

Tesis de Posgrado

Estudio de la organización genómica de elementos de ADN de *Taxoplasma gondii* y su aplicación al diagnóstico directo de la toxoplasmosis humana

Matrajt, Mariana Laura

1997

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Matrajt, Mariana Laura. (1997). Estudio de la organización genómica de elementos de ADN de *Taxoplasma gondii* y su aplicación al diagnóstico directo de la toxoplasmosis humana. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2982_Matrajt.pdf

Cita tipo Chicago:

Matrajt, Mariana Laura. "Estudio de la organización genómica de elementos de ADN de *Taxoplasma gondii* y su aplicación al diagnóstico directo de la toxoplasmosis humana". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1997.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2982_Matrajt.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ciencias Biológicas

TESIS

Estudio de la organización genómica de elementos de ADN repetitivos de *Toxoplasma gondii* y su aplicación al diagnóstico directo de la toxoplasmosis humana.

Mariana Laura Matrajt

Para obtener el título de Doctora en Ciencias Biológicas

Director: Dr. Juan C. Garberi
Co-Director: Dr. Sergio Angel

Lugar de Trabajo: Departamento de Parasitología
ANLIS-Dr. Carlos G. Malbrán

Diciembre 1997

421

Quiero dedicar y compartir este trabajo con mis padres, hermana, y mi marido Juan Margarit.

Le agradezco enormemente a mi Director, el Dr. Juan C. Garberi, quien me guió para concretar una de las etapas más importantes de mi vida.

A mi Co-Director, el Dr. Sergio Angel, a quien admiro profundamente por el entusiasmo y la dedicación que pone día a día en las tareas científicas, de quien además de haber aprendido mucho, considero que es una gran persona.

A la Dra. Viviana Confalonieri, quien me guió en los primeros pasos que he dado en la investigación científica.

Le estoy extremadamente agradecida a la Fundación Osdic y la Fundación Aragón, que gracias a la beca que me otorgaron, pude viajar al laboratorio del Dr. David Roos, Universidad de Pennsylvania, USA, uno de los laboratorios líderes en el área de la toxoplasmosis, en donde pude realizar parte de mi tesis doctoral.

Al Dr. Jorge Zorzóplulos, la Lic. María Elisa Paván y la Lic. Daniela Carbonelli, quienes me han aconsejado y enseñado, y con quienes compartí muy buenos momentos en los primeros años de mi tesis doctoral.

Al Dr. Estéban Bontempi, por su ayuda y consejos, y a quien también admiro por su dedicación a la ciencia.

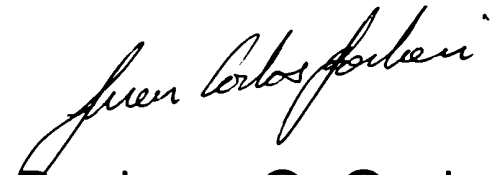
Al jefe del Dto. de Parasitología del Malbrán, Dr. Eduardo Guarnera, quien ha colaborado mucho para poder llevar a cabo este trabajo.

A mis compañeros del grupo de toxo, Vivi, Mónica, Valentina y Pablo, quienes han hecho muy agradables estos años de trabajo en el laboratorio. En especial a la Dra. Viviana Pzsenny, quien siempre ha sido uno de los pilares de nuestro laboratorio.

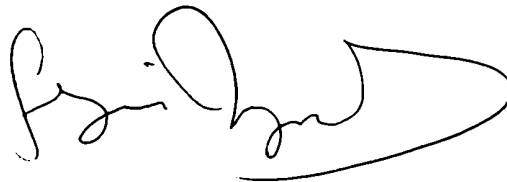
A mis compañeros del departamento de Parasitología del Malbrán.

A mis amigas, las Andreas y María, con quienes ha sido un gran placer compartir todos estos años.

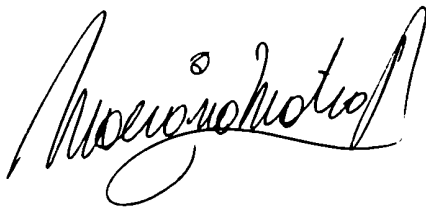
A mis amigos de tenis, en especial a Gastón y Holger.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Juan Carlos Garberi', written in a cursive style.

Dr. Juan C. Garberi

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Sergio Angel', written in a cursive style.

Dr. Sergio Angel

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Mariana Matrajt', written in a cursive style.

Lic. Mariana Matrajt

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina 5'trifosfato
bp	Pares de bases
dCTP	Desoxicitosina 5'trifosfato
DIG	Digoxigenina
dNTP	Desoxinucleótido 5' trifosfato
dUTP	Desoxiuridina 5'trifosfato
EST	Expressed sequence tags
HIV	Human Immunodeficiency Virus
hs	Horas
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
Ig	Inmunoglobulina
ISAGA	Inmunosorbent agglutination assay
Kbp	Kilopares de bases
LCR	Líquido cefalorraquídeo
M	Molar
Mb	Megabases
min	Minutos
mM	Milimolar
N	Normal
nm	Nanómetro
NTPasa	Nucleótido 5' trifosfatasa
PCR	Polymerase chain reaction
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RNAsa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
Tris HCl	Tris(hidroximetil)aminoetano clorídrico
U.V.	Rayos ultravioletas
V	Voltios

INDICE

1. Resumen	1
1.1. Abstract	4
2. Introducción	6
2.1. Ciclo de vida	6
2.2. Estructura y biología celular del taquizoito	8
2.3. Genética	10
2.4. Cepas y variabilidad genética	15
2.5. Secuencias repetidas	18
2.6. Diagnóstico y tratamiento	20
2.7. Estudio realizado	24
3. Materiales y Métodos	26
3.1. Materiales	26
3.1.1. Reactivos, enzimas y soluciones	26
3.1.2. Plásmidos	26
3.1.3. Genotecas	26
3.2. Métodos	28
3.2.1. Parásitos	28
3.2.2. Preparación de ADN de <i>T. gondii</i>	28
3.2.3. Preparación de ADN plasmídico y cosmídico	29
3.2.4. Preparación de ADN plasmídico y cosmídico	29

3.2.5. Preparación de ADN de cromosomas enteros para correr en PFGE	29
3.2.6. Cortes con enzimas de restricción	30
3.2.7. Sondas utilizadas	30
3.2.8. Secuenciación	31
3.2.9. Estudios de homología	32
3.2.10. Ensayos de PCR	32
3.2.11. Southern-blots	33
3.2.12. Transferencia de los geles de Pulse Field	35
3.2.13. Condiciones de corrida de los Pulse Field gel Electroforesis (PFGE)	35
3.2.14. Northern-blots	35
3.2.15. Tratamiento con la exonucleasa <i>Bal</i> 31	36
3.2.16. Rastreo de la genoteca genómica hecha en él fagoλ Dash II	36
3.2.17. Rastreo de la genoteca genómica hecha en cósmidos	38
3.2.18. Pacientes cuya sangre fue analizada por Dot-blot (Tabla 1)	39
3.2.19. Microorganismos	41
3.2.20. Modelo animal	41
3.2.21. Preparación de muestras de ADN a partir de muestras de sangre	41
3.2.22. Dot-blots	42
3.2.23. Ensayos de PCR basada en el gen B1 para la detección de <i>T. gondii</i> en pacientes o ratones experimentalmente infectados	43
3.2.24. Análisis de los datos de Dot-blot y PCR de los pacientes	44

3.2.25. Métodos estadísticos	45
3.2.26. Ensayos de PCR utilizando como blanco la secuencia de ABGTg7 para el diagnóstico de la toxoplasmosis humana	45
4. Resultados	47
4.1. Análisis de las secuencias repetidas previamente clonadas	47
4.2. Organización de los elementos repetidos ABGTg7 y ABGTg8	52
4.2.1. Distribución cromosómica de los elementos ABGTg7 y ABGTg8.2	54
4.2.2. Sensibilidad a la exonucleasa <i>Bal 31</i>	55
4.3. Clonado de dos clusters completos conteniendo las estructuras repetitivas ABGTg7-ABGTg8.2	56
4.3.1. Rastreo de la biblioteca construida en cósmidos	56
4.3.2. Rastreo de la biblioteca construida en el fago λ	58
4.3.3. Análisis de la secuencia del fago α	61
4.4. Análisis de la secuencia de la unidad repetida de la familia ABGTg7	63
4.5. Utilización de ABGTg7 para el diagnóstico directo de la toxoplasmosis humana	67
4.5.1. Detección de ADN de <i>T. gondii</i> mediante un ensayo de Dot-blot en pacientes con toxoplasmosis activa	67
4.5.2. Estudio comparativo del Dot-blot versus PCR para la detección de ADN de <i>T. gondii</i> en pacientes con linfadenopatías toxoplásmicas	68
4.5.3. Estudio comparativo del Dot-blot versus PCR para la detección de ADN de <i>T. gondii</i> en ratones experimentalmente infectados	69

4.5.4. Complementación entre el ensayo de Dot-blot y PCR para el diagnóstico de toxoplasmosis activa	70
4.5.5. Detección de ADN de <i>T. gondii</i> mediante un ensayo de PCR utilizando como blanco a la secuencia ABGTg7	70
5. Discusión	73
5.1. Organización genómica de los elementos repetitivos	73
5.2. Utilización de ABGTg7 en ensayos de Dot-blot para el diagnóstico directo de la toxoplasmosis humana	84
5.3. Utilización de ABGTg7 en ensayos de PCR para el diagnóstico directo de la toxoplasmosis humana	88
5.4. Diagnóstico de la toxoplasmosis con técnicas moleculares	90
6. Referencias	92

Resumen

Abstract

Toxoplasma gondii es uno de los parásitos protozoarios más ampliamente distribuidos a nivel mundial, y usualmente causa una enfermedad asintomática en los humanos. Sin embargo, la reactivación de la infección crónica en pacientes inmunocomprometidos, y la toxoplasmosis congénita de una infección primaria adquirida durante el embarazo, presentan cuadros clínicos muy severos e incluso puede causar la muerte del paciente. Además, debido a que *T. gondii* causa mortalidad de los neonatos en ovejas, también representa una causa importante de pérdida económica en las granjas.

En este trabajo dos familias de ADN repetitivas de *T. gondii* fueron caracterizadas. ABGTg7 (721 bp) presenta dos monómeros repetidos completos y 55 nt de un tercero, mostrando una disposición de tandems directos cuya unidad repetida es de aproximadamente 340 bp. ABGTg8 (1002 bp) contiene dos elementos repetidos distintos: uno denominado ABGTg8.2 y un elemento ABGTg7. ABGTg7 y ABGTg8.2 muestran patrones de hibridación muy similares en Southern-blot de ADN de *T. gondii* digerido con distintas endonucleasas de restricción, sugiriendo que ambos elementos principalmente se encuentran en la misma estructura repetitiva en tandem en el genoma. Análisis de PFGE mostraron que estos elementos repetidos se encuentran en al menos tres de los 4 cromosomas más grandes de *T. gondii*. Ensayos de sensibilidad a la endonucleasa *Bal* 31 indicaron que se encuentran localizados cerca de los telómeros de los cromosomas así como también en otras regiones de los mismos. Cinco fagos lambda recombinantes genómicos fueron aislados y dos clusters diferentes completos de la estructura repetitiva fueron

analizados. Ambos clusters contienen uno de sus extremos conservados con un fragmento de 4.4 Kbp donde se halla ubicado ABGTg8.2, ligado a numerosos fragmentos *Sal* I conteniendo todos al menos una copia de los monómeros de ABGTg7. Dentro de estos clusters ambos elementos repetidos forman parte de una estructura compleja en tandem, donde los monómeros de ABGTg7 se encuentran dispuestos tanto como tandems directos como flanqueados por otros elementos repetitivos sin o con baja homología entre ellos. Esta estructura repetitiva en tandem cumple los requerimientos asignados al ADN satelital.

Por otra parte, se evaluó el uso potencial de la secuencia ABGTg7 para el diagnóstico de la toxoplasmosis humana. Se realizaron ensayos de hibridación mediante la técnica de Dot-blot en muestras de sangre de pacientes con toxoplasmosis cerebral (CT), linfadenopatía toxoplásmica (ATL) y toxoplasmosis diseminada en pacientes trasplantados (TR). Se estudió un total de 84 individuos. Se encontraron señales positivas por Dot-blot en 12 (66.7%) de 18 casos con CT confirmada, 9 (52.9%) de 17 casos con ATL y 2 (66.7%) de 3 casos con TR con toxoplasmosis. En paralelo se realizaron ensayos de PCR en los pacientes con ATL, resultando en la detección de ADN de *T. gondii* en 10 casos (58.8%). Un estudio comparativo entre el Dot-blot y la PCR fue realizado también en ratones experimentalmente infectados con taquizoitos, el cual arrojó resultados similares: 60% y 70% de valores positivos respectivamente. Finalmente la suma de valores positivos obtenidos con ambos tests (Dot-blot más PCR) incrementó el número de sospechas de infección toxoplásmica en los pacientes con ATL a un 76.4% de casos.

Por otro lado, si se consideran los resultados positivos obtenidos simultáneamente por las dos técnicas, se confirmó el resultado en el 35.2% de los casos. Estos resultados indican que la sonda repetitiva ABGTg7 es un recurso adicional útil para el diagnóstico de la toxoplasmosis humana.

Finalmente, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los estudios básicos sobre la organización genómica de estos elementos repetidos, se desarrolló un ensayo de PCR basado en la secuencia ABGTg7 con el objeto de ser evaluado como herramienta diagnóstica.

Toxoplasma gondii is one of the most widely distributed protozoan parasites in the world, and usually causes asymptomatic disease in humans. However, reactivation of chronic infection in immunocompromised patients, and congenital toxoplasmosis resulting from primary infection acquired during pregnancy, present severe and lifethreatening clinical events. In addition, since *T. gondii* causes neonatal mortality in sheep, it also represents a major cause of economic loss in the farming industry.

In the present work two *T. gondii* repetitive DNA elements were characterized. ABGTg7 (721 bp) exhibited two complete repeat monomers and 55 nt of a third one, showing an array of direct tandems with a repeat monomer of about 340 bp long. ABGTg8 (1,002 bp) contains two different repetitive DNA elements: one named ABGTg8.2 and an ABGTg7-like element. ABGTg7 and ABGTg8.2, displayed very similar hybridization patterns in Southern blots of *T. gondii* DNA digested with different restriction endonucleases suggesting that both repeats are mainly present in the same tandem repeat structure. PFGE analysis showed that these repeats are present in at least three of the four largest chromosomes of *T. gondii*. *Bal* 31 sensitivity assays indicated that these elements are located near the telomeres and along other regions too. Five genomic lambda phages were isolated and two different completed clusters of the repeated structure were analyzed. Both clusters have a conserved border of about 4.4 Kbp where ABGTg8.2 is situated, linked to several *Sal* I fragments, all containing at least one copy of an ABGTg7 monomer. Inside these clusters both repeats are members of a more complex tandem

structure where ABGTg7-like monomers can be arranged either as direct tandems or flanked by other repeats which have no or low homology among them. This novel tandemly repeated structure meets the requirements assigned for satellital DNA.

Besides, the potential diagnostic use of ABGTg7 is reported. A Dot-blot hybridization assay in blood samples for diagnosis of cerebral toxoplasmosis (CT), acute toxoplasmic lymphadenopathy (ATL) and disseminated toxoplasmosis in transplant recipients (TR), was applied. A total of 84 individuals were studied. We found positive hybridization signals in 12 (66.7%) out of 18 cases of confirmed CT, 9 (52.9%) out of 17 of ATL and 2 (66.7%) out of 3 of TR. PCR assays were performed in parallel in patients with ATL resulting in *T. gondii* DNA detection of 10 cases (58.8%). A comparative study between Dot-blot and PCR assays performed in blood of mice that had been experimentally infected with tachyzoites gave similar results: 60% and 70% of positives respectively. Finally the sum of positive values obtained with both DNA tests (Dot-blot plus PCR) increased the number of patients with suspected toxoplasmic infection in ATL patients, up to 76.4%. On the other hand, positive values obtained simultaneously by both tests, allow to confirm the results in 35.2% of the cases. These results demonstrate that *T. gondii* ABGTg7 repetitive DNA element is an additional useful resource for diagnosing *Toxoplasma* parasitemia.

Finally, taking into account the genome organization basic studies of the repetitive elements, a PCR based on ABGTg7 sequence was developed in order to be evaluated as a diagnostic tool.

Introducción

Toxoplasma gondii (Nicolle y Manceaux 1909) es un parásito intracelular obligado y es el agente etiológico de la toxoplasmosis humana. Este protozoo pertenece al orden de los coccidios, clase Sporozoa, Subphylum Apicomplexa (Levine 1973). Parasita felinos y gran cantidad de hospedadores secundarios, prácticamente no existe un animal de sangre caliente que no pueda ser infectado por *T. gondii*. La toxoplasmosis es una infección mundialmente diseminada que se estima afecta a un tercio de la población mundial. También reviste importancia a nivel ganadero ya que causa mortalidad de los neonatos en ovejas y representa una causa importante de pérdida económica en las granjas (Gross, 1996). *T. gondii* comparte características biológicas con otros patógenos importantes de humanos y animales, como ser *Plasmodium* y *Eimeria*, también pertenecientes a los Apicomplexa.

2.1. Ciclo de vida

El *T. gondii* presenta un ciclo de vida con formas asexuales y formas sexuales o esporogónicas (Fig. 1). El gato y otros felinos salvajes son los únicos animales donde el parásito se multiplica por todas las formas, y debido a que solo en ellos ocurre el ciclo sexual, se los define como huéspedes definitivos. A su vez, en el ciclo asexual *T. gondii* presenta dos estadios: uno de reproducción alta (7 hs. para cada generación) denominado taquizoito, asociado a la etapa aguda de la infección, que es capaz de diferenciarse en una forma de replicación lenta denominado bradizoito, que está asociado a la etapa crónica. El bradizoito puede persistir dentro de los tejidos formando quistes por meses o años, reemergiendo periódicamente, a la manera de “boosters”

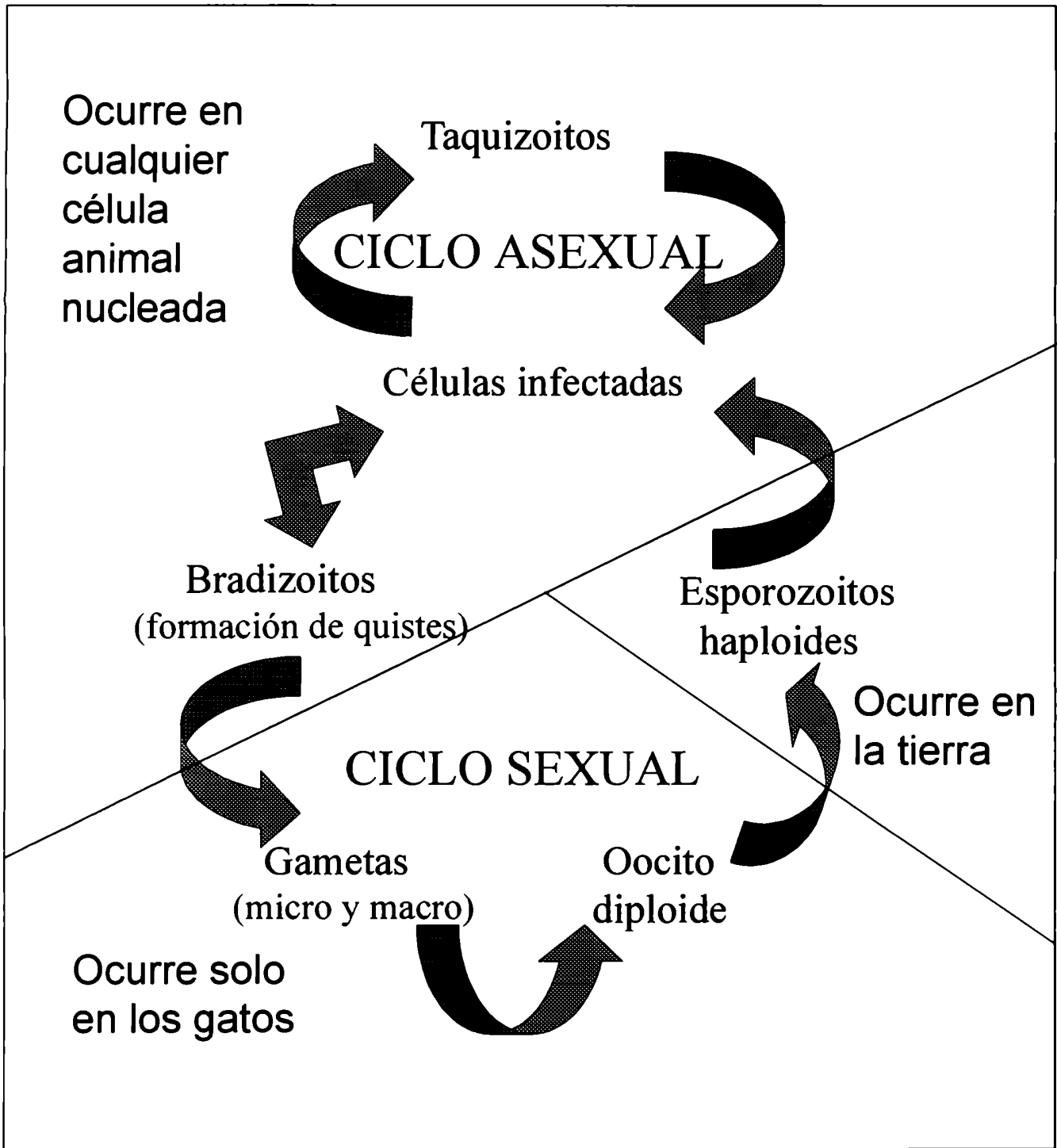


Figura 1. Ciclo de vida de *T. gondii*. Los detalles se describen en el texto.

para el sistema inmune que en definitiva es el encargado de mantener al parásito en forma quística. Debido a la alta frecuencia de infección latente, los bradizoitos representan un serio peligro para la población de individuos inmunocomprometidos.

La replicación asexual puede ocurrir en cualquier célula animal nucleada, y consiste en los siguientes pasos:

1. Adhesión a la célula huésped. En este proceso se ven envueltos una variedad de ligandos que no son receptor específicos.
2. Invasión y formación de la membrana de la vacuola parasitófora (PVM). El *T. gondii* entra dentro de la célula huésped creando y su vez penetrando dentro de un compartimento rodeado por una membrana, denominado vacuola parasitófora. Este proceso está usualmente asociado a la liberación del contenido de organelas especializadas localizadas en la región apical del parásito, denominado complejo apical.
3. Repetidos ciclos de replicación dentro de la vacuola parasitófora. *T. gondii* se replica produciendo dos células hijas en cada división. Debido a que todos los parásitos se dividen sincrónicamente en una determinada vacuola, el número de taquizoitos es siempre una potencia de dos.
4. Lisis de la célula huésped y salida de los parásitos. La salida de los parásitos está facilitada por un aumento de movilidad de los mismos que es probablemente inducida por cambios iónicos que ocurren en la membrana de la célula huésped, a su vez inducidos por el crecimiento de la vacuola parasitófora.

Por el contrario a la amplia gama de hospedadores que tienen las formas asexuales del parásito, como ya se mencionó previamente, la diferenciación sexual solo ocurre en especies felinas cuando los bradizoitos infectan las células epiteliales intestinales (después de la ingestión de, por ejemplo, un ratón infectado). Una vez dentro de las células intestinales, los parásitos pueden diferenciarse en macro- o microgametas. La fusión de estas últimas produce oocitos diploides que desarrollan una gruesa pared impermeable y son liberados con las heces. Luego de la exposición al oxígeno y la temperatura ambiente, los oocitos continúan su desarrollo mediante un proceso llamado esporogonia: dos divisiones meióticas y una división mitótica, que produce 8 esporozoitos haploides (Fig. 1).

2.2. Estructura y biología celular del taquizoito.

Los taquizoitos tienen un aspecto semilunar o en arco (Fig. 2). Miden aproximadamente 6 micrones de largo y 1,5 micrones de diámetro. Están rodeados por tres membranas: la membrana plasmática externa, y un complejo de membranas internas. Directamente debajo yacen los microtúbulos. El aparato de Golgi se encuentra en la parte apical del núcleo. El extremo anterior del parásito está caracterizado por un conjunto de organelas denominado complejo apical que está involucrado en la invasión a la célula huésped (Dubremetz, 1995). El complejo apical está formado por el conoide, las roptrías, los micronemas y los gránulos densos (Fig.2).

Como cualquier célula eucariota, el *T. gondii* posee mitocondrias, y sorprendentemente, se ha demostrado en un descubrimiento reciente (Kohler, et al.,

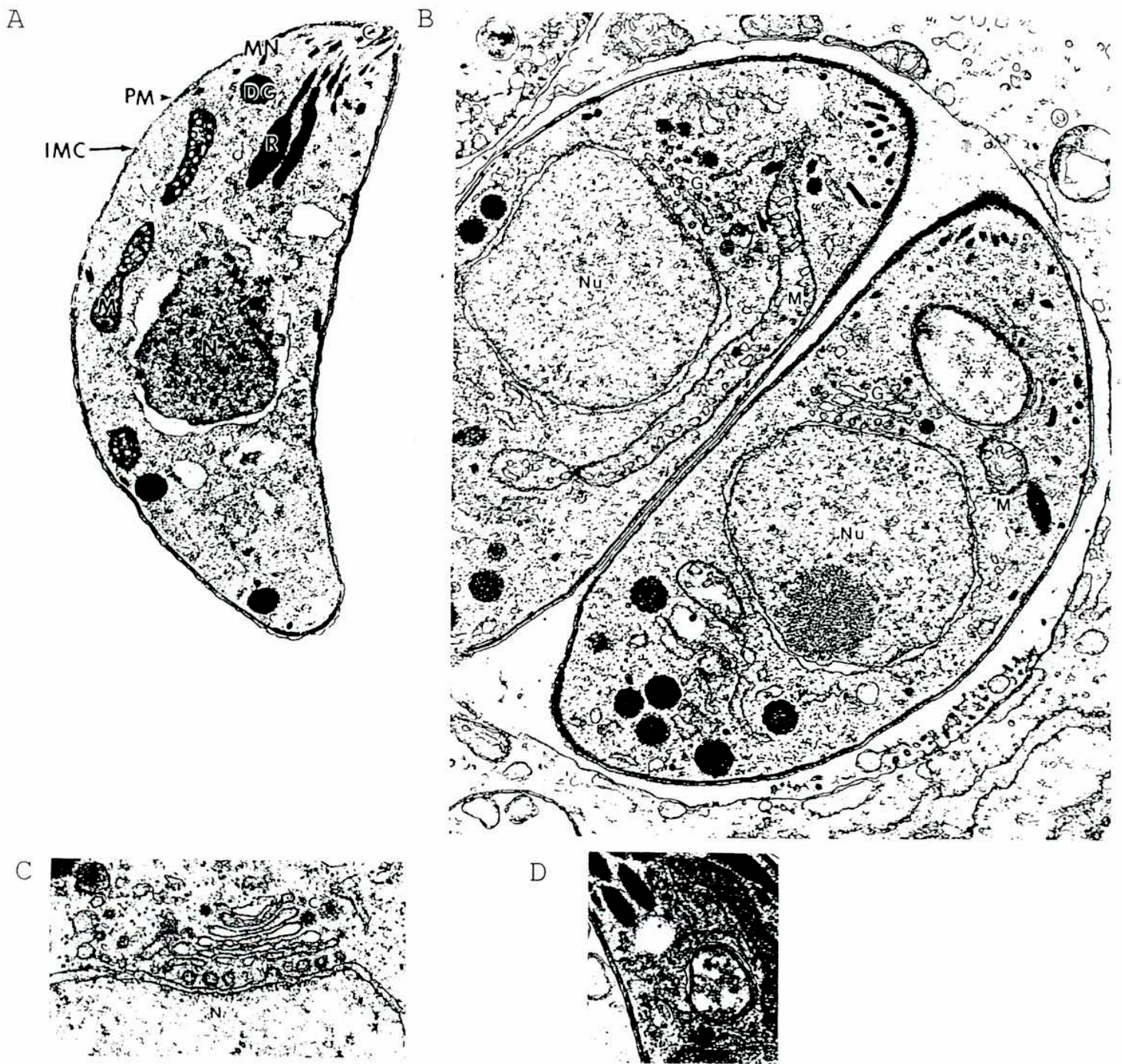


Figura 2. Microscopía electrónica de la ultraestructura del taquizoito. (A) Aspecto típico semilunar de *T. gondii*. En esta foto se pueden ver las tres membranas: membrana plasmática externa (PM), complejo membranoso interno (IMC), núcleo (N), mitocondria (M), y el complejo apical: conoide (C), roptrias (R), micronemas (MN), y gránulos densos (DG). El aparato de Golgi no es visible aquí. (B) *T. gondii* dentro de una célula humana. Además de poseer núcleo (Nu), mitocondria (M) y aparato de Golgi (G), este parásito posee una nueva estructura denominada apicoplasto (asteriscos) que es similar a los cloroplastos de las plantas. (C) Magnificación del extremo apical del núcleo donde se puede ver con claridad el aparato de Golgi. Se pueden ver vesículas emergiendo de la membrana nuclear externa e incorporándose al lado cis del Golgi. Las vesículas en el lado trans del Golgi aparecen cubiertas de clatrina. (D) Foto donde se pueden observar las 4 membranas del apicoplasto (asterisco). Las fotos fueron gentilmente cedidas por el Dr. David S Roos, Universidad de Pennsylvania, USA.

