total de 10  $\mu$ l. La reacción se dejó progresar a 16°C durante toda la noche y al otro día se utilizó para la realización de la transformación.

### 7.4.4 Transformación

Para realizar la transformación, fueron utilizadas células *E. coli* DH5 $\alpha$ F'(6.4.1), las cuales fueron hechas competentes según el protocolo antes descrito (6.4.2).

Los pasos seguidos en el protocolo de transformación fueron los mismos utilizados para el caso de pUC (6.5); sin embargo en este caso luego de realizar el shock térmico de las células, estas fueron incorporadas a la siguiente mezcla equilibrada a 42°C.

LB agar 0.7 % (LB-soft)	3 ml
X-gal (2 % en formamida)	50 $\mu$ l
IPTG (100 mM)	10 $\mu$ l
DH5 $\alpha$ F'(cultivo exponencial)	200 $\mu$ l

Esta fue homogeneizada y luego se esparció sobre una placa de petri con medio LB sin antibiótico. Se dejó solidificar el LB-soft y luego fueron incubadas a 37°C ON.

Las placas blancas en cada uno de los subclonados fueron repicadas y utilizadas para infectar un nuevo cultivo de células exponenciales de *E. coli* DH5 $\alpha$ F'(3 ml de LB). Los cultivos fueron crecidos durante toda la noche y al otro día fueron centrifugados 3 minutos a 12000 rpm. El pellet fue utilizado para obtener la forma FR, mientras que

el sobrenadante fue almacenado a 4°C y utilizado como fuente de fagos.

#### 7.4.5 Aislamiento de ADN simple cadena

Para esto se realizó la infección en un tubo estéril con cada uno de los clones obtenidos de la siguiente manera

Medio LB,	6 ml
Sobrenadante de fago recombinante,	60 $\mu$ l
Cultivo exponencial de <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ F',	60 $\mu$ l

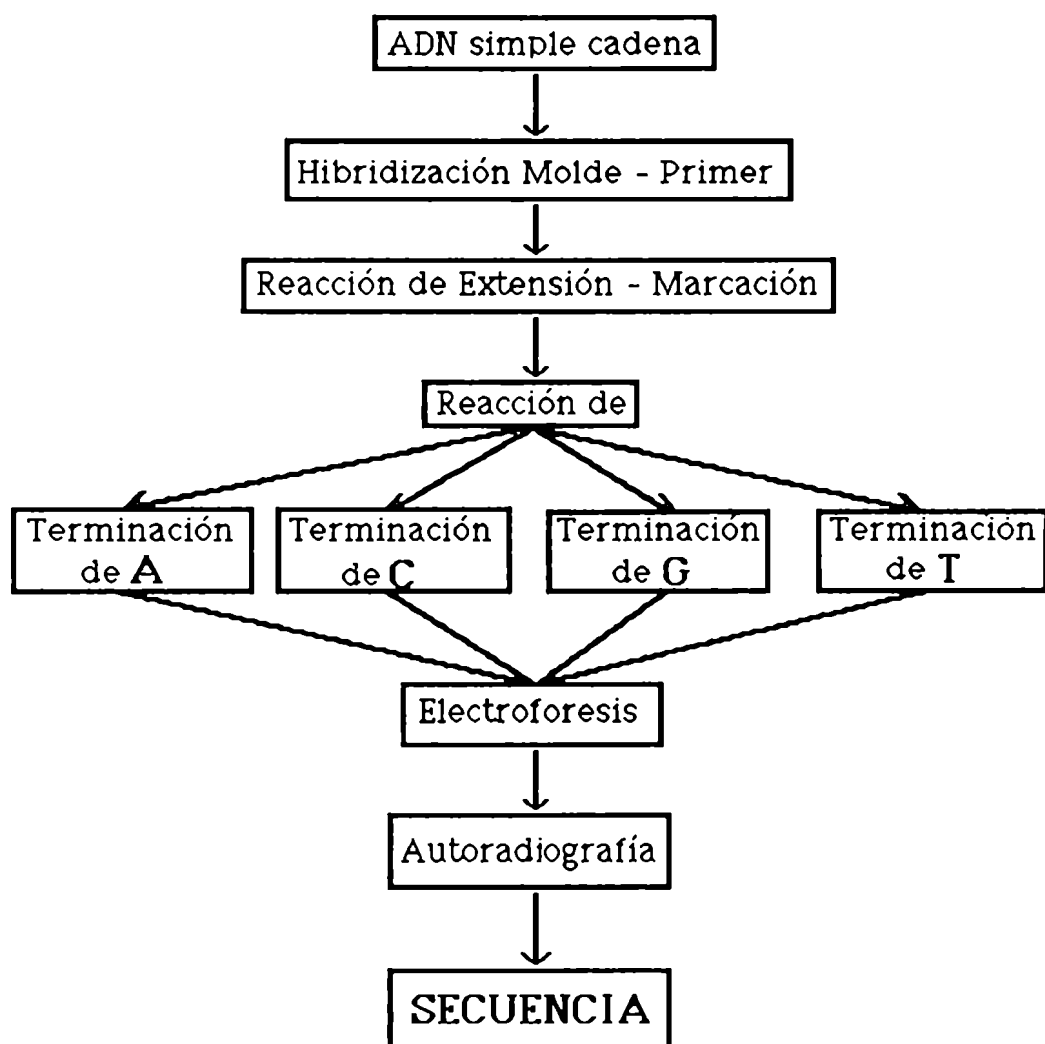
Se incubó la mezcla con agitación a 37°C durante 6 horas y posteriormente se realizó la centrifugación del cultivo para decantar las bacterias. El sobrenadante es nuevamente centrifugado para evitar contaminantes bacterianos y luego se lo fracciona de a 1.2 ml en 4 tubos eppendorf.

A cada uno de estos tubos se le agregó 150  $\mu$ l de una solución de PEG 20 %, NaCl 2.5 M. La mezcla se homogeneizó y luego de dejarlos 15 min a temperatura ambiente fueron centrifugados durante 15 min a 12000 rpm. Los 4 pellets de fagos fueron secados y luego resuspendidos en 50  $\mu$ l totales de buffer TE. Luego de realizar extracciones con solventes orgánicos el ADN fue precipitado. El pellet fue lavado 1 vez con etanol 70 % y cuando éste estuvo seco se lo resuspendió en 20  $\mu$ l de TE.

Cada una de las preparaciones fueron corridas en geles de agarosa 0.7 % de manera tal de estimar la cantidad de ADN extraído. Aproximadamente 4  $\mu$ g de ADN simple cadena fue obtenida en cada preparación.

#### 7.5 Reacción de secuenciación

Para la realización de secuenciación se ha elegido el Kit de BRL (KiloBase Sequencing™ System, cat. nº 8188SA). En este sistema (**esquema**) se realiza una reacción de marcación y elongación previa a la reacción de terminación utilizando para la síntesis el fragmento Klenow de la ADN Pol I de *E. coli*



### 7.5.1 Reacción de Hibridización Molde-Primer

Para realizar la hibridización del primer (primer de 17 bases de M13) con el ADN simple cadena del fago se realizó la siguiente mezcla en 10  $\mu$ l

ADN M13 simple cadena	1 mg en 5 $\mu$ l
Primer 17 bases	3 ng
Tris-HCl pH 8	60 mM
cloruro de magnesio	14 mM
Cloruro de sodio	70 mM

Se incubó la mezcla durante 5 min a 65°C en un baño térmico y posteriormente se dejó descender la temperatura hasta 35°C en forma lenta.

### 7.5.2 Reacción de Marcación-Extensión

Para realizar este paso en la reacción, el Kit, ajustado para la marcación con dATP a  $^{32}\text{P}$ , provee de una mezcla de extensión formada por dCTP, dGTP y dTTP 1  $\mu\text{M}$ .

Para esto, se agregó al tubo de reacción

Mezcla de extensión	2 $\mu\text{l}$
DTT 100 mM	1 $\mu\text{l}$
agua destilada	1 $\mu\text{l}$
ATP $\alpha^{32}\text{P}$ 3000 ci/mmol-10 mci/ml	1 $\mu\text{l}$
Klenow 1 U/ $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$

y se incubó durante 5 min a 37°C.

### 7.5.3 Reacción de terminación

Para la reacción de terminación, cockteles de dXTP y ddXTP rotulados como mezclas A, C, G, T fueron aportados por el Kit. Las siguientes mezclas poseen

Mezclas	A	C	G	T
d ATP	25*	250	250	250
d CTP	250	25	250	250
d GTP	250	250	25	250
d TTP	250	250	250	25
dd ATP	300			
dd CTP		100		
dd GTP			150	
dd TTP				500

\* las concentraciones son en todos los casos expresadas en  $\mu\text{M}$ .



Para la reacción de terminación, 2  $\mu$ l de cada una de estas mezclas son puestos en tubos separados rotulados y luego 3.5  $\mu$ l de la mezcla de reacción es agregada a cada uno de estos tubos.

Las nuevas mezclas son incubadas durante otros 5 min. a 37°C y posteriormente a cada una se agrega 4  $\mu$ l de buffer stop para detener la reacción.

**Buffer Stop de reacción:**

Formamida	95 %
EDTA	10 mM
Xilen cianol	0.1 %
A z u l bromofenol	d e 0.1 %

Posteriormente estas son calentadas durante 5 min a 80°C para realizar la desnaturalización de ambas cadenas, luego de lo cual las reacciones son puestas rápidamente en hielo, listas para sembrar en el gel de secuencia.

## 7.6 Análisis electroforético

Los ADN's radioactivos sintetizados en la reacción de secuenciación, son analizados en geles de acrilamida, los cuales fueron realizados utilizando una cuba de BIORAD.

Para la realización del gel se prepararon las siguientes soluciones:

**Solución de Acrilamida 40 % P/V:**

Acrilamida (BRL)	38 %
Bisacrilamida (BRL)	2 %

### 7.6.1 Preparación del gel

Los geles de acrilamida utilizados para la secuenciación se realizaron siguiendo el siguiente protocolo:

<b>Gel 8 %</b>	
Solución de acrilamida	40 % 20 % V/V
P/V	
Urea	50 % P/V
TBE	1 X
APS 10 %	300 $\mu$ l
TEMED	30 $\mu$ l

Esta mezcla fue colocada entre los vidrios de la cuba ya prearmados y se dejó solidificar durante 1 hr. Los peines usados en todas las secuencias fueron los denominados "Shark thooth" (dientes de tiburón).

Para la realización de la corrida electroforética, el gel es ensamblado en la cuba, poniendo como buffer de corrida TBE 1X. El sistema es conectado y las condiciones reguladas a 2000 V, 50 mA. El gel es precorrido durante por lo menos 1 hr a 55°C, después de lo cual las muestras son sembradas.

Cuando el xilen-cianol de la primera siembra llegó al borde inferior del gel, se realizó la segunda descarga de la misma muestra. Las siembras en estas condiciones se realizaron cada 3 hr.

Una vez que la corrida concluyó, se desensambló el sistema y el gel fue montado sobre un soporte de su tamaño. Posteriormente éste fue recubierto con celofán y una placa radiográfica fue expuesta al gel durante 16 hr.

# RESULTADOS

## 1. Introducción

Hasta el momento en que comenzamos este estudio del genoma del parásito, se habían clonado solamente genes correspondientes a proteínas de superficie del parásito. Estos fueron obtenidos a partir de genotecas de expresión construidas con ADN copia (ADN a partir de ARN mensajero del parásito).

Este tipo de sistema para clonado resuelve por dos diferentes caminos el problema de la contaminación con material celular del huésped. Por un lado, la contaminación no es tan representativa cuando hablamos del ARN, donde se supone que tanto los parásitos como las células de ratón son metabólicamente activas y por lo tanto la cantidad de ARNm en ambas células estará en el mismo orden de magnitud. Por otro lado, el éxito que se tenga en el rastreo de este tipo de genotecas, dependerá únicamente de la potencia y especificidad que tengan los anticuerpos utilizados.

Sin embargo, si se desea realizar un estudio del ADN que no se expresa, tanto la construcción de una genoteca como la detección de los recombinantes se deberá realizar indefectiblemente utilizando el ADN genómico del parásito.

La metodología para la búsqueda de secuencias repetitivas suele ser sencilla para organismos obtenidos en forma pura. Solamente es necesario cortar el ADN con diferentes enzimas de restricción y luego por la técnica de electroforesis pueden ser detectadas con algunas enzimas utilizadas, bandas que indican la presencia de elementos repetitivos.

En nuestro caso al hacer este tipo de análisis observábamos las bandas mencionadas; sin embargo, cuando esta preparación de ADN de *T. gondii* era transferida a un filtro de NC e hibridada con sondas de ADN marcadas pertenecientes al parásito, éstas hibridaban de la misma manera y con la misma intensidad que con sondas de ADN puro de ratón (**Figura 9**).

TOXO X Eco RI



**Figura 9:** ADN extraído de parásitos sin purificar cortado con la enzima Eco RI fue corrido electroforéticamente y posteriormente transferido a un filtro de NC. Una de las muestras fue hibridizada con ADN de taquizoitos impuros (T), mientras que la otra (R) fue hibridizada con ADN genómico de ratón.

De esto dedujimos que los elementos repetitivos que estábamos observando eran típicos del huésped, lo que implicaba que el ADN que utilizábamos tanto para analizar con las enzimas de restricción como para marcar, era en un gran porcentaje ADN de ratón, siendo el ADN del parásito imposible de individualizar.

Fue a partir de estos resultados que nos propusimos la búsqueda de mecanismos de purificación de los taquizoitos para luego sí realizar el estudio del genoma del parásito.

## 2. Purificación

### 2.1 Definición de parámetros

Debido a que el gradiente de centrifugación zonal en sacarosa es una técnica desarrollada para el aislamiento y purificación de organelas o componentes celulares, decidimos analizar la utilidad de este método para la separación de diferentes tipos de células.

Por un lado sabíamos que las velocidades de centrifugación que debíamos imponer a nuestro sistema deberían ser significativamente menores a las utilizadas para la separación de partículas subcelulares. Por otro, debíamos incrementar la concentración de sacarosa y disminuir el tiempo de centrifugación. Todos estos ajustes debían ser realizados para disminuir al máximo la velocidad de sedimentación, de lo contrario, encontraríamos ambos tipos de célula en el fondo del tubo.

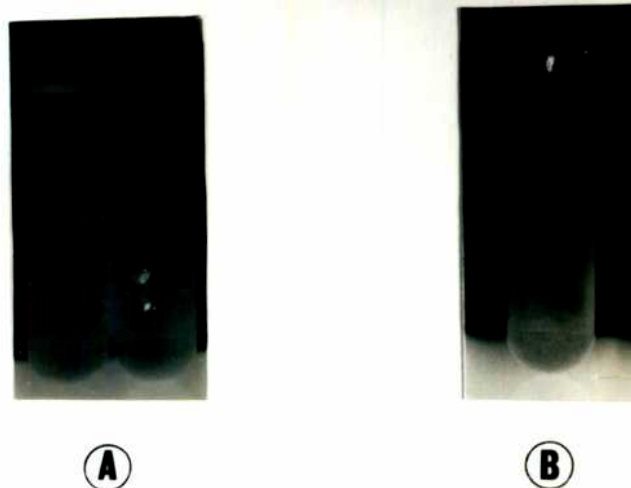
Como datos importantes teníamos algunos ejemplos de centrifugación zonal de organelas citoplasmáticas como ser mitocondrias y membranas. Estas eran separadas de otros componentes celulares centrifugando durante 1 hr en un gradiente continuo de sacarosa 10-36 % a 20000 X g.

Cuando realizamos una prueba en estas condiciones utilizando los parámetros de minipreparación (ver MyM, **2.2**) se obtuvo un patrón muy difuso (**figura 10.A**), en el cual el material se disponía preferencialmente en el fondo del tubo.

Teniendo en cuenta esta primera prueba, realizamos una segunda utilizando un gradiente continuo 20-45 % y centrifugando durante 45 min. Como se muestra en la **figura 10.B**, en este caso se consiguió obtener una banda muy tenue en el centro del gradiente. Los componentes de esta banda fueron analizados por microscopía óptica sin encontrar la presencia de ningún parásito o célula. Estos fueron rescatados nuevamente del fondo del gradiente.

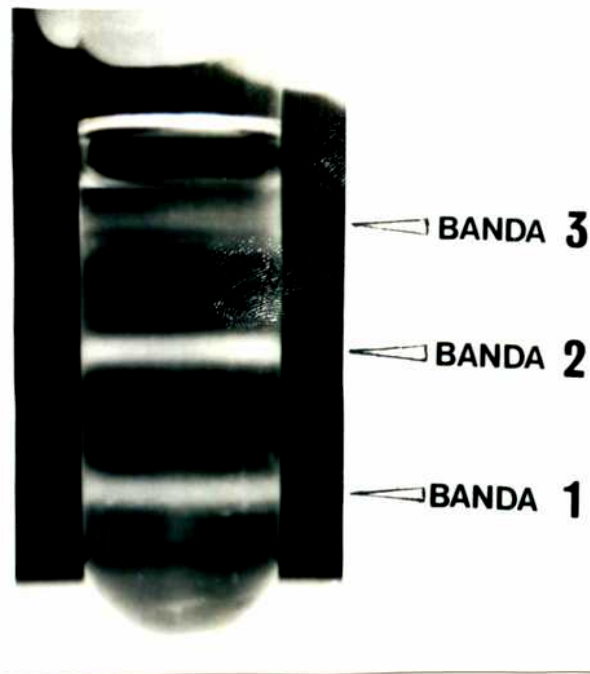
Siguiendo esta línea, disminuimos la velocidad de centrifugación hasta llegar a los 10000 X g, y posteriormente también se disminuyó el tiempo hasta los 30 min, pero en todos estos casos, la

conformación del gradiente fue exactamente la descrita anteriormente salvo que la banda vista previamente se ubicaba más cerca del tope.



**Figura 10:** Puesta a punto de los parámetros de la purificación: **A)** Gradiente continuo de sacarosa 10-36 % centrifugado a 20000 X g durante 1 hr. **B)** Gradiente continuo de sacarosa 20-45 % a 20000 X g durante 45 min

Cuando las condiciones fueron reajustadas de manera tal de realizar la centrifugación en concentraciones más altas de sacarosa (60 - 50 - 40 %) y en un gradiente discontinuo, se pudieron visualizar claramente tres bandas bien definidas (**figura 11**).