1997) la presencia de una nueva estructura denominada apicoplasto (Fig. 2) que es muy similar a los cloroplastos de las plantas verdes. El apicoplasto contiene un genoma circular de 35 Kbp, se encuentra rodeado por 4 membranas (Fig. 2D), y análisis filogenéticos agruparon al genoma de esta organela junto a las cianobacterias y los plástidos de las algas verdes. Este plástido también se encontró en otros coccidios emparentados, como ser *Eimeria tenella* y el parásito que provoca la malaria *Plasmodium falciparum*. Todas estas observaciones indican que el Phylum Apicomplexa adquirió este plástido por endosimbiosis secundaria, probablemente de un alga verde (Kohler, et al., 1997).

De las principales moléculas de la superficie del taquizoito, las dos implicadas en la invasión han sido denominadas: SAG1 (surface antigen glycoprotein 1), ligando que se une a la célula huésped, y SAG2, que permite la reorientación antes de la invasión (Smith, 1995, Grimwood y Smith, 1996). Estos autores observaron que varias proteínas son secretadas por las roptrías en el momento de la invasión, y se integran a la vacuola parasitófora en formación. En cambio, la liberación de proteínas de los gránulos densos parece estar regulada por calcio y ocurre dentro de los 10 minutos, dando lugar a la formación de una red de túbulos membranosos que estabilizan la vacuola parasitófora.

La invasión ha demostrado ser un proceso activo, sin inducir ningún plegamiento de la membrana, ni reorganización de los microfilamentos de actina, ni fosforilación de las proteínas del huésped. La invasión ocurre rápidamente dentro de

los 25-40 segundos, al contrario de cuando el parásito es fagocitado proceso que dura 2-4 minutos (Morisaki et al., 1995).

La membrana de la vacuola parasitófora (PVM) demostró funcionar como un colador molecular (Schwab et al., 1994). Existe un libre flujo bidireccional a través de la PVM, debido al pasaje pasivo a través de los poros de la misma. Esto le permite al parásito intercambiar moléculas de hasta 1300-1900 Da con el citoplasma de la célula huésped sin gasto de energía.

El *T. gondii* produce una nucleósido trifosfato hidrolasa (NTPasa) que se localiza en estructuras vesiculares dentro del parásito y cuando éste infecta a su huésped se libera al espacio vacuolar quedando parcialmente asociada con la PVM. De esta manera el ATP (menor que 1300 Da) presente en la célula huésped puede permear, servir de sustrato a la NTPasa y así proveer energía al parásito (Bermudes et al., 1994).

2.3. Genética

A pesar de la importancia de las enfermedades humanas y veterinarias producidas por protozoarios, ha sido muy difícil revelar los mecanismos de patogénesis de muchos de estos organismos, particularmente de los parásitos intracelulares. En parte este problema se debe a la dificultad de cultivarlos y a la falta de un apropiado sistema genético. *T. gondii* es una excepción promisoriosa a esta regla, por un lado es muy fácil de cultivar y actualmente se ha avanzado mucho en su sistema genético,

razón por la cual varios investigadores han decidido utilizar este parásito como un modelo para comenzar a comprender el parasitismo intracelular (Sibley et al., 1993).

El *T. gondii* puede ser cultivado in vitro en forma segura utilizando técnicas estándar de cultivo celular, de manera tal que el taquizoito es capaz de replicarse asexualmente en forma indefinida. También es capaz de formar placas de lisis, facilitando el clonado y cuantificación. En la naturaleza, *T. gondii* se comporta como un parásito promiscuo, infectando casi cualquier tejido de vertebrados (Frenkel, 1973). *In vitro*, este amplio rango de hospedadores facilita experimentos que son conceptualmente similares a los estudios genéticos que son realizados con las células somáticas, donde la existencia de células mutantes pueden ser usadas para determinar qué funciones el parásito puede hacer por sí mismo y qué requiere de su hospedador (Pfefferkon, 1981).

Al contrario de muchos protistas, la estructura genética de *T. gondii* es relativamente convencional, es decir, similar a la de la célula hospedadora de los mamíferos con respecto a la organización génica, el uso de codones, y predilección de nucleótidos (Roos, 1993, Ellis et al., 1993). Además su genoma es haploide y pequeño (7.7×10^7 bp; Cornelissen et al., 1984). En los últimos años, muchos investigadores examinaron la posibilidad de realizar transfecciones en este parásito, que resultaron ser muy exitosas (Soldati y Boothroyd, 1993; Donald y Roos, 1993, 1994, Kim et al., 1993, Sibley et al., 1994). El primer paso fue expresar transientemente el gen reportero CAT (cloranfenicol acetil transfasa) bajo el control de varios promotores de *T. gondii* (Soldati y Boothroyd, 1993). Luego se

logró la transformación estable de taquizoitos explotando la susceptibilidad de *T. gondii* al cloranfenicol (Kim et al., 1993). La introducción del gen CAT fusionado a secuencias toxoplásmicas y seguido de selección con cloranfenicol, resultó en parásitos que establemente expresan el gen CAT. Utilizando una construcción de este tipo estos autores también lograron el knock-out de un gen de copia única denominado Rop1 (Kim et al., 1993). Paralelamente a este trabajo, otro laboratorio logró la transformación estable de *T. gondii* utilizando secuencias derivadas del gen de la Dihidrofolato reductasa timidilato sintetasa (DHFR-TS), que fueron usadas para producir distintos vectores (Donald y Roos, 1993). Mutaciones introducidas en el gen DHFR por analogía con la resistencia a la droga pirimetamina en malaria, confirió resistencia también a *T. gondii*, convirtiéndose en un potente marcador de selección para estudios genéticos (Donald y Roos, 1993). Este último laboratorio también desarrolló la estrategia de mutagénesis insercional en *T. gondii*, utilizando vectores que se integran a lo largo del genoma parasitario al azar por recombinación no homóloga (Donald y Roos, 1995). Estos autores emplearon un plásmido conteniendo el alelo DHFR-TS resistente a pirimetamina, y utilizando esta metodología, lograron clonar el gen de la uracil fosfo ribosiltransferasa (Donald y Roos, 1995), y el gen de la hipoxantin-xantin-guanin fosforribosiltransferasa (Donald et al., 1996).

A partir de los trabajos realizados en el área de genética molecular por los siguientes autores: Soldati et al., (1995), Black et al., (1995), Boothroyd et al., (1995), Donald et al., (1996), Seeber y Boothroyd, (1996), Soldati, (1996) y Bohne

et al., (1997), y sumados a los trabajos previamente mencionados, varios sistemas de transfección se encuentran ahora desarrollados, lo que permitió que actualmente pueden ser utilizadas las siguientes estrategias:

- Expresiones transientes de genes recombinantes en taquizoitos (con posibilidad de elegir varios promotores), y recientemente también la expresión específica en bradizoitos.
- Mapeos funcionales de dominios regulatorios, usando varios genes reporteros.
- Transformaciones estables de parásitos con material recombinante, utilizando varios marcadores de selección ligados o co-transfectados a este último.
- Sobreexpresión de transgenes vía amplificación de marcadores de selección co-integrados.
- Clonado por complementación vía introducción de ADN de cepas mutantes en parásitos salvajes (o viceversa).
- Inactivación de genes por inserción, utilizando vectores de transformación que se integran con alta frecuencia en el genoma por recombinación no-homóloga.
- Producción de 'Pseudodiploides' (duplicación de un locus endógeno en el taquizoito haploide), facilitando el estudio de genes esenciales en forma heterocigota.
- Deleciones genéticas (knock-outs de genes) por recombinación homóloga
- Reemplazo de alelos, facilitando el análisis de alelos mutantes por remoción del alelo endógeno.

Un ejemplo de una transfección transiente de *T. gondii* utilizando el gen reportero GFP (green fluorescent protein) se muestra en la Figura 3.

Asimismo es posible realizar experimentos de genética clásica, co-infectando un gato con dos clones diferentes de *T. gondii* cada uno llevando un marcador de resistencia. Utilizando esta metodología se demostró que marcadores no ligados segregan independientemente (Pfefferkon, 1980).

Debido a que los cromosomas de *T. gondii* no se condensan y por lo tanto no es posible realizar experimentos de citogenética clásica, el cariotipo de *T. gondii* ha sido investigado separando los cromosomas en Pulse Field Gel Electroforesis (PFGE). *T. gondii* posee al menos 11 cromosomas (el cromosoma 1 está compuesto por dos: la y lb que son muy difíciles de separar en gel) cuyo tamaño varía desde aproximadamente 2 Mb hasta más de 6 Mb (Sibley y Boothroyd, 1992). Varias sondas de copia única hibridan con la región donde se siembran los bloques, lo que indica que hay uno o más cromosomas que no entran al gel, que ha sido denominado cromosoma X (Sibley y Boothroyd, 1992).

Por otra parte se ha puesto en marcha un proyecto genoma para *T. gondii* que tiene por objeto secuenciar ESTs (Expressed sequences Tags o secuencias que se expresan). La identificación y clonado de genes ha sido enormemente aumentada por la reciente producción a gran escala y secuenciación de ESTs, actualmente la base de datos de *T. gondii* contiene más de 10.000 ESTs (Smith et al., 1997). Por otra parte, un mapa de ligamiento genético fue construido utilizando marcadores de bajo número de copias que definen polimorfismos del largo de los fragmentos de

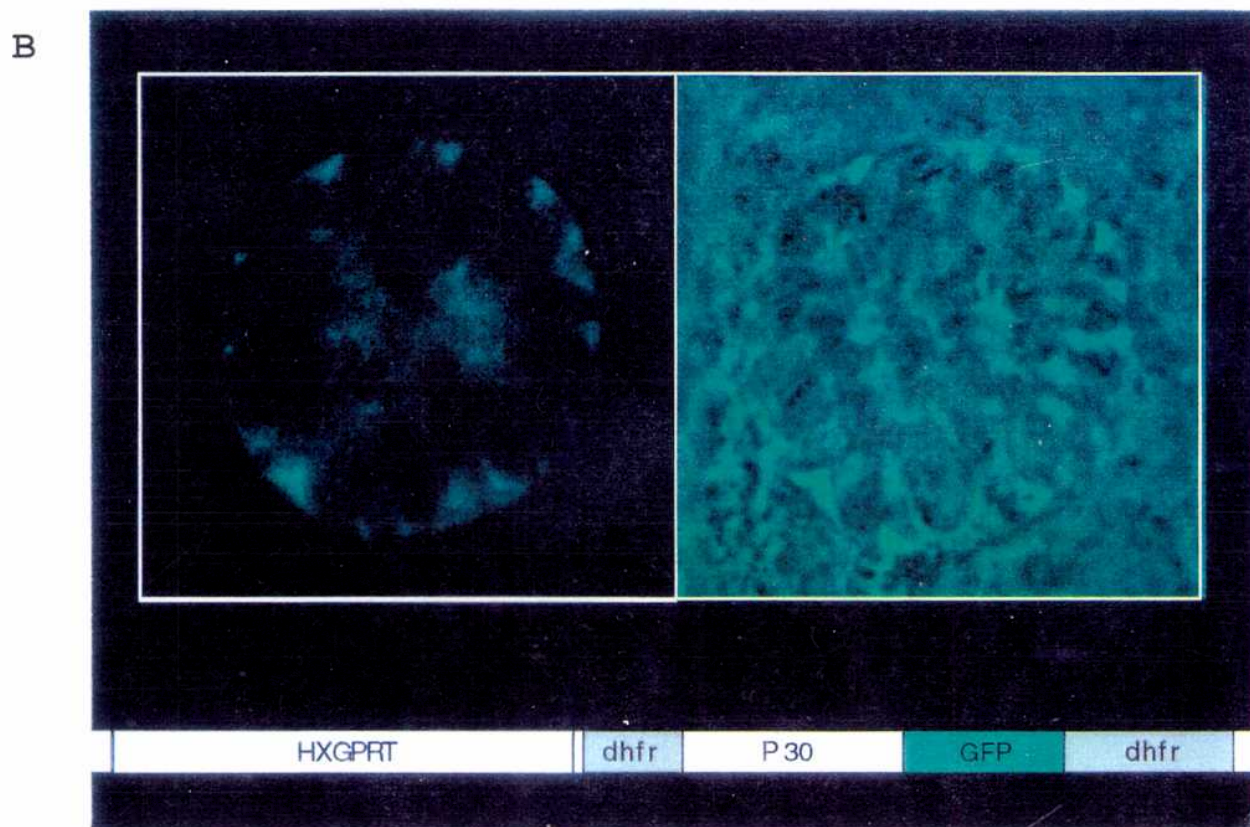
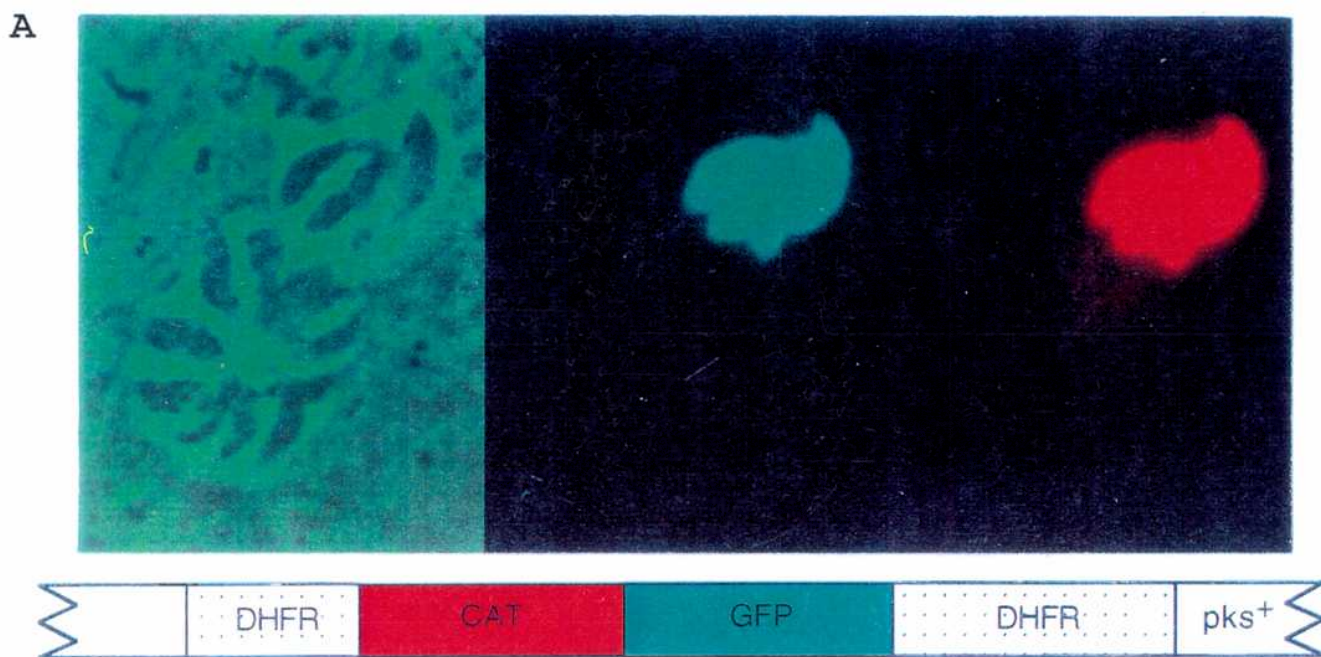


Figura 3. Transfección de *T. gondii* con la proteína "green fluorescent protein" (GFP) (manuscrito en preparación, Matrajt et al.). (A) En verde se muestra la foto de contraste de fase y en negro la foto de fluorescencia. Debajo de las fotos, se muestra la construcción genética utilizada en la transfección: DHFR (regiones 5' y 3' no traducidas del gen de la Di-Hidro Folato Reductasa de *T. gondii*), CAT (gen reportero CAT), GFP (gen reportero GFP), pks+ (plásmido Bluescript). En la foto de contraste de fase se pueden ver dos vacuolas parasitóforas conteniendo varios parásitos y solo una de las vacuolas expresó la construcción transfectada: la que se ilumina en la foto de fluorescencia. La GFP fluoresce naturalmente (sin el agregado de ningún sustrato), en cambio en producto del gen CAT se visualizó después del agregado de un anticuerpo anti-CAT. (B) En verde, la foto de contraste de fase y en negro, la foto de fluorescencia. En este caso la construcción utilizada (se muestra debajo de las fotos) tiene agregada delante del gen GFP una porción codificante para un péptido señal de la proteína de *T. gondii* P30, que lleva las señales para secretar la proteína al espacio extracelular. Por esta razón la vacuola parasitófora que se ve en la foto de contraste de fase, luego muestra fluorescencia en los espacios dentro de la vacuola rodeando a los parásitos, que ahora se ven negros porque secretaron la GFP. HXGPRT: gen de *T. gondii* de la Hipoxantin Guanidin Fosfo Ribosil Transferasa que fue utilizado como marcador de selección para obtener transfectantes estables.

restricción (RFLPs) (Sibley et al., 1992). Estos marcadores de RFLPs segregaron en 11 grupos de ligamiento distintos que mostraron una correlación con los grupos de ligamiento físicos previamente definidos en el cariotipo molecular (Sibley et al., 1992). También se encuentra en proceso de construcción un mapa físico de cada uno de los cromosomas utilizando la estrategia de superposición de contigs, hasta la fecha solo se ha construido el mapa físico del cromosoma 1b (Smith et al., 1997).

2.4. Cepas y variabilidad genética

Muchas cepas de *T. gondii* fueron estudiadas en diferentes laboratorios, aunque difieren en su virulencia y otros aspectos, se piensa que todas las cepas constituyen una única especie (la única especie dentro del género *Toxoplasma*) (Levine, 1988). Si bien esta definición fue basada en estudios morfológicos, los estudios a nivel molecular que se han desarrollado recientemente (Sibley y Howe, 1996) coinciden plenamente en este aspecto.

La cepa virulenta RH es comúnmente usada en muchos laboratorios debido a su alta tasa de replicación, su alta productividad, y su alta eficiencia para lisar la célula huésped facilitando el aislamiento de gran cantidad de taquizoitos poco contaminados con material celular.

Las cepas virulentas de *T. gondii* pueden ser mantenidas en el laboratorio pasándolas intraperitonealmente en ratones o bien in vitro en cultivo de tejidos. Las cepas no virulentas pueden ser mantenidas en ratones como quistes latentes o como taquizoitos en cultivo. La cepa virulenta RH no forma quistes en ratones, tal vez

debido a su gran virulencia o alteraciones genéticas que prevengan la diferenciación en bradizoito.

La diversidad genética entre las distintas cepas es muy baja. En un estudio realizado combinando RFLPs e isoenzimas y utilizando 125 cepas distintas, se determinó que la estructura genética poblacional es predominantemente clonal y que *T. gondii* comprende principalmente tres linajes clonales (Howe y Sibley 1995, Sibley y Howe, 1996). Esta conclusión es sostenida por estudios filogenéticos y análisis estadísticos de la frecuencia de los genotipos predominantes. La clonalidad de *T. gondii* indicaría que la recombinación sexual ocurre mucho menos frecuentemente en la población de lo esperado. Por el contrario, la mayoría de los aislamientos se originan por expansión mitótica de un número limitado de genotipos. Una consecuencia de este fenómeno es que muchos genotipos recombinantes posibles no son encontrados. En el caso de los marcadores de RFLPs que han sido utilizados para distinguir entre cepas, existen 1700 combinaciones posibles entre los alelos de 6 loci independientes y sin embargo solo fueron encontradas 15 combinaciones en 100 cepas independientes estudiadas. Sibley y Howe, (1996), concluyen que la ausencia de estos posibles genotipos en las poblaciones naturales es un argumento más en favor de que la recombinación sexual es poco frecuente.

Sin embargo, que la población sea clonal no implica que no existan diferencias entre los miembros individuales de un linaje. La identificación de estas diferencias es más fácilmente alcanzada utilizando sondas con alto número de copias

que tienen alta sensibilidad para detectar pequeñas diferencias y por otra parte este tipo de secuencias evolucionan rápidamente (Cristina et al 1991b, Howe y Sibley 1994, Cristina et al., 1995).

Correlaciones entre fenotipos biológicos y linajes específicos demostraron que de los tres linajes existentes, el denominado I está correlacionado con cepas virulentas en ratón, el II con cepas que en su mayoría están asociadas a la toxoplasmosis humana tanto en la forma congénita como en los pacientes inmunocomprometidos, y el III con cepas presentes en distintos animales (Howe y Sibley 1995).

En una revisión reciente, Frenkel y Ambroise-Thomas (1997) puntualizaron que durante el pasaje rutinario del taquizoito en el laboratorio, después de aproximadamente 315-490 divisiones celulares, pueden ocurrir cambios genómicos que fenotípicamente se expresan por la pérdida de la capacidad de formar oocitos. Por otro lado estos autores sostienen que la baja diversidad genética está principalmente relacionada con el hecho de que el gato desarrolla rápidamente una fuerte inmunidad contra *T. gondii* y por lo tanto cuando este es infectado por una determinada cepa de *T. gondii* es muy difícil que otra cepa distinta pueda coinfectarlo y ocurra un apareamiento entre distintos genotipos. Para que ocurra recombinación entre distintos genotipos, el gato debería ingerir el mismo día dos fuentes de alimento distintas que contengan dos cepas diferentes de *T. gondii* (por ejemplo dos ratones contaminados con distintas cepas), y este no es un evento frecuente en la naturaleza. Sobre la base de estas observaciones, estos autores

proponen que la clasificación en tres linajes propuesta por Howe y Sibley sea revisada. Es decir, que se debería considerar la historia de los pasajes de las cepas dentro del laboratorio y un estudio más exhaustivo analizando los genotipos de *T. gondii* presentes en los gatos debería realizarse debido al rol central de estos en la transmisión de *T. gondii* y su capacidad de adquirir una inmunidad efectiva.

2.5. Secuencias repetidas

Una importante porción de los genomas eucariotas consiste en ADN repetitivo. Estas secuencias pueden ser elementos transponibles (secuencias móviles y dispersas) o estar localizadas en uno o más sitios en forma de tandem. Las secuencias repetidas en tandem han sido divididas en tres clases de acuerdo al largo de sus unidades repetidas y al tamaño de sus arreglos en: microsátélites, minisátélites y satélites (Singer y Berg, 1991; Charlesworth et al., 1994). Los micro- y minisátélites son secuencias moderadamente repetitivas y sus arreglos son simples. Mientras los microsátélites poseen unidades muy cortas (2-5 bp) los minisátélites un poco más largas (de 15 bp aproximadamente) y el largo de los arreglos envuelve regiones de entre 0.5-30 Kbp. El ADN satélite se encuentra altamente repetido, posee unidades que pueden variar desde 5-10 bp hasta mucho más de 100 bp y normalmente se encuentra organizado en grandes clusters (hasta 100 Mb) en las regiones heterocromáticas de los cromosomas cerca de centrómeros y telómeros. Se asume que la evolución de las secuencias repetidas en tandem es consecuencia de procesos de recombinación desigual durante la duplicación del ADN (Harding et al.,

1992). Estas secuencias muestran una larga persistencia evolutiva (Gray et al., 1991) y pueden proveer información sobre los cambios genéticos que acompañan a la evolución. Se han hecho varios estudios sobre la dinámica evolutiva del DNA repetitivo que fueron revisados por Charlesworth et al., 1994. Muchas de estas secuencias en tandem se localizan en regiones teloméricas o subteloméricas de los cromosomas (Derik de Bruin et al., 1994; Yu-Jing Zhang et al., 1994) y se ha sugerido que facilitan la recombinación meiótica y la conversión génica que podrían contribuir al alto grado de polimorfismo cromosómico que a su vez podría facilitar la habilidad de los parásitos a evadir las defensas del huésped (Derik de Bruin et al., 1994).

Por otra parte, una característica interesante de las familias de ADN satélite es que presentan un alto grado de similitud a nivel nucleotídico entre las unidades repetidas dentro de una misma especie, comparado con una muy baja similitud de las unidades repetidas entre especies cercanamente emparentadas (Maeda et al., 1986, Grenier et al., 1997). En general, este tipo de secuencias son especie específicas, y tienen una tasa de evolución muy alta comparada con por ejemplo las familias multigénicas. Por esta razón se cree que podrían cumplir un rol en la especiación de los organismos, debido a que son las responsables de generar grandes clusters genómicos nuevos con muy baja homología cromosómica con otras especies (Grenier et al., 1997). Esta característica del ADN satélite ha impulsado a que estas secuencias hayan sido utilizadas para el diagnóstico directo de numerosas enfermedades, y para el diagnóstico taxonómico.