**Figura 11:** 1<sup>er</sup> gradiente de purificación. Centrifugación a  $10^5 \times g$  durante 30 min en un gradiente discontinuo de sacarosa 60 - 50 - 40 %. El ejemplo de la foto fue realizado en condiciones de maxipreparación

## 2.2 Análisis de la purificación

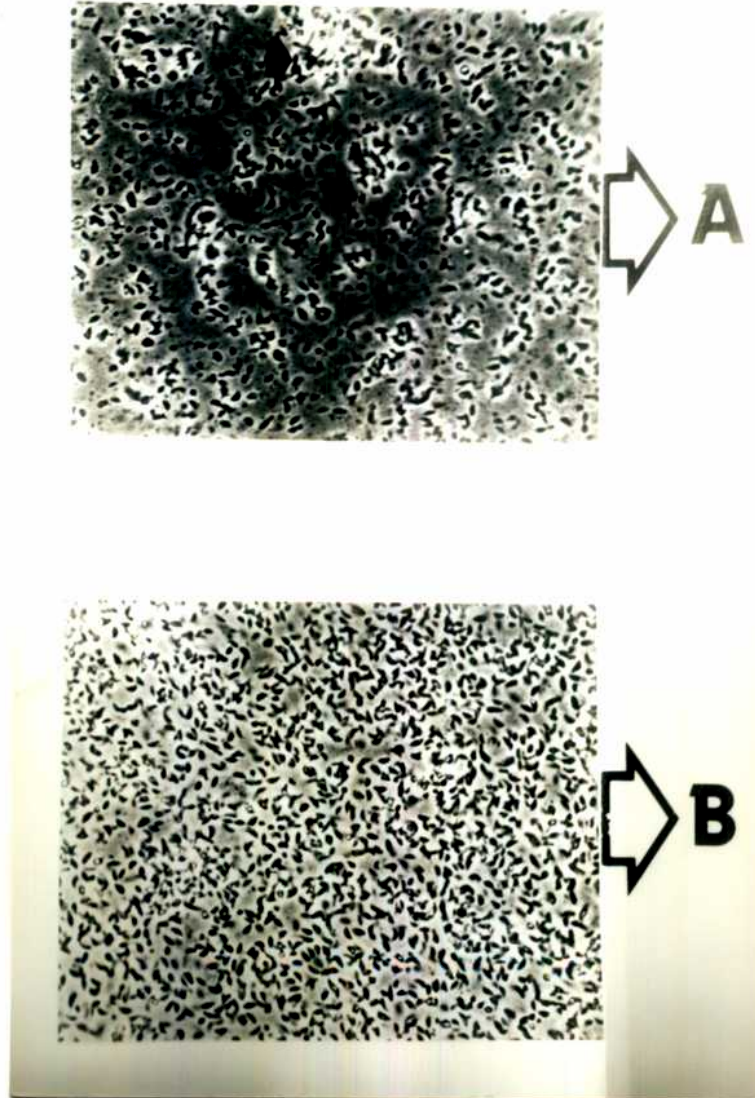
### 2.2.1 Análisis microscópico

Muestras de la parte central de cada banda fueron obtenidas de manera tal de poder analizar sus contenidos.

**Banda 1:** contiene en su mayor parte células de ratón o células de ratón parasitadas. También se pueden visualizar células en el momento de la explosión parasitaria, es decir con los parásitos saliendo de su interior.

**Banda 2:** Esta banda esta formada solamente por parásitos (**figura 12.B**) mostrando visualmente un mejoramiento apreciable en el grado de purificación comparando esta preparación con la muestra cruda de parásitos (**figura 12.A**). La cantidad de células presentes es muy escasa con respecto al gran número de parásitos visualizados. Cuando esta preparación fue teñida con





**Figura 12:** Preparaciones de parásitos vistas al microscopio óptico. **A)** Preparación de taquizoitos obtenidos directamente del peritoneo de ratón. Las flechas indican zonas con grupos celulares parasitados. **B)** Preparación de taquizoitos de peritoneo de ratón luego de ser extraídos de la banda 2 del 1<sup>er</sup> gradiente de sacarosa para su purificación.



McGrungwal/Giemsa, se pudieron apreciar algunos elementos esféricos con coloración típica de núcleos.

**Banda 3:** En esta banda no fueron observados parásitos ni células. Tampoco fueron encontrados núcleos celulares cuando sus componentes fueron teñidos con McGrungwal/Giemsa.

### 2.2.2 Análisis por Dot Blot (1<sup>er</sup> gradiente)

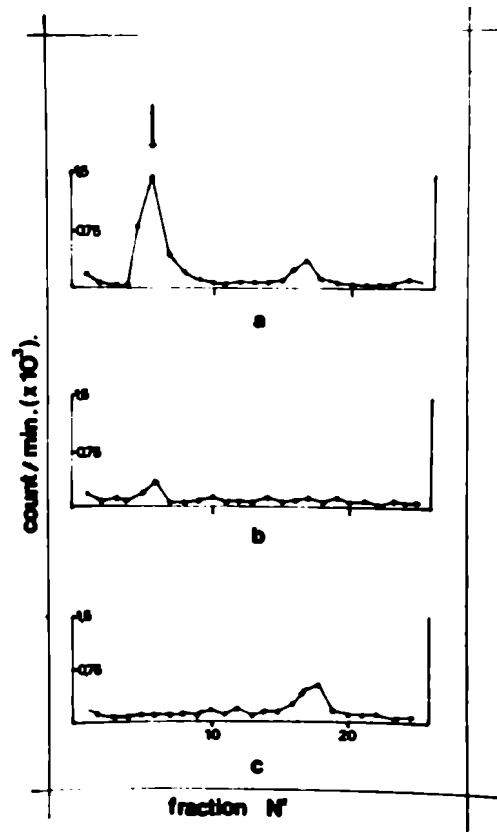
El gradiente de sacarosa (minipreparación) fue desarmado en 25 fracciones de 200  $\mu$ l, las cuales fueron lavadas para luego ser utilizadas en un análisis de Dot Blot sembrando el material directamente sobre el filtro de nitrocelulosa (ver MyM, 5.1).

Las fracciones fueron analizadas por la técnica de hibridización utilizando como sonda ADN de ratón marcado con dCTP  $\alpha^{32}$ P por la técnica de "Nick Translation" ( $2 \times 10^7$  cpm/ $\mu$ g). Como se muestra en la **figura 13.A**, el análisis del contenido de las distintas fracciones mostró una reacción fuerte en las fracciones correspondientes a la banda 1 (flecha entera), y una débil en la zona correspondiente a la banda 2 (flecha punteada).

Las fracciones pertenecientes a la zona de la banda 3 no mostraron ningún tipo de reacción, lo que se corresponde con la falta de tinción visto en el examen microscópico.

### 2.3 Formulación de un segundo gradiente

Dado que este resultado evidenciaba aún una leve contaminación del material parasitario con material genético de ratón, (**figura 13.a**, flecha punteada), se decidió recentrifugar el material de esa banda en las mismas condiciones del 1<sup>er</sup> gradiente. Además se realizó la recentrifugación de las bandas 1 y 3. con el fin de comprobar que el material extraído del primer gradiente sedimentara en el mismo sitio.



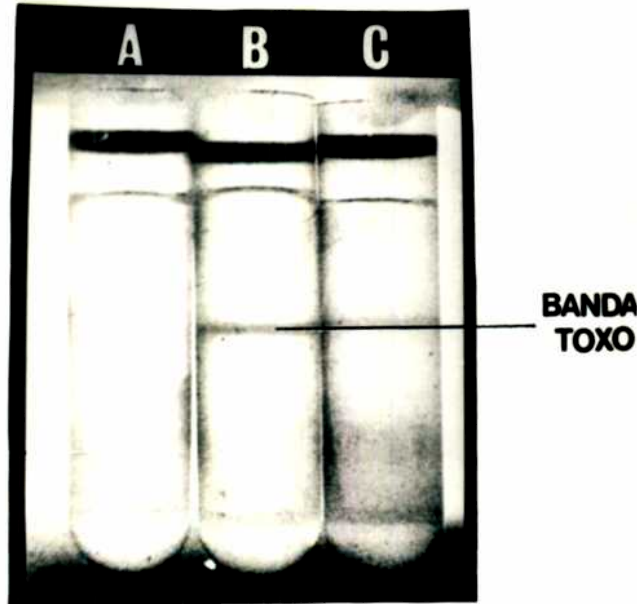
**Figura 13:** Análisis de Dot Blot de las fracciones de los gradientes. Fracciones de los gradientes (a, primer gradiente; b y c, recentrifugación de la banda 2 del primer gradiente) conteniendo células del peritoneo de ratón o taquizoitos de *Toxoplasma gondii* fueron sembrados sobre filtros de NC, lisados in situ e hibridizados con ADN genómico de ratón (a y b) o con el ADN obtenido de la banda 2 del 2<sup>do</sup> gradiente de sacarosa (c), ambos marcados con dCTP  $\alpha^{32}\text{P}$ . Luego de la hibridización los sitios con las muestras fueron cortados y se contó la radioactividad asociada a cada fracción.

la **figura 14**, muestra la serie de tubos en los cuales se realizó la centrifugación de las bandas del 1<sup>er</sup> gradiente. Cuando se recentrifugó la banda 3 (tubo A), ésta no se volvió a formar, probablemente por la baja concentración de su material o a posibles pérdidas ocurridas durante los lavados.

En el caso del tubo B (**figura 14**), en el cual se sembró el material proveniente de la banda 2, se pudo ver que se repetía la posición relativa de la banda a lo largo del tubo, y que esta banda no se dividía en otras al menos visibles.

En el caso del sembrado de las fracciones pertenecientes a la banda 1 del 1<sup>er</sup> gradiente (tubo C, **figura 14**), se pudo visualizar la división de ésta en dos bandas, una equivalente a la banda 2, y la otra correspondiente a la banda 3 del 1<sup>er</sup> gradiente. Como era de esperar, los parásitos que se encontraban adheridos a las células de

ratón en la 1<sup>er</sup> centrifugación se separaron, posiblemente debido al manipuleo y sedimentaron en la banda 2.



**Figura 14:** Segundo gradiente de sacarosa.

Cada una de las bandas obtenidas del primer gradiente fueron recentrifugadas en las mismas condiciones en tres tubos diferentes (tubo A: banda 3; tubo B: banda 2; tubo C: banda 1).

Esto fue posteriormente corroborado por la observación al microscopio del material extraído

### 2.3.1 Análisis por Dot blot (2<sup>do</sup> gradiente)

El material contenido en las fracciones extraídas del tubo B de la **figura 14** (tubo que contenía la banda 2 del 1<sup>er</sup> gradiente), fue lavado y sembrado sobre un papel de NC. Este material fue nuevamente hibridizado con el ADN de ratón marcado con dCTP  $\alpha^{32}P$  por la técnica de "Nick Translation". Como se muestra en la **figura 13.b** solamente un pequeño pico de radioactividad se localiza en las fracciones correspondientes a la zona donde bandean las células de ratón (flecha entera). Sin embargo en este caso no se detectó ningún tipo de reacción en la zona en la cual bandean los

parásitos (flecha punteada), evidenciando la pureza de esta zona en lo que respecta a la falta de ADN de ratón.

#### **2.4 Hibridización con ADN de la Banda 2**

El material extraído de la banda 2 del segundo gradiente fue utilizado para el aislamiento de ADN del parásito. Un  $\mu\text{g}$  del ADN aislado fue utilizado para realizar la marcación por "Nick Transaltion", obteniendo en este caso una actividad específica de  $2 \times 10^7$  cpm/ $\mu\text{g}$ , es decir con la misma actividad con que se marcó el ADN de ratón.

Cuando esta sonda fue utilizada para analizar las distintas fracciones del segundo gradiente (tubo B, **figura 14**) se pudo comprobar que ésta solamente hibridizaba con la zona correspondiente a la banda 2 (**figura 13.c**, zona de flecha punteada).

Además, la zona en la cual bandeaba el material de ratón (**figura 13.c**, zona de flecha entera), no mostró ningún tipo de reacción con esta sonda, lo que de alguna manera indica que no hay a esta altura parásitos asociados a las células.

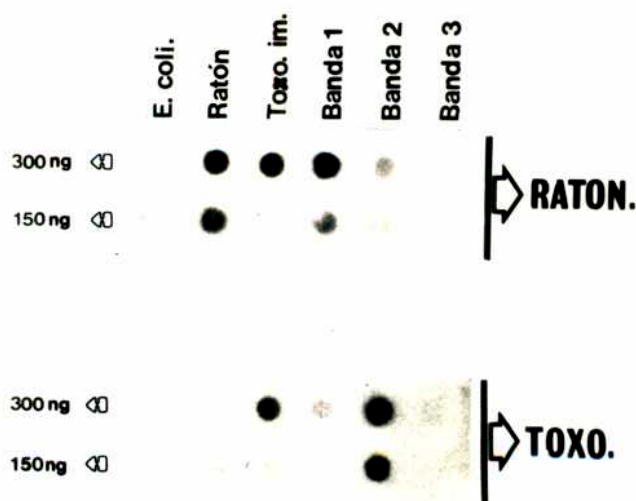
#### **2.5 Dot Blot con ADN de las diferentes bandas**

Con el objeto de continuar el análisis de la calidad de la purificación, ADN extraído de los componentes de cada banda del primer gradiente, junto con muestras de ADN de parásitos no purificados, ADN de hígado de ratón, y ADN de *E. coli* utilizado como control negativo, fueron sembrados en filtros de NC en dos diferentes concentraciones (**figura 15**).

Solamente las muestras que contienen ADN de ratón (Ratón, Toxo impuro, Banda 1) dieron fuertes reacciones positivas cuando fueron hibridizadas con ADN de ratón radiomarcado (panel ratón). En el caso de la banda 2, luego del primer gradiente, hay aún una leve reacción de hibridización debida a material de ratón contaminante, lo que ratifica el resultado previo (**figura 13.a**).

Cuando este mismo filtro fue analizado con la sonda obtenida de la banda 2 del segundo gradiente (panel Toxo), solamente aquellas muestras que evidenciaban la presencia de taquizoitos

reaccionaron positivamente. Como también se observó en el gráfico de la **figura 13.a** hay una leve reacción de la sonda con el material de la banda 3 debido a parásitos asociados a células que se encuentran en esta banda.



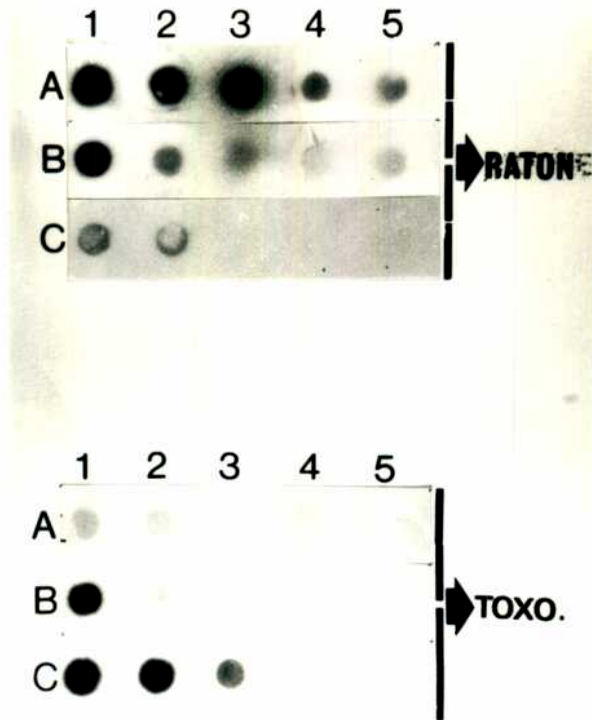
**Figura 15:** Análisis por Dot Blot de cada banda.

Dos distintas cantidades de ADN (150 y 300 ng) proveniente del material de las diferentes bandas del primer gradiente y material control (ADN de ratón, *E. coli.*, y parásitos no purificados) fueron sembrados sobre NC. Uno de estos filtros fue hibridizado con ADN genómico de ratón radiomarcado (ratón) mientras que el otro se lo hibridizó con ADN de parásitos también radiomarcado obtenido de la banda 2 del segundo gradiente (Toxo).

## 2.6 Análisis del grado de purificación

Con el objeto de determinar el grado de contaminación de cada una de las preparaciones de ADN de taquizoitos con ADN proveniente de células de ratón, se diseñó una experiencia de Dot Blot. Diluciones al medio de ADN de hígado de ratón, ADN de preparaciones crudas de parásitos y ADN obtenido del material de la banda 2 del 2<sup>do</sup> gradiente de sacarosa, fueron sembrados por duplicados sobre NC (**Figura 16**)





**Figura 16:** Análisis en el grado de purificación de los parásitos. Diluciones al medio realizadas con muestras de ADN obtenidas de hígados de ratones Balb/c (A), de exudados peritoneales extraídos de ratones infectados con taquizoitos de *T. gondii* (B) y de parásitos purificados a través de dos gradientes sucesivos de sacarosa (C), fueron sembrados sobre NC. Estos fueron hibridizados con ADN genómico de ratón (Ratón) o con ADN de taquizoitos purificados (Toxo), ambos radiomarcados con  $dCTP\alpha^{32}P$ . Las cantidades de ADN sembradas fueron las siguientes: 1, 200 ng; 2, 100 ng; 3, 50 ng; 4, 25 ng; 5, 12.5 ng

e hibridizados con ADN genómico de ratón (panel Ratón) y ADN extraído de la banda 2 del segundo gradiente (panel Toxo).

De los resultados obtenidos en las autoradiografías se desprende que es necesario solamente 3 o 4 veces más cantidad de ADN de ratón en la preparación de parásitos impurificados para igualar la intensidad de señal del ADN de ratón extraído de hígado (100 % de ADN de ratón).

Haciendo el análisis entre las líneas A y C vemos que en este caso se necesita aproximadamente 16 veces más ADN de ratón en la preparación de ADN de los parásitos purificados como para igualar el mismo nivel de señal que en el ADN de ratón puro.

De este resultado se desprende que la contaminación de las preparaciones crudas de parásito con ADN proveniente de las células del huésped ronda entre el 25 y el 35 % mientras que en las preparaciones de ADN de los taquizoitos purificados la contaminación corresponden solamente al 8 %.

En el caso en que el duplicado del filtro fue hibridizado con ADN de taquizoitos provenientes de la banda 2 del 2<sup>do</sup> gradiente de sacarosa (**figura 16**, panel Toxo) se obtuvieron resultados similares a los anteriores.

### **2.7 Análisis de viabilidad de los parásitos**

Con el objeto de determinar la viabilidad de los taquizoitos luego del proceso de purificación, se realizó una prueba de virulencia.

De un lote de 10 ratones inoculados intraperitonealmente con los taquizoitos purificados, todos murieron después del cuarto día posterior a su infección (el tiempo promedio de supervivencia fue de 80 hr). En todos los casos se extrajo líquido ascítico encontrándose un promedio de  $5 \times 10^7$  parásitos por ratón.

Los controles inoculados con solución salina como placebo no evidenciaron sintomatología alguna.

### **2.8 Rendimiento de la purificación**

En lo que respecta al rendimiento de la purificación, este fue obtenido por conteo en cámara de Neubauer antes y después del procedimiento.

Un 65 % del total de los parásitos sembrados en el primer gradiente (maxipreparación, MyM, **2.2**) fueron recuperados directamente del material de la banda 2. Este material se dividió en tres tubos de minipreparación para la realización del segundo gradiente, de los cuales se recuperó aproximadamente el 70 % de los parásitos luego de la centrifugación. De esto se desprende un rendimiento total de 42 %. En ningún momento se calculó el aporte de los parásitos recuperados por la recentrifugación de la banda 1 del primer gradiente, pero este material, a pesar de no haber sido usado en ningún momento en nuestros experimentos, aportaría un porcentaje significativo al rendimiento.

## **2.9 Análisis electroforético del ADN**

### **2.9.1 Comparación con el ADN del Huésped**

Para determinar el grado de purificación de las muestras de ADN obtenidas, así como también la integridad de éste una vez purificado por los métodos antes descritos, se realizó una electroforésis en un gel de agarosa 1 % (**figura 17.A**) y una posterior transferencia (**Figuras 17.B y C**).

Muestras intercaladas de 3 µg de ADN de taquizoitos con ADN de ratón (extraído de hígado), fueron corridas sin digerir (m y t) o digeridas con diferentes enzimas de restricción (Msp I, Hpa II, Eco RI, Hind III, Pst I).

Como se muestra en el gel, el ADN aislado de los parásitos purificados por gradiente no muestra ningún tipo de alteración visible (por ejemplo alto grado de degradación), ya que como cualquier ADN de alto peso molecular en este tipo de geles, se lo encuentra concentrado en el lugar de la siembra.

Por otro lado, se desprende de esta figura que el ADN purificado es altamente calificado para ser analizado por cortes con enzimas de restricción.