A pesar de pequeño tamaño del genoma de *T. gondii*, contiene elementos de ADN repetitivos como ocurre en el resto de eucariotas (Angel et al., 1991, Cristina et al., 1991a, Cristina et al., 1991b, Ossorio et al., 1991, Blanco et al., 1992, Cristina et al., 1995). El grupo del Dr. Garberi y colaboradores describieron el clonado de tres elementos repetidos que demostraron ser específicos para *T. gondii*, al principio denominados pTg1, pTg4 (renombrado ABGTg4) y pTg8 (Blanco et al., 1992). El número de copias estimado es de aproximadamente 800-1000 para pTg4, 150-200 para pTg8 y 30-40 para pTg1. Cristina et al., (1991a) clonó otros elementos repetidos, algunos de ellos compartiendo homología con ABGTg4. Uno de estos últimos, denominado TGR1E, detectó ADN de 15 cepas de *T. gondii* tanto virulentas como no virulentas (Cristina et al., 1995). Ossorio et al., (1991) demostraron la existencia en el genoma nuclear de secuencias mitocondriales flanqueadas a ambos extremos por secuencias repetidas directas o invertidas de 91 bp.

La organización genómica de los elementos ABGTg4, TGR1E, y pTg8 no ha sido profundamente estudiada. En cambio, sí la aplicación diagnóstica en los casos de ABGTg4 y TGR1E (Angel et al., 1992, Cristina et al., 1992, Gross, 1996).

2.6. Diagnóstico y tratamiento

T. gondii se encuentra entre las infecciones parasitarias de mayor prevalencia en humanos de la población mundial, se estima que la población de riesgo abarca a 5430 millones de personas (Smith, 1996). Si bien las infecciones son muchas veces

asintomáticas, recientemente, con el advenimiento del virus HIV, ha emergido por el hecho de haberse convertido en una de las enfermedades oportunistas que más afectan a los enfermos de SIDA. En Europa, entre el 25 y el 40% de los pacientes con SIDA mueren por encefalitis toxoplásmica.

La toxoplasmosis reviste especial importancia en pacientes que sufren inmunodepresión, ya sea ésta provocada antes de realizar un transplante, o bien sea consecuencia de una enfermedad, como ser SIDA o Cáncer; así como también en neonatos por no poseer éstos su sistema inmune desarrollado. En estos casos, tanto la infección reciente de toxoplasmosis, como la reactivación pueden tener consecuencias muy graves como por ejemplo, coriorretinitis, retardo mental, encefalitis y en ocasiones la muerte del paciente.

Hasta hace unos años, la forma más utilizada para acercarse al diagnóstico de la toxoplasmosis aguda era el análisis serológico, ya sea por seroconversión, por un incremento significativo de los títulos de anticuerpos anti-*T. gondii*, ó por detección de IgMs e IgAs específicas para el parásito. Este tipo de diagnóstico tiene escaso valor en los casos de pacientes inmunocomprometidos, ya que se trata de pacientes con alteraciones de su sistema inmune, donde la serología solo sirve para saber si el paciente estuvo expuesto a *T. gondii*. Por lo general, la enfermedad se descubre cuando se producen serias alteraciones neurológicas o por el registro de anomalías en el diagnóstico por imágenes (tomografías computadas, resonancia magnética nuclear, etc.) realizado a estos pacientes. Por otro lado estos síntomas son compatibles con la forma cerebral que presentan otras enfermedades infecciosas oportunistas

(tuberculosis, enfermedad de chagas, cryptococcosis, etc.) y consecuentemente es fundamental establecer el diagnóstico correcto del agente etiológico para poder efectuar un tratamiento eficaz (Luft y Remington, 1992).

Donde el análisis serológico no es confiable, una alternativa es la detección directa del patógeno, dado que los métodos clásicos de recuperación del parásito desde muestras del paciente son poco sensibles o muy lentos. Existen varios métodos descriptos, entre los más usados se encuentran la recuperación del parásito desde la muestra por el pasaje en ratones o por cultivos celulares, o bien la detección de las distintas formas de *T. gondii* por técnicas de inmunohistoquímica en muestras de biopsias o autopsias. Sin embargo estas técnicas han demostrado ser o muy lentas o muy poco sensibles. Por dicha razón recientemente se avanzó en la aplicación de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a la investigación de material genómico de *T. gondii* en diferentes muestras biológicas y en pacientes con diferentes etiologías (ver revisiones de Holliman, 1994; Smits et al., 1995, Roberts et al., 1996).

Hasta ahora, 5 secuencias de ADN de *T. gondii* han sido elegidas para ensayos de PCR (Smits et al., 1995). Una de las secuencias blanco más utilizadas es el gen B1, repetido 35 veces y de función desconocida (Burg et al., 1989). TGR1E, relacionada con ABGTg4, de mayor número de copias que B1, ha sido empleada como molécula blanco para amplificar ADN a partir de líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, sangre y suero (Cristina et al., 1992, Gross, 1996).

También se ha desarrollado una alternativa al diagnóstico por PCR utilizando la secuencia repetitiva ABGTg4, como sonda de hibridación en ensayos de Dot-blot.

Utilizando esta técnica fue posible detectar la presencia de parásitos en distintos tejidos y sangre de ratones experimentalmente infectados (Blanco et al., 1992), y en líquido cefalorraquídeo de pacientes con SIDA (Angel et al., 1992).

Es importante destacar que una vez que es diagnosticada la infección toxoplásmica, esta puede ser eficazmente neutralizada por tratamientos específicos. Clásicamente, se han utilizado inhibidores de la vía metabólica de los folatos, típicamente una combinación sinérgica de sulfonamidas y pirimetamina. La respuesta de los pacientes a éste tratamiento usualmente es considerada como la confirmación del diagnóstico de toxoplasmosis.

Sin embargo, el tratamiento a largo plazo en pacientes inmunocomprometidos muchas veces no puede ser utilizado debido al desarrollo de hipersensibilidad. Por esta razón, la identificación de nuevos agentes antiparasitarios es una necesidad actual, como también es la necesidad de un diagnóstico certero.

Algunas alternativas han sido utilizadas en los años recientes, pero no existe aún un tratamiento general aplicable para la toxoplasmosis asociada a SIDA. Entre estas alternativas se encuentran la utilización de antibióticos como la clindamicina y azitromicina. Si bien estos antibióticos son inhibidores de la síntesis proteica procariótica, no parecen afectar los ribosomas citoplasmáticos de *T. gondii* (Beckers et al., 1995) y su acción contra *T. gondii* todavía no ha sido clarificada (Fichera et al., 1995).

2.7. Estudio realizado

El conocimiento de la organización genómica de las secuencias repetidas previamente clonadas (Blanco et al., 1992) no solo aportaría al conocimiento básico del genoma de *T. gondii* sino también permitiría optimizar los sistemas de diagnóstico. Con el objetivo de conocer qué tipos de elementos repetitivos del parásito están presentes en ABGTg7 y pTg8 (renombrado ABGTg8) se realizaron experimentos de secuenciación, de Southern-blot con ADN genómico del parásito y con los cromosomas separados por Pulse Field Gel Electroforesis (PFGE), y experimentos de sensibilidad a la exonucleasa *Bal* 31. Dado que se encontró que en el genoma del parásito existían dos elementos de ADN repetitivos aparentemente distintos estrechamente ligados y formando una estructura compleja, se profundizó clonando grandes fragmentos genómicos, con el objeto de caracterizar clusters completos de estas estructuras repetidas.

Los estudios previos hechos con la técnica de Dot-blot para el diagnóstico directo de la toxoplasmosis humana mostraron ser útiles en muestras de líquido cefalorraquídeo (Angel et al., 1992), el siguiente paso era analizar su utilidad en muestras de sangre que son mucho menos cruentas y más fáciles de obtener, y a su vez comparar esta técnica con el diagnóstico por PCR. Para ello, lo que se hizo fue analizar un total de 84 pacientes utilizando como sonda ABGTg7 para los ensayos de Dot-blot. Por otro lado se hicieron ensayos comparativos entre Dot-blot y PCR B1 (como diagnóstico de referencia) en algunos de los pacientes analizados y en ratones experimentalmente infectados.

Finalmente, de los resultados obtenidos del estudio básico de los elementos repetitivos, se desarrollaron ensayos de PCR usando como blanco las secuencias ABGTg8 y ABGTg7 para ser utilizadas en muestras de pacientes.

Materiales y Métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Reactivos, enzimas y soluciones

Los reactivos utilizados fueron obtenidos fundamentalmente de BRL, Sigma, Merck y Pharmacia. Las enzimas de restricción de BRL, Pharmacia y New England Biolabs. Otras enzimas de Promega y BRL.

Las soluciones más usuales empleadas, así como los medios de cultivo para el crecimiento de las bacterias y fagos han sido preparados según Maniatis et al., (1989).

3.1.2. Plásmidos.

Los plásmidos recombinantes pTg7 y pTg8 fueron clonados por el Dr. Jorge Blanco. La descripción del clonado de pTg8 se encuentra en Blanco et al., (1992), y pTg7 fue clonado de la misma manera resultando ser una extensión de pTg4 (Angel et al., 1991). Las secuencias repetidas de *T. gondii* contenidas en los mismos fueron denominadas ABGTg7 y ABGTg8.

3.1.3. Genotecas

Las genotecas utilizadas fueron proporcionadas gentilmente por el laboratorio del Dr. David S. Roos, Universidad de Pennsylvania, USA.

La genoteca de cósmidos fue construida con ADN genómico de *T. gondii* (cepa RH) en el vector SuperCos I (Stratagene) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El tamaño del inserto promedio fue de 40 Kbp.

La genoteca de fagos fue construida en el fago λ Dash II (Stratagene) de acuerdo a las instrucciones del proveedor, utilizando ADN genómico (cepa RH). Los tamaños de los insertos variaron entre 10-16 KBP.

3.2. Métodos

3.2.1. Parásitos

Los taquizoitos de *T. gondii* pertenecientes a la cepa RH fueron crecidos en la cavidad peritoneal de ratones CF1. Fueron lavados tres veces en PBS 1x (PBS 10x: NaCl 80g/l, KCl 2 g/l, Na₂HPO₄ 11.5 g/l, KPO₄ 2 g/l pH= 7,2) y purificados filtrándolos por una membrana de polycarbonato de 3 µm de poro (Nucleopore Polycarbonato, Costar).

3.2.2. Preparación de ADN de *T. gondii*.

La lisis de los parásitos ($10^8 \sim 10^9$ toxoplasmas/ml.) fue llevada a cabo por 2 hs a 56°C en 20 mM Tris-HCl pH= 8, 20 mM EDTA (ethylenediaminetetracetic acid, disodium salt), 150 mM NaCl, 1% SDS (sodium dodecyl sulfate), conteniendo 100 µg/ml proteinasa K (BRL). Luego el ADN fue extraído sucesivamente con volúmenes iguales de fenol cloroformo isoamilalcohol (según se describe en Maniatis et al., 1989) y precipitado con etanol absoluto toda la noche a 0°C (según Maniatis et al., 1989). El ADN fue precipitado por centrifugación, se lavó con etanol 70%, y se resuspendió en TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH=8). Luego se agregó 5 µl de RNasa A (20 mg/ml, Sigma), se incubó 1 hora a 37°C, se extrajo con fenol-cloroformo y finalmente fue reprecipitado.

3.2.3. Preparación de ADN plasmídico y cosmídico.

El ADN plasmídico y cosmídico se obtuvo por el método de lisis alcalina descrito por Maniatis et al., (1989). Solo en unos pocos casos, se usó el método de 'Boiling' (Maniatis et al., 1989) para una rápida determinación de la presencia de un determinado inserto después de un subclonado.

3.2.4. Preparación de ADN plasmídico y cosmídico

La preparación del ADN de los fagos se hizo a partir de tres placas de petri (150 mm) conteniendo una lisis confluyente del fago a purificar, a las cuales se les agregó 10 ml a cada una de buffer TM (50 mM Tris-HCl pH=7.5, 10 mM MgSO₄) y se dejó agitando durante 3 horas. Se colectó el sobrenadante de las placas, se centrifugó 10 min a 2500 rpm y al sobrenadante se lo dividió en alíquotas de 1 ml en tubos eppendorf. A cada tubo se le agregó 200 µl de PEG 8000 (Sigma) y se llevo a 2,5 M de NaCl. Se incubó 30 min en hielo y se centrifugó 30 min a 14000 rpm en microcentrífuga. Se resuspendió el pellet en 25 µl de TE, se extrajo una vez con fenol, 2 veces con fenol-cloroformo, una con cloroformo y el ADN fue precipitado con etanol absoluto. Se hizo otra extracción con fenol-cloroformo y se reprecipitó el ADN.

3.2.5. Preparación de ADN de cromosomas enteros para correr en PFGE

Pellets de 10⁸ parásitos previamente lavados con PBS, fueron mezclados 1:1 con 1.5% de agarosa low melting (BRL) y dejados solidificar en hielo en los moldes

provistos por el aparato Chef Mapper System de Bio-Rad. Una vez obtenidos los bloques fueron incubados durante 24 horas a 50°C en el siguiente buffer: 0.5 M EDTA, 1% N-Laurylsarcosine, 1 mg/ml de Proteinasa K. Se hicieron 3 lavados con TE y luego se incubaron 30 min en hielo con 20 mg/ml de PMSF preparado fresco en isopropanol. Se volvió a lavar 3 veces con TE y los bloques se guardaron en TE a 4°C hasta su uso.

3.2.6. Cortes con enzimas de restricción.

Los cortes con enzimas de restricción se hicieron siguiendo las instrucciones provistas por el proveedor de cada enzima, generalmente en un volumen total de 50µl.

3.2.7. Sondas utilizadas.

La sonda ABGTg7 se obtuvo por la liberación del inserto contenido en pTg7 mediante digestión con enzimas de restricción (*Eco* RI-*Hind* III). El plásmido pTg7 fue clonado por el Dr. Jorge Blanco de la misma manera que la descrita en Blanco et al., (1992) y el inserto contenido en él resultó ser una extensión de ABGTg4 (Angel et al., 1991). La sonda ABGTg8.1 deriva de la religación del plásmido pTg8 (Blanco et al., 1992) cortado con *Eco* RI. Luego de la religación, el inserto resultó en una sonda que contiene los primeros 500 bp de la secuencia ABGTg8 (ver Fig. 8). La sonda ABGTg8.2 deriva de la amplificación por PCR de una parte de ABGTg8 utilizando los mismos primers que fueron usados para secuenciar (Tg8-1:

5'-aaataacgatccatgaatcg-3' y Tg8-2: 5'-ttgtctggcggacatggagg-3', obtenidos de National Biosciences Inc., Plymouth, MN). Estos primers amplifican un fragmento de 526 bp (posiciones 263 a 789 en ABGTg8) (ver Fig. 5). La sonda denominada 78 bp también deriva de la amplificación por PCR de una parte de ABGTg8 utilizando los siguientes primers: 5'-cgcgcatcgcaggacagaca- 3' y 5'-agagtacaggtgggtaacgc-3' (suministrados por la firma Biodinamics, Argentina). Estos primers amplifican un fragmento de 78 bp (posiciones 548-626 en ABGTg8) (Fig. 4 y 8). Las condiciones de los ensayos de PCR se detallan más adelante. En todos los casos las sondas fueron corridas en geles de agarosa y purificadas del gel con el kit Quialex II de Quiagen con el objeto de ser radiomarcadas.

También fue utilizado como sonda un oligonucleótido diseñado a partir de una secuencia telomérica de *Eimeria tenella* (Shirley, 1994): 5'-aggctttagggttagggtt- 3'.

3.2.8. Secuenciación

El inserto correspondiente a las secuencia ABGTg8 fue subclonado en M13mp 18 y 19 y secuenciado usando el kit de Sequenase versión 2.0 de USB (United States Biochemical) de acuerdo a la técnica de Sanger (Sanger et al, 1977). Debido al gran tamaño de ABGTg8, para completar la secuencia dos primers internos fueron construidos (Tg8A y Tg8B previamente descriptos) y usados para la elongación. Los accession numbers para ABGTg7 y ABGTg8 son X74557 y Z48732 respectivamente.

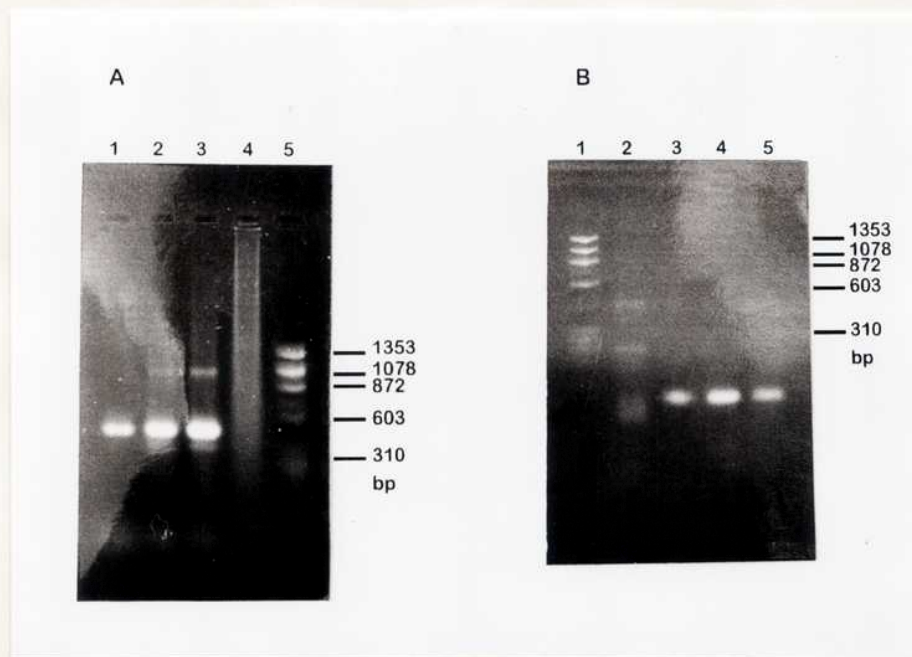


Figura 4. (A) Amplificación de ABGTg8.2. 1: 5ng, 2: 50ng, 3: 500ng de ADN de *T. gondii* amplificados utilizando los primers descritos en Mat. y Met. 4: control negativo, mezcla de reacción sin ADN. 5: marcador de peso molecular, ϕ X174-*Hae* III. (B) Amplificación de los 78 bp contenidos en ABGTg8.2. 1: marcador de peso molecular, ϕ X174-*Hae* III; 2: control negativo, mezcla de reacción sin ADN; 3: 78 bp purificados del gel utilizando en kit Qiaex II; 78 bp amplificados a partir del plásmido pTg8; 5: 78 bp amplificados a partir de ADN de *T. gondii*.

La región secuenciada del fago *a* (ver Fig. 15 y 16) fue obtenida luego de subclonar dos fragmentos *Eco* RI en pBluescript II SK+. Estos clones fueron secuenciados en forma automática en la Universidad de Pennsylvania, USA, comenzando en ambos extremos de los insertos, utilizando los primers T3 y T7. El accession number para esta secuencia es AF022237.

3.2.9. Estudios de homología.

Las búsquedas de similitud tanto con ADN como con proteínas fueron realizadas accediendo al National Center for Biotechnology Information (NCBI) y utilizando BLAST network services.

Los estudios de homología entre las secuencias de ADN fueron realizados utilizando una combinación de programas de computación (Deveraux et al., 1984), y el programa de alineamiento múltiple Clustal W.

3.2.10. Ensayos de PCR

Las reacciones de amplificación se realizaron con la enzima termoestable Taq ADN polimerasa (2 unidades por ensayo, obtenida de BRL o Proinega) con una mezcla de reacción conteniendo 1 X React. Buffer (10 mM Tris-HCl pH= 8.4, 50 mM KCl), 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 275 mM de cada uno de los oligos y el ADN a ser amplificado. La reacción se realizó en un volumen final de 50 µl y para prevenir la evaporación, se agregó 40 µl de aceite mineral. En paralelo se realizaron reacciones control sin contener ADN.

Las muestras fueron amplificadas por 40 ciclos en un termociclador automático (Sontec Científica Argentina). Para obtener ABGTg8.2 fue utilizado el siguiente programa: desnaturalización a 94°C por 5 min, ciclos de 60 s de desnaturalización a 94°C, 60 s de 'annealing' a 45°C y 90 s de extensión a 72°C. Para obtener los 78 bp el mismo programa fue utilizado con la diferencia que la temperatura de 'annealing' fue de 50°C.

Luego los productos de amplificación fueron analizados en geles de agarosa al 1,5%-2% teñidos con Bromuro de Etidio. Un ejemplo de estas amplificaciones PCR se muestra en la Fig.4.

Las temperaturas de 'annealing' y la factibilidad de utilizar un set de primers en un ensayo de PCR fueron estudiadas con el programa de computación Oligo TM, Versión 4.0 (Primer Analysis Software).

3.2.11. Southern-blot.

Tres microgramos de ADN genómico o de fago lambda o de cósmidos, fueron digeridos con enzimas de restricción, corridos en gel de agarosa y transferidos a membranas de nylon (Hybond, BRL) por vacío utilizando el aparato VacuGene XL, Pharmacia, siguiendo las instrucciones de la empresa. El ADN se fijó a la membrana por 2 hs a 80°C ó con UV (50 mj, horno de UV Bio-Rad). La prehibridación se realizó en 6 X SSC (1x SSC= 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate, pH= 7) más 0,25% leche descremada (marca Difco) a 65 °C. La hibridación se realizó durante 18 hs en la misma solución con las sondas marcadas con ³²P

(α dCTP) con una actividad específica de aproximadamente 5×10^8 cpm/mg de ADN. La marcación de las sondas se realizó por “random primer” utilizando un kit de BRL. Los lavados se realizaron a alta astringencia en 0,1 X SSC, 0,1% SDS a 65 °C, y se autoradiografiaron con pantallas intensificadoras a -70 °C. Cuando la sonda de 78 bp fue utilizada, los lavados se realizaron a baja astringencia: un lavado en 2xSSC y otro lavado de 5 min en 0,2 X SSC, 0,2% SDS a 45°C. En algunos casos, cuando se deseó realizar una cuantificación, además de autoradiografiarse los filtros fueron escaneados mediante el aparato Phosphor Imager (GS-250 Molecular Imager, Bio-Rad). Con el objeto de realizar hibridaciones sucesivas con distintas sondas, los filtros fueron lavados con 0.2N NaOH, 1% SDS a 100°C y dejados enfriar hasta temperatura ambiente. Para verificar la eliminación total de la señal radioactiva, los filtros fueron expuestos toda la noche al Phosphor Imager.

Cuando se utilizó el oligonucleótido como sonda, éste fue marcado con ^{32}P (γ ATP) por el método que utiliza la enzima polinucleótido kinasa descrito por Maniantis et al., (1989). Las hibridaciones fueron realizadas toda la noche a 45°C en 6xSSC, 0.01 M NaHPO_4 pH= 6.8, 1 mM EDTA, 0.5% SDS, 100 μg de espermatozoos de salmón y 0.1% de leche descremada. Se realizaron 2 lavados de 10 min en 6xSSC primero a temperatura ambiente y después a 45°C.

3.2.12. Transferencia de los geles de Pulse Field.

Los geles de Pulse Field fueron irradiados con luz UV utilizando el programa “nic” del aparato GS Gene-linker de Bio-Rad. Se transfirieron a membranas Zeta Probe (Bio-Rad) por la técnica de transferencia capilar en solución alcalina descrita por Maniatis et al., (1989). Las condiciones de hibridación fueron las mismas que las mencionadas arriba para los Southern-blots.

3.2.13. Condiciones de corrida de los Pulse Field gel Electroforesis (PFGE).

Los geles de PFGE fueron corridos utilizando un aparato Chef mapper System de Bio-Rad, usando agarosa (Rapid agarose, BRL) grado cromosomal 0.5% y buffer de corrida 0.5x TBE (60 g/l Tris-HCl, 30.8 g/l ácido bórico, 3.8 g/l EDTA) mantenido durante la corrida a 18°C. Los bloques conteniendo los cromosomas fueron sembrados en una cuba de 13cm x 14cm, el “switch time” se varió linealmente desde 120 s hasta 720 s durante 96 hs, a 2.7 V/cm, con un ángulo de 120°. Después de la electroforesis, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio, fotografiados y transferidos como se describió previamente.

3.2.14. Northern-blots.

Un Northern-blot conteniendo ARN tanto de taquizoitos como de bradizoitos fue generosamente cedido por Dr. David Roos, Universidad de Pennsylvania, USA. El mismo fue hibridado de la misma manera que los Southern-blots, tanto con ABGTg7 como con ABGTg8.2 marcados radioactivamente.

3.2.15. Tratamiento con la exonucleasa *Bal* 31.

El protocolo utilizado se basó en el descrito por Zhang et al., (1994). Diez μg de ADN genómico de alto peso molecular fueron digeridos a 30°C con 1.5U de la exonucleasa *Bal* 31 (Promega, 1U remueve 200 bp en 10 min a 30°C cuando se utiliza 33 μg de ADN), tomando los siguientes puntos seriados en el tiempo: 0, 5, 10, 20, 30 min Para cada punto se sacó una alícuota de 2 μg de ADN y la reacción fue frenada con 20 mM de ethylene glycol-bis(b-aminoethyl ether)-N,N,N,N-tetraacetic acid (EGTA). Luego se extrajo con fenol-cloroformo, se precipitó con etanol, se digirió con *Alu* I y el ADN fue fraccionado en un gel de agarosa 0.8 % para luego ser analizado por Southern-blot.

3.2.16. Rastreo de la genoteca genómica hecha en el fago λ Dash II.

La cepa bacteriana huésped usada fue XL1-Blue MRA. La preparación de bacterias competentes se hizo de la siguiente manera: una colonia de XL1-Blue MRA fue crecida en 50 ml de medio LB (10 g/l de NaCl, 10 g/l de bactotripton, 5 g/l de extracto de levadura) suplementado con 0.2% de Maltosa y 10 mM de MgSO_4 , se midió la absorbancia a 600 nm, se centrifugaron las células y se resuspendieron a $\text{OD}_{600}=0.5$ en 10 mM MgSO_4 .

La titulación de los fagos se hizo de la siguiente manera: se hicieron diluciones de los fagos en buffer SM (5.8 g/l de NaCl, 2 g/l de MgSO_4 , 50 ml de Tris-HCl pH=7.5, 5 ml de 2% gelatina), 1 μl de estas diluciones se agregó a 200 μl

de células competentes preparadas como fue descrito, se incubaron los fagos y bacterias por 15 min a 37°C, fueron agregados a 3 ml de top agar (medio NZY más 0.7% de agarosa) y plaqueados en placas conteniendo medio NZY (5 g/l de NaCl, 2 g/l de MgSO₄, 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de NZ amina o hidrolizados de caseína, pH=7.5, más 15 g/l de agar). Finalmente se contaron las placas de lisis y se determinó la concentración de la genoteca en unidades formadoras de placas por mililitro (pfu/ml).

Una vez determinado el título de la genoteca, se plaquearon tres placas de 150mm conteniendo 50000 pfu/placa. Este plaqueo se realizó igual que la titulación pero con 600 µl de células competentes y 6.5 ml de top agar. Una vez crecidas las placas, se refrigeraron por 2 hs a 4°C, y se transfirieron a filtros de nitrocelulosa (Immobilon-Nc, Nitrocellulose, Sigma) por 2 min También se realizaron duplicados y para ello un segundo filtro fue transferido por 4 min (en todos los casos se marcaron con tinta china para luego poder ser orientados). Después de la transferencia, los filtros se desnaturalizaron por 2 min en 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH. Se neutralizaron 5 min en 1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH=8, y se enjuagaron 30 s en 0.2 M Tris-HCl pH=7.5, 2x SSC. Finalmente se hornearon a 80° C por 2 hs.

La prehibridación se realizó en 6X SSC, 0.1% SDS más 0,25% leche descremada a 65 °C. La hibridación se realizó durante 18 hs en la misma solución con ABGTg8.2 marcado con ³²P por “random primer” utilizando un kit de BRL. Los lavados se realizaron a alta astringencia en 0,2 X SSC, 0,2% SDS a 65 °C, y se autorradiografiaron con pantallas intensificadoras a -70 °C.

Luego de este primer rastreo se aislaron 11 positivos que claramente hibridaron tanto con el filtro original como con su réplica. Un círculo de aproximadamente un centímetro de la placa original conteniendo cada uno de estos positivos, se colocó en 1ml de buffer SM más 20 μ l de cloroformo para ser guardados hasta su uso.

En el rastreo secundario se plaquearon aproximadamente 1000 pfu/placa grande, y se siguió trabajando con 5 de los 11 positivos previamente aislados. En este paso la hibridación se realizó con ABGTg7 marcado. De esta manera se pudieron purificar estos 5 positivos, que además fueron sometidos a un rastreo terciario para confirmar su purificación total. Luego de esto se procedió a aislar ADN para ser analizado por Southern-blot.

3.2.17. Rastreo de la genoteca genómica hecha en cósmidos.

Con el objeto de titular la genoteca, 30 μ l de la misma se colocaron en 3 ml de medio LB, se realizaron diluciones y se plaquearon en placas de LB-ampicilina (los cósmidos llevan resistencia a ampicilina). Una vez determinado el título, se hicieron 3 placas de 150 mm conteniendo 9000 colonias recombinantes por placa. También se construyó un filtro grillado donde se colocaron 100 colonias recombinantes bien aisladas y paralelamente fue guardado un stock de glicerol de cada una de estas colonias. Las placas fueron transferidas de la misma forma que se describió previamente. Tanto los filtros correspondientes a las placas como el filtro

grillado se hibridaron con ABGTg8.2 marcado con ^{32}P , de la misma manera que se describió para la genoteca del fago λ Dash II.

Varios positivos fueron obtenidos en los filtros correspondientes a las placas y 3 positivos en el filtro grillado. Debido a que en el filtro grillado las colonias recombinantes ya se encontraban bien purificadas, se decidió seguir trabajando con estas 3 recombinantes, y por consiguiente se prosiguió a preparar ADN.

3.2.18. Pacientes cuya sangre fue analizada por Dot-blot (Tabla 1).

Se estudió un total de 84 individuos. Los pacientes fueron analizados de la siguiente manera: presentación clínica, serología para toxoplasmosis y tomografías computadas. También se realizaron estudios serológicos para *Cryptococcus*, *Mycobacterium*, *Trypanosoma*, cultivos de hongos, y ensayos específicos para herpes, citomegalovirus y sífilis. Algunas veces también se realizaron conteos de CD4. En todos los casos de pacientes con SIDA y diagnóstico de toxoplasmosis activa los conteos de CD4 estuvieron entre $20/\text{mm}^3$ y $300/\text{mm}^3$.

Individuos con encefalitis: Este grupo de estudio consistió en 29 pacientes. Dieciocho de ellos fueron clasificados como toxoplasmosis cerebral confirmada y 11 como encefalitis causada por otros organismos, que nosotros hemos denominado encefalitis no toxoplásmica. La toxoplasmosis cerebral activa fue establecida o bien por la recuperación clínica y tomográfica del paciente después del tratamiento específico con pirimetamina y sulfadiazina, o por la examinación histológica e

inmunohistológica de muestras de biopsias o autopsias. Las muestras de sangre analizadas por Dot-blot fueron obtenidas antes que el tratamiento sea aplicado.

Individuos con linfadenopatías toxoplásmicas: Este grupo de estudio consistió en 17 pacientes. La infección toxoplásmica fue definida de la siguiente manera: síntomas clínicos compatibles, como ser, linfadenopatía cervical, fiebre y mialgia; seroconversión de IgMs e IgGs desde no detectar anticuerpos anti *T. gondii* hasta diferentes niveles de reacción positiva. El estado serológico del paciente fue determinado por inmunofluorescencia indirecta (IFI) tanto con anticuerpos IgG como IgM, y por ISAGA se determinaron anticuerpos IgM específicos anti *T. gondii*. Como estos individuos son inmunocompetentes no se utilizó ningún tratamiento.

Individuos trasplantados: Este grupo de estudio consistió en 6 pacientes que recibieron un trasplante de riñón o corazón. Tres de ellos resultaron tener toxoplasmosis confirmada juzgada por la recuperación del paciente después del tratamiento específico con pirimetamina y sulfadiazina o por la examinación histológica e inmunohistológica de muestras de biopsias.

Individuos con toxoplasmosis crónica: Las muestras de individuos con IFI positivo e ISAGA o IFI-IgM negativos, fueron clasificadas como toxoplasmosis crónica (19 casos).

Individuos seronegativos: Trece individuos inmunocompetentes que no mostraron tener anticuerpos contra *Toxoplasma*.

Todos los grupos de estudio fueron analizados a doble ciego.

3.2.19. Microorganismos.

Las muestras de ADN de *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *Echinococcus granulosus*, *Pneumocystis carinii* fueron suministradas por el Dr. Eduardo Guarnera, Dto. Parasitología, INM "Carlos G. Malbran". *Mycobacterium tuberculosis* y *M. avians* por la Dra. Lucia Barrera, Dto. Micobacterias, INM "Carlos G. Malbran". *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Nocardia asteroides* y *N. brasiliensis* por la Dra. Graciela Davel, Dto. Micología, INM "Carlos G. Malbran".

3.2.20. Modelo animal.

Cinco machos y 5 hembras de ratones CF1 en la edad de 2 meses fueron inoculados intraperitonealmente con 1000 taquizoitos de *T. gondii*, cepa RH. Dos ratones fueron mantenidos sin infección para usarlos como controles negativos. En el día 5 postinoculación, se tomaron muestras de sangre periférica fueron extraídas y se colocaron en 5 mM EDTA.

3.2.21. Preparación de muestras de ADN a partir de muestras de sangre.

Por cada individuo, 5 ml de muestras de sangre con EDTA fueron coleccionados. Dos volúmenes de 150 mM NaCl fueron agregados a 5 alíquotas de 300 µl (en total 1.5 ml de sangre por individuo). Se congelaron y descongelaron una vez, se centrifugaron en microcentrífuga por 1 min y se lavaron 2 veces con TE. Se resuspendió el pellet correspondiente a 300 µl de sangre en 150 µl de buffer TES (Tris HCl 10 mM, EDTA 150 mM, NaCl 150 mM, pH=7.4), más 1% SDS y 200

$\mu\text{g/ml}$ de Proteinasa K. Las muestras se incubaron por 2 hs a 56°C . El ADN se extrajo con fenol-cloroformo, se precipitó con etanol, se recuperó por centrifugación y se resuspendió en $500\ \mu\text{l}$ de TE. La concentración de ADN fue obtenida por espectrofotometría a $260\ \text{nm}$ en un espectrofotómetro Shimadzu PR-1, como se describe en Maniatis et al., (1989).

La extracción de ADN de ratones experimentalmente infectados se realizó de la misma manera que en los pacientes, a partir de $500\ \mu\text{l}$.

3.2.22. Dot-blots.

Diez μg de ADN genómico resuspendidos en $100\ \mu\text{l}$ de agua destilada, fueron sembrados en filtros de nitrocelulosa (Hybond ECL Western, Amersham) aplicando vacío con el aparato GS Gene Prep Manifold System, Bio-Rad y luego horneados por 2 hs a 80°C . Las hibridaciones se realizaron en $6\times\ \text{SSC}$, 0.1% SDS y 1% agente bloqueante de Boehringer Mannheim DIG DNA labeling kit (Boehringer Mannheim, Alemania) a 60°C . La sonda utilizada fue ABGTg7, marcada con digoxigenina-dUTP por “random primer” de acuerdo a las instrucciones del proveedor (DIG Labeling Kit system, Boehringer), y usada a una concentración de $25\ \text{ng/ml}$. Los lavados se realizaron a alta astringencia ($0.1\times\ \text{SSC}$, 1% SDS, 65°C). Además, en cada ensayo de Dot-blot se sembró una curva de ADN de taquizoitos de *T. gondii* como controles positivos y $10\ \mu\text{g}$ de ADN de un ratón no infectado como control negativo. Las señales fueron clasificadas de la siguiente manera: positivo,

cuando la intensidad fue igual o mayor que el ADN correspondiente a 5000 parásitos y negativo, cuando la intensidad fue menor que 5000 parásitos. Este valor de corte fue determinado después de realizar experimentos con ADN de pacientes negativos controles.

3.2.23. Ensayos de PCR basada en el gen B1 para la detección de *T. gondii* en pacientes o ratones experimentalmente infectados.

El blanco de la amplificación fue la secuencia del gen B1 de *T. gondii* (Burg et al., 1989) que es comúnmente usado como una PCR de referencia. Las reacciones de amplificación se realizaron de la misma forma en que fueron descritas previamente. Los primers utilizados fueron los siguientes: 5'-ggaactgcatccgttcgatgag-3', 5'-tctttaaagcgttcgtggtc 3'. Además de 1 µg de ADN de cada paciente analizado, una amplificación en paralelo conteniendo 50 pg de ADN de *T. gondii* fue realizada con el objeto de testear la presencia de posibles inhibidores de la Taq polimerasa presentes en las muestras de los mismos.

Las muestras fueron amplificadas por 40 ciclos de la siguiente manera: desnaturalización a 94°C por 5 min, ciclos de 45 s de desnaturalización a 94°C, 60 s de 'annealing' a 55°C y 90 s de extensión a 72°C. Se utilizaron métodos estrictos para evitar la contaminación, como ser, los distintos pasos se realizaron en tres laboratorios separados, se utilizó un juego de pipetas exclusivo para preparar las mezclas de reacción, se utilizaron tips con barrera resistente a aerosoles. Asimismo, las muestras fueron analizadas por lo menos en dos ensayos independientes.

Los productos de PCR fueron corridos en geles de agarosa 1.5%, visualizados por tinción con bromuro de etidio, y finalmente fue realizado un Dot-blot para determinar la especificidad del producto amplificado. La hibridación de los Dot-blots se realizó con un oligonucleótido interno: 5'-ggcgaccaatctgcgaatacacc-3' biotinilado en su extremo 5'. Las muestras fueron hervidas durante 10 min, sembradas en nitrocelulosa con un aparato de Dot-blot (GS Gene Prep Manifold System, Bio-Rad). Las membranas fueron prehibridadas en 6 x SSC, 5 x solución Denharts, 0.1 % SDS, 250 mg/ml de ADN de espermatozoos de salmón a 43°C por 2 hs. Las hibridaciones se realizaron en la misma solución más 35 pg/ml de sonda. Los filtros fueron lavados 2 veces en 6 x SSC, 0.1% SDS a 43°C por 15 min. Finalmente fueron revelados con un sistema de detección no-radioactivo (BluGENE, BRL) de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

3.2.24. Análisis de los datos de Dot-blot y PCR de los pacientes.

Cada ensayo fue repetido 2 veces con diferentes muestras de ADN extraídas de la misma muestra de sangre. Después de comparar entre ensayos, aquellas muestras que dieron resultados diferentes fueron repetidas por lo menos 2 veces más. Por consiguiente, algunas muestras fueron arbitrariamente elegidas para estudiar la reproducibilidad.

3.2.25. Métodos estadísticos.

Los intervalos de confianza de los porcentajes de positivos fueron obtenidos usando una distribución binomial.

3.2.26. Ensayos de PCR utilizando como blanco la secuencia de ABGTg7 para el diagnóstico de la toxoplasmosis humana.

Después de concluida la secuenciación de ABGTg7 se diseñaron primers con el programa Oligo TM, cuya secuencia es la siguiente: 5'tccgatgtagagtatt3' (Tg7-1) y 5'accctctgacctccgc3' (Tg7-2). Estos primers amplifican un fragmento de 350 bp. La temperatura de "annealing" es de 40°C.

Luego de analizada la secuencia consenso de los monómeros de ABGTg7 (Fig. 18), se diseñó otro set de primers: 5'-tgctgtgtgcagtctgtct-3' (Tg7-3) y 5'-tgctgatggggtcaccgcg-3' (Tg7-4), que se muestran en la Fig. 18. La temperatura de "annealing" fue de 45°C. Las reacciones de amplificación se realizaron de la misma forma en que fueron descritas previamente. Estos primers amplifican un fragmento de 142 bp.(Fig. 20). Los primers fueron generosamente cedidos por el Dr. Jorge Blanco obtenidos en el NIH, USA. Los métodos para evitar la contaminación fueron los mismos que los descritos para la PCR B1. Controles con ADN de ratón y humano fueron realizados. Los productos de PCR fueron corridos en geles de agarosa 1.5%, visualizados por Bromuro de Etidio, y finalmente un Dot-blot fue realizado para determinar la especificidad del producto amplificado. Para ello se

realizó una hibridación con ABGTg7 marcado de la misma forma que fue descrito previamente.

Resultados

4.1. Análisis de las secuencias repetidas previamente clonadas.

La secuenciación de los plásmidos recombinantes conteniendo las secuencias repetitivas de *T. gondii* previamente clonados (Blanco et al., 1992), pTg7 y pTg8, dio origen a las secuencias que fueron denominadas ABGTg7 y ABGTg8 (Fig. 5).

ABGTg7 (721 bp) comprende dos unidades repetidas en tandem completas de 327 y 339 bp (a y b respectivamente), más una tercer unidad incompleta de 55 bp (c). Los monómeros ABGTg7a y ABGTg7b mostraron tener gran homología (86%) entre ellos (Fig. 6). Búsquedas hechas en el GeneBank utilizando el programa Blast rescataron otras secuencias repetidas de *T. gondii*: TGR1A, TGR1E, TGR2 y TGR4 (Cristina et al., 1991a). Las secuencias TGR1A y TGR1E (353 bp) son unidades repetidas similares a los monómeros presentes en ABGTg7. En cambio, TGR2 (674 bp) y TGR4 (1032 bp) contienen solo partes con homología con los monómeros de ABGTg7. La homología entre ABGTg7 y las distintas secuencias TGR varió entre 69-82%, siendo la mayor razón de polimorfismos mutaciones puntuales o de pequeñas regiones, así como deleciones o inserciones.

ABGTg8 (1002 bp) fue partida en tres partes (tres partes iguales de 330 nucleótidos aproximadamente) con el objeto de buscar homologías internas pero no fue encontrado nada significativo. En cambio, la porción final de ABGTg8 (posiciones 792-1002) comparte un 78% de homología con ABGTg7 entre las posiciones 179-387, y un 75% entre las posiciones 527-670 en la cadena reversa y complementaria en ambos casos (Fig. 7A y Fig. 8A). Además, ABGTg8 (posiciones

548-626) comparte un 64% de homología con TGR2 (201-279) y un 65% con TGR4 (747-825), siendo las diferencias causadas por mutaciones puntuales o hasta 3 nucleótidos (Fig. 7B y Fig. 8A). Esta última zona de homología, que comprende solo 78 bp en ABGTg8, está incluida en TGR2 y TGR4 en una zona de homología mayor (344 bp) cuando se las compara (Cristina et al., 1991a), la cual a su vez está fuera de las zonas de homología con ABGTg7 en dichas secuencias.

Para ver si ABGTg7 y ABGTg8 se transcriben, las mismas fueron hibridadas a un Northern-blot conteniendo ARN tanto de taquizoitos como de bradizoitos, y en ningún caso se obtuvo señal positiva, indicando que se trata de secuencias no codificantes.

ABGTg7

SalI

```

1  GTCGGCACTCGGCACGCACTGTCGACGTGCTGGGTGTGGCGGCGCTATGGTCGCTGTACGTGAAAGAAATCGTCGCGTAC
81  CTCCGATGGTAGAGTTATTGTGTGTGTCGTTGTGCAGTCTGTCTCCGATATTGTTGACTTTTTTTCAGGGCCAGAGACGT
161 AAGAGCAGAAAAGGTTGCTGGGTCCTTCTGTGTCTTGAGGCAACTGCCGACGACGTAGAGATTAGTGCTGATGGGGT
      AluI AluI
241 CACCGCGCTGAGGCGTAGCTAGCTTGGCGGCGGAGGCACTGTGCGGGCGGACTGGCATGTTTCATTTGCGGCACAGGTGC
      SalI
321 TCCCGCAGGTCCGACATCACTCTGGCACCGAATTGTCGACGTGCTGGGTGTGGCGGCGCTCATGGGTCCGCTGGTACGTG
401 AAAGGAGAATCGTCGCTGTACCTGCGCGGATGGGTCAGAGGTTATTGGTTGTGTGTCGTTGCAGTCTGTCTCCGATATT
481 GTTGAGCGTTTTTTTTTCAGGGCCAGACGGTAAGAGCAGAAAAGGTTGCTGGGCCCTTCTGTGTCTTGAGGCAACTGCCGA
      AluI
561 GCACGAGAGATTAGTGCTGATGGGTCACGCGCTGAGGCGTACGTAGCTTGGCGCGAGGCACTGTGCGGCGGACGACATGTT
      AluI
641 TCATTTGCGGCACAGGTGCTCCCGCAGGTCCAGCATACTGGCACAGCTTGTTTCGACGTGTGGTTGCGCGCCATGGTCCGA

```


ABGTg7 :

```

a  -GTCGG----CACTC-GGCACGCACT-G-TCGACGTGCTGGGTGTGGCGGCGCTATGGTCGC--- 54
b  G...C.ACAT.....T.....CG.A.T.-.....CAT.GGT.GGC 64
c  G...CAGCAT.....--.....AGCT.-.T.....-.T.....-.C.....-.GAC 56

a  -TGTACGTGAAAG--AAATCGTCGC-GTACCTCCGATGGTAG-----A-GTTATTGTGTGTGT-C 108
b  TG.....GAG.....T.....G..CG.A.G.GTCAG.G.....GT.....GT 129

a  GTTGTGCAGTCTGTCTCCGATATTGTTGACTTTTTTTCAG-GGCCAGAGACGTAAGAGCAGAAAA 172
b  CG.....GCG.....TTCA.....CG.....-- 192

a  GGTGCTGGGTCCTCTTCTGTGTCTTGAGGCAACTGCCGACGACGTAGAGATTAGTGCTGATGG 237
b  253

a  GGTACCCGCGCTGAGGCGTAGCTAGCTGGCGGCGGAGGCACTGTGCGGGCGG-GACTGGCATGTT 301
b  .-.....-.....CG.....--C.....-.CG.....-A..... 310

a  TCATTTGCGGCACAGGTGCTCCCGCA 327
b  336

```

Figura 6. Homología (“Dot matrix”) entre los distintos monómeros de ABGTg7 denominados a, b, y c. Los puntos indican la presencia del mismo nucleótido y las rayas indican deleciones.

A

ABGTg8 (1002-792)	GGGGGCGGGTGGTGTGTCTCGTGGCGTCTGCTGCACCACGTAGCGTAGAG	50
ABGTg7 (179-387)	T...T.CTC.TC.....T.A...AA...C...G.....	45
ABGTg7 (527-670)	T...C.CTC.TC.....T.A...AA...-C...G.....	42
ABGTg8 (1002-792)	ACTACTGCTGATTGGGTCATGGCAATGAGGTGTAGTTAGCTGGCGGCGGA	100
ABGTg7 (179-387)	.T..G.....G.....CC..GC.....C...C.....	95
ABGTg7 (527-670)	.T..G.....G.....-C..GC.....C...CG.....-C..	88
ABGTg8 (1002-792)	CGCGCTGTGCG-GTGACATGTCCACGTTCCATTTGCGGCGGGCCGCAGC	149
ABGTg7 (179-387)	G..A.....G.C.GG.CTGG..T...T.....A.A.GT..TC.	140
ABGTg7 (527-670)	G..A.....---.CGGACGA..T...T.....A.A.GT..TC.	130
ABGTg8 (1002-792)	CATTGGTCGGACATCACTCTGGCA-GGAACGGACGACGTGTTGCGTTCCG	198
ABGTg7 (179-387)	.GCA....C.....CC...TT.T.....C..G..GT..	180
ABGTg7 (527-670)	.GCA.....-G..TA.....-AGCTT.TT.....G....GC.	166
ABGTg8 (1002-792)	GGGCGCCACAGGCTC	213
ABGTg7 (179-387)	C.....TCAT..G..	195
ABGTg7 (527-670)	C.....-T..TC.	177

B

ABGTg8 (548-626)	CGCGCATCGCAGGACAGACACGCAGCCTCTGACGCGTGTCTGA-AACACGT	49
TGR2 (279-201)	.A.....C.TC.C.G.....TG.CG.....CA.GA.TC...C.....	50
TGR4 (747-825)	.A.....C..C.C.G.....T..CT.....CA.GA.TC...C.....	50
ABGTg8 (548-626)	CATCGCGTAGCGTTCACGACCTGTACTCT	78
TGR2 (279-201)A.G..A.GGT..A.GT...C..T.	79
TGR4 (747-825)A.GT...GGA..A.GT...C..T.	79

Figura 7. (A) Homología (“Dot matrix”) entre ABGTg8 (posiciones 1002-792) y los monómeros de ABGTg7 (posiciones 179-387 y 527-670). Los puntos indican la presencia del mismo nucleótido y las rayas indican deleciones. (B) Homología (“Dot matrix”) entre ABGTg8 (posiciones 548-626) y las secuencias TGR2 (posiciones 279-201) y TGR4 (posiciones 747-825). Esta región es la que ha sido denominada “78 bp”. Los puntos indican la presencia del mismo nucleótido.

4.2. Organización de los elementos repetidos ABGTg7 y ABGTg8.

Lo primero que se hizo para estudiar la organización de estos elementos repetidos en el genoma, fueron experimentos de Southern-blot con ADN genómico de *T. gondii* digerido con distintas enzimas de restricción. Como sondas se usaron ABGTg7 y otras dos generadas a partir de ABGTg8 que fueron denominadas ABGTg8.1 y ABGTg8.2 (Fig. 8A). Los detalles de cómo se obtuvieron las distintas sondas se describen en Materiales y Métodos. ABGTg8.1 comprende los primeros 500 bp de ABGTg8 y es una región que no presentó homología con ninguna otra secuencia. ABGTg8.2 va desde la posición 263 hasta la 789 dentro de ABGTg8 y comprende los 78 bp previamente mencionados, que comparten homología con otras secuencias de *T. gondii*. Por otra parte, la zona con homología con ABGTg7 queda excluida de ambas sondas derivadas de ABGTg8 (Fig. 8A). ABGTg8 completa no fue utilizada debido a que esta secuencia contiene una porción con homología con ABGTg7.

Southern-blots realizados con ADN genómico cortado con *Alu I*, *Sal I* y *Eco RI*, e hibridados con ABGTg8.1, ABGTg8.2 y ABGTg7 (Fig. 8B) revelaron que ABGTg8.1 es copia única o una secuencia de bajo número de copias, mientras que ABGTg8.2 y ABGTg7 son secuencias repetidas, siendo ABGTg7 la más repetida de todas (Fig. 8B).

ABGTg7 y ABGTg8.2 mostraron patrones de hibridación muy similares (Fig. 8B). Solo unas pocas bandas son detectadas por una sola de estas dos sondas.

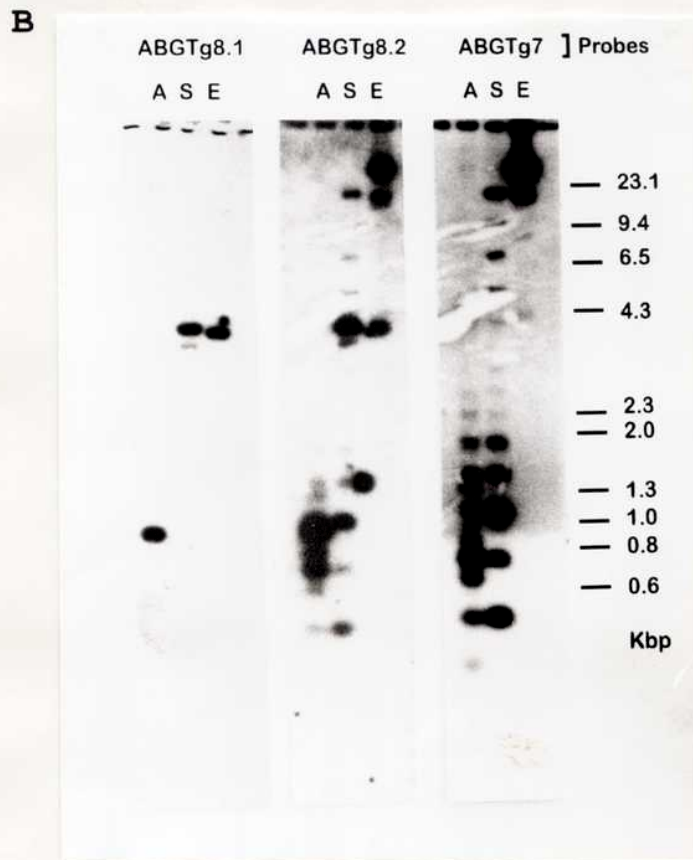
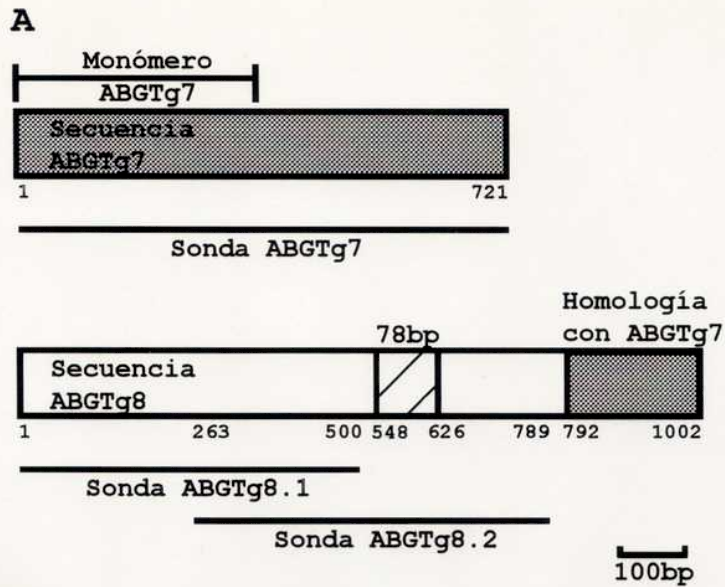


Figura 8. ADN genómico de *T. gondii*, digerido con distintas enzimas de restricción e hibridado con los distintos elementos repetidos. (A) Representación esquemática de los elementos repetidos y ubicación de las sondas utilizadas. El área indicada como 78 bp muestra la zona de homología con los elementos TGR2 y TGR4 (ver detalles en el texto), y el área indicada como homología con ABGTg7 muestra homología con cada uno de los monómeros de ABGTg7 (ver texto). Los números debajo de la secuencia indican principios y finales de las sondas y regiones de homología. (B) Southern-blot del ADN genómico digerido con distintas enzimas de restricción e hibridado con ABGTg8.1, ABGTg8.2, y ABGTg7 marcados radioactivamente. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron λ -Hind III DNA and ϕ X174-Hae III DNA. E: Eco RI, S: Sal I, y A: Alu I.