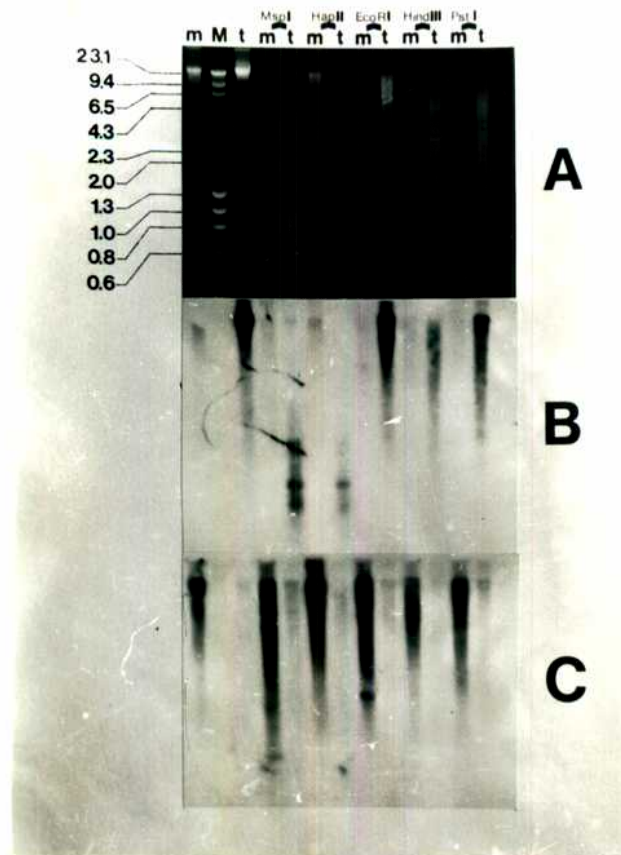
Cuando el material de este gel fue transferido a filtros de NC e hibridados con ADN de taquizoitos purificados (Panel B), y ADN de ratón puro (panel C) radiomarcados, se evidenció el alto grado de purificación que tienen las muestras obtenidas. Esto se demostró ya que no se detectó casi señal de hibridación en los caminos que contenían ADN de Ratón en el panel A (contaminación proveniente de la sonda), ni en los caminos con ADN del parásito en el panel B (contaminación de la muestra).

### **2.9.2 Análisis de ADN genómico de *T. gondii***

Con el objeto de realizar una caracterización parcial del genoma de *Toxoplasma gondii*, el ADN de taquizoitos purificados fue aislado y fracciones de 3 µg fueron digeridas con diferentes endonucleasas



de restricción. Posteriormente cada una de estas muestras fue corrida en un gel de agarosa 1 %, transferido a NC e



**Figura 17:** Comparación de ambos genomas.

Muestras de ADN obtenidas de tachizoitos purificados (t) o de hígados de ratones Balb/c (m) fueron cortados con las enzimas de restricción indicadas y analizados electroforéticamente en un gel de agarosa 1 % (A). Posteriormente este gel fue transferido a filtros de NC e hibridizado con ADN de tachizoitos purificados (B) o ADN de ratón (C), ambos radiomarcados.

hibridizado con ADN de *Toxoplasma gondii* marcado radioactivamente por la técnica de "Nick Translation".

Como se muestra en la **figura 18**, el ADN del parásito es fácilmente digerido con enzimas que tienen como sitio de reconocimiento secuencias de 4 nucleótidos con Guanina y Citosina (Hae III, Hpa II, Msp I) dando una población de fragmentos que oscilan entre 2.3 y 0.3 Kpb. También se demostró que el ADN del parásito es sensible a las enzimas Hha I, Taq I y Alu I (datos no mostrados).

Por otro lado, tanto Eco RI como Hind III fueron enzimas que mostraron una baja frecuencia de corte en el ADN de *T. gondii* (**figura 18**).

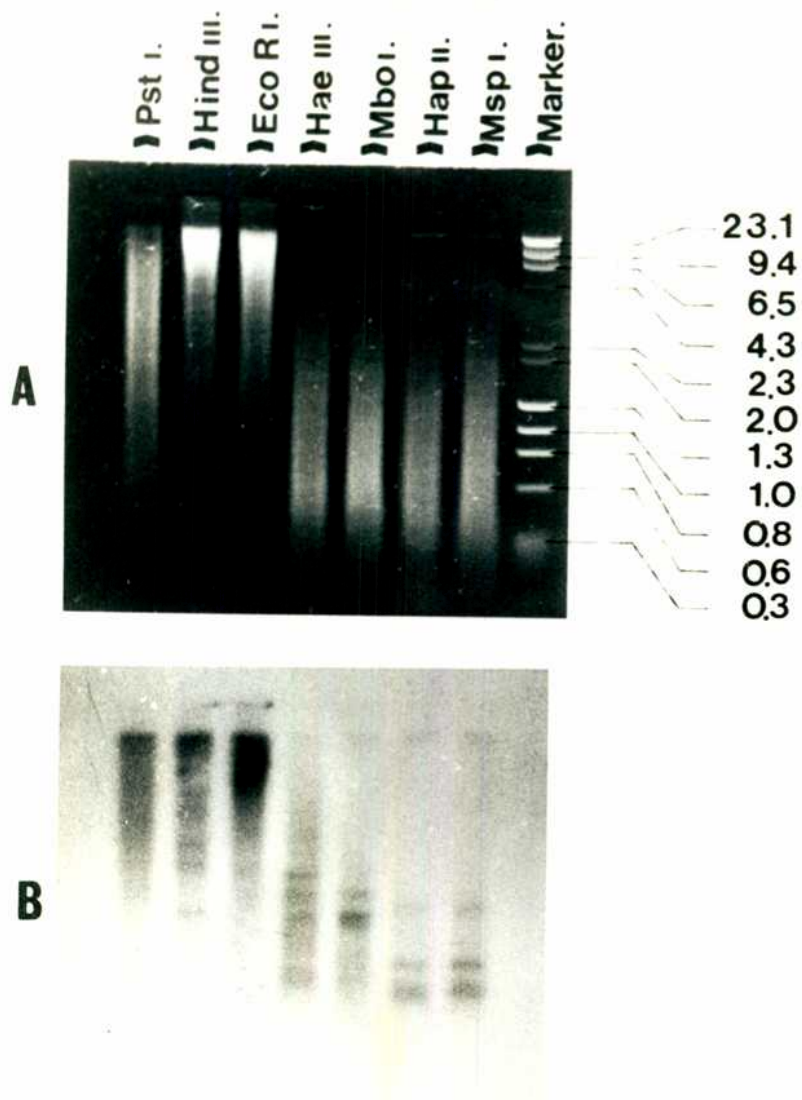
### 2.9.3 Análisis de la metilación

Las enzimas Hpa II y Msp I son isoesquisómeros, es decir enzimas que tienen un mismo sitio de reconocimiento (5'CCGG3') pero aisladas de diferente fuente. Estas dos enzimas actúan totalmente sobre esta secuencia si no se encuentra metilada en ninguna de sus citosinas. Sin embargo, estas lo hacen diferencialmente dependiendo de cual de las dos citosinas de la secuencia este metilada (<sup>m</sup>C). Las exigencias de corte para estas dos enzimas son complementarias (Busslinger et al, 1983; McClelland, 1983).

Hpa II	corta	<sup>m</sup> C C G G
	no corta	C <sup>m</sup> C G G
Msp I	corta	C <sup>m</sup> C G G
	no corta	<sup>m</sup> C C G G

Como se muestra en la figura anterior (**figura 17.A y C**), el ADN de ratón muestra una degradación mayor (mayor concentración de fragmentos de bajo peso molecular) cuando éste es tratado con Msp I que cuando se lo trata con Hpa II. Este resultado, demuestra el gran nivel de metilación en la segunda citosina de esta secuencia por lo menos en el caso del material genético de ratón extraído de células hepáticas.

En el caso en que se realizó este mismo análisis con ADN obtenido de taquizoitos (**figura 17.A y B; figura 18**) no se observaron diferencias en los patrones de corte de estas dos enzimas. De esto se desprende la existencia en el estadio de taquizoito de una falta de metilación de cualquiera de las dos citosinas de la secuencia de corte para estas dos enzimas.

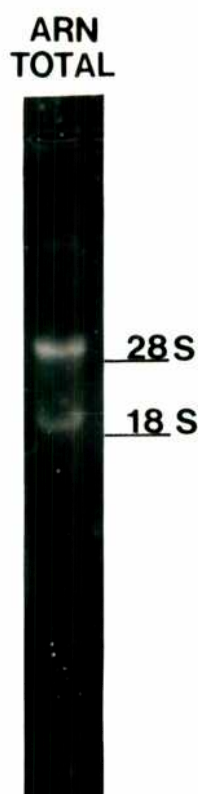


**Figura 18:** Análisis del ADN genómico de *Toxoplasma gondii*. ADN de taquizoitos purificados fue cortado con las enzimas indicadas y corrido electroforéticamente en un gel de agarosa al 1% (A). Marker indica el ADN marcador de peso molecular corrido en paralelo. (B) Southern Blot del gel anterior hibridizado con ADN genómico de *Toxoplasma gondii* radiomarcado con dCTP $\alpha^{32}$ P por la técnica de "Nick Translation".

## 2.10 Purificación de ARN total de los parásitos

Para determinar si el método de purificación de los taquizoitos tiene algún efecto sobre la obtención del ARN del parásito, se utilizó una preparación de éstos obtenidos luego de los dos gradientes sucesivos para realizar el aislamiento del ARN total. A partir de  $5 \times 10^8$  taquizoitos puros, se obtuvo por el método antes descrito (MyM 3.5) 471  $\mu\text{g}$  de ARN total.

Como se ve en la **figura 19** la electroforesis de 15  $\mu\text{g}$  de este material, mostró una relación 2/1 entre las masas de ARNr 28 y 18 S, dando prueba de la integridad de la muestra y por lo tanto del bajo efecto que tiene el método de purificación sobre el ARN extraído.



**Figura 19** : Extracción de ARN total del parásito.

ARN total (15  $\mu\text{g}$ ) extraído de taquizoitos purificados a través de dos gradientes sucesivos de sacarosa fue corrido en un gel de agarosa 1 % según las condiciones detalladas en MyM 4.2.2b

### 2.11 Detección de secuencias repetitivas

Analizando el patrón obtenido en el Southern Blot hibridizado con ADN de parásitos radiomarcado (**Figura 18.B**), se pudo individualizar una amplia serie de fragmentos repetitivos con la mayoría de estas enzimas.

Como era de esperar, los patrones de hibridización de las enzimas Msp I y Hpa II fueron idénticos, mostrando en ambos casos 3 bandas (1.3 - 0.7 - 0.5 kpb aproximadamente). Con las otras enzimas se obtienen un gran número de fragmentos repetitivos que son en general de mayor tamaño que los que presentan las dos enzimas de restricción antes nombradas. Por otro lado, en el caso del corte con la enzima Eco RI, se ve que la mayor parte de la hibridización se da en la parte del gel correspondiente a fragmentos de alto peso molecular, mientras enzimas como Pst I, no muestran la presencia de fragmentos repetitivos relevantes, siendo el patrón de hibridización sumamente homogéneo.

## 3 Clonado de ADN repetitivo

### 3.1 Selección de recombinantes

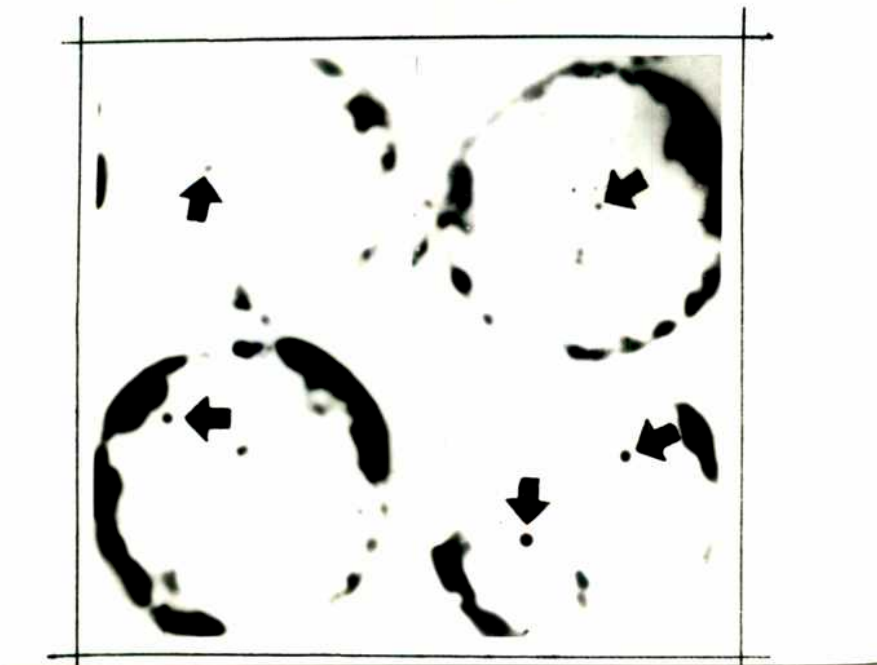
Mediante la metodología antes descrita (MyM, **6**), se realizó el clonado de los fragmentos de restricción producidos por la enzima Hpa II en el sitio Acc I del plásmido pUC19 (MyM, **figura 7**). Estos fragmentos fueron previamente fraccionados, eligiendo para el clonado los del rango de 1.3 a 0.3 kpb.

Los diferentes controles de la transformación realizados a la par del experimento, dieron dentro de los valores esperados, teniendo una eficiencia de transformación de  $5 \times 10^6$  ufc/ $\mu$ g de ADN de pUC19.

Aproximadamente 4500 colonias fueron rastreadas por hibridización con ADN radiomarcado para la detección de fragmentos repetitivos. Para ello, ADN de *Toxoplasma gondii* fue



aislado de parásitos purificados a través de un doble gradiente de sacarosa y utilizado para marcar por la técnica de "Nick Translation" con  $dATP\alpha^{32}P$ . Esta técnica se caracteriza por marcar el ADN homogéneamente, por lo tanto los fragmentos que se encuentren en un alto número de copias se marcarán en mayor proporción que aquellos fragmentos encontrados en bajo número. La autorradiografía de los filtros (**Figura 20**) corresponde a 4 de los diez originales utilizados para el rastreo de las 4500 colonias. Como se ve en esta figura hay un gran número de clones que dan una señal clara de hibridización. Sin embargo, solamente aquellas colonias con un alto nivel de señal luego de una exposición radiográfica de toda la noche, fueron tomados para estudiar más detalladamente.



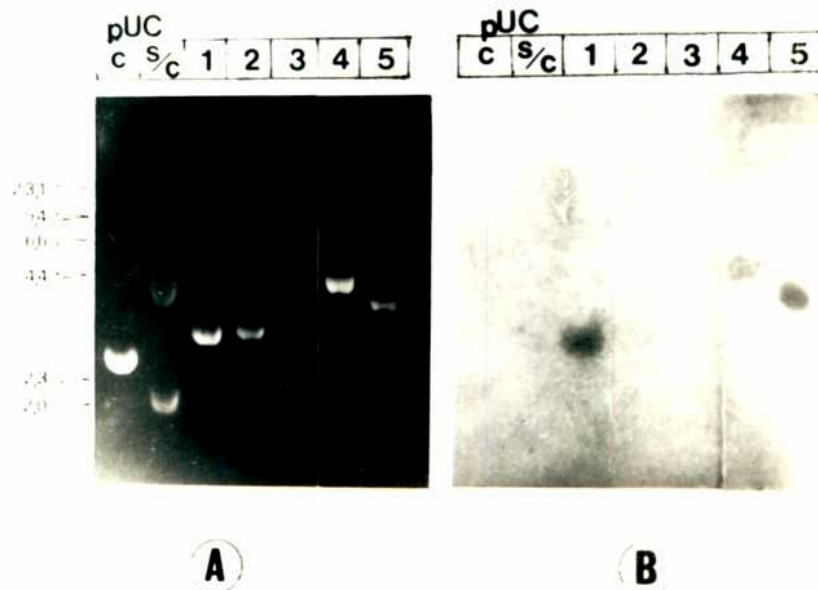
**Figura 20:** Rastreo de la genoteca. Cuatro filtros representativos con colonias conteniendo plásmidos recombinantes (flechas) fueron rastreados con ADN total de taquizoitos purificados radiomarcado con  $dCTP\alpha^{32}P$ .

En total aproximadamente 50 colonias cumplieron estos requisitos y por lo tanto, estas fueron plaqueadas de manera ordenada en una nueva caja de petri. Del resultado de un segundo rastreo de estas 50 colonias siguiendo las mismas condiciones utilizadas para el

primero, solamente aquellas que mantuvieron su señal de hibridización fueron utilizados para la continuación del trabajo.

### 3.2 Elección de los fragmentos altamente repetidos

Con el fin de seleccionar aquellos clones que contengan los fragmentos mayormente repetidos, minipreparaciones de plásmidos obtenidos de éstos fueron cortadas con la enzima Hind III y corridos en un gel de agarosa (**figura 21.A**). Los fragmentos separados durante la corrida fueron transferidos a un filtro de NC e hibridizados con ADN genómico total de *Toxoplasma gondii* marcado radioactivamente con dATP $\alpha^{32}$ P (actividad específica  $5 \times 10^7$  cpm/ $\mu$ g de ADN).



**Figura 21:** Southern Blot de plásmidos recombinantes. Minipreparaciones de 5 colonias recombinantes representativas (1 a 5) fueron cortadas con la enzima Hind III, corridos electroforéticamente (**A**) y transferidos a filtros de NC. c y s/c representan los caminos con plásmido pUC 19 tratado y sin tratar con la enzima. (**B**) Radiografía mostrando la hibridización del filtro con ADN de taquizoitos radiomarcado con dATP $\alpha^{32}$ P por la técnica de "Nick Translation". Se realizó la exposición radiográfica durante 2 hr.

De todos los clones positivos, solamente aquellos que dieron señal luego de 2 hr de exposición fueron elegidos para la continuación del trabajo (muestra 1, 4 y 5 en la **figura 21.B**), siendo estos los

plásmidos portadores de los fragmentos más representados dentro del genoma del parásito.

Mediante la corrida en paralelo de marcadores de peso molecular se realizó una estimación del tamaño de los fragmentos clonados. Conociendo el tamaño de pUC19 (2686 pb) se determinó que estos tres fragmentos tenían pesos moleculares de:

Calle del gel	Denominación del clon	Tamaño del Inserto.
1	Tg1	300 pb
4	Tg8	800 pb
5	Tg6	600 pb

La hibridización de un filtro idéntico con ADN de ratón marcado por la técnica de "Nick Translation" con dATP $\alpha^{32}\text{P}$  (Actividad específica de  $5 \times 10^7$  cpm/ $\mu\text{g}$ ) en las mismas condiciones de hibridización y lavados utilizado para la sonda del parásito pero exponiéndolo durante 48 hs a  $-70^\circ\text{C}$ , no evidenció ningún tipo de reacción (dato no mostrado).