La principal de estas bandas no compartidas es una de 3.9 Kbp detectada por ABGTg8.2 (línea *Eco* RI), probablemente debido a la presencia de un sitio interno *Eco* RI conservado (posición 500-506 en ABGTg8, Fig. 5). Además, existen numerosas bandas compartidas por las dos sondas pero con intensidades muy diferentes. Un claro ejemplo de éstas, es la banda de 4 Kbp (línea *Sal* I) que es detectada en forma mucho más intensa por ABGTg8.2. De todas formas, a pesar de las diferentes intensidades, casi todas las bandas resultantes de la digestión del ADN genómico con *Sal* I o *Alu* I hibridaron tanto con ABGTg7 como con ABGTg8.2, produciendo una escalera de fragmentos de restricción correspondiente a la misma estructura repetitiva en tandem. Todos estos datos indican fuertemente que existe una íntima asociación en la organización genómica de estos dos elementos repetidos. Se detectaron entre 8-10 bandas que hibridan con ambas sondas en las escaleras generadas por *Sal* I o *Alu* I. La presencia de estas 8-10 bandas sugiere: (i) la ausencia o poca frecuencia del correspondiente sitio de restricción en la secuencia de ADN; y (ii) la presencia de clusters conteniendo varias copias repetidas en tandem de la estructura ligada ABGTg7-ABGTg8.2.

Con el objeto de ver si otros elementos repetidos no relacionados con la familia ABGTg podían estar asociados, el filtro de la Fig. 8B fue lavado para eliminar la marca radioactiva y rehibridado con un oligonucleótido diseñado a partir de una secuencia telomérica del parásito emparentado *Eimeria tenella* denominada B67 (Shirley, 1994). El patrón de hibridación obtenido fue completamente distinto,

sugiriendo que este tipo de secuencias repetidas no están ligadas a la familia ABGTg (Fig. 8 bis).

4.2.1. Distribución cromosómica de los elementos ABGTg7 y ABGTg8.2.

Debido a que los cromosomas de *T. gondii* no presentan un condensamiento completo y por lo tanto no es posible realizar experimentos de citogenética clásica, la distribución cromosómica de estos elementos repetidos fue investigada hibridando ABGTg7 y ABGTg8.2 con los cromosomas separados por Pulse Field Gel Electroforesis (PFGE) (Fig. 9). Diferentes condiciones electroforéticas fueron probadas hasta encontrar una que permitió obtener el cariotipo molecular de *T. gondii* previamente descrito por Sibley y Boothroyd, (1992). *T. gondii* posee al menos 11 cromosomas (el cromosoma I está compuesto por dos: Ia y Ib que son muy difíciles de separar en gel) cuyo tamaño varía desde aproximadamente 2 Mb hasta más de 6 Mb (Fig. 9A). Varias sondas de copia única hibridan solo con el bloque, lo que indica que hay uno o más cromosomas que no entran al gel (Sibley y Boothroyd, 1992), denominado cromosoma X.

Los patrones de hibridación del Southern-blot hecho con el PFGE, indican que tanto ABGTg7 como ABGTg8.2 parecen estar presentes en los 4 cromosomas más grandes de *T. gondii*: VII a X (Fig. 9B). Debido a que los cromosomas VIII y IX generalmente presentan una separación parcial (Sibley y Boothroyd, 1992), no hay certeza que estas sondas estén detectando al cromosoma VIII ó al IX ó a ambos. Lo que se puede concluir es que estos elementos están presentes en al menos 3 de los 4 cromosomas más grandes de *T. gondii*.

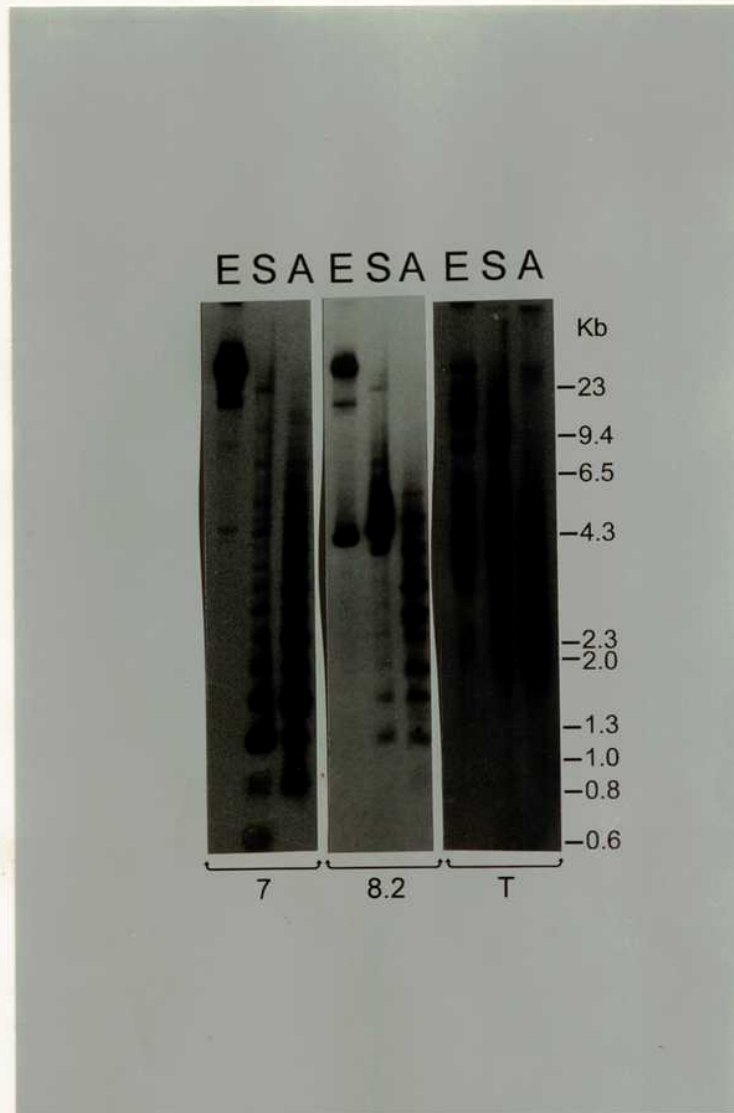


Figura 8 bis. Southern-blot de ADN genómico de *T. gondii* donde se puede ver el patrón de hibridación de la sonda telomérica de *Eimeria tenella* denominada B67 (Shirley, 1994). ADN genómico digerido con *Eco* RI (E), *Sal* I (S) y *Alu* I (A), e hibridado con ABGTg7 (7), ABGTg8.2 (8.2) y la sonda telomérica (T). Los marcadores de peso molecular utilizados fueron λ -*Hind* III DNA and ϕ X174-*Hae* III DNA. En este southern-blot no salió bien la calle de *Alu* I debido a la presencia de restricciones parciales.

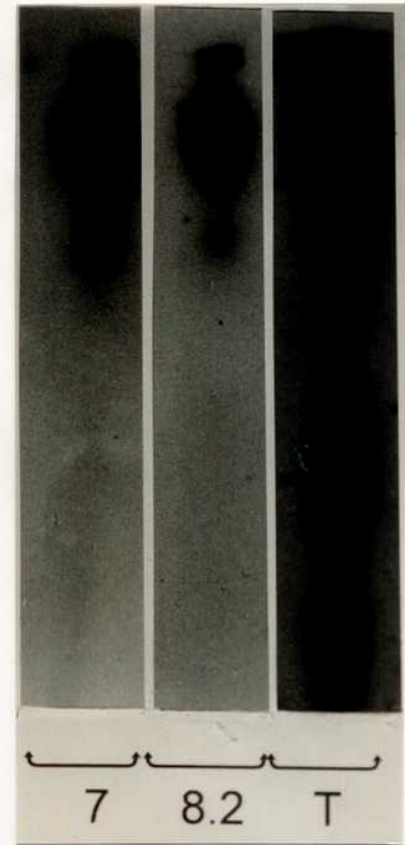
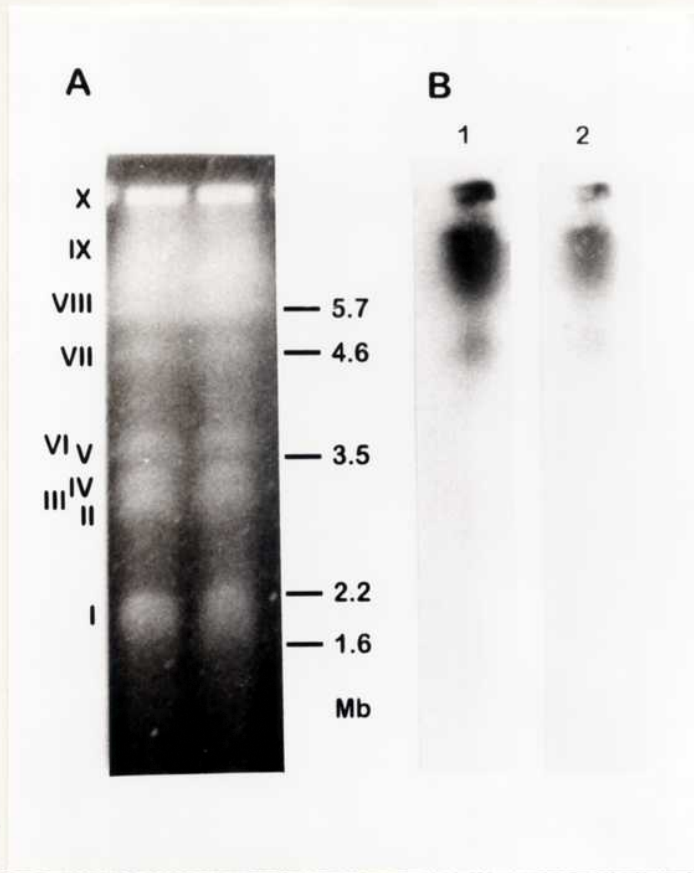


Figura 9. Distribución de los elementos repetidos en los cromosomas de *T. gondii* separados por PFGE. El "switch-time" se varió desde 120seg hasta 720 seg por 96 hs a 2.7 V/cm con un ángulo de 120°, usando un aparato Chef Mapper de Bio-Rad. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron *S. Pombe*, *S. Cerevisiae* y *C. Albicans*. (A) Cromosomas teñidos con Bromuro de Etidio. El cromosoma I comprende dos: IA y IB. (B) Autorradiografía de las calles conteniendo los cromosomas de *T. gondii* después de la hibridación con ABGTg7 (1) ó ABGTg8.2 (2) marcados radioactivamente.

Figura 9 bis. PFGE donde se puede ver el patrón de hibridación de la sonda telomérica de *Eimeria tenella* denominada B67 (Shirley, 1994). Autorradiografía de las calles conteniendo los cromosomas de *T. gondii* después de la hibridación con ABGTg7 (7) ABGTg8.2 (8.2), y la sonda telomérica marcadas radioactivamente.

Dado que la secuencia telomérica B67 de *Eimeria tenella* hibrida con todos los cromosomas de dicho parásito (Shirley, 1994) el cual se encuentra muy relacionado a *T. gondii*, el oligonucleótido previamente utilizado como sonda fue utilizado esta vez para hibridar el PFGE transferido como un control de la integridad de todos los cromosomas después de la transferencia alcalina. Todos los cromosomas de *T. gondii* hibridaron (Fig. 9 bis).

4.2.2. Sensibilidad a la exonucleasa *Bal* 31.

Con el objeto de determinar la ubicación de los clusters ABGTg7-ABGTg8.2 dentro de los cromosomas de *T. gondii*, éstos fueron tratados con la exonucleasa *Bal* 31. Esta enzima tiene actividad exonucleasa sobre la doble cadena del ADN, por lo tanto, si uno trata los cromosomas, esta enzima degradará el ADN comenzando por los extremos de los mismos. Así, después del tratamiento a distintos tiempos con *Bal* 31, si una secuencia se encuentra cerca de los telómeros, será degradada mucho antes que las secuencias que se encuentran más internamente en los mismos, lo que se visualiza por la desaparición de las bandas específicas de hibridación en un análisis de Southern-blot. Esta estrategia ha sido utilizada por numerosos autores, para saber si una determinada secuencia se localiza subteloméricamente.

El tratamiento con *Bal* 31 se puede realizar sobre los cromosomas enteros o sobre ADN de alto peso molecular, el protocolo utilizado aquí (ver detalles en Materiales y Métodos) se basó en el que fue utilizado por Zhang et al., (1994).

En la Fig. 10 se puede ver que algunas bandas detectadas por ABGTg7 desaparecen rápidamente con el tratamiento de *Bal* 31, mientras que otras lo hacen

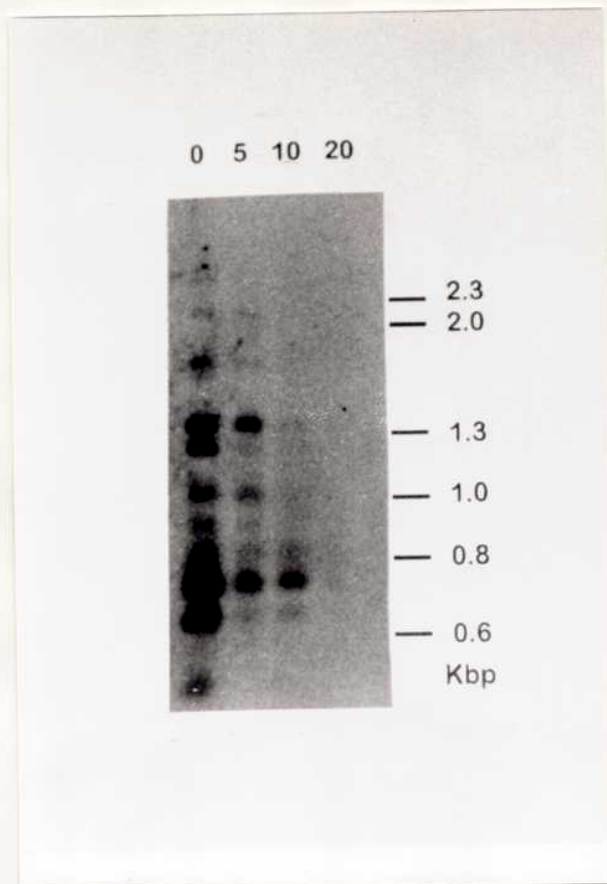


Figura 10. Digestión del ADN genómico de *T. gondii* con la exonucleasa *Bal 31*. Diez μg de ADN genómico de alto peso molecular fueron digeridos en 50 μl de Buffer (buffer de *Bal 31* provisto por Promega) con 1.5 U de *Bal 31* a 30°C. A los 0, 5, 10, 20 y 30 min. se retiraron alíquotas de 10 μl a las que se le agregó 10 μl de 20 mM EGTA. Las muestras se extrajeron con fenol-cloroformo, se precipitaron con etanol, se digirieron con *Alu I*, se realizó un Southern-blot y se hibridaron con ABGTg7 marcada radioactivamente. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron λ -*Hind III* DNA y ϕ X174-*Hae III* DNA.

más lentamente y existen otras que no se degradan más rápido que el ADN total. Estos resultados sugieren que estas secuencias estarían localizadas en diferentes regiones de los cromosomas, algunas cerca de los telómeros, mientras que otras, más internamente.

4.3. Clonado de dos clusters completos conteniendo las estructuras repetitivas ABGTg7-ABGTg8.2.

Con el objeto de caracterizar un cluster completo ABGTg7-ABGTg8.2 y sus regiones flanqueantes se procedió a rastrear una biblioteca genómica de *T. gondii*.

4.3.1. Rastreo de la biblioteca construida en cósmidos.

Una biblioteca de cósmidos construida con ADN genómico de *T. gondii* en el vector SuperCos 1, fue rastreada con ABGTg8.2. Se aislaron tres cósmidos, y se realizó un Southern-blot al cual se lo hibridó tanto con ABGTg8.2 como con ABGTg7. Ambas sondas hibridaron con los tres cósmidos, dos de ellos mostraron un patrón de hibridación prácticamente idéntico, por lo que se decidió seguir trabajando solo con aquellos que mostraron algunas diferencias entre sí (Fig. 11).

Por otra parte, fue muy llamativo que el patrón de hibridación obtenido con los cósmidos fue muy diferente del obtenido con el ADN genómico, lo que hizo sospechar que esos cósmidos no estaban reflejando al genoma de *T. gondii*, lo que implica que habrían sufrido algún rearrreglo durante el proceso de clonado. Como el

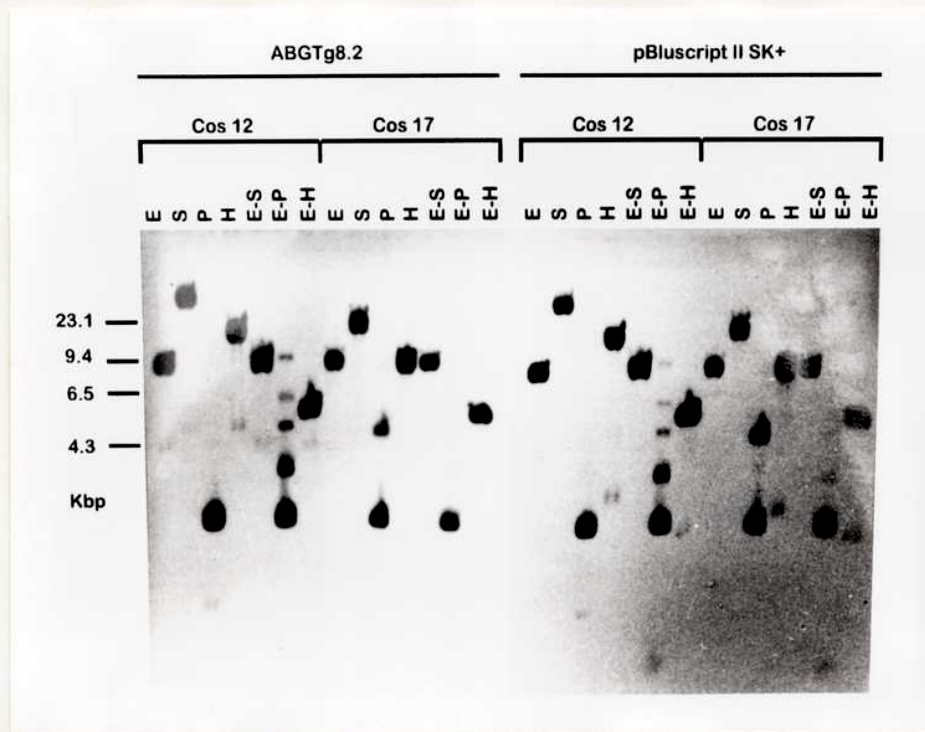


Figura 11. Southern-blot de los cósmidos clonados digeridos con distintas enzimas de restricción e hibridado con ABGTg8.2 y pBluscript marcados radioactivamente. E: *Eco* RI, S: *Sal* I, P: *Pst* I, H: *Hind* III, E-S: *Eco* RI + *Sal* I, E-P: *Eco* RI + *Pst* I, E-H: *Eco* RI + *Hind* III. Cos 12: Cósmido 12, Cos 17: Cósmido 17. El marcador de peso molecular utilizado fue λ -*Hind* III DNA.

vector SuperCos I contiene secuencias del plásmido pBluescript, el primer control realizado fue hibridar los southern de los cósmidos con pBluescript II SK+ para localizar las bandas del vector. Como se puede ver en la Fig. 11, excepto por bandas menores, todas las bandas detectadas por ABGTg8.2 también son detectadas por pBluescript II SK+. La posibilidad más factible es que estos elementos repetidos hayan rearmado (probablemente recombinado) con los brazos del vector.

Otra posibilidad es que las sondas utilizadas estuvieran contaminadas con el plásmido pUC (ABGTg7 y ABGTg8 están clonadas en pUC), vector que comparte secuencias tanto con pBluescript, como con SuperCos I. Sin embargo, esta posibilidad parece muy poco probable debido a que, por un lado el rastreo original fue hecho con ABGTg8.2 que es un fragmento de PCR purificado, y por otro lado, de haber existido contaminación con plásmido no se hubiesen detectado solo tres cósmidos sino que tendrían que haber hibridado casi todos los cósmidos de la genoteca. De hecho, se hizo una amplificación por PCR con los primers de ABGTg8.2 a partir de ADN de los cósmidos obteniéndose la banda del tamaño esperado, la cual fue digerida con enzimas de restricción que cortan dentro de ABGTg8.2 confirmando la identidad de dicha secuencia.

Finalmente se concluyó que estos cósmidos no pueden ser utilizados para caracterizar un cluster ABGTg7-ABGTg8.2 porque evidentemente sufrieron algún reordenamiento. Por lo tanto, se decidió desechar estos cósmidos e intentar un nuevo clonado a partir de una genoteca construida en el fago lambda que son

bastante más estables que las genotecas de cósmidos, aumentando así las posibilidades de obtener clones sin reordenamientos.

4.3.2. Rastreo de la biblioteca construida en el fago λ .

Una genoteca construida en el fago λ Dash II fue rastreada con ABGTg8.2. Del primer rastreo se levantaron 11 clones de los cuales se siguió trabajando con 5 de ellos. Los 5 clones hibridaron con ABGTg7 también.

Lo primero que se hizo fue purificar y caracterizar uno de estos clones, que fue denominado fago α . En la Fig. 12 se muestra un Southern-blot del fago α digerido con varias enzimas de restricción e hibridado con ABGTg7, ABGTg8.2 y ABGTg8.1. En paralelo se hibridó ADN genómico de *T. gondii* digerido con las mismas enzimas, con el objeto de descartar reordenamientos post-clonado, pudiéndose comprobar que la mayoría de las bandas detectadas en el fago correlacionaban con bandas presentes en el ADN genómico (más adelante se muestra un southern genómico en paralelo con los fagos analizados). No todas las bandas correlacionaron, debido a que algunas de ellas, por encontrarse en uno de los extremos del inserto, uno de los sitios de restricción es aportado por el vector y no por el ADN genómico del parásito. Un ejemplo de estas bandas es la de 1.1 Kbp en la línea *Eco* RI que se ve en la Fig. 12, que no está presente en el ADN genómico (ver Fig. 8). Esta última banda corresponde a uno de los extremos del inserto donde un sitio *Eco* RI se encuentra dentro del mismo, mientras que el otro sitio está presente en los brazos del vector.

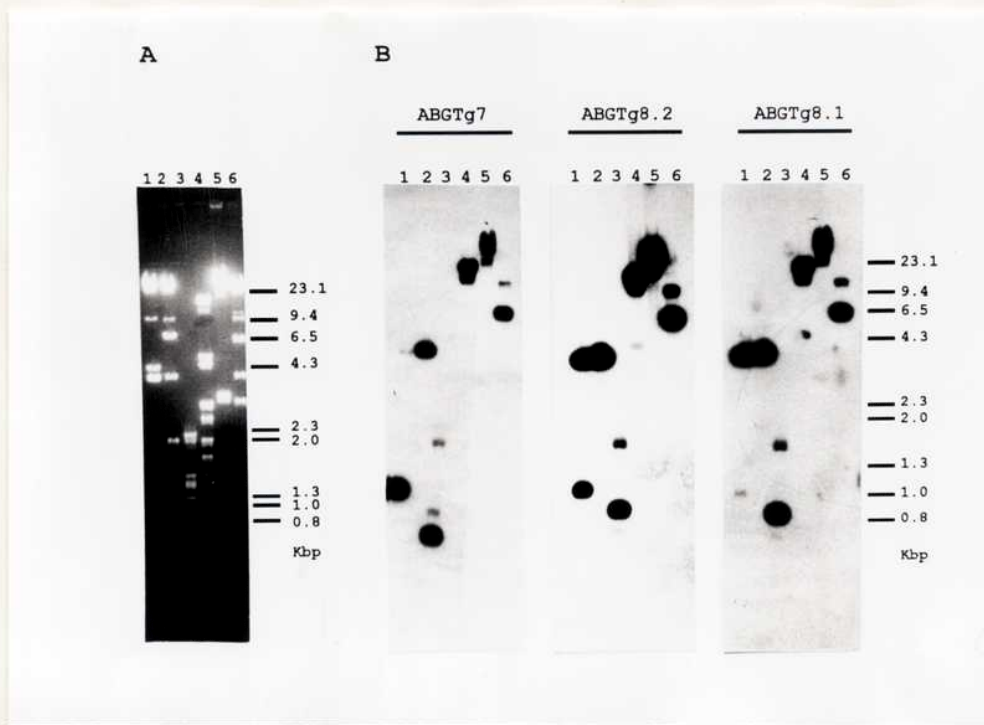


Figura 12. Fago *a* digerido con distintas enzimas de restricción e hibridado con ABGTg7, ABGTg8.2 y ABGTg8.1 marcados radioactivamente. (A) Gel teñido con Bromuro d Etidio. (B) Southern-blot. 1: *Eco* RI, 2: *Sal* I, 3: *Alu* I, 4: *Pst* I, 5: *Hind* III, 6: *Xba* I. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron λ -*Hind* III DNA y ϕ X174-*Hae* III DNA.

Luego se hicieron restricciones parciales del fago *a* con la enzima *Sal* I, y dobles restricciones con algunas de las enzimas utilizadas en el Southern anterior (Fig. 13). Finalmente, a partir de los geles teñidos con Bromuro de Etidio y los Southern de las figuras 12 y 13 se pudo construir un mapa de restricción completo del fago *a* para la enzima *Sal* I y un mapa parcial para las enzimas *Eco* RI y *Xba* I (se muestra más adelante). De esta manera se pudo observar que el fago *a* contendría un cluster ABGTg7-ABGTg8.2 truncado y por lo tanto se procedió a purificar los 4 fagos restantes para ver si se podía obtener un cluster completo.

Luego de purificados, se hizo un Southern-blot con los 5 fagos (los 4 restantes fueron denominados *b*, *c*, *d* y *e*) y digeridos con las enzimas *Eco* RI y *Sal* I, hibridado en paralelo a ADN genómico, con ABGTg7, ABGTg8.2, y los 78 bp (Fig. 14). A partir del patrón de bandas observado por tinción con Bromuro de Etidio y del ensayo de Southern de la Fig. 14 y el mapa de restricción del fago *a* se pudo construir un mapa completo de todos los fagos para las enzimas *Sal* I y *Eco* RI. En la Fig. 15 se muestra el mapa de restricción de cada uno de los fagos y los fragmentos que hibridan con ABGTg7 y/o ABGTg8.2.