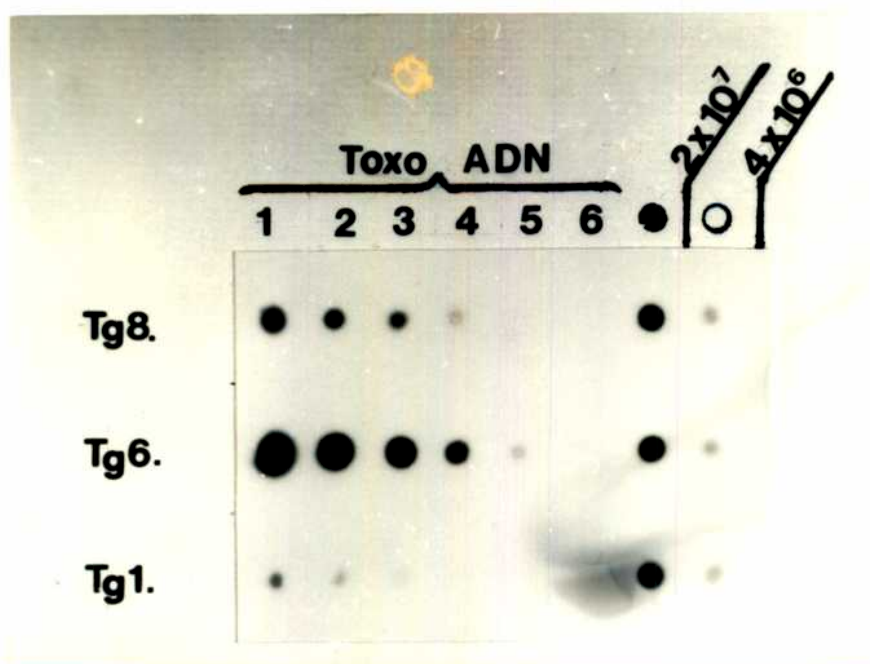
### 3.3 Determinación del número de copias

Para la determinación del número de copias que tiene cada uno de los fragmentos clonados dentro del genoma de *Toxoplasma gondii*, se realizó un experimento de Dot Blot utilizando para la hibridización las diferentes sondas (pTgs) marcadas radioactivamente (**figura 22**). Mediante la comparación de las señales obtenidas entre cantidades conocidas de material genómico total de taquizoitos purificados y cantidades conocidas de los distintos plásmidos recombinantes se pudo estimar el número de copias.

Como se muestra en la figura, aproximadamente  $4 \times 10^6$  copias de plásmido con el inserto Tg1 dan el mismo nivel de señal que la hibridización de 6.4 ng de ADN de taquizoitos. Dado que la cantidad de ADN equivalente a 10.000 parásitos es de aproximadamente 1 ng (el genoma haploide de *Toxoplasma gondii* tiene un tamaño de  $7,7 \times 10^7$  pb; Cornelissen y col 1984), Tg1 estaría representado dentro del genoma en aproximadamente 60-



70 copias. Siguiendo el mismo análisis, para Tg6 se estimó el número de repeticiones en 1000 copias, mientras que en el



**Figura 22:** Número de copias de cada fragmento clonado. Diferentes cantidades de ADN genómico total de *Toxoplasma gondii* (1: 12.8 ng; 2: 6.4 ng; 3: 3.2 ng; 4: 1.6 ng; 5: 0.4 ng; 6: 0.08 ng) fueron hibridizadas con los tres plásmidos conteniendo los fragmentos Tg1, Tg6 y Tg8. Los números en las líneas de la derecha indican la cantidad de copias del plásmido respectivo sembradas para la realización de la comparación.

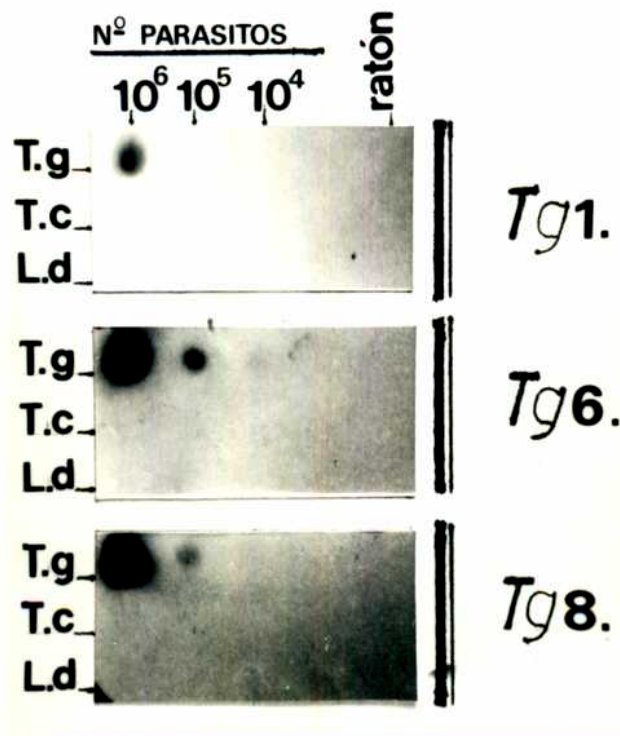
caso de Tg8 el número estimado fue de aproximadamente entre 200 y 300 copias

Estos resultados se correlacionan con la señal obtenida en el Southern realizado con los diferentes plásmidos recombinantes e hibridizado con ADN de parásitos marcado (**figura 21.B**), donde Tg6 (camino 5) mostró una mayor intensidad de señal, mientras que Tg1 y Tg8 lo hicieron con aproximadamente la misma.

### 3.4 Análisis de la especificidad

Para determinar el grado de especificidad que tienen cada una de las sondas clonadas en la detección del genoma de *Toxoplasma gondii*, se realizó un experimento de Dot Blot utilizando diferentes cantidades de taquizoitos de *Toxoplasma gondii* como control positivo; parásitos causantes de infecciones de relevancia en nuestra región geográfica (*Trypanosoma cruzi* y *Leishmania*

*donovani*) y ADN de ratón (1 µg) como control negativo. Estos filtros, fueron posteriormente hibridizados con cada una de las sondas purificadas por electroelución y marcadas con dATP α<sup>32</sup>P. Como se ve en la **figura 23**, solamente el ADN de taquizoitos hibridizó con cada una de las sondas clonadas de acuerdo a su número de repeticiones en el genoma. En las condiciones de estringencia utilizadas (0,1 X SSC, 60°C) no se detectó ningún tipo de señal con los otros parásitos ni con el ADN de ratón.



**Figura 23:** Control de especificidad de las diferentes sondas. Diferentes cantidades (10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup> y 10<sup>4</sup>) de parásitos (T.g: *Toxoplasma gondii*; T.c: *Trypanosoma cruzi*; L.d: *Leishmania donovani*) fueron sembrados directamente sobre filtros de NC junto con ADN (1 µg) genómico de ratón (Ratón). Posteriormente cada uno de los filtros fue hibridizado con las distintas sondas repetitivas clonadas (Tg1, Tg6 y Tg8).

### 3.5 Dot Blot con ARN total de taquizoitos

Aproximadamente 5 µg de ARN total de taquizoitos purificados fueron sembrados en dots sobre filtros de NC e hibridizados con cada una de las sondas clonadas. Ninguna de ellas dio reacción con el ARN del filtro (dato no mostrado). Para este estudio se utilizaron condiciones de lavado de alta estringencia (60°C y 0.1 X SSC) y se

dejaron los filtros exponiendo durante 15 días a  $-70^{\circ}\text{C}$  con placas intensificadoras.

### 3.6 Análisis de Southern de las sondas clonadas:

La disposición de estos fragmentos de ADN repetitivo dentro del genoma del parásito se analizó mediante diferentes experimentos de Southern Blot. Para esto, los taquizoitos fueron purificados a homogeneidad por el sistema antes descrito (MyM 2) y el ADN genómico parasitario fue extraído de este material (MyM 3.1; **figura 5**).

Se realizaron cortes con diversas enzimas de restricción y el material resultante fue sometido a electroforésis y posteriormente transferido a filtros de NC como se detalló anteriormente (MyM 5.2, **figura 6**).

En todos los casos las sondas utilizadas para la hibridización fueron purificadas por electroforésis en agarosa y posterior electroelución, y marcadas con  $\text{dATP}\alpha^{32}\text{P}$  por "Random Primer" obteniendo actividades específicas de alrededor de  $5 \times 10^8$  cpm/ $\mu\text{g}$ .

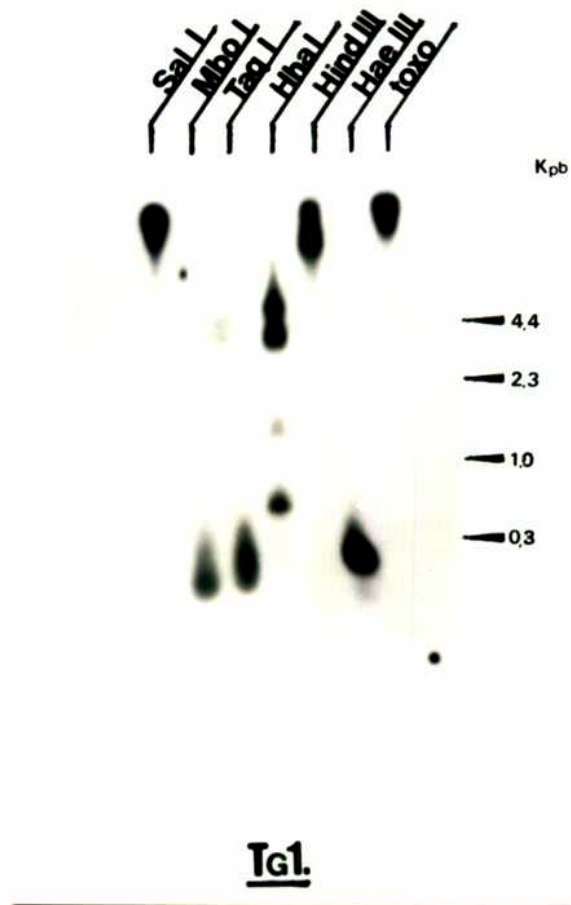
En un primer análisis (**figuras 24, 25 y 26**) utilizando las enzimas Sal I ( $5'\text{G}\downarrow\text{TCGAC }3'$ ), Mbo I ( $5'\downarrow\text{GATC }3'$ ), Taq I ( $5'\text{T}\downarrow\text{CGA }3'$ ), Hha I ( $5'\text{GCG}\downarrow\text{C }3'$ ), Hind III ( $5'\text{A}\downarrow\text{AGCTT }3'$ ) y Hae III ( $5'\text{GG}\downarrow\text{CC }3'$ ), se obtuvieron patrones de hibridización semejantes entre Tg6 y Tg8 (**figuras 25 y 26**). Sin embargo la sonda Tg1 originó un patrón completamente diferente (**figura 24**).

Comparando los patrones de hibridización de Tg6 y Tg8, se observa que estos hibridizan con idénticos fragmentos de restricción ubicados en la zona correspondiente a bajo peso molecular (entre 1.2 y 0.2 Kpb), aunque la intensidad de la señal de cada uno de los fragmentos hibridizados varía según la sonda utilizada (comparar los patrones de Sal I, Mbo I, Hae III y Taq I).

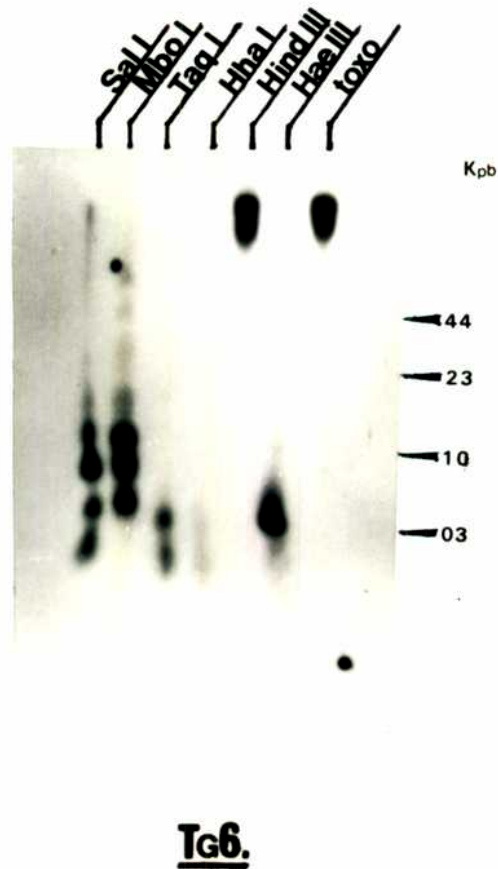
Sin embargo, cuando analizamos más detalladamente el patrón de hibridización para las enzimas Mbo I y Sal I en la zona de mayor peso molecular (entre 23 y 0.8 Kpb) (**figura 27**) se observan diferencias significativas entre los patrones de hibridización con

las tres sondas. Así, Tg1 sigue dando un patrón totalmente diferente a las otras dos sondas (Tg6 y Tg8) mientras que estas

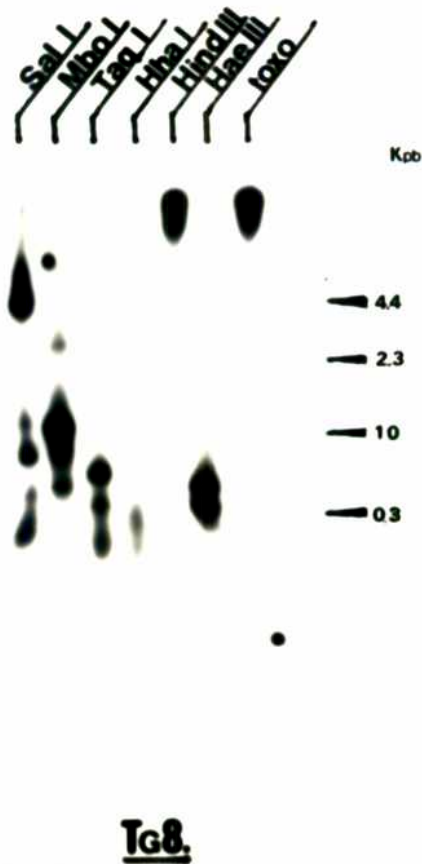




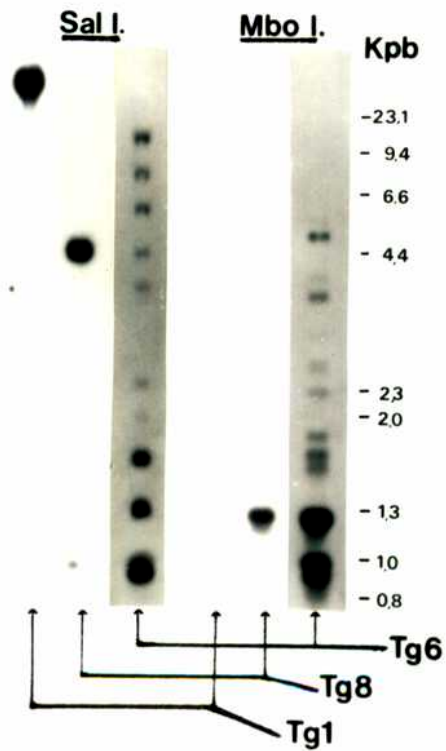
**Figura 24:** Southern Blot con Tg1. Muestras de ADN de taquizoitos fueron cortadas con las enzimas de restricción indicadas, transferidas a filtros de NC y estos hibridizados con el fragmento Tg1 radiomarcado con  $dCTP\alpha^{32}P$  por la técnica de "Random Primer". El camino denominado Toxo representa el ADN del parásito sin digerir



**Figura 25:** Southern Blot con Tg6. Muestras de ADN de taquizoitos fueron cortadas con las enzimas de restricción indicadas, transferidas a filtros de NC y estos hibridizados con el fragmento Tg6 radiomarcado con  $dCTP\alpha^{32}P$  por la técnica de "Random Primer". El camino denominado Toxo representa el ADN del parásito sin digerir.



**Figura 26:** Southern Blot con Tg8.  
Muestras de ADN de taquizoitos fueron cortadas con las enzimas de restricción indicadas, transferidas a filtros de NC y estos hibridizados con el fragmento Tg8 radiomarcado con  $dCTP\alpha^{32}P$  por la técnica de "Random Primer". El camino denominado Toxo representa el ADN del parásito sin digerir.



**Figura 27:** Southern blot con Sal I y Mbo I.  
Muestras de ADN de tachizoitos fueron cortadas con las enzimas Sal I y Mbo I e hibridizadas con cada uno de los fragmentos radiomarcados.

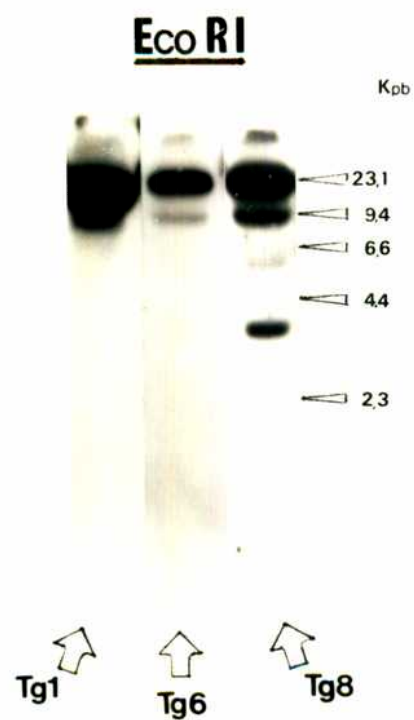


comparten hibridización solamente con los fragmentos de 1000, 1360 y 1700 pb de Sal I y 1000 y 1200 pb de Mbo I. Es evidente además la aparición de un fragmento de aproximadamente 4.4 Kpb que hibridiza mayoritariamente con la sonda Tg8.

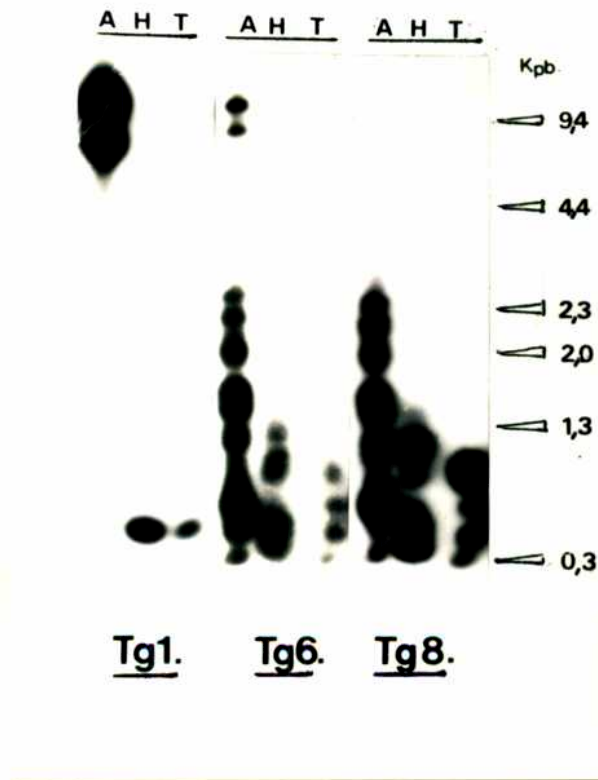
Por otro lado, el corte del ADN del parásito con la enzima Hha I (**figuras 24, 25 y 26**) genera subfragmentos muy pequeños conteniendo las secuencias Tg6 y Tg8 que se escapan fuera del gel durante la corrida y por lo tanto provocan la pérdida en la estequiometría de hibridización con estas dos sondas. En el caso de Tg1 con esta enzima (**figura 24**) se obtiene un patrón de hibridización formado por cuatro fragmentos de aproximadamente 0.6; 1.4; 3 y 5 Kpb.

En el caso en que el ADN del parásito fue digerido con la enzima Hind III, hibridizaron con las tres sondas únicamente fragmentos de alto peso molecular (ubicados cerca del origen del gel) mostrando un patrón muy parecido al material no digerido (Toxo). Cuando se realizó el mismo análisis pero esta vez con muestras de ADN de taquizoitos digeridas con la enzima Eco RI (5'G<sup>↓</sup>AATTG 3')(**figura 28**), se observó que las tres sondas hibridizaban con fragmentos de restricción de alto peso molecular (> de 9.4 kpb) aunque el fragmento con el cual hibridizó Tg1 demostró tener una leve variación en el tamaño con respecto al mayor de los fragmentos con el cual hibridizaron Tg6 y Tg8. Estos, parecen hibridizar con los mismos fragmentos de restricción (de aproximadamente 23 y 9 Kpb) aunque Tg8 hibridizó con 2 bandas adicionales de 4 y 6 Kpb.

La restricción de muestras de ADN del parásito con las enzimas Alu I (5'AG<sup>↓</sup>CT 3'), Hpa II (enzima utilizada para el clonado) y Taq I, corridas electroforéticamente y transferidas a filtros de NC (**figura 29**) mostró nuevamente una coincidencia importante en los patrones de hibridización de los fragmentos generados por estas enzimas y los clones Tg6 y Tg8, siendo evidente especialmente en el caso de la enzima Alu I. Solamente dos bandas de alto peso molecular (alrededor de 9.4 Kpb) son hibridizadas solamente con Tg6.



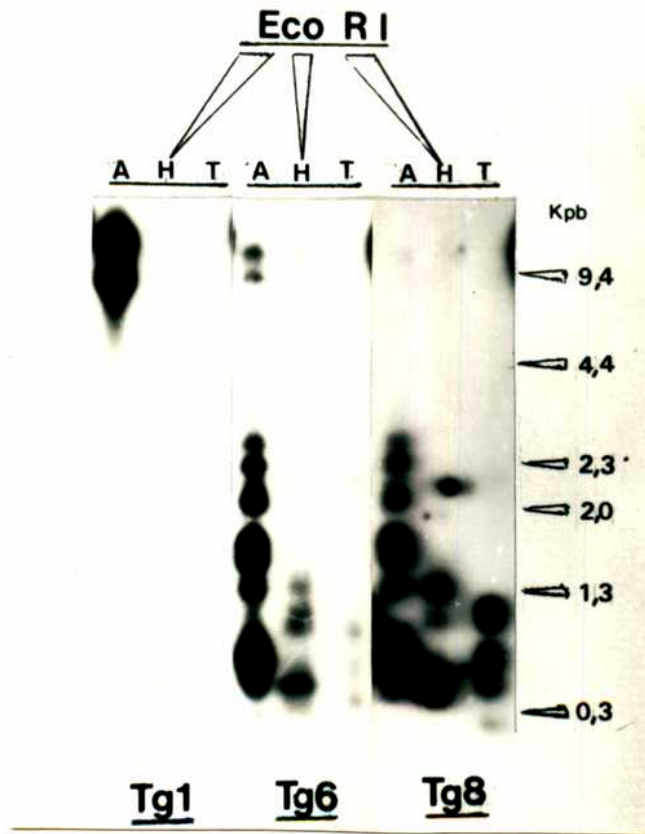
**Figura 28:** Southern Blot con Eco RI.  
Muestras de ADN de taquizoitos fueron cortadas con la enzima Eco RI e hibridizadas con cada uno de los fragmentos radiomarcados.



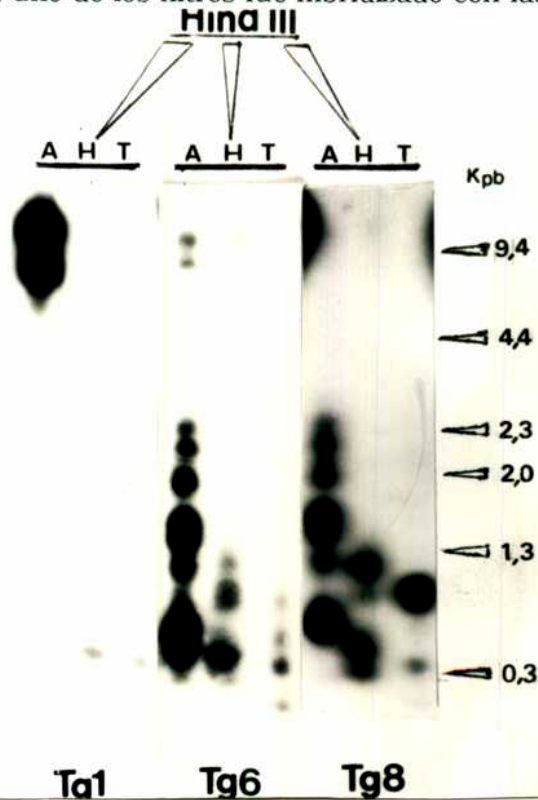
**Figura 29:** Southern Blot con Alu I, Hpa II y Taq I. Muestras de ADN de taquizoitos fueron cortadas con las enzimas Alu I (A), Hpa II (H) y Taq I (T) e hibridizadas con cada uno de los fragmentos radiomarcados.

los patrones de hibridización de los fragmentos generados por estas enzimas y los clones Tg6 y Tg8, siendo evidente especialmente en el caso de la enzima Alu I. Solamente dos bandas de alto peso molecular (alrededor de 9.4 Kpb) son hibridizadas solamente con Tg6.

Cuando previamente al corte con las enzimas antes mencionadas, el ADN de taquizoitos fue digerido con Eco RI (**figura 30**) o Hind III (**figura 31**) se pudieron registrar algunos cambios en la estequiometría de hibridización con Tg6 y Tg8 pero no así con Tg1.



**Figura 30:** Southern Blot realizando doble corte (Eco RI). Muestras de ADN de tachizoitos fueron cortadas previamente con la enzima Eco RI y posteriormente con cada una de las enzimas indicadas: Alu I (A), Hpa II (H) y Taq I (T). Cada uno de los filtros fue hibridizado con las tres sondas de ADN



**Figura 31:** Southern Blot realizando doble corte (Hind III). Muestras de ADN de tachizoitos fueron cortadas previamente con la enzima Hind III y posteriormente con cada una de las enzimas indicadas: Alu I (A), Hpa II (H) y Taq I (T). Cada uno de los filtros fue hibridizado con las tres sondas de ADN repetitivo radiomarcadas.

### 3.6 Secuenciación

Con el fin de determinar la secuencia de los tres fragmentos repetitivos se realizó el subclonado de los mismos en el genoma del fago M13 mp18 y 19.

Los fragmentos Tg1 y Tg6 fueron subclonados en el sitio Eco RI-Hind III del polylinker de ambos vectores de manera de obtener la secuencia completa.

Por otro lado, Tg8 que es el fragmento de mayor tamaño fue subclonado en dos partes aprovechando un sitio interno de reconocimiento para la enzima Eco RI. Así, el corte del plásmido que contiene el fragmento Tg8 (pTg8) con las enzimas Hind III y Eco RI libera del plásmido dos fragmentos: un fragmento Eco RI-Hind III denominado Tg8EH y un fragmento Eco RI-Eco RI denominado Tg8E.

El fragmento Tg8EH fue clonado en M13mp 18 y 19 para obtener su secuencia completa mientras el fragmento Tg8E solamente se clonó en M13mp 18 y posteriormente se seleccionaron los clones que poseían al fragmento en las dos orientaciones posibles.

De esta manera siguiendo el protocolo detallado en MyM (7.5 y 7.6) se obtuvieron las secuencias de Tg1 (**figura 32**), Tg6 (**figura 33**) y Tg8 (**figura 34**), de las que se desprenden un porcentaje en G + C de 43.8 ; 58 y 50 % para Tg1; Tg6 y Tg8 respectivamente.

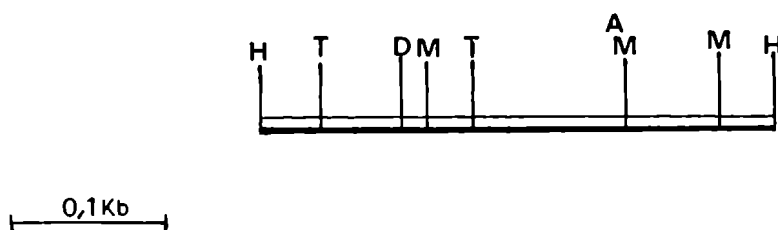
Las homología detectada entre estas tres secuencias por procesamiento informático (DNASIS V 3.00, Hitachi Software Engineering Co., LTD) no superó en ninguno de los casos el 57 %. Sin embargo, cuando se realizó el análisis interno de cada una, se observó que Tg6 esta formada por dos subunidades repetidas Sal I/Taq I de aproximadamente 340 pb a las que se denominó Tgsub6A y Tgsub6B (**figura 35.A**). Estas dos secuencias estan alineadas en tandem directos (es decir una tras otra en sucesión y en la misma dirección) determinando entre ellas un grado de homología del 84 % (**figura 35.B**). Dentro de cada una de ellas se encuentran secuencias (1 a 6 en la **figura 35.A**) que conservan el 100 % de homología, mientras las zonas entre ellas presentan diferencias atribuibles a deleciones o mutaciones puntuales.

En las secuencias Tg1 y Tg8, no se detectaron marcos de lectura de un largo significativo como para suponer su posible traducción a un producto peptídico. Sin embargo, en el caso de Tg6 fueron detectados 2 posibles marcos de lectura. Uno en la secuencia directa comenzando en el nucleótido 47 con un largo de 171 pb y otro en la secuencia complementaria, comenzando en el nucleótido 85 con un largo de 255 pb.

Ⓐ

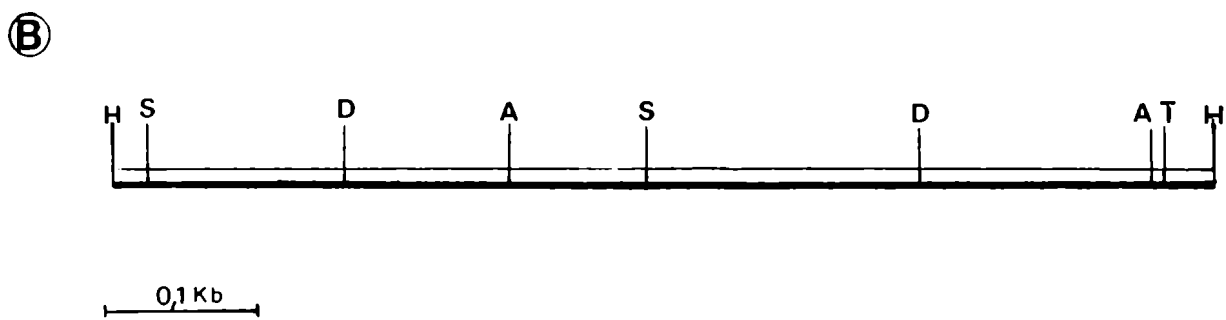
	10	20	30	40	50	60
5'	GTCGGAACT	AACTGCTATG	TAATGTCTTT	CAACTGTATA	TCGTTCGACG	TACGACTCAC
	70	80	90	100	110	120
	CGTTAGCATA	TCAGGCTAGC	GTACGCATGT	CTTATAGGCC	CACGAGGATA	CAAGGATCAA
	130	140	150	160	170	180
	TGAGCGAAAC	CATACACTTA	CTTCGACCAT	ATTTACGCTT	TCTTGTGACA	TACCTGTTAA
	190	200	210	220	230	240
	TCTAATTATA	TCTATCGTGC	AGTTGATGAC	ACATACAATA	GTAGCAAATC	TAGCTACGAG
	250	260	270	280	290	300
	ATCATACTCT	CTCATTATCA	CTCCCTCTCC	TTCTCCGCGC	AAGACACTCG	CTGTGCTTCT
	310	320				
	AGTGTGATCA	CCTCTCCGCT	GTTTCCGAC	3'		

Ⓑ



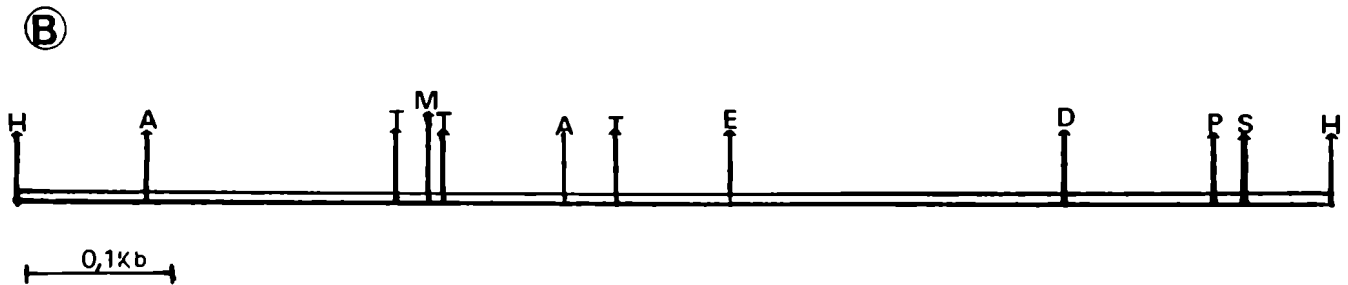
**Figura 32:** **A)** Secuencia de fragmento repetitivo Tg1. Este fragmento consta de 329 pb con un porcentaje en C+G de 43,8 %. **B)** Mapa de restricción para algunas de las enzimas más importantes (H: Hpa II; T: Taq I; D: Hae III, M: Mbo I, A: Alu I).

①  
 5' GTCGGCACTC GGCACGCACT GTCGACGTGC TGGGTGTGGC GGCGCTATGG TCGCTGTACG  
 70 80 90 100 110 120  
 TGAAAGAAAT CGTCGCGTAC CTCCGATGGT AGAGTTATTG TGTGTGTCGT TGTGCAGTCT  
 130 140 150 160 170 180  
 GTCTCCGATA TTGTTGACTT TTTTTCAGGG CCAGAGACGT AAGAGCAGAA AAGGTTGCTG  
 190 200 210 220 230 240  
 GGTCCTCTTC TGTGTCTTGA GCAACTGCCG CAGCACGTAG AGATTAGTGC TGATGGGGTC  
 250 260 270 280 290 300  
 ACCGCGCTGA GCGGTAGCTA GCTGGCGGGC GAGGCACTGT GCGGGCGGGA CTGGCATGTT  
 310 320 330 340 350 360  
 TCATTTGCGG CACAGGTGCT CCCGCAGGTC CGACATCACT CTGGCACCGA ATTGTCGACG  
 370 380 390 400 410 420  
 TGCTGGGTGT GGCGGCGCTC ATGGGTGCGC TGGTACGTGA AAGGAGAATC GTCGCTGTAC  
 430 440 450 460 470 480  
 CTGCGCGGAT GGGTCAGAGG TTATTGGTTG TGTGTGTCGT GCAGTCTGTC TCCGATATTG  
 490 500 510 520 530 540  
 TTGAGCGTTT TTTTCAGGGC CAGACGGTAA GAGCAGAAAG GTTGCTGGGC CCTCTTCTGT  
 550 560 570 580 590 600  
 GTCTTGAGGC AACTGCCGAG CACGAGAGAT TAGTGCTGAT GGGTCACGCG CTGAGGCGTA  
 610 620 630 640 650 660  
 CGTAGCTGGC GCGAGGCACT GTGCGGCGGA CGACATGTTT CATTTGCGGC ACAGGTGCTC  
 670 680 690 700 710 720  
 CCGCAGGTCC AGCATACTGG CACAGCTTGT TCGACGTGTG GTTGCGCGCC ATGGTCCGAC



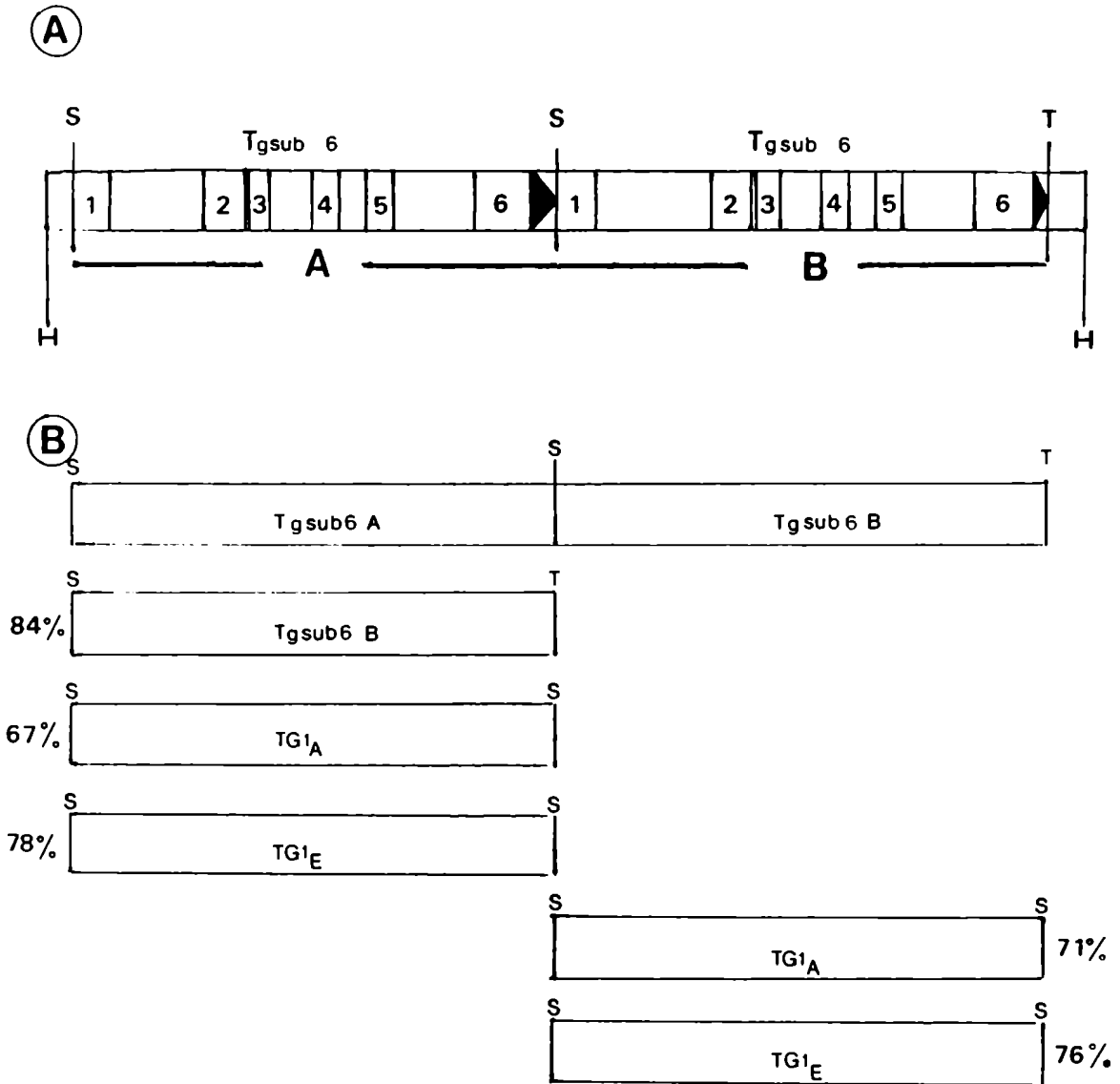
**Figura 33: A)** Secuencia de fragmento repetitivo Tg6. Este fragmento consta de 720 pb con un porcentaje en C+G de 58%. Los sitios para la enzima Sal I se encuentran subrayados. El sitio de Taq I se encuentra doblemente subrayado **B)** Mapa de restricción para algunas enzimas más importantes (H: Hpa II; T: Taq I; D: Hae III, A: Alu I, S: Sal I).