El fago *d* tiene un fragmento *Eco* RI de 6 Kbp que tiene dentro una región de aproximadamente 2.6 Kbp con fragmentos *Sal* I de 0.65 y 0.35 Kbp repetidos al menos 2-3 veces donde cada uno de ellos hibrida por lo menos una vez con ABGTg7 (Fig. 15). Esto último fue determinado realizando un "Profile Analysis" en el equipo Phosphor Imager en base a lo siguiente: por secuencia se sabía que uno de los fragmentos *Sal* I (el de 4 Kbp) contiene un solo monómero ABGTg7, por lo

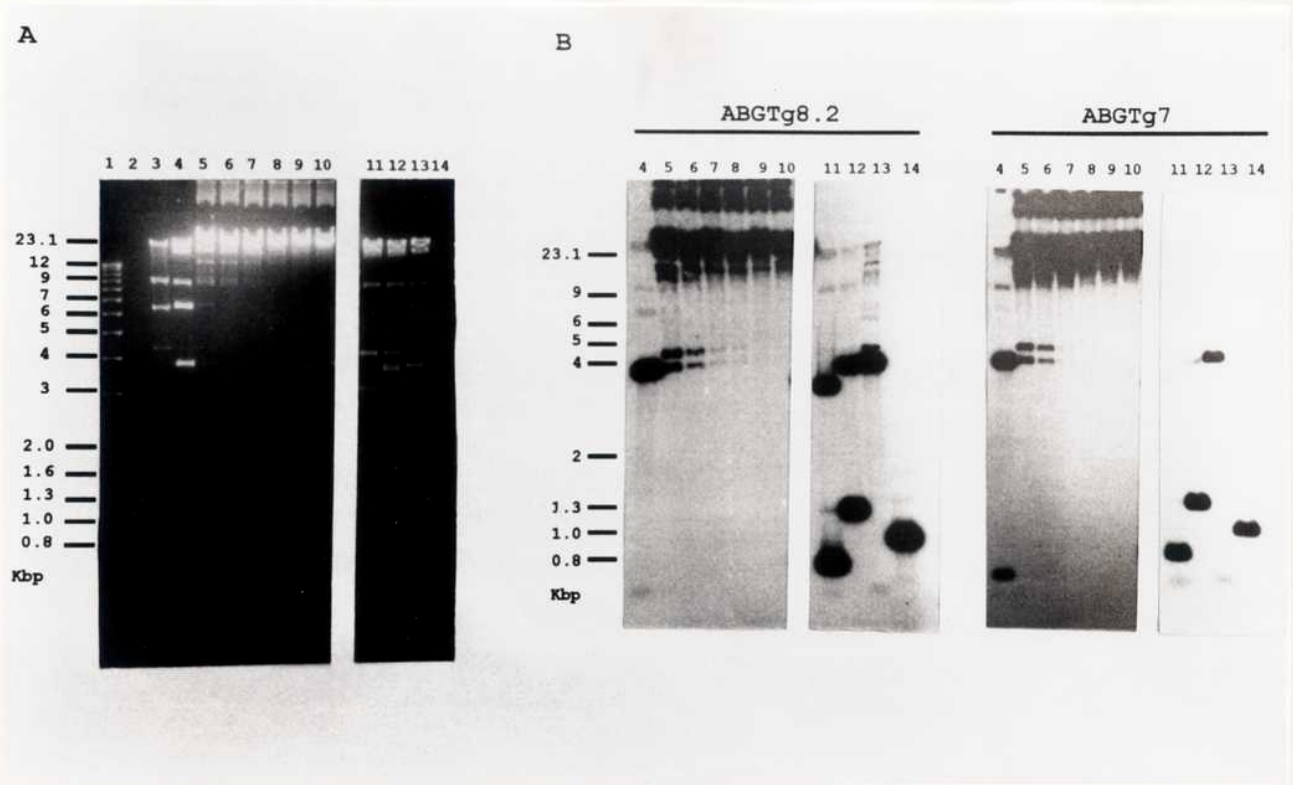


Figura 13. Restricciones parciales y dobles restricciones del fago α . (A) Gel teñido con Bromuro de Etidio. (B) Southern-blot hibridado con ABGTg8.2 y ABGTg7 marcados radioactivamente. 1: 1KBP Ladder, 2: ϕ X174-*Hae* III DNA, 3: λ -*Hind* III DNA, 4 digestión total con *Sal* I, 5: 2U de *Sal* I, 6: 1U de *Sal* I, 7: 0.5U de *Sal* I, 8: 0.25U de *Sal* I, 9: 0.125U de *Sal* I, 10: 0.06U de *Sal* I, 11: *Eco* RI + *Sal* I, 12: *Eco* RI + *Xba* I, 13: *Sal* I *Xba* I, 14: *Taq* I. Las restricciones parciales con *Sal* I fueron realizadas durante una hora con las distintas cantidades de enzima indicadas e inmediatamente luego se las sembró en el gel de agarosa para realizar el Southern-blot.

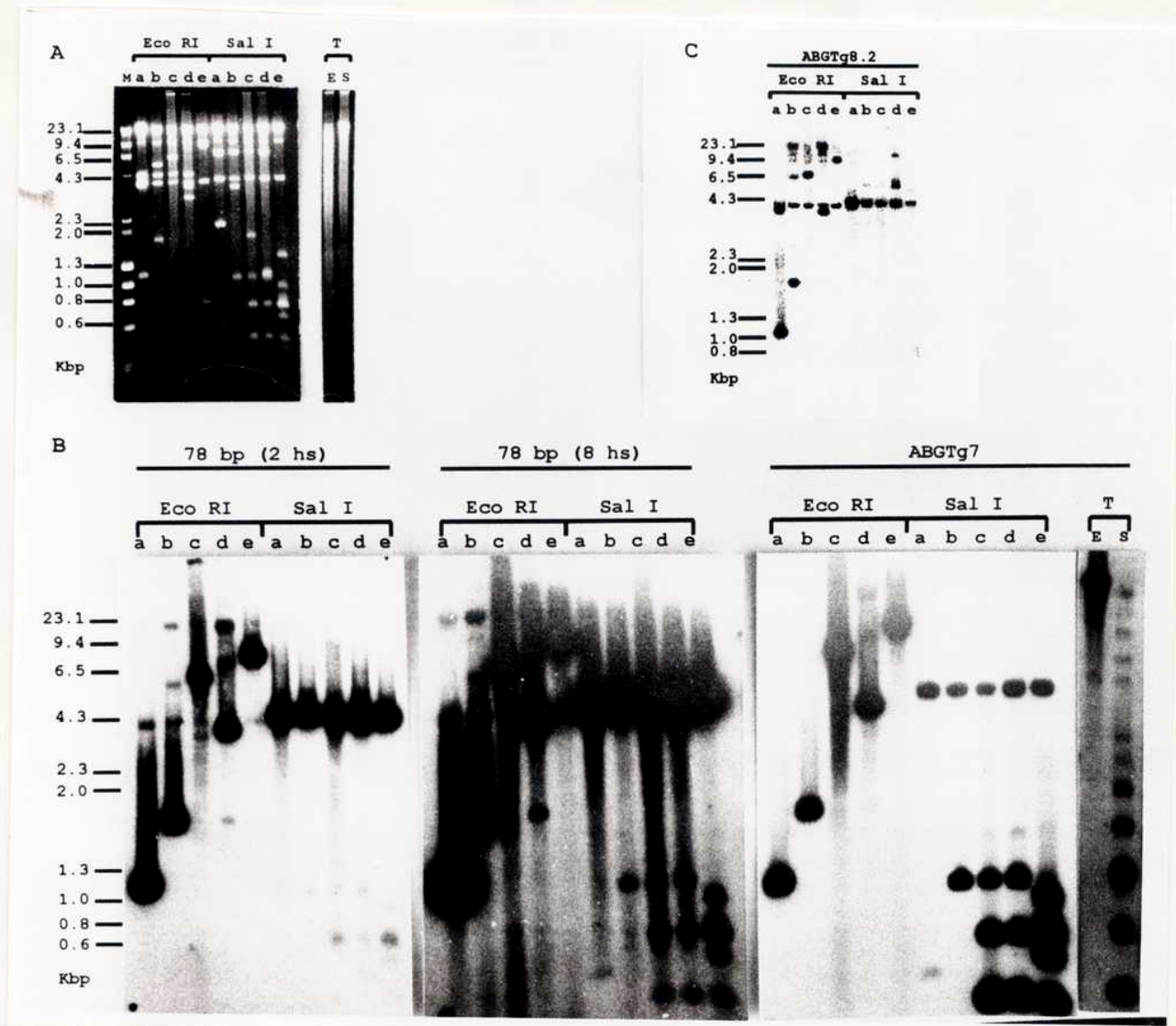


Figura 14. Southern-blot de los fagos *a*, *b*, *c*, *d*, y *e* digeridos con *Eco* RI y *Sal* I e hibridados con los 78 bp, ABGTg8.2 y ABGTg7 marcados radioactivamente. (A) Gel teñido con Bromuro de Etidio. (B) y (C) Southern-blot. M: marcador de peso molecular, λ -*Hind* III DNA y ϕ X174-*Hae* III DNA; a: fago *a*, b: fago *b*, c: fago *c*, d: fago *d*, e: fago *e*, E: *Eco* RI, S: *Sal* I, T: ADN genómico de *T. gondii*. 78 bp (2 hs): 2 horas de exposición, 78 bp (8 hs): 8 horas de exposición, donde se pueden ver mejor las bandas de bajo peso molecular (1.3-0.35 Kbp).

tanto se cuantificó la radioactividad unida a cada una de las bandas y se comparó con la unidad (al fragmento que posee una sola copia), sumado al hecho que por mapeo de restricción el largo total de esta región es de aproximadamente 2.6 Kbp. Probablemente de una de estas regiones genómicas la secuencia ABGTg7 fue originalmente clonada, debido a que en esta zona se deberían encontrar varios monómeros de ABGTg7 en tandem. El fago *c* contiene una versión más corta de esta región. El fago *e* contiene otro cluster, dentro de un fragmento *Eco* RI de 8.5 Kbp, con fragmentos *Sal* I que hibridan con ABGTg7 de 0.9, 0.8, 0.65, 0.6 y 0.35 Kbp repetidos también al menos 2-3 veces (Fig. 15). En total, en el cluster presente en el fago *d* hay como mínimo 7 monómeros de ABGTg7, mientras que en el cluster presente en el fago *e* hay como mínimo 13.

De acuerdo al mapa de restricción, hay 4 fagos (fagos *a-d*) que pertenecen a la misma familia, mientras que el fago *e* exhibe un cluster diferente. Solo los fagos *d* y *e* contienen clusters completos, y vale la pena señalar que a pesar de que estos dos clusters son bastante distintos ambos presentan un fragmento *Eco* RI - *Sal* I de 4.4 Kbp conservado (Fig. 15), que hibrida tanto con ABGTg8.2 como con ABGTg8.1. Este fragmento contiene las principales bandas genómicas que hibridan con ABGTg8.2 y ABGTg8.1: la banda de 3.9 KB *Eco* RI y la banda de 4 Kbp *Sal* I (Fig. 8).

El patrón de hibridación obtenido de la digestión del fago *d* con la enzima *Sal* I es similar al obtenido con la misma enzima en el ADN genómico (Fig. 14), lo que indica que este cluster seguramente está más representado en el genoma que el

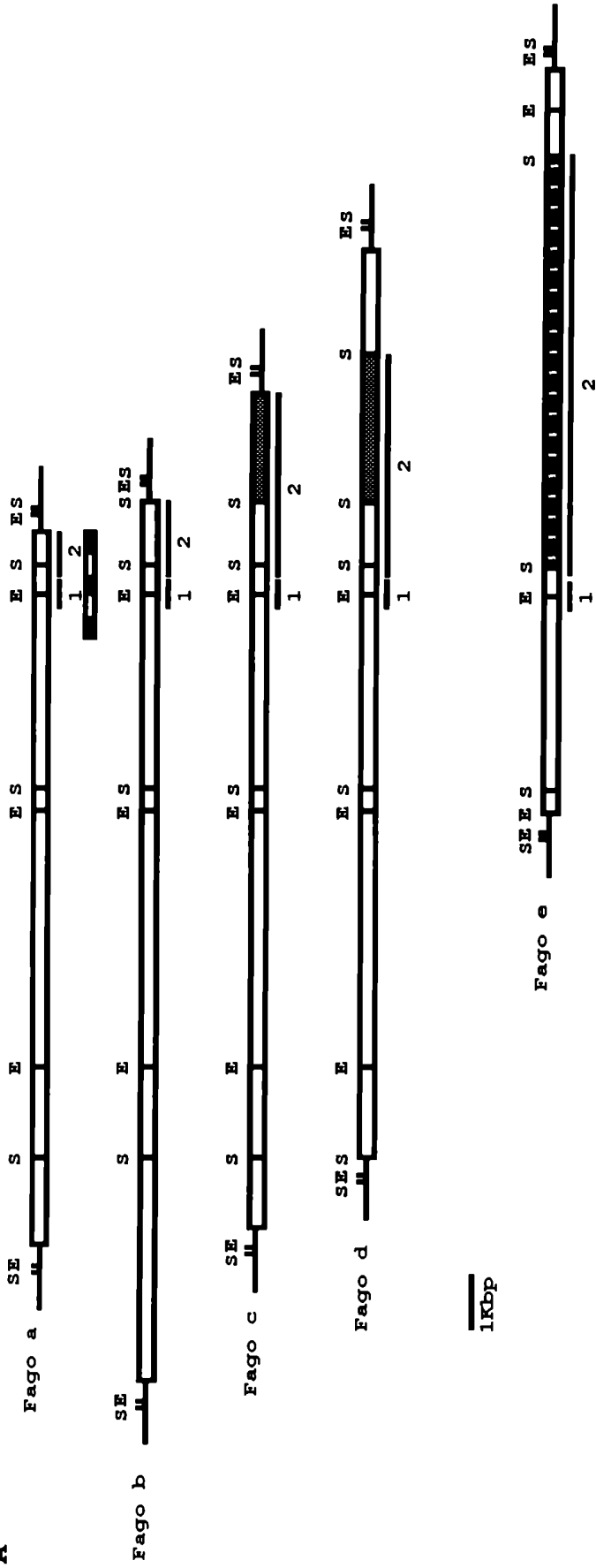
del fago *e*. Además, el fragmento *Eco* RI de 8.5 Kbp presente en el fago *e* es débilmente detectado por ABGTg7 en el ADN genómico (Fig. 8 y Fig. 14), hecho que corrobora su menor representación. El fragmento *Eco* RI genómico que contiene al cluster presente en el fago *d* probablemente corresponda a alguna ó ambas de las bandas de aproximadamente 23 Kbp (Fig. 8 y 14) que no pudieron ser clonadas en su totalidad (uno de los sitios *Eco* RI es aportado por los brazos del vector, Fig. 15).

4.3.3. Análisis de la secuencia del fago *a*.

Una pequeña porción del fago *a* fue secuenciada (Fig. 15 y Fig. 16). Un monómero de ABGTg7 fue encontrado flanqueado a ambos lados por regiones que no tienen homología con ABGTg7 (Fig. 15B). Hacia la región río arriba, se encuentra un elemento ABGTg8.2, mientras que hacia la región río abajo se encuentra un elemento que se denominó TGR4(7-343)RE (Fig. 15B). La razón de esta denominación es que TGR4(7-343)RE presenta alta homología (86%) con una parte de TGR4 (Cristina et al., 1991a) en las posiciones 7 a 343. Además, río abajo de TGR4(7-343)RE hay 109 bp con menor homología con TGR4 (77%) en las posiciones 344-453, y con pequeñas porciones que presentan homología con TGR1E (Fig. 15B).

Sabiendo que los monómeros de ABGTg7 se pueden encontrar tanto en tandem como flanqueados por otros elementos, y que los 78 bp comparten homología con otros elementos repetidos de *T. gondii* distintos de los monómeros de ABGTg7, se intentó determinar la presencia de elementos similares a los 78 bp

A



Fragmentos Sal I de
0.65 y 0.35 Kbp
repetidos 2-3 veces

Fragmentos Sal I de 0.9,
0.8, 0.65, 0.6 y 0.35
Kbp repetidos 2-3 veces

Región secuenciada

Brazos de λ

B

dentro de los clusters clonados. Para ello, el Southern-blot de los fagos fue hibridado con los 78 bp radiomarcados (amplificados por PCR a partir de ABGTg8) (Fig. 14). Como era esperable, dada la homología observada por secuencia (Fig. 7B), solo en condiciones de baja astringencia, los 78 bp detectaron las mismas bandas *Sal* I que ABGTg7, indicando que secuencias similares a los 78 bp podrían encontrarse presentes dentro de los clusters entre los monómeros de ABGTg7 (Fig. 14).

1 GAGGGCACGTTACAGACGATGTTTTTTTTTCTTCATTATGGTGGACATATCGC
 55 GCGATTATTTATTTCCACACCCGGCACAGCGAACCCGTCCGGACGCAGAAAAAAA
 109 CNTGGGAACAGCATGTTCGGCTTAACCTTTCTGCATGCAGCAGTGAACAGGCCCG
 163 GTGCAGAACACTCCCTAGCTATGCCAACGCTCGACGGGTCCGGTAGGTAAGCG
 217 CAGGCACGAACGACACCCGGGTTGTCTGGACAAGAACGTCNTACTGAGAAAATTC
 271 ATGAGACACAGAGAATCTTCACAACAGCGAATGACGAACTCCGCGTGCGGGAAA
 325 AGGCTTGGAGCAGGCGGCTAATGGGAGTTGTCATCTCAACCACACCCGCGACGA
 378 ATCCTGATTCCTCACCGTTTCGTGTGTGCCACCATTTGTTGAAACCACGCATGC
 432 ACAGAAATGGCAAACGCGAATGAGACTAGAAAAGCCTACGGACTATACATCCGA
 487 ATATCGATGAAGAAAAACGTACCATGAATCGAACAAAGGTGGCTTTGAAAGCA
 541 GACCTTGAAAATTTCTGCATGTGACTTGTTTCATTACGAAGTGCAAGACAGTGAA
 595 CAGTTAGCCTCAACTACGCCAGGGCTGCGCAGCACACCAATTTCCGCGTCCCTCGC
 649 AACATCCTGGTATTTCCCGTGTAGTGTGCGTTAGGCGATTACTGTCACACCATA
 703 CCGAAACATGTGGCACCCGCCACGAACAGCAAGTAGCGAATTCGGGAACGAATGA
 757 GCATGGATATCAGACATCGGTAAAGGTTATCGCGCATCGCAGGACAGACACGCA
 811 GCCTCTGACGCGTGTGCGAAACACATCATCGCGTAGCGTTCACCACCTGTACTC
 865 TGCATGATGTAATGCCCGGATGAAGCGCAAAGCACCATTTCTAGTCTCCATTA
 919 GGTCCCGTCCCTGTACATATGCAGCCAAGCCGCGAAGGCCCAAACAAATGCAT
 973 ACAGCGAATCATGTCTCACCCGTTCCCTCCATGTCCGCCAGACAACCAGACAATC
 1027 CCGACGCCTGTGGCGCCCCGAACGCAACACGTCGTCCGTTCCCTGCCAGAGTGA
 1081 TGTCGGACCAATGGCTGGCGGCCGCGCCGCAAATGGAACGTGGACATGTCACCC
 1134 GCACAGCGCGTCCGCCGCGCAGCTAACCACACCTCATTGCGATGACCAATCAGCA
 1189 GTAGTCTCTACGCTACGTGGTGCAGCAGANGCCACGAGACACACCACCCGCCCC
 1243 CGGGTCCTTTTGCTCCCTTACCTCCCGCGCCTGGGCAATACGCCCGACCATCTC
 1297 CCAGACAGATACACGACGACACACAATAAACCCTCTCACCCATCCGCGCATT
 1351 TACGCGACGAGTCGCATAACCATAACAACGCCGACCATGTGGCGCCGCCACACC
 1405 AACACGTCGACAATTCGTGCCAGAGCGACGTCGGACCTCTGGCTGTCACCTGCG
 1459 GCGGAACCTAGACATCGCTACACCGCCACACAGCGCTTCCGACGCGAGCCGAC
 1513 AAACCCTCAACACGTAACCTCCATCACGTGTAGTCTCTGCATGGCCTGACGTCC
 1567 GAGTCGAAATACGAAATCGGCACTCTCATTCTCGCTCACTCTCGCTTCCGTGTC
 1621 ACGAGCAGCCACGCCGAAAACCACCTGCCAATCACACACAGCGAAGCACTTCT
 1675 CACGCGGGCCTCCATCCACCACCCCCACCCCTCATCCCACCCCGCAACCTGTG
 1729 GCGCCGCCAAACGCAACACGTCGGCAGTTCGTGCCAAAGTGCCGAAGGANTCTG
 1783 GCTGGCGGGCGCGCCACACACGCAACGTGGAAATGCCGCCGCCACAGTGCCTCC
 1837 GCTGGCAACAATCAACACCTTATCGCCGTG

Figura 16. Secuencia obtenida a partir del fago *a*. El sitio *Eco* RI se encuentra subrayado y el sitio *Sal* I, doble subrayado.

4.4. Análisis de la secuencia de la unidad repetida de la familia ABGTg7

Se realizó un alineamiento múltiple con todos los monómeros de ABGTg7 secuenciados hasta este momento utilizando el programa Clustal W, que se muestra en la Fig. 17. A partir de éste se pudo obtener una secuencia consenso para esta familia, que se muestra en la Fig. 18. En la Fig. 17 se puede observar el polimorfismo presente en esta familia, como así también por ejemplo que TGR1E y A presentan mayor homología entre ellas que con el resto, lo mismo que sucede con TG7A y B, y TGR2 y 4. En la figura 18 se pueden observar las regiones más conservadas y más variables de esta familia.

TGR1E GTCGACGTGTTGGGTGTGGCG-CGCCACATGGTCCGGCCGGTGTATGATATGCGATTCGT
 TgR1AT.....-.....T.....G.....
 Tg7CG.....-
 .T.....G.....C.....
 Tg7AC.....G...T--.....--..T.-.ACG...A.GAA--A....
 Tg7BC.....G...T-.....GT...T...ACG...A.G.A.A....
 TGR2 CG.CG.T...-..C.....----.....CA....T...TT.T-CCCG....A.T....
 TGR4 CG.CG.T...G.C.....AG.C.....C.....T...TT.T.CCCG....A.T....

TGR1E CGA-GTGCATGCACGGAT-GGGTGAGAGGTTACTGGTTGTGTGTCGTTATGCAGTCTGTC
 TGR1A ..-.....G.....-.....C.....GT.....A.....
 TG7C ..C-..AA...G.....-.....T.A.....CG..T-.....
 TG7A ..C-..A.C.C.G---..-..TA...---..T..--.....G.....
 TG7B ..CT..A.C...G.....-.....C.....T.....-G.....
 TGR2 ..C-..A.C...G.....A.....A...T.....G..T.....
 TGR4 ..C-..A.C...G.....-.....A...T.....G.....

TGR1E TGGGAGATGGTCGGGCGTATTGCCAGGCGCCGGAG-ATGTTAGAAGAAAAGGTTGCGGG
 TGR1AC..T.....T...TTG.....G.....-G.AAG...GC...T.AAC.....
 TG7C-G.AAGG..GC.....ACC.....
 TG7A ..CC..T..T..T.AC--..T...TTT...GC.A.AGACG.AAG..C.....T..
 TG7B ..CC..T..T..T.A...T...TTT...GC.A.AC.-G.AAG..C.....-.....T..
 TGR2 ..C-..G.T.CT..-.....CTT...A...T...-G.AAG..G.....C..ACT..C.
 TGR4 ..C.....T.CT.....TC..TT...AAC.T...-G.AAG.AG.....C..ACTC.C.

TGR1E A-CGTGTGGTGTGTCTCGAGGCAACTGCGGCACCACGTAG-----GGACTACTGCTGATG
 TGR1A GG.....T.....-A.....
 TG7C GG..G.....T...T...T.....CGTAGA.....T
 TG7A GT.C.C.TC.....T.....C...G.....-A..T..G.....
 TG7B GC.C.C.TC.....T.....T.CCG.G...-.....-A..T..G.....
 TGR2 GC.....TC.....C.....T.....CGCCGA.G.G.....
 TGR4 GCGTG..TC.....AT.CACCGA.G.G.....

TGR1E GGGTCACCGCGATGAAGGTGTAGTTAGCTGGCGGCGGAGGCACTGTGCGGGCGGGACGAC
 TGR1A-.....A...C.....C...T.G.AC.T.T.
 TG7C ..-..T..A...-.....G.....C..G.....T.AC.T.T.
 TG7AC...-..C...C.....TGG
 TG7B ..-.....C...-..C...CG.....C--.....-.....-
 TGR2 ..A.G.....CAG-....-T..GTAG.AC.....ACG.
 TGR4 .A..G.....G...-.....T...G...A.....C...-..C.T.T.

TGR1E CATGTTTCATTTGCGGCACAGGTGCTC-CCCGAGGTCCGACATCACTC-GGCAC-GAATT
 TGR1A .G..C.AG...GT.....G..G.TC.-.TA..A...-..C.GG.....-.....-C.C.
 TG7C ..C...C.....G.G.CC..CAG..ATT...G.....T...G-...CG
 TG7A-..GC.....T...C.....
 TG7B-..GC.....G...-.....-.....A.CT.G
 TGR2-A.....T...C.A...C..CAT.A..G...C.-.....
 TGR4AG.....AG.G.CCA.CT-..AAGA.GT.TT.GG....TT.....-..GC.

Figura 17. Alineamiento múltiple (realizado con el programa ClustalW) de todos los monómeros de ABGTg7 secuenciados hasta el presente. TG7C corresponde al monómero hallado dentro de la secuencia del fago α , TG7A y B corresponden a los hallados dentro de ABGTg7 (a y b) y TGR2 y 4, a los hallados dentro de TGR2 y 4. TGR1E y A consisten en un solo monómero (353 bp). Los puntos indican la presencia del mismo nucleótido y las rayas indican deleciones.

GtCgaCgTGttGgGTGTGGCgGCGCcaCAGGTCCgGCcGtTgtatggtatGaGatTCGTCGc
 GTaCcTGCGCGGATGGGTGAGAgGTTATTGGTTGTGTG***TCGTTgTGcAGTCTGTCT***gcGAgAT
 tGttGggCGTtTTgttCAGGcgCnGgaGGTAAGAGaagAAAaGGacgCggGGcCgtgTtcTGT
 GTCTcGaGGCAACTGCgGCAcCACGtAGAGactAc***TGCTGATGGggTcACCGC***gatGaGGtGT
 agtTAGcTGGCgGCGGAGGCACTGTGCGGgcGggAtgtcCATGTTtcATTTGCGGCaCaGgtG
 CtcCCacagGTCCgaCatCACTCtGGCACGaattGTCGAC

Figura 18. Secuencia consenso de la unidad repetida de la familia ABGTg7. Las letras mayúsculas y subrayadas indican la presencia de ese nucleótido en las 7 secuencias analizadas; las mayúsculas indican la presencia en 6 de las 7 secuencias analizadas; y las minúsculas indican el nucleótido mayoritario. En negrita e itálica se encuentran indicados los primers Tg7-3 y Tg7-4 utilizados para amplificar ABTGg7.

4.5. Utilización de ABGTg7 para el diagnóstico directo de la toxoplasmosis humana.

4.5.1. Detección de ADN de *T. gondii* mediante un ensayo de Dot-blot en pacientes con toxoplasmosis activa.

Se estudió un total de 84 pacientes mediante hibridación por Dot-blot utilizando el elemento repetido ABGTg7 (Tabla 1). Los pacientes fueron divididos en dos grandes grupos: grupo A, los pacientes con toxoplasmosis activa confirmada, y grupo B, pacientes sin toxoplasmosis o con toxoplasmosis crónica. A su vez, estos grupos fueron divididos en distintos subgrupos según presentaran encefalitis, linfadenopatías, transplantes de órganos (ver detalles en Materiales y Métodos) (Tabla 1).

De los 38 pacientes con toxoplasmosis activa, 60.5% revelaron señales positivas por Dot-blot en las muestras de sangre analizadas (Tabla 1, grupo A).

Con el objeto de comparar del Dot-blot en pacientes con diferentes formas de infección toxoplásmica activa, los datos fueron listados en forma separada en la Tabla 1. El ADN de *T. gondii* fue detectado en 12 de 18 pacientes con toxoplasmosis cerebral (66.7%), 9 de 17 pacientes con linfadenopatía toxoplásmica (52.9%) y 2 de 3 pacientes transplantados (66.7%) (Tabla 1, grupo A).

El ensayo de Dot-blot con la sonda ABGTg7 demostró ser específico, debido a que ningún falso positivo fue observado. Como se muestra en la Tabla 1 (grupo

B), no se detectó ninguna señal positiva en ninguno de los grupos con toxoplasmosis no activa.

Además, no se observó hibridación cruzada con 500 ng de ADN de organismos clínicamente relacionados con *T. gondii* como ser, *P. carinii*, *C. neoformans*, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *N. asteroides*, *N. brasiliensis*, ó otros patógenos como *P. falciparum*, *P. vivax*, *E. granulosus*, y *C. albicans* (datos no mostrados). En un trabajo previo (Blanco et al., 1992) tampoco se observó hibridación cruzada con *Eimeria*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, ni ADN humano o de ratón.

4.5.2. Estudio comparativo del Dot-blot versus PCR para la detección de ADN de *T. gondii* en pacientes con linfadenopatías toxoplásmicas.

Con el objeto de establecer la correlación entre la hibridación por Dot-blot con la sonda ABGTg7 y un ensayo de PCR que es frecuentemente usado internacionalmente por varios laboratorios (PCR basada en el gen B1 de *T. gondii*, Burg et al., 1989), se realizó un estudio paralelo utilizando ambas técnicas.

En la Fig. 19, se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos por Dot-blot y PCR en las muestras de sangre de 9 pacientes con linfadenopatía toxoplásmica. El ensayo de Dot-blot es considerado positivo cuando la intensidad de la señal obtenida es mayor o igual que 5000 parásitos (ver detalles sobre el ensayo de Dot-blot en Materiales y Métodos). Por lo tanto, basado en las intensidades, los pacientes 1,3,4,5, y 8 serían positivos (Fig. 19A). Por otro lado los pacientes 2,3,5, y 8, serían positivos por PCR, basado en la presencia de bandas del tamaño esperado

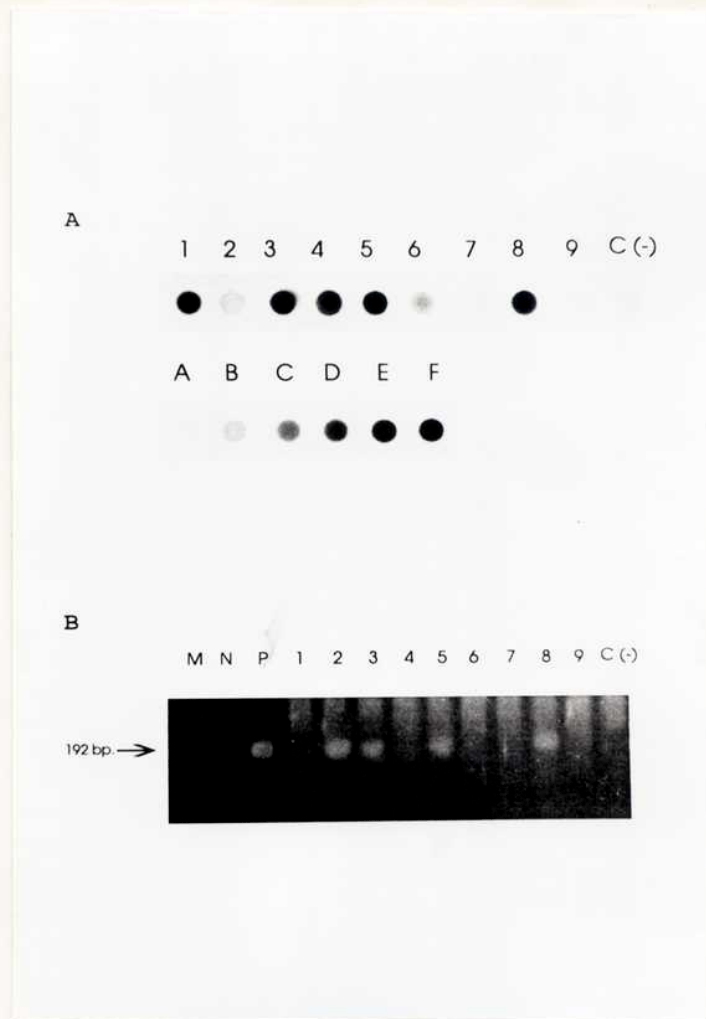


Figura 19. Detección de ADN de *T. gondii* en muestras de sangre de pacientes con linfadenopatía (1 a 9) y un control negativo [C(-)]. (A) Dot-blot de los pacientes hibridado con ABGTg7 marcado con digoxigenina-dUTP. También fueron hibridadas diferentes cantidades de ADN de *T. gondii* equivalentes a: 0 (dot A), 1000 (dot B), 5000 (dot C) 10.000 (dot D), 20.000 (dot E) y 50.000 (dot F) parásitos más 5 μ g de ADN negativo. (B) Productos de amplificación de las muestras de los pacientes analizados en gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio. El marcador de peso molecular utilizado fue ϕ X174-*Hae* III DNA (M). La flecha indica el tamaño del producto de producto de amplificación esperado. Línea N, control negativo que consiste en amplificación de la mezcla de reacción sin ADN; línea P, control positivo que consiste en la amplificación de 1 ng de ADN de *T. gondii*.

en el gel, Fig. 19B. Los resultados de PCR fueron confirmados por una hibridación con una sonda interna biotinilada (ver detalles en Materiales y Métodos).

En total, 9 de 17 muestras (52.9%) dieron señales positivas por Dot-blot, y 10 de 17 muestras (58.8%) produjeron un producto de amplificación del tamaño correcto por PCR (Tabla 2). Sin embargo, en 7 de las 17 muestras (41.1%) se observaron diferentes resultados entre las dos técnicas utilizadas. En 3 muestras se obtuvieron señales positivas por Dot-blot y negativas por PCR (17.6%). Por el contrario, en 4 muestras (25.5%) se obtuvieron señales positivas por PCR y negativas por Dot-blot (Tabla 2). Una inhibición total o parcial de la reacción de PCR fue observada en las muestras que dieron resultados negativos por PCR y positivos por Dot-blot, esto último fue analizado agregando a las mismas una pequeña cantidad (50 pg) de ADN de *T. gondii*.

4.5.3. Estudio comparativo del Dot-blot versus PCR para la detección de ADN de *T. gondii* en ratones experimentalmente infectados.

Con el objeto de analizar en más detalle el estudio comparativo entre las técnicas de Dot-blot y PCR en muestras de sangre, se desarrolló un modelo experimental en ratones, inoculando los mismos con *T. gondii*.

En este experimento, el ADN del parásito fue detectado por Dot-blot en el 60% de las muestras de sangre de 10 ratones experimentalmente infectados, y en un 70% de las muestras por la técnica de PCR (Tabla 2). Una vez más, 1 de las 10 muestras analizadas dio resultados distintos con las 2 técnicas utilizadas (Tabla 2).

4.5.4. Complementación entre el ensayo de Dot-blot y PCR para el diagnóstico de toxoplasmosis activa.

Para los 17 pacientes con linfadenopatía toxoplásmica analizados tanto por Dot-blot como por PCR, si se suman los resultados positivos obtenidos por ambas técnicas, se incrementa el número de sospechas de infección toxoplásmica a un 76.4% de los casos (la suma de los que dieron positivo por los dos métodos con los que dieron positivo por uno solo de ellos) (Tabla 2). Por otro lado, si se consideran los resultados positivos obtenidos simultáneamente por las dos técnicas, se confirmó el resultado en el 35.2% de los casos (considerando solo los que dieron positivo por ambos métodos) (Tabla 2).

4.5.5. Detección de ADN de *T. gondii* mediante un ensayo de PCR utilizando como blanco a la secuencia ABGTg7.

A partir de la secuencia de ABGTg7 se diseñaron primers, denominados Tg7-1 y Tg7-2 (ver Mat. y Met.), para ser utilizados en ensayos de PCR con fines diagnósticos. La elección de ABGTg7 tuvo que ver con el hecho de que esta secuencia presenta en el genoma de *T. gondii* un número de copias mucho mayor que ABGTg8 (ABGTg7 posee aproximadamente 1000 copias por genoma haploide y ABGTg8 250 copias, Blanco *et. al.*, 1992), con lo cual se esperaba obtener mayor sensibilidad utilizando esta secuencia y además la misma ya había sido utilizada con éxito para el diagnóstico en ensayos de Dot-blot (tanto en los resultados aquí presentados como en Angel *et. al.*, 1992). No obstante así, se hizo una prueba para

comparar las PCRs ABGTg7(Tg7-1-2) y ABGTg8.2. Se amplificaron muestras conteniendo diferentes cantidades de ADN de *T. gondii* y sorprendentemente la sensibilidad de la PCR ABGTg8.2 fue mayor que la de ABGTg7(Tg7-1-2) (datos no mostrados). Una posible explicación es que los primers que habían sido elegidos para ABGTg7 no estaban levantando todas las copias existentes sino solo algunas de ellas. Esto podría deberse a que al tratarse de secuencias repetitivas con gran variabilidad o polimorfismo entre las distintas copias, los primers elegidos estuvieran hibridando en una zona variable, y solo se peguen a algunas de todas las copias existentes, lo cual fue confirmado por el alineamiento múltiple. De hecho, dichos primers se localizan en la misma región unidad repetida (por eso amplifican un fragmento de 350 bp), pero en una región lo suficientemente variable para que el programa Oligo TM los eligiera como buenos candidatos cuando se sometió a su análisis a la secuencia ABGTg7. La localización de estos primers se muestra en la Fig. 17 bis.

```

TGR1E   CGA-GTGCATGCACGGAT-GGGTGAGAGGTTACTGGTTGTGTGTCGTTATGCAGTCTGTC
TGR1A   ...-.....G.....-.....C.....GT.....A.....
TG7C    ..C-..AA...G.....-.....T.A.....CG..T.....
TG7A    ..C-..A.C.C.G---...-..TA...---...T...-.....G.....
TG7B    ..CT..A.C...G.....-.....C.....T.....-G.....
TGR2    ..C-..A.C...G.....A.....A.....T.....G..T.....
TGR4    ..C-..A.C...G.....-.....A.....T.....G.....

```

Figura 17 bis. Se muestra una región del alineamiento múltiple extraída de la Fig. 17 donde se puede ver la localización de los primers Tg7-1 y Tg7-2 (negrita y subrayados).

Así, los primers utilizados en ABGTg8 debían estar hibridando en una zona más conservada y levantando un número de copias mayor que ABGTg7 a pesar que esta última posea más copias por genoma. Por lo tanto, una vez realizados los estudios de homología, a partir de las zonas conservadas de la secuencia consenso de los monómeros de ABGTg7 (Fig. 18), se diseñaron nuevos primers denominados Tg7-3 y Tg7-4, para ser utilizados en diagnóstico. Esta nueva PCR-ABGTg7 presenta mayor sensibilidad que la PCR-ABGTg8 (Fig. 20). Una característica de este nuevo ensayo PCR-ABGTg7 es que la banda que se obtiene es más ancha de lo común, probablemente debido a que se estén levantando distintas copias con pequeñas variaciones en su tamaño. A partir de estos resultados se siguió trabajando sólo con la PCR-ABGTg7 nueva (primers Tg7-3 y Tg7-4).

Para evaluar su utilización en el diagnóstico de la toxoplasmosis humana, distintas clases de muestras de pacientes con sospecha de toxoplasmosis fueron analizados y los resultados se muestran en la tabla 3.

En los pacientes 2, 9, 10 y 14, el diagnóstico de toxoplasmosis no pudo ser confirmado hasta la fecha. El paciente 18 resultó tener una toxoplasmosis crónica. Por lo tanto, el porcentaje de detección para los pacientes con toxoplasmosis activa confirmada fue de 53.8% (sobre un total de 13 pacientes).

Es interesante comentar que se analizó una segunda muestra del paciente 7 al poco tiempo de empezado el tratamiento anti-*Toxoplasma* y la PCR-ABGTg7 se negativizó.

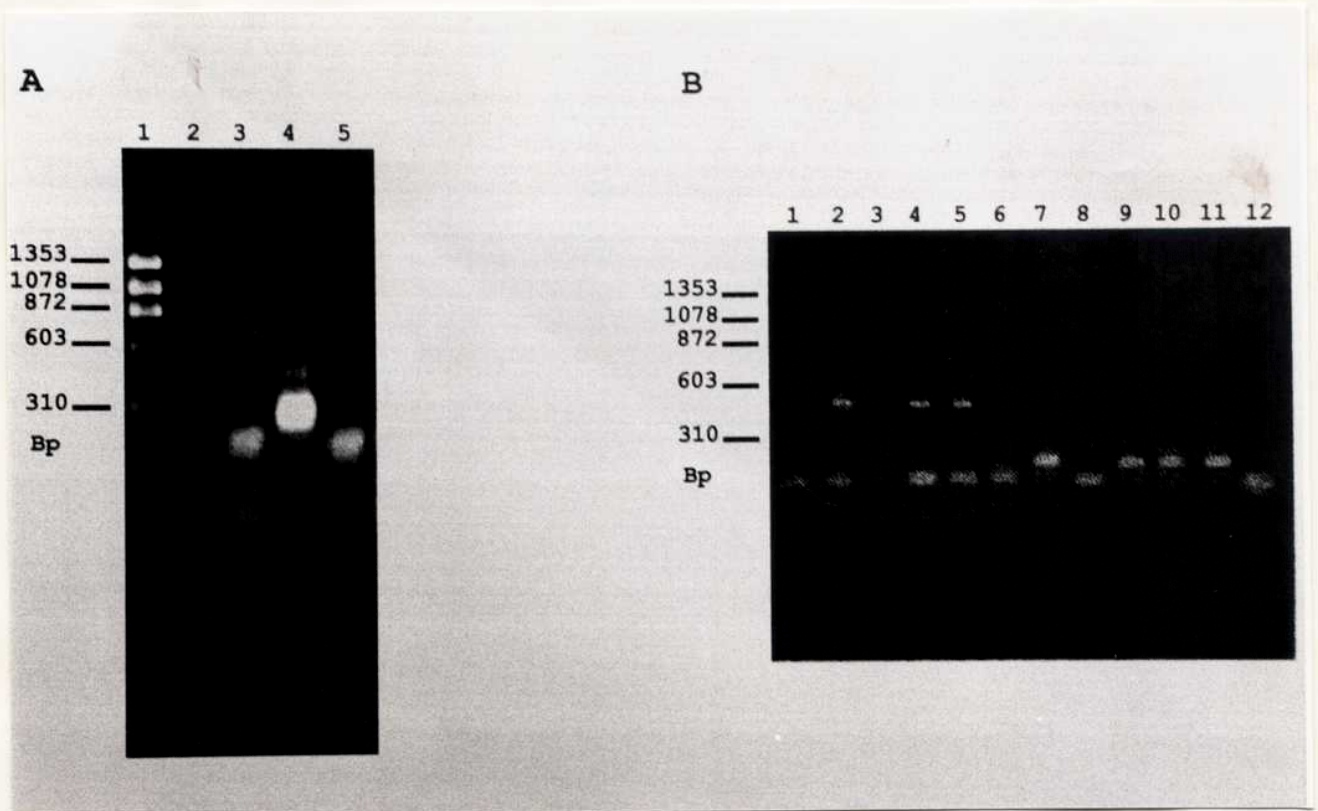


Figura 20. (A) Comparación de PCRs utilizando primers de ABGTg8.2 y ABGTg7. 1: marcador de peso molecular, ϕ X174-*Hae* III, 2: 5 ng de ADN de *T. gondii* amplificados utilizando primers de ABGTg8.2, 3 y 5: controles negativos, 4: 5 ng de ADN de *T. gondii* amplificados utilizando primers de ABGTg7. (B) Detección de ADN de *T. gondii* en muestras de un paciente, utilizando las PCRs ABGTg8.2 y ABGTg7. En 1 a 6 se utilizaron primers de ABGTg8.2, en 7 a 12, primers de ABGTg7. 1: control negativo, 2: control positivo, 3, 4 y 5: amplificación del ADN del paciente extraído a partir de 50, 300 y 600 μ l de sangre respectivamente, 6: amplificación del ADN a partir de una biopsia de corazón, 7: control positivo, 8: control negativo, 9, 10 y 11: amplificación del ADN del paciente extraído a partir de 50, 300 y 600 μ l de sangre respectivamente, 12: amplificación del ADN a partir de una biopsia de corazón. El marcador de peso molecular utilizado fue ϕ X174-*Hae* III.

Discusión

5.1. Organización genómica de los elementos repetitivos.

En este trabajo se describe la relación entre dos elementos de *T. gondii* repetidos en tandem: ABGTg7 y ABGTg8. ABGTg7 contiene dos unidades repetidas completas, más 55 nucleótidos de una tercer unidad. ABGTg8 contiene dos elementos repetidos diferentes, uno de ellos relacionado con las unidades de ABGTg7, y otro, denominado ABGTg8.2 con un tamaño no mayor de 300 bp, que se encuentra ligado a los monómeros de ABGTg7. Además, ambos elementos repetidos forman parte de una estructura en tandem más compleja presente en el genoma en grandes clusters, en al menos 3 de los 4 cromosomas más grandes del parásito, y a juzgar por los ensayos hechos con *Bal* 31, algunos elementos estarían cerca de los telómeros mientras que otros estarían localizados en regiones internas de los cromosomas.

Del análisis de 5 fagos genómicos, se obtuvieron dos clusters completos distintos de estas estructuras repetidas ABGTg8.2-ABGTg7. Existen diferencias cuantitativas entre ambos clusters dado que uno de ellos (fagos *a-d*) se encuentra más representado en el genoma de *T. gondii*, como fue observado por el patrón de los Southern así como también lo sugiere el hecho de que 4 de 5 clones, corresponden a este cluster. Debido a que ambos clusters poseen uno de sus extremos conservado, con un fragmento de aproximadamente 4.4 Kbp (fragmento *Eco* RI – *Sal* I) que hibrida tanto con ABGTg8.2 como con ABGTg8.1, se estima que la secuencia río arriba de ABGTg8.2, ABGTg8.1, sería un elemento repetido de bajo número de copias, de características y tamaño aún no determinados. El hecho

que ABGTg8.2 detecte numerosas bandas en un Southern-blot genómico y casi todas compartidas con ABGTg7, infiere que ABGTg8.2 estaría básicamente relacionado a los elementos ABGTg7. Como soporte adicional, la presencia de los 78 bp dentro de ABGTg8.2, que también hibridan dentro del cluster de ABGTg7, implica que estos dos elementos repetidos no-homólogos pertenecen a una única estructura.

El análisis de la secuencia del fago *a*, indica que existen dos tipos de subestructuras dentro de los clusters ABGTg8.2-ABGTg7: monómeros de ABGTg7 de aproximadamente 340-350 bp dispuestos en tandems directos, y monómeros de ABGTg7 flanqueados a ambos lados por otros elementos también de aproximadamente 300-350 bp que no contienen homología con ABGTg7 y en este caso tampoco entre ellos (por ejemplo: ABGTg8.2-ABGTg7-TGR4(7-343)RE). Cristina et al., (1991a) también encontró un monómero de ABGTg7 flanqueado por dos elementos no relacionados en la secuencia TGR4. Además, TGR4 en las posiciones 7 a 343, posee una homología significativa con el elemento previamente mencionado TGR4(7-343)RE. Las secuencias TGR fueron subclonadas a partir de un fago λ EMBL3 recombinante seleccionado de una biblioteca genómica de *T. gondii* (Cristina et al., 1991a). Los datos sugieren que el cluster aislado por estos autores es similar al cluster contenido en los fagos *a-d*. TGR1A y E son monómeros similares a los contenidos en ABGTg7, mientras que solo parte de TGR2 (posiciones 344-674) y TGR4 (posiciones 337-688) contienen monómeros similares a los de ABGTg7. Además TGR2 (posiciones 1-344) y TGR4 (posiciones 688-

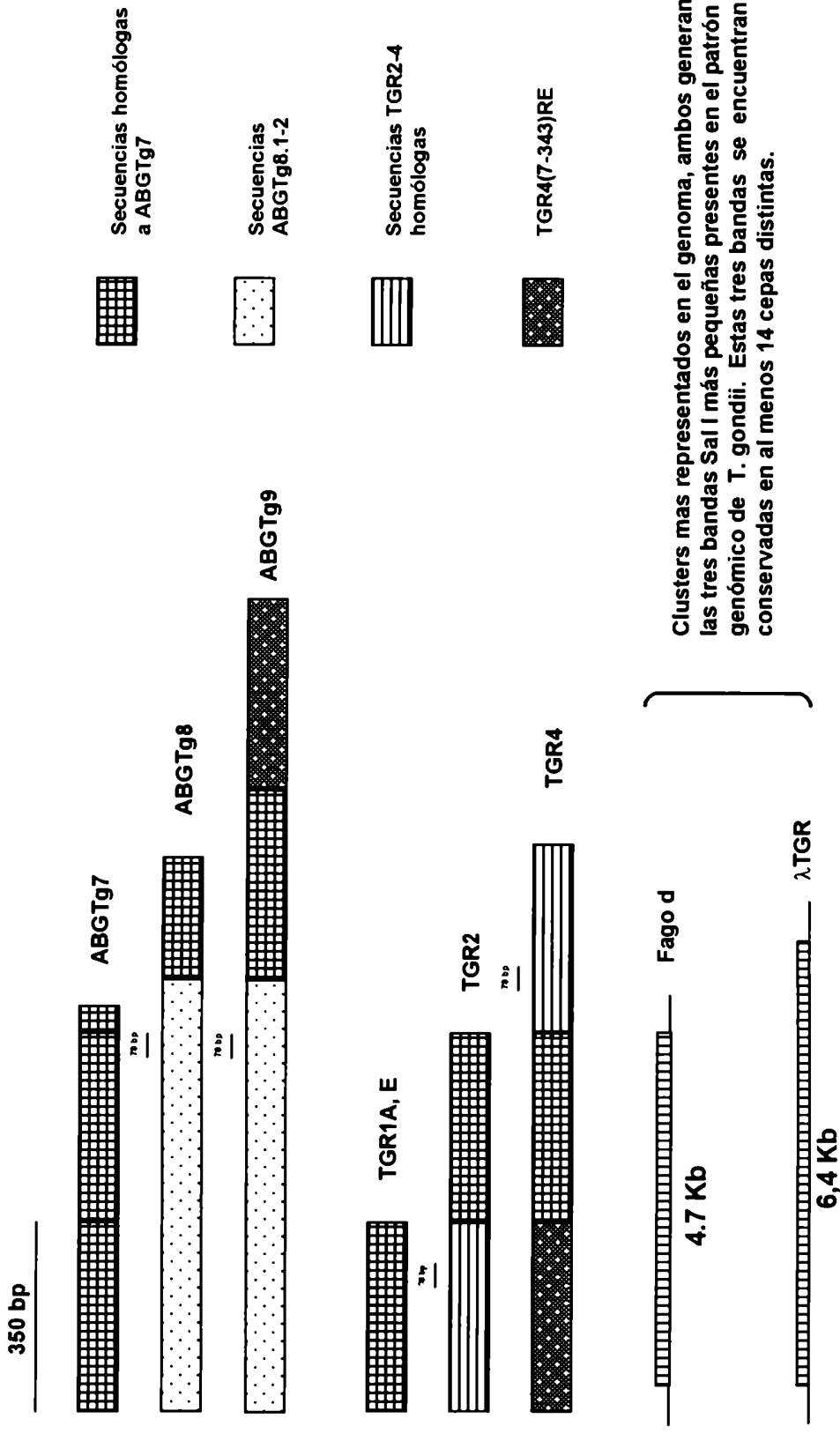
1032) comparten gran homología entre ellos indicando la presencia de por lo menos dos elementos repetidos distintos en este cluster. Por otro lado, ABGTg8.2, que se encuentra presente en dos clusters diferentes, contiene una región de 78 bp con homología con TGR2 y TGR4. Por lo tanto, los elementos flanqueantes a ABGTg7 también pueden contener homología entre ellos, aunque no se encuentran tan conservados como los monómeros de ABGTg7, y en algunos casos la homología puede darse solo en pequeñas regiones. Más aún, algunos de estos elementos flanqueantes contendrían regiones pequeñas con homología a TGR1E (Cristina et al., 1991a). Todos estos datos indican que los monómeros de ABGTg7 son el elemento principal de estos clusters, en los que se encuentran dispuestos en tandem, interrumpidos a veces por otros elementos. Mientras que los monómeros de ABGTg7 probaron pertenecer a una familia muy polimórfica de *T. gondii*, los otros elementos no muestran una relación tan obvia. En la Fig. 21 se muestra un esquema que resume lo mencionado en este párrafo.

En la naturaleza es posible encontrar una gran variedad de estructuras repetitivas complejas. Dentro del área de la Parasitología se encontró una diversidad de elementos repetitivos no relacionados, como por ejemplo los presentes en las regiones subteloméricas de *Plasmodium falciparum* (De Bruin et al., 1994). Estos autores demostraron que las regiones subteloméricas de los cromosomas de *P. falciparum* contienen 4 elementos repetidos no relacionados silenciosos transcripcionalmente, y sugirieron que estos elementos promueven el apareamiento entre cromosomas facilitando la recombinación meiótica y la conversión génica

entre los genes próximos a los telómeros. El genoma de *Trypanosoma cruzi* contiene un elemento repetitivo disperso de 428 bp que ha sido denominado SIRE (Vazquez et al., 1994). Este elemento se encuentra presente en algunos genes ribosomales P2 β y la inserción de un elemento SIRE río arriba del gen TcP2 β -H1.8 introdujo un nuevo sitio 3' acceptor para el "trans-splicing". Otro ejemplo es el genoma de *Trichinella spiralis* que contiene dos elementos repetidos en tandem de 516 y 604 bp respectivamente relacionados entre ellos y a su vez con otro elemento repetido de 1.1 Kbp (Connolly et al., 1995). Estos dos elementos comparten aproximadamente un 60% de homología y se encuentran dispuestos como un dímero repetitivo. La estructura de *T. gondii* aquí descrita es bastante diferente a los casos previamente mencionados, así como también es distinta de otras estructuras repetitivas complejas fuera del área de la parasitología (Zhang et al., 1994, Tourmente et al., 1994., Forsyth y Geary, 1996), mostrando una vez más la diversidad presente en la naturaleza.