**(A)**  
 5' GTCGGACAGG ATGTTCTCTAC TGAGAAAATT ATGAGACACA GAGAATCTCA CAACAGCGAA  
 70 TGACGAACTC CGCGTGC GGA AAAGGCTTGA AGCTGGCGGC TAATGGGAGT TGTCATCTCA  
 130 ACACACCGCG ACGGAATCCT GATTCTACGT TCGTGTGTGC ACATTTGTTG AAACACGCAT  
 190 GCACAGAATG GCAAAC TCGG AATGGCAAAC TGC GAATGAG ACTAGAAAAG CCTACGGACT  
 250 ATACATCCGA ATATCGATGA AGAAATAACG ATCCATGAAT CGAACAAAGG TGGCTTTGAA  
 310 AGCAGACCTT GAAAATTTCT GCATGTGGAC TTGTTGCATT GACGAAGTGC AAGACAGTAA  
 370 CAGTTAGCTC AACTACGCCA GGGCTGCGCA ACACAGGCTC GAAACATTTT CCGTTCTGCA  
 430 ACATCTGTAT TTTCTCGTGT AGTGTCGTTA GCGATTATGT CACACATCCA ACATTGAATT  
 490 CGGGAACGAA TGAGCATGGA TATCAGACAT CGGTAAAGGT TATCGCGCAT CGCAGGACAG  
 550 ACACGCAGCC TCTGACGCGT GTCGGAAACA CGTCATCGCG TAGTTCACCA CCTGTACTCT  
 610 GCATGATGTA ATGCCCCCGA TGAAGCGCAA AGCAGGATTT CTAGTCTCCA TTCGGTCCCC  
 670 GTCCTGTACA TATGCAGCCA AGCCGCGAAG GCCCAAACA AATGCATACA GCGAATCATG  
 730 TCTCACCCGT TCCTCCATGT CCGCCAGACA ACCAGACAAG CCCGAGGCTG TGCCCCCGCG  
 790 CAACAGTCTG CCGTTCTGCA GAGTGATGTC GACATGCTGC GCGGCAATGA CGTCACATTC  
 850 ACGAAGGTCG CGCAGTATAC TATCCGAC 3'



**Figura 34: A)** Secuencia de fragmento repetitivo Tg8 clonado. Este fragmento consta de 868 pb con un porcentaje en C+G de 50%. El sitio de restricción para la enzima Sal I se encuentra subrayado. El sitio de corte de Eco RI se encuentra punteado. **B)** Mapa de restricción para algunas enzimas más importantes (H: Hpa II; T: Taq I; D: Hae III, M: Mbo I, A: Alu I, E: Eco RI, M: Mbo I, P: Pst I).





**Figura 35:** Análisis de la secuencia Tg6.  
**A)** Mapa de Tg6 mostrando las dos repeticiones en tandem de las secuencias (Tgsub6A y Tgsub6b) Las zonas numeradas en cada una de las secuencias representan los fragmentos que comparten 100% de homología. **B)** Comparación entre las subsecuencias que forman a Tg6 y las secuencias TG1A y TG1E clonadas por el grupo de Cristina y col, en 1991.

# CONCLUSIONES

## 1. Purificación

Como se mencionó anteriormente, *Toxoplasma gondii* es un parásito intracelular obligado. Debido a requerimientos bioquímicos aún no muy bien definidos necesita indefectiblemente de una célula para poder propagarse.

Hasta el momento se ha logrado la multiplicación de los parásitos en un amplio número de líneas celulares, aunque aún no ha podido superarse la eficiencia, la facilidad y el bajo costo que implica la amplificación de los taquizoitos en la cavidad peritoneal de ratones. Independientemente del sistema utilizado para el mantenimiento y propagación de los taquizoitos, todos los sistemas antedichos resultan en preparaciones del parásito contaminadas con material celular propio de cada uno de los sistemas. Este hecho trajo aparejado un retraso en los estudios bioquímicos y moleculares del parásito.

La cantidad absoluta de ADN estimada por parásito de acuerdo a mediciones microfluorométricas realizadas por el grupo de Cornelissen (Cornelissen y col., 1984) fue de  $7,7 \times 10^7$  pb mientras que el contenido de ADN de una célula eucariótica con un genoma diploide es casi 2 ordenes de magnitud mayor ( $5,2 \times 10^9$  pb). Esto implica que una contaminación del 1 % con células en una muestra de taquizoitos, implicará una contaminación del 50 % con el material genético del huésped.

Es por esto que nos propusimos desarrollar un método de purificación que nos brindara un grado mínimo de contaminación.

Desde hace algún tiempo se vienen proponiendo diferentes métodos para la purificación de los taquizoitos. Los primeros desarrollados (Fulton y Spooner, 1957; Tsunematsu, 1960; Lycke y Lunde, 1964) tenían como problemas fundamentales bajos niveles de rendimiento y grados de purificación no compatibles con un estudio de ácidos nucleicos.

La factibilidad de la utilización de un método de purificación en gran escala utilizando un gradiente zonal de densidad con alto rendimiento fue descrito en 1976 por Masihi y col. Utilizando un gradiente de Ficoll, estos autores consiguieron obtener preparaciones con 1 % de células de peritoneo de ratón y un rendimiento máximo del 70 %.

Mediante la utilización de un gradiente isopícnico en CsCl/Hoechst 33258, el grupo de Johnson y col. (1986) obtuvo preparaciones de ADN de *Toxoplasma gondii* con alrededor de un 90 % de pureza. Este método utilizado previamente para la purificación de ADN de *Plasmodium*, se basa en las diferencias en el contenido en G+C entre el genoma de este parásito y el de la célula huésped. Sin embargo, este método requiere una centrifugación de 16 hr a altas velocidades lo cual lo excluye para ser utilizado como un método de rutina.

Con el mismo fin y en paralelo, en nuestro laboratorio hemos desarrollado un método de purificación de taquizoitos de *Toxoplasma gondii*. Este método basado en las diferentes velocidades de sedimentación entre los taquizoitos y las células contaminantes, se llevó a cabo mediante dos gradientes discontinuos sucesivos en sacarosa (60-50-40 %) centrifugados durante 30 min. a baja velocidad (10.000 x g).

En este trabajo además, hemos demostrado a través de estudios de hibridización que la purificación permite la obtención de ADN con niveles de contaminación menores al 10 % (**figura 16**), lo que significa que nuestras preparaciones poseen un 99,9 % de pureza (1 célula del huésped cada 1000 taquizoitos).

Para la realización de una purificación de este tipo, es necesario como material de partida solamente parásitos provenientes de 10 ratones inoculados ( $5 \times 10^8$  taquizoitos) demostrándose en estas condiciones buenos niveles de rendimiento en el sistema de minipreparaciones (aproximadamente un 42 % del número inicial utilizado).

Por otro lado, este sistema tiene como ventaja adicional la posibilidad de obtención de taquizoitos viables, capaces de repetir el mismo cuadro de infección en ratones que los parásitos sin purificar. Esto implica que estos parásitos son altamente

calificados para su utilización en estudios bioquímicos como así también en la purificación de componentes parasitarios sin ningún tipo de interferencia con material del huésped. Como ejemplo de ello fue demostrada la purificación de cantidades óptimas de ARN total del parásito sin degradación evidente (**figura 19**) y obviamente la purificación de ADN del parásito.

## **2 Análisis parcial del genoma de *Toxoplasma gondii***

El ADN aislado de los parásitos purificados ha demostrado niveles de pureza compatibles con su empleo en reacciones de digestión con enzimas de restricción (**figura 17**), mostrando diferencias claras en los patrones de corte e hibridización con el material extraído de células eucarióticas superiores.

### **2.1 Grado de metilación del ADN del parásito**

Teniendo como control el ADN proveniente de células de ratón se pudo demostrar que existe una baja o nula frecuencia de metilación en las citosinas de la secuencia de reconocimiento para las enzimas Hpa II y Msp I (CCGG) del ADN de taquizoitos (**figura 17**).

Entre el 2 y el 7 % de los residuos citosina de las células animales se encuentran metilados, siendo las metilaciones más comunes las de las citosinas que forman el duplete CG.

La presencia de secuencias metiladas en el ADN ha sido relacionada con un decrecimiento de la actividad transcripcional (Reeves, 1984), influyendo esta metilación a pesar de encontrarse fuera de los genes en cuestión. Así, el resultado obtenido con el ADN de taquizoitos de *Toxoplasma gondii* podría ser interpretado como propio de un estadio muy activo del parásito. La importancia acreditable a la metilación en la regulación transcripcional del parásito podrá dilucidarse por análisis semejantes del ADN proveniente de otros estadios parasitarios.

### 3. Secuencias repetitivas

Mediante Southern Blot del ADN genómico total del parásito, se demostró la presencia de una gran variedad de secuencias repetitivas (**figura 18**). De las enzimas utilizadas, Hae III, Mbo I y Msp I o Hpa II tienen secuencias de reconocimiento determinadas por 4 nucleótidos, generando como es esperado, mayor número de fragmentos de bajo peso molecular que las enzimas cuya secuencia de corte está determinada por 6 nucleótidos (Eco RI, Pst I y Hind III). Por otro lado, el alto contenido en G+C que posee el genoma del parásito (57 %, Perroto y col., 1971) parece determinar la gran degradación de su genoma por enzimas como Hae III y Hpa II o Msp I cuyas secuencias de reconocimiento son 100 % G+C.

#### 3.1 El por que de la elección de las secuencias Hpa II

La elección de las secuencias repetitivas obtenidas por corte con Hpa II para la realización del clonado se debió no solo a su nivel de hibridización con ADN total del parásito sino también a que esta enzima produce fragmentos repetitivos de tamaños fácilmente clonables en un vector plasmídico (**figura 18**).

Además, la frecuente metilación que sufre la secuencia de reconocimiento para la enzima Hpa II en el genoma de las células de ratón (C<sup>m</sup>CGG) impide que se generen fragmentos de bajo peso molecular que contaminen los que provienen del genoma del parásito.

#### 3.2 Southern Blots. Análisis de las secuencias clonadas

El Análisis de los Southern Blot realizados con ADN total del parásito cortado con la enzima Sal I e hibridizados con Tg6 mostraron señales de bandas de aproximadamente 340, 680 (**figura 25**) 1000, 1300, 1700, 2000 y 2300 pb (**figura 27**), lo que implica una periodicidad de aproximadamente 340 pb. Este tamaño coincide con el determinado para cada una de las subunidades que forman parte de Tg6, demostrando que cada una de estas (las

Tgsub6s) serían las unidades mínimas de esta familia de secuencias repetitivas. El patrón de bandas en la hibridización determina una distribución en tándems directos de hasta 7 unidades siendo la causa del polimorfismo la desaparición azarosa de los sitios de restricción Sal I que los delimitan. Por ejemplo, el fragmento Tg6 clonado es un dímero del tándem en el cual uno de los tres sitios de reconocimiento para la enzima Sal I se ha convertido en un sitio Taq I por la aparición de una mutación puntual. (**Figura 33, 35**).

Paralelamente a nuestro trabajo en el laboratorio del Dr. Ambroise-Thomas (Cristina y Col., 1991a) se han clonado secuencias repetitivas de *Toxoplasma gondii* a partir de una genoteca de ADN total del parásito en el fago  $\lambda$ . Estas secuencias aisladas (TGR1A, TGR1E, TGR2 y TGR4) han demostrado tener entre ellas un gran nivel de homología, lo que permitió a sus autores reportarlas como pertenecientes a una familia de secuencias repetitivas del parásito. Comparando con nuestro estudio, cada una de las subunidades de Tg6 (Tgsub6 A y B), han mostrado gran nivel de homología con las secuencias clonadas por el grupo francés, especialmente con las secuencias TGR1A y TGR1E (**figura 35 B**) concluyendo que todas estas secuencias serían unidades mínimas de la misma familia de ADN repetitiva.

Por otro lado, la secuencia Tg8 mostró durante todo el análisis realizado por Southern Blot patrones de hibridización sumamente parecidos con los obtenidos con la secuencia Tg6 (ver enzimas Sal I, Mbo I, Eco RI, Alu I, Hpa II y Taq I; comparando Tg6 y Tg8 en **figuras 25, 26, 27, 28, 29, 30 y 31**). Sin embargo contrariamente a lo esperado, luego de la secuenciación no se encontró entre estos dos fragmentos la homología acorde a las exigencias impuestas en nuestras hibridizaciones (homología  $\geq 90$  %). Por lo tanto, ambas secuencias debían encontrarse muy cercanas dentro del genoma del parásito para dar patrones tan similares.

Esta hipótesis fue finalmente comprobada por dos datos importantes: En primer lugar se encontró hibridización de ambas secuencias con una banda Sal I menor de 300 pb (enzima Sal I, **figuras 25 y 26**), y en segundo lugar la presencia en Tg6 y Tg8 de un sitio Sal I cerca de uno de sus extremos (**figuras 33 y 34**). Esto

determina la presencia de un espaciador entre ambas secuencias causante de los patrones de hibridización similares.

Si por otro lado tenemos en cuenta el patrón de hibridización obtenido con Tg6 y Tg8 de los fragmentos generados por la enzima Eco RI (**figura 28**) podemos concluir que ambos reconocen 2 bandas de alto peso molecular dentro de los cuales se encontrarían representados en forma conjunta. La presencia de dos bandas adicionales en el patrón obtenido al hibridizar exclusivamente con Tg8 (fragmentos de aproximadamente 4 y 6 Kpb, **figura 28**) indica que parte del total de las secuencias Tg8 que hay en el genoma del parásito se encontrarían separadas de Tg6.

Por último en todos los análisis realizados en paralelo con Tg1, se mostró total independencia de este fragmento con respecto a Tg6 y Tg8 aún en la hibridización con fragmentos de alto peso molecular. Esto indica que Tg1 se encontraría topológicamente alejada de estas dos secuencias.

### **3.3 Número de repeticiones de secuencias clonadas**

De los tres clones elegidos para trabajar, Tg6 es el que se encuentra en mayor número de copias dentro del genoma del parásito (aproximadamente 1000 copias en su genoma haploide) (**figura 22**). Dado que el fragmento Tg6 clonado está formado por dos subsecuencias (Tgsub6) dispuestas en tándem (**figura 35.A**), concluimos que cada una de estas se repetiría 2000 veces dentro del genoma.

Conociendo que el fragmento Tg6 posee un tamaño de 720 pb y el genoma haploide de *T. gondii* consta de  $7.7 \times 10^7$  pb, (Cornelissen y col., 1984) se desprende que este fragmento ocuparía casi el 1 % del genoma. Haciendo el mismo cálculo para Tg8 (250 copias y 868 pb) y Tg1 (60-70 copias y 329 pb), se obtiene que éstas en forma conjunta ocuparían el 0.3 % del total del genoma.

Debido a la gran variabilidad demostrada en cada una de las unidades Tgsub6 es posible que las condiciones de lavado impuestas en este experimento nos haga subestimar el número de este fragmento en el genoma. Por lo tanto, el valor de 1 % sería el porcentaje mínimo de genoma ocupado por esta secuencia.

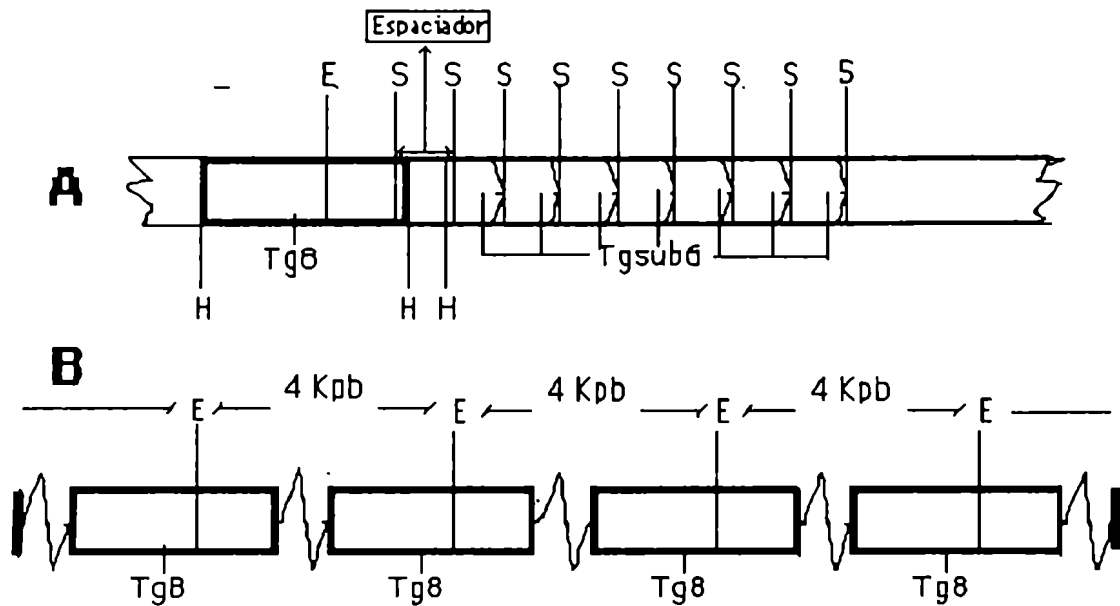
El porcentaje que una familia de estas secuencias ocupa del genoma de parásitos protozoarios varía según las especies y el origen. Así, por ejemplo en *Plasmodium falciparum* también perteneciente al phylum *Apicomplexa* Levine 1970 (Levine 1985) la familia más repetitiva de su genoma es de origen nuclear y ocupa entre 1 y 10% (Aslund y col, 1985; Barker, 1990). Por otro lado, en el caso de los parásitos pertenecientes al orden *Kinetoplastida* (*Trypanosoma* y *Leishmania*) el porcentaje varía entre el 1 al 10 % si es de origen nuclear (Wincker y col. 1990; Ellis y Crampton, 1988) y es de alrededor del 10 % si son de origen minicromosomal (Sloof y col., 1983; González y col., 1984).

A diferencia de nuestro trabajo, el grupo francés (Cristine y col. 1991a) ha obtenido los fragmentos pertenecientes a la familia Tgsub6 a partir de una genoteca de ADN total del parásito, siendo el clon aislado el que dio la señal más fuerte. Este hecho junto al porcentaje que estos fragmentos ocupan del genoma de *T. gondii* nos indicaría que la familia Tgsub6 sería una de las secuencias más repetidas dentro del genoma del parásito.

### 3.4 Modelo de la disposición de las secuencias

En base al análisis realizado con estas secuencias en los experimentos de Southern Blot se propone un modelo que resume la disposición de éstas en el genoma de la cepa RH de *Toxoplasma gondii* (figura 36). El panel A representa los tándems directos de entre 5 y 7 secuencias Tgsub6 (unidad mínima de la familia Tg6) determinado por la presencia de fragmentos de restricción Sal I con una multiplicidad de aproximadamente 340 pb. Muy cercano al tándem de Tgsub6 se encontraría el fragmento Tg8 separado solamente por un fragmento **espaciador** Sal I de pequeño porte. Este sería el vínculo entre ambas secuencias y justificaría los patrones de hibridización compartidos por ambas. La orientación del fragmento Tg8 con respecto al tándem de unidades Tgsub6s se encuentra definido por la localización del sitio de restricción para la enzima Sal I en este fragmento.





**Figura 36:** Posible disposición de las secuencias Tg8 y Tgsub6s en el genoma de *T. gondii*

Además, la presencia de dos fragmentos Eco RI que solamente hibridizan con Tg8 (**figura 28**) nos hace postular que estas secuencias contienen tándems de Tg8 en forma pura en algún lugar del genoma y no intercalada con fragmentos Tg6sub6 (**figura 36.B**).

Debido al número de copias asignado para cada fragmento en el genoma del parásito (**figura 22**), y estimando que Tg8 se encuentra en forma aislada en un 10 % de los casos determina que solamente 1 fragmento de Tg8 estaría adosado a cada uno de los tándems de Tgsub6s. De esta manera, podemos decir que al menos 225 estructuras mixtas como las propuestas (1 Tg8 y tándem de Tgsub6) estarían distribuidas en el genoma del parásito.

La localización de Tg1 no puede ser determinada con precisión con los datos obtenidos hasta aquí, pero éstos sugieren la posibilidad de que esta secuencia tenga una distribución totalmente independiente a las de Tg6 y Tg8 en el genoma del parásito.

### 3.5 Clasificación de las secuencias repetitivas clonadas

Dentro de las denominadas secuencias repetitivas, las más numerosas en los genomas de eucariotas son las pertenecientes al grupo de ADN satélites. Estas secuencias han sido estudiadas en un amplio número de especies, teniendo en común que todas están formadas por una secuencia consenso repetida en tándem un gran número de veces (Hardman y col., 1986).

Además los componentes de estas secuencias pueden presentar un amplio grado de variación alrededor de la secuencia consenso. Estas variaciones han sido observadas no solamente entre especies cercanas sino también dentro de la misma especie o individuo (Miklos y Gill, 1981).

Generalmente el ADN satélite se encuentra en las regiones más condensadas de la heterocromatina cromosómica no teniendo en la mayoría de los casos capacidad de transcripción (Hardman y col., 1986).

Secuencias del tipo satélite parecen estar también muy representadas en el ADN de los protozoos. Así por ejemplo han sido encontradas en *Trypanosoma cruzi* (Sloof y col., 1983; Wincker y col., 1990) *Leishmania donovani* (Ellis y Crampton, 1988) y en *Plasmodium falciparum* (Aslund y col., 1985) entre otros.

En nuestro estudio de secuencias repetitivas de *T. gondii* hemos detectado 3 secuencias que se encuentran repetidas en mayor o menor grado dentro de su genoma.

Por un lado, ninguna de estas secuencias hibridizó con ARN total del parásito, lo que demuestra, que estas no son transcriptas en el estadio de taquizoito. Solamente la secuencia Tg6 tendría marcos de lectura abiertos de un tamaño significativo aunque de ser utilizados deberían serlo en otro estadio parasitario.

Las tres secuencias han demostrado tener diferente naturaleza siendo la secuencia Tg6 la que encuadraría a priori dentro del grupo de ADN satélite del parásito. Esta familia como se demostró estaría dispuesta en un arreglo de tándems directos habiendo entre las unidades que la componen diferencias que alcanzan al 12

% (número de cambios de base + deleciones/número de bases totales). Esta diferencia que se obtiene de la comparación de Tgsub6A y B indicaría diferencias intraindividuales (provenientes de un único clon) mientras que las intraespecíficas obtenidas de la comparación de éstas con las secuencias detectadas por Cristina y col. llegan hasta el 30%. Estas variaciones provocan polimorfismos en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLPs) hecho que ha sido utilizado por el grupo del Dr. Ambroise-Thomas para la caracterización de cepas del parásito (Cristina y col. 1991b).

Por otro lado aún no se puede inferir si estas secuencias se encuentran ubicadas en un determinado cromosoma o si están dispersas en todo el genoma con una localización específica (por ejemplo formar parte de secuencias teloméricas).

Según estudios realizados mediante la técnica de pulse field gel electrophoresis (PFGE) se ha determinado que el número máximo de cromosomas en el parásito sería de 5 (Candolfi y col., 1989). La detección de las secuencias repetitivas en experimentos de Southern realizados luego del uso de esta técnica permitirá dilucidar la localización de cada una de éstas en el genoma.

En el caso de Tg1 no se han obtenido datos como para ubicarla en un determinado grupo de secuencias repetitivas. Por lo pronto no se le ha podido detectar ningún tipo de multiplicidad en los fragmentos de restricción con las enzimas utilizadas, de manera que no está claro si está organizada como un tándem.

Por otro lado Tg8 parece encontrarse en la mayoría de los casos acompañando los tandem de Tg6. La asociación entre estas dos secuencias probablemente forme parte de una estructura mayor dentro de los cromosomas de *T. gondii*.

### **3.6 Posible origen de estas secuencias**

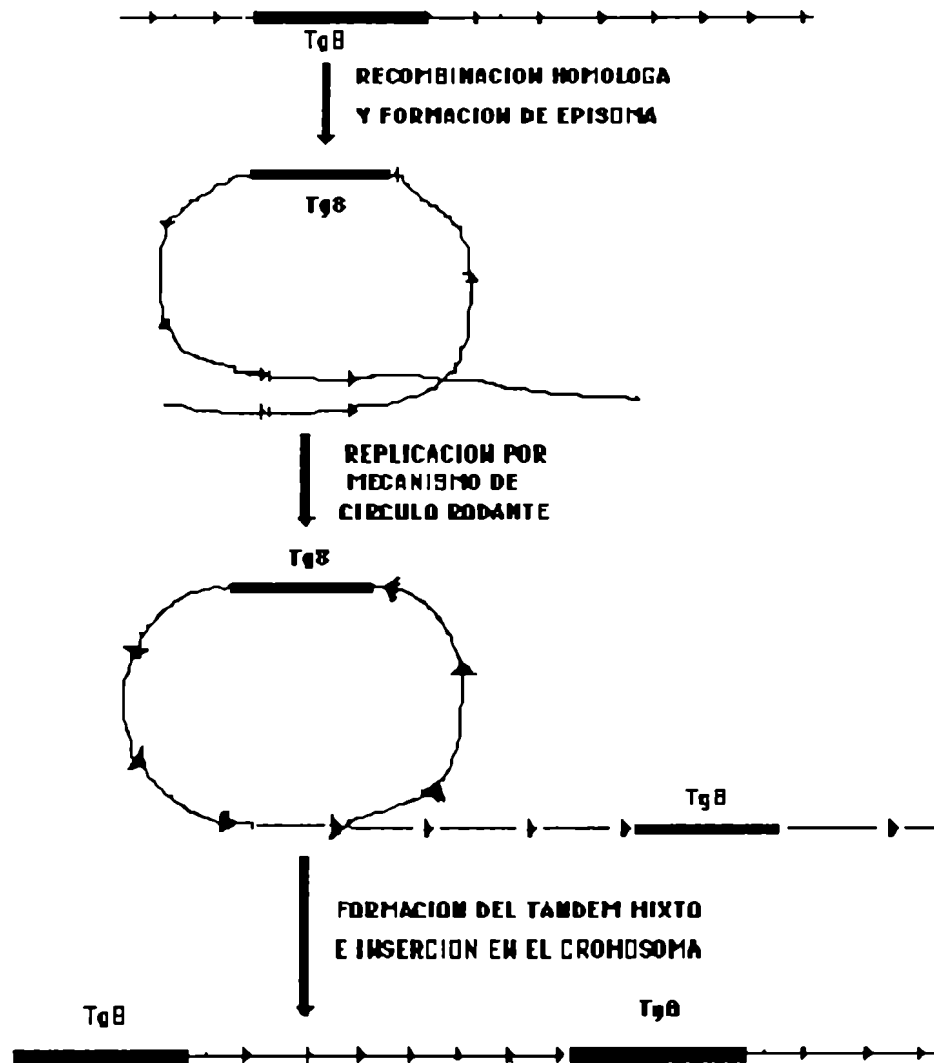
Con respecto al proceso de amplificación que origina una determinada secuencia en tándem se han utilizado una serie de hipótesis siendo la de la recombinación desigual la más reconocida (John y Miklos, 1979). La recombinación desigual es un evento raro que ocurre debido a una recombinación ilegítima entre cromátides hermanas durante la mitosis, o entre cromosomas

homólogos durante la meiosis. Este proceso producto del desalineamiento de determinadas secuencias, resulta a posteriori de la recombinación, en la duplicación en tándem de la secuencia en una de las cromátides y una delección equivalente en la otra.

Por otro lado, Walsh, en 1987 describió un modelo basado en la recombinación homóloga intracatenaria de una secuencia ya estructurada en secuencias repetitivas que se escinde y da como resultado un elemento extracromosómico. Si este elemento contiene un origen de replicación, se replicará mediante un mecanismo de círculo rodante resultando en largas cadenas con el elemento inicial multiplicado en tándem. Por último, las secuencias así amplificadas se volverán a insertar en algún sitio del cromosoma por recombinación homóloga (sobre tándems preamplificados) o por recombinación ilegítima.

En el caso de las secuencias repetidas descritas en este trabajo encontramos por un lado secuencias Tg8 en tándem separados del resto y secuencias de Tgsub6 preamplificada en tándem. Estos provendrían de la amplificación por un mecanismo de recombinación desigual ya que el número de copias no es importante.

Sin embargo se puede explicar la amplificación de los tándems mixtos Tgsub6 y Tg8 mediante el modelo de Walsh debido a la diferente tasa de amplificación que parecen haber tenido estas secuencias. Para esto (**figura 37**), un tándem de Tgsub6 con un Tg8 incluido (proveniente posiblemente de una inversión), se circularizaría y escindiría dando un episoma que posteriormente a su replicación por el mecanismo de círculo rodante, dará múltiples secuencias de éstas en tándem.



**Figura 37:** Modelo de amplificación del tándem mixto Tg8-Tgsub6s

Posteriormente estas secuencias se introducirán por los mecanismos explicados, en el genoma concluyendo con el arreglo existente.

Evidencias del modelo de Walsh han sido demostradas en secuencias satélites de roedores argentinos (Rossi y col. 1990) postulando este tipo de amplificación para explicar el patrón de periodicidad que guardan estas secuencias.

### 3.7 Implicancias posteriores de estas secuencias

La utilización de secuencias repetitivas para el diagnóstico de parásitos ha sido implementada desde el comienzo de la década pasada y desarrollada intensivamente para cada uno de los parásitos más estudiados. Estos estudios han comenzado con la detección de *P. falciparum* (Franzen y col., 1984; McLaughlin y col., 1987), *L. donovani* (Barker y Butcher, 1983) y *T. cruzi* (González y col., 1984; Macina y col., 1987).

En el caso de *T. gondii* hasta el momento solamente han sido utilizadas secuencias provenientes de genes de bajo número de copias para la detección del parásito en muestras biológicas utilizando la técnica de PCR (Burg y col., 1989; Grover, 1990; Savva y col., 1990; Holliman y col., 1990; Weiss y col., 1991).

Hay una serie de etapas a seguir en el desarrollo de sondas con estos fines. La primera y fundamental es el aislamiento de sondas del parásito, su caracterización y el análisis de su especificidad. Posteriormente se desarrolla la metodología a seguir con las muestras en las cuales se realizará la detección y como última etapa se realizan las pruebas de campo con la mayor cantidad de muestras posibles comparando el nuevo método con los ya existentes.

Estos pasos posteriores a la caracterización se encuentran en pleno desarrollo en nuestro laboratorio, siendo hasta el momento los resultados altamente satisfactorios. La prueba final de campo en última instancia indicará el grado de éxito logrado con el diagnóstico por sondas moleculares.

## BIBLIOGRAFIA

- Aaij C. y Borst, P. (1972). The gel electrophoresis of DNA. *Biochem. Biophys. Acta* **269**, pg 192-200.
- Angel, S., Blanco, J. C., Maero, E., Pszeny, V. y Garberi, J. (1991a). Repetitive DNA sequences of *Toxoplasma gondii* for development of diagnostic probes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **86**, 4, pg 483-484.
- Angel, S., Blanco, J., Romano, L., Maero, E. y Garberi, J. (1991b). Técnica de hibridización de ADN para la detección de *Toxoplasma gondii*. *Medicina Bs. As.* **51**, 2, pg 185-186.
- Asai, T., Kim, T., Kobayashi, M. y Kojima, S. (1987). Detection of nucleoside triphosphate hydrolase as a circulating antigen in sera of mice infected with *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity* **55**, pg 1332-1335.
- Åslund, L., Franzén, L., Westin, G., Persson, T., Wigzell, H. y Pettersson, U. (1985). Highly reiterated non-coding sequence in the genome of *Plasmodium falciparum* is composed of 21 base pair tandem repeats. *J. Mol. Biol.* **185**, pg 509-516.
- Barker, D. C. y Butcher, J. (1983). The use of DNA probes in the identification of leishmaniasis: Discrimination between isolates of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **77**, pg 285-297.
- Barker, D. C. (1989). Molecular Approaches to DNA Diagnosis. *Parasitology*, **99**, pg S125-S126.
- Barker Jr, R. H. (1990). Minireview: DNA probe diagnosis of parasitic infections. *Experimental Parasitology* **70**, pg 494-499.

- Barker Jr., R. H., Suebsaeng, L., Rooney, W., Alecrim, G. C.,  
Dourado, H. V. y Wirth, D. F. (1986) Specific DNA probe for  
the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. *Science*  
**231**, pg 1434-1436.
- Barker Jr., R. H., Suebsaeng, L., Rooney, W. y Wirth, D. F., (1989).  
Detection of *Plasmodium falciparum* infection in human  
patient: A comparison of the DNA probe method to  
microscopic diagnosis. *Am. J. of Trop. Med. Hyg.* **41**(3), pg  
266-272.
- Birnboim, H. y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction  
procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic  
Acid Research*, **7**(6), pg 1513-1522.
- Blanco, J. C., Angel, S. O., Maero, E., Pszeny, V., Serpente, P. y  
Garberi, J. (1992). Cloning of repetitive DNA sequences from  
*Toxoplasma gondii* and their usefulness from parasite  
detection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **46** (3), pg 350-357.
- Blanco, J. C., Serpente, P., Angel, S., Pszeny, V. y Garberi, J.  
(1990). Cloning and preliminary characterization of  
repetitive sequences of genomic DNA from *Toxoplasma  
gondii*. *J. Protozool.*, **37**, 1, abs 105, 1990.
- Bommer, W., Hofling, K. H. y Heunert, H. H (1969). Multiplication  
of *Toxoplasma gondii* in cell culture. *Ger. Med. Mon.* **14**, pg  
1-12.
- Borst, P., Overdulve, P., Weijers, P. J., Fase-Fowler, F. y Van Den  
Berg, M. (1984) DNA circles with cruciforms from *Isospora  
(Toxoplasma) gondii*. *Biochimica et Biophysica Acta* **781**, pg  
100-111.
- Brooks, R. G. y Remington, J. S. (1986). Transplant-related  
infections, In: *Hospital Infections* (Bennett, J. V. and



- Brachman, P. S., eds.), pg 581-618, Little, Brown and Company, Boston.
- Burg, J. L., Grover, C. M., Pouletty, P. y Boothroyd, J. C. (1989). Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii* by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **27**, pg 1787-1792.
- Brutlag, D. L. (1980). Molecular arrangement and evolution of heterochromatic DNA. *Annu. Rev. Genet.* **14**, pg 121-144.
- Busslinger, M., deBoer, E., Wright, S., Grosveld, F. G. y Flavell, R. A. (1983). The sequence GGC<sup>m</sup>CGG is resistant to Msp I cleavage. *Nucleic Acid Research*, **11**(11), pg 3559-3561.
- Candolfi, E., Arveiler, B., Mandel, J. L. y Kien, T. (1989). Structure du génome de *Toxoplasma gondii*. Premiers résultats. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* **7**, pg 27-32.
- Cesbron-Delauw, M. F., Guy, B., Torpier, G., Pierce, R. J., Lenzen, G., Cesbron, J. Y., Charif, H., Lepage, P., Darcy, F., Lecocq, J. P. y Capron, A. (1989). Molecular characterization of a 23-kilodalton antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, pg 7537-7541.
- Cornelissen, A. W. C. A., Overdulve, J. P y Van der Ploeg, M. (1984). Determination of nuclear DNA of five Eucoccidian parasites, *Isospora (Toxoplasma) gondii*, *Sarcocystis cruzi*, *Eimeria tenella*, *E. acervulina* and *Plasmodium berghei*, with special reference to gamontogenesis and meiosis in *I. (T.) gondii*. *Parasitology*, **88**, pg 531-553.
- Cristina, N., Fiaud, M., Santoro, F., Oury, B. y Ambroise-Thomas, P. (1991a). A family of repeated DNA sequences in *Toxoplasma gondii*: Cloning, sequence analysis and use in strain characterization. *Experimental parasitology* **73**, pg 73-81.

- Cristina, N., Oury, B., Ambroise-Thomas, P. y Santoro, F. (1991b). Restriction-fragment-length polymorphisms among *Toxoplasma gondii* strains. *Parasitol. Research* **77**, pg 266-268.
- Crouse, J. y Amorese, D. (1987). Ethanol precipitation: ammonium acetate as an alternative to sodium acetate. *Focus*, **9**(2), pg 3-5.
- Davis, L. G., Dibner, M. D. y Battey, J. F. (1986). *Molecular Biology*. Elsevier Science Publishing Co., N. Y, 10017.
- Derawin, F., Beauvois, B. y Lariviere, M. (1986). Serological study of the prevalence of toxoplasmosis in 167 patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) or Chronic Lymphadenopathy Syndrome (LAS). *Biomedicine and Pharmacology*. **40**, pg 231-232.
- Desmots, G. y Couveur, J. (1979). Congenital toxoplasmosis: a prospective study of the offspring of 542 women who acquired toxoplasmosis during pregnancy. *Pathophysiology of congenital disease*. (Thalahammer, Baumgarten and Pollak, eds.): Perinatal medicine, Sixth European Congress, Stuttgart, George Thieme publishers. pg 51-60.
- Desmots, G. y Couvreur, J. (1974). Toxoplasmosis in pregnancy and its transmission to the fetus, *Bill. New. York. Acad. Med.*, **50**(2), pg 146.
- Desmots, G. y Remington, J. S. (1981). Immunoglobuline M-Immunsorbent Agglutination Assay for diagnosis of infectious diseases: diagnosis of acute congenital toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* **14**, pg 1486-1491.
- Desmots, G.(1973).Toxoplasmose oculaire.Etude épidémiologique. (Bilan de 2030 examens d'humeur aqueuse). *Arch. Ophthalmol.* **48**, pg 165-172.

- Doran, D. J. (1973) Cultivation of *Coccidia* in avian embryos and cell culture, en Hammond, D. M. y Long, P. L. eds., *The Coccidia*. University Park Press, Baltimore, pg 183-252.
- Dubbey, J. P., Miller, N. L. y Frenkel, J.(1970). Characterization of a new fecal form of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* **56**, pg 447-456.
- Dubbey, J. P., Miller, N. L. y Frenkel, J.(1970). The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J. Exp. Med.* **132**, pg 636-662.
- Dubey, J. P. y Beattie, C. P. (1988). *Toxoplasmosis of animals and man*. Boca Raton, Fla: CRC Press Inc, pg 1-220.
- Dubey, J. P. y Urban, J. F.(1990). Diagnosis of transplacentally induced toxoplasmosis in pigs. *Am. J. Vet. Res.* **51**(8), pg 1295-1299.
- Dubey, J. P.(1986). A review of toxoplasmosis in pigs. *Vet. Parasitol* **19**, pg 181-223.
- Dubey, J. P., Miller, S., Desmouts, G., Thulliez, P. y Anderson, W. R.(1986a). *Toxoplasma gondii*-induced abotion in dairy goats. *JAVMA*, **188**(2), pg 159-162.
- Dubey, J. P., Miller, S., Powell, E. C. y Anderson, W.(1986b). Epizootiologic investigation on a sheep farm with *Toxoplasma gondii*-induced abotion. *JAVMA*, **188**(2), pg 155-158.
- Dupouy-Camet, J., Lavareda de Souza, S., Bougnoux, M. E., Mandelbrot, L., Hennequin, C., Dommergues, M., Benarous, R. y Tourte-Schaerfer, C. (1990). Preventing congenital toxoplasmosis. *The Lancet* **336**, pg 1017-1018.

- Ellis, J. y Crampton, J. (1988). Characterization of a simple, highly repetitive DNA sequence from the parasite *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **29**, pg 9-18.
- Feinberg, A. P. y Vogelstein, B. (1984). Addendum: a technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specificity. *Anal. Biochem.* **137**, pg 266-267.
- Franzen, L., Shabo, R., Perlman, H., Wigzell, H., Westin, G., Aslund, L., Perreson, T. y Petterson, U. (1984). Analysis of clinical specimens by hybridization with a probe containing repetitive DNA from *P. falciparum* malaria. *Lancet* **1**, pg 525-527.
- Frenkel, J. K. (1973). Toxoplasmosis: Parasite life cycle, Pathology and immunology. En Hammond, D. M (ed.): *The coccidia*, Baltimore, University Park Press, pg 343-410.
- Frenkel, J. K. (1974). Pathology and pathogenesis of congenital toxoplasmosis. *Bull. N Y Acad. Med.* **50**, pg 182-191.
- Frenkel, J. K., (1976). Toxoplasmosis. In: *Pathology of tropical and extraordinary diseases.*(Binford and Connor Eds). Armed Force Institute of Pathology, Washington, D.C., pg 284-300.
- Frenkel, J., Dubey, J. P. y Miller, N. L.(1970). *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science* **167**, pg 893-896.
- Fulton, J. D. y Spooner, D. F. (1957). Preliminary observations on the metabolism of *Toxoplasma gondii*. *Trans. of the Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg.* **31**, pg 123-124.
- Fulton, J. D. y Turk, J. L. (1959). Direct agglutination test for *Toxoplasma gondii*. *Lancet*, **11**, pg 1068-1069.

- Garberi, J. C., Blanco, J. C., Angel, S. O. Pszeny, V., Arakelian, M. C. y Pastini, A. (1990). *Toxoplasma gondii*: A rapid method for the isolation of pure Tachyzoites. Preliminary characterization of its genome. Mem. Osw. Cruz, **88**, 4, pg 429-434.
- Gibson, W. C., Dukes, P. y Gashumba, J. K. (1988). Species-specific DNA probes for the identification of african trypanosomes in tsetse flies. Parasitology **97**, pg 63-73.
- Goldman, M. (1957). Staining *Toxoplasma gondii* with fluorescein labelled antibody. II A new serological test for antibodies to *Toxoplasma* based upon inhibition of specific staining. J. Exp. Med. **105**, pg 459-473.
- Goldman, M., Carver, R. K. y Sulzer, A. J. (1957a). Similar internal morphology of *T. gondii* and *Besnoitia jellisoni* stained with silver protein. J. Parasitology. **43**, pg 490-491.
- Goldman, M., Carver, R. K. y Sulzer, A. J. (1958). Reproduction of *T. gondii* by internal budding, J. Parasitology., **44**(2), pg 161.
- Gonzalez, A., Prediger, E., Huecas, M. E., Nogueira, N. y Lizardi, P. M. (1984). Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: Its use in a high-sensitivity detection assay. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, pg 3356-3360.
- Gransden, W. R. y Brown, P. M. (1983). Pneumonia and disseminated toxoplasmosis in a male homosexual. Br. Med. J. **286**, pg. 1614.
- Grover, C. M., Thulliez, P., Remington, J. S. y Boothroyd, J. C. (1990). Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction in amniotic fluid. J. Clin. Microbiol. **22**, pg 2297-2301.

- Hammond, D. M. (1973). Life cycle and development of *Coccidia*, en Hammond, D. M. and Long, P. L. eds., *The Coccidia*. University Park Press, Baltimore, pg 45-79.
- Hardman, N. (1986). Structure and function of repetitive DNA in eukariotes. *Biochem. J.* **234**, pg 1-11.
- Hassl, A. y Aspöck, H. (1990). Detection and Characterization of circulating antigen in acute experimental infection of mice with four different strain of *Toxoplasma gondii*. *Zbl. Bakt. Hyg.* **272**, pg 526-534.
- Hassl, A., Aucr, H., Hermentin, K., Picher, O. y Aspöck, H. (1987). Experimental studies on circulating antigen of *Toxoplasma gondii* in intermediate hosts: Criteria for the detection and structural properties. *Zbl. Bakt. Hyg.* **263**, pg 625-634.
- Holliman, R. E., Johnson, J. B. y Savva, D. (1990). Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in association with AIDS using the polymerase chain reaction. *Scand. J. Infect. Dis.* **22**, pg 243-244.
- Holmberg, M., Vaidya, A. B., Sheton, F. C., Snow, R. W., Greenwood, B. M. Wigzell, H. y Pettersson, U. (1990). A comparison of two DNA probes, one for *Plasmodium falciparum* and one with wider reactivity, in the diagnosis of malaria. *Trans. of the Royal Society of Trop. Med. and Hyg.* **84**, pg 202-205.
- Hutchison W. M., Dunachie, J. F., Work, K. y Siim, J. C., (1971a) The life cycle of the coccidian parasite *Toxoplasma gondii* in the domestic cat. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **65** (3), pg 380-399.
- Hutchison W. M., Dunachie, J. F., Furguson, D. J. y Gardner, I. C., (1971b) Endogenous development of the coccidian parasite

- Toxoplasma gondii*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **65** (4), pg 429-430.
- Isei, Y., Iida, T., Sato, K., Susuki, T., Shimada, K. y Nishioka, K. (1985). Detection of circulating antigen in sera of rabbits infected with *Toxoplasma gondii*. Infection and Immunity **48**, pg 269-272.
- Jacobs, L., Remington, J. S. y Melton, M. L. (1960). A survey of meat samples from swine, cattle and sheep for the presence of encysted *Toxoplasma*. J. Parasitol. **46**, pg 23-28.
- Jacobs, L., Frenkel, J. K., (1967). Toxoplasmosis, CRC Handbook Series in Zoonoses: Parasitic zoonoses.
- Janku, J. Pathogenesa a pathologická anatomie tak nazvaného kolobomu žluté skvrny u oku normálně velikém a mikronphthalmickém s nálezem parazitu v sítnici (1923). Cas. Léč. Ces. 62: 1021-1027, 1054-1059, 1081-1085, 1111-1115, 1138-1144. (para traducción al inglés, ver el mismo autor, Ček Parasitol. **6**, pg 9-58, 1959.
- John, B. y Miklos, G. L. G. (1979). Functional aspects of satellite DNA and heterochromatin. In "International review of cytology (Bourne, G. H. and Danielli, J. F., eds.) pg 1-114, Academic Press, New York.
- Johnson, A. M., Dubey, J. P. y Dame, J. B. (1986). Purification and Characterization of *Toxoplasma gondii* tachyzoite DNA. The Australian J. of Exp. Biol. and Medical Science, **64**, pg 351-355.
- Johnson, A. M., Illana, S., McDonald, P. J. y Asai, T. (1989). Cloning, expression and nucleotide sequence of the gene fragment encoding an antigenic portion of the nucleoside triphosphate hydrolase of *Toxoplasma gondii*. Gene, **85**, pg 215-220.

- Jones, T. C., (1979). Toxoplasmosis. In Cecil's Textbook of Medicine (Beeson, Dermott and Wyngaarden, Eds). 15<sup>th</sup> Ed. Saunders Co., pg 594-598.
- Kingsbury, D. T. (1987). DNA probes in the diagnosis of genetic and infectious diseases. TIBTECH, Elsevier Publications, Cambridge, pg 107-111.
- Krick, J. A. y Remington, J. S., (1978). Toxoplasmosis in the adult An overview. N. Engl. J. Med **298**, pg 550-551.
- Lainson, R. (1958). Observations on the development and nature of pseudocysts and cysts in *Toxoplasma gondii*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **52**, pg 396-407.
- Lawrence Burg, J., Perelman, D., Kasper, L. H., Ware, P. L. y Boothroyd, J. C. (1988). Molecular analysis of the gene encoding the mayor surface antigen of *Toxoplasma gondii*. The Journal of Immunology, **141**, pg 3584-3591.
- Levine, N. D. (1973). *Sarcocystis, Toxoplasma* and related protozoa. In Levine, N : Protozoan parasite of domestic animals and of man. segunda edición. Minneapolis, Burgess Publishing Co.
- Levine, N. D. (1985). Phylum II, *Apicomplexa Levine, 1970*. En: Lee, J. J, Hunter, S. H, Bovee, E. C. (eds.) An illustrated guide to the protozoa. Allen Press, Lawrence, K. S, pg 371.
- Luft B. J. y Remington, J. S. (1988) Toxoplasmic encephalitis. J. Infec. Dis., **157**, pg 1-6.
- Luft, B. J., Brooks, R. G., Conley, F. K., McCabe, R. E. y Remington, J. S. (1984). Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. JAMA **252**, 913-917.



- Lund, E. Lycke, E. y Sourander, P.(1961). A cinematographic study of *Toxoplasma gondii* in cell cultures. Br. J. Exp. Pathol. **42**, pg 357-362.
- Lycke, E. y Lund, E. (1964). A tissue culture method for titration of infectivity and determination of growth rate of *Toxoplasma gondii*. Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica **60**, pg 209-220.
- Lyke, E., Carlberg, K y Norrby, R. (1975). Interaction between *Toxoplasma gondii* and its host cells; function of the penetration-enhancing factor of *Toxoplasma*. Infect. Immun. **11**, pg 853-861.
- Maniatis, T. Fritsch, E. y Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Manwell R. D. y Drobeck, H. P.(1953). The behavior of *Toxoplasma* with notes of its taxonomics status. J. Parasitol **46**, pg 577-584.
- Masihi, K. N., Mach, O., Valkoun, A. y Jiba, J.(1976). *Toxoplasma gondii*: Large-scale purification by zonal density gradient centrifugation. Exp. Parasitol. **39**, pg 84-87.
- Masina, R. A., Arauzo, S., Reyes, M. B., Sanchez, D. O., Basombrio, M. A., Montaman, E. E., Solari, A. y Frasch, A. C. (1987). *Trypanosoma cruzi* isolates from Argentina and Chile grouped with the aid of DNA probes. Mol. Biochem. Parasitol. **25**, pg. 45-53.
- Maxam, A. M. y Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. **74**, pg 560-564.

- McClelland, M. (1983). The effect of site specific methylation on restriction endonuclease cleavage (update). *Nucleic Acid Research* **11**(1), pg r169-r173.
- McCulloch, W. F. y Remington, J. S. (1975). Toxoplasmosis. En: Hubbert, W. T. McCulloch, W. F. and Schnurrenberger, P (eds.): *Diseases transmitted from Animals to man*. Sexta edición, Springfield, III., Charles C Thomas, Publisher, pg 805-821.
- McLaughlin, G. L., Breman, J. C., Collins, F. H., Schwartz, I. K., Brandling-Bennett, A. D., Sulzer, A. J., Collins, W. E., Skinner, J. C., Ruth, J. L., Andrysiak, P. M., Kasje, D. C. O. y Kampbell, G. H. (1987). Assessment of a synthetic DNA probe for *Plasmodium falciparum* in african blood specimens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **37**, pg 27-36.
- McLeod, R y Remington, J. S. (1980). Toxoplasmosis. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 9th ed., Isselbacher, K. H., Adams, R. D., Braunwald, E., Petersdorf, R. G. and Wilson, J. D., eds. McGraw-Hills, New York, pg 879-885.
- Messing, J., Gronenborn, B., Muller-Hill, B. y Hofschneider, P. H. (1977). Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: insertion of a Hinc II fragment of the *lac* regulatory region in the M13 replicative form in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **5**, pg 3642.
- Miklos, G. L. G y Gill, A. C. (1981). The DNA sequences of cloned complex satellite DNAs from Hawaiian *Drosophila* and their bearing on satellite DNA conservation. *Chromosoma* **82**, pg 409-427.
- Milner, R. J., Bloom, F. E., Lai, C., Lerner, R. A. y Sutcliff, J. A. (1984). Brain-specific genes have identifier sequences in their introns. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **81**, pg 713-717.

- Mullis, K. B. y Faloona F. A. (1987). Specific syntheses of DNA in vitro via a polymerase chain reaction. *Methods Enzimol.* **155**, pg 335-350.
- Nagel, S. D. y Boothroyd, J. C. (1988). The  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulins of *Toxoplasma gondii* are encoded by a single copy genes containing multiple introns. *Mol. Biochem. Parasitology*, **29**, pg 261-273.
- Nicholle, C. y Manceau, L. (1908). Sur une infection a corps de leishman (ou organisme voisins) du gondi. *C. R. Acad. Sci. Paris.* **147**, pg 763-766.
- Nicholle, C. y Manceau, L. (1909). Sur un protozoaire nouveau de Gondi. *Toxoplasma*. *Arch. Inst. Pasteur. Tunis.* **2**, pg 97-103.
- Nichols, B. A. y Chiappino, M. L. (1987). Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *J. Protozool.* **34** (2), pg 217-226.
- Nichols, B. A., Chiappino, M. L. y O'Connor, G. R. (1983). Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. *J. Ultrastruc. Res.*, **83**, pg 85-98.
- Perroto, J., Keister, D. B. y Gelderman, A. H. (1971). Incorporation of precursors into *Toxoplasma* DNA. *J. Protozool.* **18**, pg 470-473.
- Pfefferkorn, E. R., Pfefferkorn, L. C. y Colby, E. D. (1977). Development of gametes and oocyst in cats fed cysts deribed from cloned trophozoites of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitology* **63**, pg 48.
- Potasman, I., Resnick, L., Luft, B. J. y Remington, J. S. (1988). Intrathecal production of antibodies against *Toxoplasma gondii* in patients with toxoplasmic encephalitis and the

acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Ann. Intern. Med.* **108**, pg 49-51.

Prince, J. B., Araujo, F. G., Remington, J. S., Lawrence Burg, J., Boothroyd, J. C. y Sharma, S. D. (1989). Cloning of cDNAs encoding a 28 kilodalton antigen of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitology.* pg 3-13.

Prince, J. B., Auer, K. L., Huskinson, J., Parmley, S. F., Araujo, F. G. y Remington, J. S. (1990). Cloning, expression and cDNA sequence of surface antigen P22 from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **43**, pg 97-106.

Rawal, B. D. (1959). Toxoplasmosis: a dye test survey on sera from vegetarians and meat eaters in Bombay. *Trans. R. Soc. Trop. Hyg.* **53**, pg 61-63.

Reeves, R. (1984). Transcriptionally active chromatin. *Biochim. Biophys. Acta* **81**, pg 713-717.

Remington J. S. y Desmonts, G. (1976): Toxoplasmosis. In: Remington, J. S., Klein, J. P. Eds.: *Infection disease of the fetus and the newborn infants*. Philadelphia. W. B. Saunders Co., pg 191-332.

Remington, J. S. y Cavanaugh, E. N. (1965). Isolation of encysted form of *Toxoplasma gondii* from human skeletal muscle and brain. *N. Engl. J. Med.* **273**, pg 1308-1310.

Remington, J. S. y Desmond, G. (1983). Infectious disease of the fetus and newborn infant. (Remington and Klein eds). pg 167-172.

Remington, J. S. y Desmond, G., (1983). Toxoplasmosis. In: *Infectious disease of the fetus and newborn infant*. (Remington, J. S. and Klein, J. D., eds.), pg 143-283, Sauders Co., 2nd Ed., Philadelphia.

- Remington, J. S. in discussion, Lainson, R. (1961). Observation on the nature and transmission of *Toxoplasma* in the light of its wide host and geographical range. *Survey Ophthalmology*. **6**, pg 721-758.
- Remington, J. S., Bloomfield, M. M., Rusell, E. y Robinson, W. S. (1970). The RNA of *Toxoplasma gondii*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **133**, pg 623-626.
- Report of the WHO meeting of investigators. *Toxoplasmosis* (1969). WHO Tech. Rep. Ser., **431**, pg. 31.
- Rossi, M. S., Reig, O. A. y Zorzópulos, J. (1990). Evidence for rolling-circle replication in a major satellite DNA from the South American rodents of the genus *Ctenomys*. *Mol. Biol. Evol.* **7**(4), pg 340-350.
- Sabin, A. B. (1941). Toxoplasmic encephalitis in children. *Journal of the American Medical Association* **116**, pg 801-807.
- Sabin, A. B. y Feldman, H. A. (1948). Dyes as microchemicals indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science* **108**, pg 660-663.
- Sabin, A. B. y Olitski, P. (1937). *Toxoplasma* and obligate intracellular parasitism. *Science* **85**, pg 336-337.
- Sanger, F., Nickens, S. y Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain - terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, pg 5463-5467.
- Savva, D., Johnson, J. D. y Holliman, R. (1990). Polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii*. *J. Med. Microbiol.* **32**, pg 25-31.

- Scholtyssek, E. (1973). Ultrastructure, En Hammond, D. M. and Long, P. L. eds., *The Coccidia*. University Park Press, Baltimore, pg 81-144.
- Sims, T. A., Hay, J. y Talbot, I. C. (1989). An electron microscope and immunohistochemical study of the intracellular location of *Toxoplasma* tissue cysts within the brains of mice with congenital toxoplasmosis. *Br. J. Exp. Path.* **70**, pg. 317-325.
- Sloof, P., Bos, J. L., Konings, A. F. J. M., Menke, H. H., Borst, P., Gutteridge, W. E. y Leon, W. (1983). Characterization of satellite DNA in *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *J. Mol. Biol.* **167**, pg 1-21.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, pg 503-517.
- Souza, O. E., Saenz, R. E. y Frenkel, J. K. (1988). Toxoplasmosis in Panamá: A 10-year study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **38**(2), pg 315-322.
- Stone, W. B. y Manwell, R. D. (1969). Toxoplasmosis in cold-blooded host. *J. Protozool.* **16**, pg 99-102.
- Tsunematsu, Y. (1960). Purification of *Toxoplasma gondii* by means of sonic vibration and tryptic digestion. *Am. J. of Trop. Med and Hyg.* **9**, pg 556-561.
- Voller, A., Bidwell, D. E., Barlett, A., Fleck, D. G., Perkins, M. y Oladehin, B. (1976). A microplate enzyme-immunoassay for *Toxoplasma* antibody. *J. Clin. Path.* **29**, pg 150-153.
- Wahl, G. M., Stern, M. y Stark, G. R. (1979). Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzoxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, pg 3543.

- Walsh, J. B. (1987). Persistence of tandem arrays: implication for satellite and simple sequence DNAs. *Genetics*, **115**, pg 553-567.
- Water, A. P. y McCutchan, T. F. (1989). Rapid, sensitive diagnosis of malaria base on ribosomal RNA. *The Lancet*, saturday 17 june 1989, pg 1343-1346.
- Weiss, L. M., Udem, S. A., Salgo, M., Tanowitz, H. B. y Witner, M. (1991). Sensitive and specific detection of *Toxoplasma* DNA in an experimental murine model: Use of *Toxoplasma gondii* specific cDNA and the polymerase chain reaction. *J. Infec. Dis.* **163**, pg 180-186.
- Wilson, C. B. y Remington , J. S. (1980). What can we do to prevent congenital toxoplasmosis? *Am. J. Obstet. Gynecol.* **138**, pg 357-363.
- Wilson, C. B., Remington, J. S., Stagno, S. y Reynolds, D. W. (1980). Development of adverse sequelae in children born with subclinical *Toxoplasma* infection. *Pediatrics* **66**, pg 767-774.
- Wincker, P., Roizes, G. y Goldenberg, S. (1990) Characterization of *Trypanosoma cruzi* specific nuclear repeated sequences. *Mol. Biochem. Parasitol.* **41**, pg 147-152.
- Wreightt, T. G., Gray, J. J., Balfour, A. M. (1986). Problems with serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in heart transplant recipients. *J. Clin. Pathol.* **39**, pg 1135-1139.