Mientras que los microsátélites y minisátélites generalmente se encuentran localizados en las regiones eucromáticas de los cromosomas con tasas de recombinación intermedias y altas, los satélites usualmente se encuentran en las regiones heterocromáticas donde la recombinación se encuentra severamente reducida, incluyendo telómeros, centrómeros y el organizador nucleolar (Charlesworth et al., 1994; Jamilena et al., 1993). Utilizando un modelo de simulación, Stephan y Cho (1994), encontraron que el tamaño de las unidades repetidas en el ADN satélite es en promedio mucho más grande que el de los

Secuencias repetidas de *T. gondii*



Clusters mas representados en el genoma, ambos generan las tres bandas Sal I más pequeñas presentes en el patrón genómico de *T. gondii*. Estas tres bandas se encuentran conservadas en al menos 14 cepas distintas.

Figura 21. Esquema que resume todas las secuencias repetitivas caracterizadas hasta la fecha, relacionadas con la familia ABGTg7. Las áreas con distintos sombreados o patrones representan secuencias homólogas a los distintos elementos repetitivos indicados.

minisatélites, y que estructuras complejas o de órdenes mayores son comunes en el ADN satélite pero no en los minisatélites. Tanto elementos de gran tamaño (350 bp contra aproximadamente 15 bp que usualmente se encuentran en los minisatélites) como estructuras complejas fueron encontradas en los clusters ABGTg8.2-ABGTg7 analizados. Por esta razón se sugiere que los elementos repetidos aquí analizados constituyen parte del ADN satélite de *T. gondii*. Por otra parte, la sensibilidad de algunas bandas de ABGTg7 a *Bal 31* indica la presencia de algunas de ellas cerca de las regiones teloméricas. Las bandas con sensibilidad intermedia o no sensibles podrían estar localizadas en otras regiones heterocromáticas de los cromosomas, esto último sugerido por el hecho de que estas secuencias no se transcriben.

Los dos clusters distintos aquí clonados, probablemente se pudieron haber generado por un alineamiento incorrecto entre los clusters originales, pero sí alineados por sus monómeros homólogos (intercambio desigual), como ha sido demostrado para el caso del Satélite Alfa humano (Warburton et al., 1993). El satélite Alfa es una familia de elementos repetidos en tandem no codificantes presentes en los centrómeros de todos los cromosomas humanos y de primates. Las unidades repetitivas principales del satélite son de 171 bp, organizadas en tandem dentro de arreglos lineales distintos que forman estructuras repetidas de órdenes mayores. El estudio realizado por estos autores, comprende un set de 13 variantes de estructuras repetidas de órdenes mayores, integradas por una subfamilia de 5 monómeros de 171 bp distintos. Estas estructuras de órdenes mayores difieren en su tamaño por números enteros de sus monómeros y fueron generadas por el

intercambio entre las mismas estructuras no correctamente alineadas, pero sí alineados por sus monómeros homólogos. Se demostró que la distribución de los eventos de recombinación no fue azarosa, lo que sugirió posibles efectos de la secuencia primaria y/o de la estructura de la cromatina, y la posición de los mismos parece estar asociada con el sitio de unión de una proteína específica del centrómero denominada CENP-B (Warburton et al., 1993). Además la proteína CENP-B comparte una homología significativa con una proteína codificada por el transposón “Pogo” de *Drosophila melanogaster*, lo que otra vez sugiere un rol para CENP-B en la recombinación del ADN. En estudios futuros, sería interesante determinar los sitios de recombinación por comparación de los clusters ABGTg8.2-ABGTg7 y la posibilidad de interacción con proteínas de unión al ADN.

Otra característica de los clusters ABGTg8.2-ABGTg7 es que se encuentran dispersos a lo largo de los cromosomas más grandes de *T. gondii*. Este tipo de ADN satélite, dispuesto en tandem en clusters y a su vez disperso, fue reportado en numerosos insectos (Traut, 1987; Blancheot, 1991; DiBartolomeis et al., 1992), *Caenorhabditis elegans* (La Volpe et al., 1988), *Xenopus laevis* (Spohr et al., 1981), *Saccharomyces cerevisiae* (Martinez-Soriano et al., 1991), especies de *Triturus* (Vignoli et al., 1991) y múridos (Hirning et al., 1989). De hecho, la amplia distribución genómica de estos clusters en muchos organismos no puede ser fácilmente explicada por la generación *in situ* de los mismos, por esta razón fue propuesto que este tipo de clusters deberían movilizarse por algún mecanismo de transposición. (Traut 1987, Traut et al., 1992). Si las secuencias aquí analizadas

surgieron por un mecanismo de transposición es también una pregunta abierta. Recientemente, se presentó evidencia molecular de transposición de estructuras repetitivas en tandem para especies de *Chironomus thummi* (Hankeln et al., 1994, Ross et al., 1997), *Sinapis arvensis* (Kapila et al., 1996), los genomas del arroz (Ohtsubo et al., 1994), y *Brassica juncea* (Xia et al., 1994). Los elementos Cla son una familia de ADN repetido en tandem que constituyen un minisatélite presente en varias especies de *Chironomus*. Mientras que estos de elementos se encuentran dispersos en los cromosomas de *C. t. thummi*, en subespecies muy relacionadas, se encuentran localizados solo en la zona centromérica. Lo que se ha demostrado es que esta distribución diferencial se debe a la transposición de los clusters de elementos Cla durante la evolución del genoma de *C. t. thummi*, y que se movilizan junto con sus regiones flanqueantes (Hankeln et al., 1994, Ross et al., 1997). *Sinapis arvensis* contiene una familia de ADN repetitiva en tandem de unidades de 700 bp que a su vez se encuentran flanqueadas por secuencias repetidas invertidas, lo que estaría evidenciando un evento de transposición. Esta familia contiene dentro de sus unidades un motivo de “subrepeats” tipo telomérico, pero su localización no es telomérica sino interna en los cromosomas y la familia es especie específica (Kapila et al., 1996). Los genomas de arroz contienen una familia de secuencias de ADN repetitivas en tandem denominada TrsA que se insertó en dos loci distintos por un mecanismo de transposición y se hallan flanqueadas por secuencias repetidas directas (Ohtsubo et al., 1994). *Brassica juncea* posee una familia denominada Carnep que en su mayoría se encuentra dispuesta en grandes arreglos de unidades

repetidas en tandem, con unidades de 176 bp. Sin embargo algunos clusters se encuentran dispersos en el genoma y cada uno de ellos se encuentra flanqueado por elementos repetidos invertidos que no son parte de la secuencia básica de la familia *Carnep*, por lo que se ha sugerido un mecanismo de transposición durante su dispersión (Xia et al., 1994).

Las fuerzas que gobiernan la evolución del ADN satélite son menos comprendidas que las que controlan los micro- y minisatélites, hecho debido principalmente a que el gran tamaño de los clusters de ADN satélite impiden el análisis experimental directo (Charlesworth et al., 1994). El intercambio desigual en combinación con la deriva genética al azar y la selección natural pueden ejercer efectos importantes en la acumulación genómica de las secuencias repetitivas en tandem (Charlesworth et al., 1994). Modelos de simulación por computadora sugieren que las estructuras repetitivas complejas o de órdenes mayores se forman preferencialmente en regiones de baja recombinación y poca presión de selección sobre el tamaño de los arreglos (Stephan y Cho, 1994). Los procesos de intercambio genético se han considerado importantes en el moldeado de los genomas complejos, resultando en la duplicación, deleción o fusión génica y contribuyendo a la diversidad genética presente en las poblaciones durante la evolución (Dover, 1986, Strachan et al., 1985). La utilización del ADN satélite de *T. gondii* en estudios futuros, podría agregar nuevos datos a la dinámica evolutiva de este tipo de secuencias. *T. gondii* es un modelo simple e interesante de explorar, su genoma es pequeño y el taquizoito posee altas tasas de división celular, presenta tamaños

pequeños del ADN satélite en comparación con otros eucariotas, y comprende sólo tres linajes clonales predominantes.

Además de su interés desde el punto de vista básico, el ADN satélite puede tener aplicaciones prácticas interesantes, generalmente aprovechando el hecho de que sean secuencias especie específicas. Por ejemplo, en el área de la parasitología, se ha utilizado al ADN satélite de los nematodos como marcador taxonómico para uso agronómico (Grenier et al., 1997). Los nematodos son utilizados como control biológico contra varios insectos que afectan los cultivos. Los mismos actúan entrando al insecto huésped y lo matan en dos días. Debido a que existen varias especies de nematodos que difieren en su efectividad, una identificación rápida y precisa de éstos es necesaria para su uso como agentes de control biológico. El uso de ADNs satélites especie específicos, permitió distinguir de manera efectiva y rápida entre especies cercanamente relacionadas (Grenier et al., 1997). Para el caso de *T. gondii*, ABGTg7 ha demostrado ser útil para el diagnóstico de la toxoplasmosis humana. En una revisión reciente sobre el polimorfismo genómico de este parásito, Frenkel y Ambroise-Thomas (1997), puntualizaron que no existe un polimorfismo tal que justifique una división específica o subespecífica. El uso de una secuencia homóloga a los monómeros de ABGTg7, TGR1E, para el estudio de los polimorfismos entre cepas de *T. gondii* permitió agruparlas de acuerdo a su virulencia (Cristina et al., 1995). Los patrones de las distintas cepas digeridas con la enzima *Sal* I e hibridadas con TGR1E, mostraron variabilidad sólo en las bandas ubicadas por encima de la región de 2 Kbp, mientras que todas las cepas

mantuvieron conservadas las bandas de 0.35, 0.65 y 1.1 Kbp (Cristina et al., 1995). Estas tres últimas bandas son generadas por el fago λ -TGR (Cristina et al., 1991a) y los fagos *c-d* (Fig. 14). Estos resultados sugieren que el cluster presente en el fago *e*, el cual genera otras bandas debajo de la región de 2 Kbp (2 conservadas y 3 no) (Fig. 14 y 15), no se

encuentra muy representado entre las distintas cepas de *T. gondii*. Además el análisis de la digestión con *Sal* I de los fagos *c-d* y TGR, sugiere que ninguno de los 3 contiene un cluster que produce el patrón de RFLPs distintivo ni completo para ninguna de las cepas analizadas, debido a que todos los fagos principalmente generan las bandas conservadas, pero hay muchas más bandas presentes en el patrón *Sal* I por encima de la región de 2 Kbp (ver por ejemplo el patrón de la cepa RH en la Fig. 8). La única banda distintiva presente en los fagos *a-e*, es la banda conservada de 4 Kbp (*Sal* I) (Fig. 14 y 15) situada en uno de los extremos de los clusters, y presente en varias cepas pero no en todas (Cristina et al., 1995). Debido a que el rastreo de la genoteca fue realizado con ABGTg8.2, se han seleccionado los clusters conteniendo la banda conservada de 4 Kbp, es decir, aquí se clonó un tipo particular de clusters, pero la existencia de otros tipos es necesaria para explicar los patrones diferenciales de los RFLPs con la enzima *Sal* I. Por lo tanto, o bien existen clusters que han perdido numerosos sitios *Sal* I, ó lo más probable, es que se encuentren dispersos en diferentes regiones del genoma y justamente sean estas regiones flanqueantes las responsables de los patrones diferenciales de los RFLPs. Una vez más, los datos sugieren una estructura compleja para las secuencias

relacionadas con ABGTg7, incluyendo elementos repetidos polimórficos en combinación con la dispersión en distintos sitios a lo largo de los cromosomas de *T. gondii*.

5.2. Utilización de ABGTg7 en ensayos de Dot-blot para el diagnóstico directo de la toxoplasmosis humana.

Debido a que ABGTg7 resultó ser la secuencia más repetida del genoma de este parásito, además de ser específica y haber resultado útil para el diagnóstico en líquido cefalorraquídeo de pacientes con SIDA (Angel et al., 1992), en este trabajo se decidió evaluar el valor diagnóstico del ensayo de Dot-blot en muestras de sangre. Se pudo detectar la presencia del parásito en el 66.7% de los casos de toxoplasmosis cerebral y pacientes transplantados, y en el 52.9% de los casos con linfadenopatías toxoplásmicas. Estos resultados fueron obtenidos independientemente, con un alto grado de reproducibilidad.

El hecho de que el porcentaje de señales positivas sea mayor en los casos de toxoplasmosis cerebral y trasplantes, sugiere que la reactivación y diseminación del parásito podría ser una característica en los pacientes inmunocomprometidos. Sin embargo, Khalifa et al., (1994) detectaron muy poca parasitemia en pacientes con SIDA y encefalitis por el método de PCR. Estos autores concluyeron que la detección del parásito por PCR en este tipo de pacientes podría ser útil solo en los pacientes con una infección cerebral muy severa o diseminación de la enfermedad. Asimismo, Rodriguez et al., (1997) encontraron que en los casos de encefalitis toxoplásmica la detección de ADN por el método de PCR es mucho más útil en los pacientes que no han recibido tratamiento profiláctico anti-*Toxoplasma*. El alto porcentaje de señales positivas halladas por Dot-blot en este trabajo, pueden ser explicadas por el hecho de que fueron realizados en pacientes con manifestaciones

cerebrales muy severas y que no recibieron tratamientos profilácticos. A pesar del estado neurológico avanzado de estos pacientes el ensayo fue suficientemente rápido (2-3 días) para aplicar una terapia específica exitosa.

Un diagnóstico rápido y preciso de la toxoplasmosis activa es un requisito *fundamental* para el manejo de los pacientes. Para alcanzar este objetivo, muchos investigadores desarrollaron ensayos de PCR basados en genes de bajo número de copias (Bretagne et al., 1995, Burg et al., 1989, Dupuoy-Camet et al., 1993, Filice et al., 1993, Gros et al., 1992, Grover et al., 1990, Guy y Joynson 1995, Khalifa et al., 1994, Lavrard et al., 1995 Smits et al., 1995). El ensayo de PCR demostró una alta sensibilidad, detectando entre 1-10 taquizoitos cuando se utiliza ADN purificado de *T. gondii*. Por esta razón el ensayo de PCR ha sido planteado en un principio como un método con alto potencial para el diagnóstico de la toxoplasmosis activa en humanos. El ensayo de Dot-blot tiene un límite de sensibilidad de 800 parásitos (Blanco et al., 1992). Si bien la sensibilidad es bastante menor que la obtenida por PCR, cuando se desarrolla una parasitemia en un paciente, la cantidad de parásitos parece ser suficiente como para ser detectados por ambas técnicas. Por otra parte hay que tener en cuenta que una cosa es el límite de sensibilidad cuando se trata de ADN de *T. gondii* purificado, y otra cosa muy distinta es la detección en una muestra biológica.

Usando muestras de sangre de pacientes con Linfadenopatías, Guy y Joynson (1995), detectaron ADN de *T. gondii* con una PCR basada en el gen B1, en un 53% de los casos. Dupoy-Camet et al., (1993), obtuvieron resultados positivos en

un 68% de los pacientes con toxoplasmosis cerebral, utilizando una PCR basada en el gen P30. Dupon et al., (1995), obtuvieron señales positivas por una PCR basada en una secuencia ribosomal, en un 76.9% de los pacientes con toxoplasmosis cerebral, utilizando dos muestras distintas de cada paciente: una de líquido cefalorraquídeo y otra de sangre; y sus datos mostraron un 40% de detección si solo utilizaban sangre. Sin embargo, el uso de la técnica de PCR para el diagnóstico de la toxoplasmosis, en otros casos llevó a resultados contradictorios. Por ejemplo, Ho-Yen et al., (1992) no pudieron encontrar ninguna señal positiva en 13 pacientes con linfadenopatía toxoplásmica; y Lavrard et al., (1995), compararon el ensayo de PCR con la técnica de cultivo celular y la tinción de Giemsa en muestras de lavados broncoalveolares de pacientes con toxoplasmosis pulmonar sin encontrar ninguna diferencia entre los distintos ensayos; y finalmente estos autores comentaron que analizaron 10 pacientes con toxoplasmosis cerebral por PCR y no hallaron ningún resultado positivo.

Los resultados de los pacientes con linfadenopatías obtenidos por PCR en este trabajo, son consistentes con lo que encontraron Guy y Joynson (1995). Cuando se compara el valor diagnóstico del Dot-blot con el de PCR se obtienen resultados similares (52.9 versus 58.8%). En los ratones infectados experimentalmente la detección de ADN de *T. gondii* se logró en un 60% de los casos para el Dot-blot y en un 70% para la PCR. Además, en algunas muestras solo una de las dos técnicas (ó el Dot-blot ó la PCR) fue capaz de detectar el ADN de *T. gondii*. Un Dot-blot negativo con una PCR positiva puede significar o bien un falso positivo de PCR o

bien que la técnica de PCR es más sensible. Debido a que no se encontraron falsos positivos, la última explicación es la más probable. Un Dot-blot positivo y una PCR negativa puede ser explicado por una inhibición total o parcial de la reacción de amplificación debido a la presencia de inhibidores en las muestras de los pacientes, como ha sido demostrado para las muestras a las que se le agregó 50 pg de ADN de *T. gondii* (equivalente a aproximadamente 500 parásitos). Un trabajo reciente demostró que a partir de las mismas muestras de sangre, el ADN extraído por extracción fenólica reduce la sensibilidad de la PCR-B1, en comparación a otros tipos de extracciones no-fenólicas (Rodríguez et al., 1997). De todas maneras, lo que vale la pena señalar es que el uso conjunto de ambas técnicas permitió aumentar la tasa de detección de *T. gondii* a un 76.4% en los pacientes con linfadenopatías. Por otra parte, la tasa de detección simultánea de ambas técnicas (35.2%) es bastante mediocre.

En conclusión, los resultados aquí obtenidos mostraron que el ensayo de Dot-blot con la sonda ABGTg7 marcada no radioactivamente es rápido, simple, sensible y específico. Por otra parte, resulta fácil obtener muestras de sangre y el método de obtención es no invasivo. Además, hasta el presente la técnica de Dot-blot no arrojó ningún falso positivo para las muestras analizadas. Por todo lo expuesto, lo que se propone es que, el ensayo de Dot-blot puede ser utilizado como una alternativa para la detección de *T. gondii* en fluidos biológicos y debido a que no muestra problemas de inhibición y es fácil de estandarizar, la combinación con la técnica PCR-B1 podría ser una interesante y exitosa complementación para mejorar el rastreo de *T.*

gondii al menos en muestras de sangre. Por otra parte, si bien para el rastreo de *T. gondii* se podrían sumar los resultados obtenidos con las dos técnicas, la confirmación del diagnóstico debería basarse en la obtención del mismo resultado por ambas técnicas. En este sentido, Holliman et al., (1996) sugirieron que para PCR, se necesita la obtención de resultados positivos por al menos dos ensayos distintos. Finalmente, la obtención de un resultado negativo, no descarta una infección activa de *T. gondii*.

5.3. Utilización de ABGTg7 en ensayos de PCR para el diagnóstico directo de la toxoplasmosis humana.

Si bien el número de pacientes aquí analizados todavía no es lo suficientemente grande para establecer una conclusión definitiva, los resultados obtenidos con esta técnica son promisorios y en principio indicarían que la PCR ABGTg7 con los primers aquí utilizados podría ser utilizada para el diagnóstico de la toxoplasmosis humana.

Vale la pena comentar que la PCR a partir de muestras de Biopsias no parece estar puesta a punto aún, debido a que en el paciente número 1 cuya sangre fue positiva y el diagnóstico de toxoplasmosis fue confirmado, dio un resultado negativo en la muestra de biopsia. Por lo tanto también habría que considerar dudosos los resultados obtenidos en los pacientes 5 y 6. Actualmente se está trabajando para mejorar la extracción de ADN de muestras de biopsias. Asimismo, la utilización de

kits comerciales que han demostrado extraer ADN con un alto grado de pureza y en forma reproducible, serán aplicados en el futuro.

Cristina et al., (1992) utilizando primers de la secuencia TGR1E, que se muestran en la Figura 22 y también se encuentran dentro de la secuencia consenso de ABGTg7, obtuvieron resultados satisfactorios para la detección de *T. gondii* en pacientes con SIDA. En el trabajo realizado por estos autores analizaron 88 pacientes con SIDA con sospecha de toxoplasmosis, de los cuales 4 dieron resultados positivos por PCR y por otras técnicas de diagnóstico.

gtcgacgtggtgggtgtggcggcgccacatggtccggccggtgtatg
 gtatgagattcgtcgcgtacctgcgcggatgggtgagaggttattgg
ttgtg ***tgtcgttgtcagtcgtct***gcgagattggtggcgttttgt
 tcaggcgcnggaggtaagagaagaaaaggacgcggggccgtgttctg
 tgtctcgaggcaactgcggcaccacgtagagactac***tgctgatgggg***
tcaccgcgatgaggtgtagtttagctggcggcggaggcactgtgcggg
cgggatgtccatgtttcatttgcggcacaggtgctcccacaggtccg
 acatcactctggcacgaattgtcgac

Figura 22. Secuencia consenso de la unidad repetida de la familia ABGTg7, donde se muestran los primers utilizados por Cristina et al., (1992) (doble subrayados), y los utilizados en este trabajo, TG7-3 y TG7-4 (negrita e itálica).

5.4. Diagnóstico de la toxoplasmosis con técnicas moleculares.

Un grupo de laboratorios europeos, con el fin de evaluar el valor diagnóstico de la técnica de PCR, analizaron 110 pacientes con SIDA y sospecha de encefalitis toxoplásmica, 54 pacientes con encefalitis toxoplásmica confirmada, y 46 pacientes sin encefalitis toxoplásmica (Gross, 1996). Para ello usaron como blanco de la PCR, tanto el gen B1 como la secuencia TGR1E. Lograron un 50% de detección en los pacientes con encefalitis toxoplásmica confirmada y comentaron que la PCR no parece ser una técnica útil para analizar pacientes con sospecha de encefalitis toxoplásmica. Por otro lado también comentaron que obtuvieron varios falsos positivos en el grupo sin encefalitis toxoplásmica y que por lo tanto esta técnica necesita ser mejorada y vuelta a analizar.

Robert et al., (1996) analizaron los límites de la técnica de PCR para el diagnóstico de la toxoplasmosis cerebral en pacientes inmunocomprometidos tanto en muestras de sangre como de líquido cefalorraquídeo. Utilizaron también PCRs basadas tanto en B1 como TRG1E. Estos autores lograron un nivel de detección de 58.9% utilizando una u otra PCR (B1 ó TGR1E), sin embargo la detección simultánea de las dos PCRs (B1 y TGR1E) fue de 23.5%. La conclusión que sacaron fue que la sensibilidad de la PCR para el diagnóstico de la toxoplasmosis cerebral en pacientes inmunocomprometidos es muy baja, probablemente debido a una diseminación hematogena del parásito inconstante y/o transitoria. Por otro lado, también evaluaron la utilización de la PCR para el diagnóstico prenatal de la toxoplasmosis congénita a partir de líquido amniótico, y concluyeron que muy

diferente es el valor diagnóstico de la PCR en estos casos, donde la contribución de esta técnica es fundamental. El hecho de que la técnica de PCR constituya una herramienta sensible y efectiva para el diagnóstico de la toxoplasmosis congénita fue también sugerido por Joss y Ho-yen, (1997).

El nivel de detección tanto del Dot-blot como de la PCR presentados en este trabajo fue acorde a lo descrito en la bibliografía para los distintos casos de toxoplasmosis diseminada (cerebral, linfadenopatías, trasplantados). Estos resultados sugieren que ambas técnicas podrían ser aplicadas a cualquier tipo de fluido biológico incluyendo líquido amniótico y más recientemente orina (Fuentes et al., 1996). Trabajos en esta dirección están siendo llevados a cabo.

Referencias

- Angel, S.O., Blanco, J., Maero, E., Pszeny, V., and Garberi, J.C. 1991. Repetitive DNA sequences of *Toxoplasma gondii* for development of diagnostic probes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz-Rio 86: 483-484.
- Angel, S.O., Maero, E., Blanco, J., Pszeny, V., Zala, C., Gonzales, R., Perelmuter, H., and Garberi, J.C. 1992. Early diagnosis of toxoplasmic encephalitis in AIDS patients by dot blot hybridization analysis. J. Clin. Microbiol. 30: 3286-3287.
- Beckers C.J., Roos D., Donald R.G., Luft B.J., Schwab J.C., Cao Y., Joiner K.A. (1995). Inhibition of cytoplasmic and organellar protein synthesis in *Toxoplasma gondii*. Implications for the target of macrolide antibiotics. J. Clin. Invest. 95:367-376.
- Bermudes D., Peck K.R., Afifi M.A., Beckers C.J.M., Joiner K.A. (1994). Tandemly repeated genes encode nucleosido triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. J. Biol Chem 269:29252-29260.
- Black M., Seeber F., Soldati D., Kim K., Boothroyd J.C. 1995. Restriction enzyme mediated integration elevates transformation frequency and enables cotransfection of *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol. 74:55-63.
- Blancheot, A. 1991. A *Musca domestica* satellite sequence detects individual polymorphic regions in insect genome. Nucleic Acids Res. 19: 929-932.
- Blanco, J., Angel, S.O., Maero, E., Pszeny, V., Serpente, P., and Garberi, J.C. 1992. Cloning of repetitive DNA sequences from *Toxoplasma gondii* and their usefulness for parasite detection. Am. J. Trop. Med. Hyg. 46: 350-357.
- Bohne W., Wirsing A., and Gross U. 1997. Bradyzoite-specific gene expression in *Toxoplasma gondii* requires minimal genomic elements. Mol. Biochem. Parasitol. 85:89-98.

- Boothroyd J.C., Black M., Kim K., Pfefferkorn E.R., Seeber F., Soldati D. 1995. Forward and reverse genetics in the study of the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. Adolph K (ed) Methods in molecular genetics. Academic, New York pp 3-29.
- Bretagne, S., J. M. Costa, J. Fleury-Feith, F. Poron, M. L. Dubreuil-Lemaire, and M. Vidaud. 1995. Quantitative competitive PCR with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of toxoplasmosis in AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.* **33**:1662-1664.
- Burg, J. L., C. M. Grover, P. Pouletty, and J. C. Boothroyd. 1989. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **27**:1787-1792.
- Charlesworth, B., Sniegowski, P., and Stephan, W. 1994. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* **371**: 215-220.
- Connolly B., Ingram L.J., Smith D.F.. 1995. *Trichinella spiralis*: cloning and characterisation of two repetitive DNA sequences. *Exp. Parasitol.* **80** (3): 488-498.
- Cornelissen, A., Overdulve, J.P., and Van der Ploeg, M. 1984. Determination of nuclear DNA of five eucoccidian parasites, *Isospora (Toxoplasma) gondii*, *Sarcocystis cruzi*, *Eimeria tenella*, *E. acervularia* and *Plasmodium berghei*, with special reference to gametogenesis and meiosis in *I. (T.) gondii*. *Parasitology* **88**: 531-553.
- Cristina N., Derouin F., Pelloux H., Pierce R., Cesbron-Delauwn M. F., Ambrosie-Thomas P.. 1992. Detection of *Toxoplasma gondii* by "Polymerase Chain Reaction" (PCR) technique in AIDS infected patients using the repetitive sequence TGR1E. *Pathol. Biol.* **40**:52-55.
- Cristina, N., Dardé, M. L., Boudin, C., Tavernier, G., Pestre-Alexandre, M., and Ambroise-Thomas, P.A. 1995. A DNA fingerprinting method for individual characterization of *Toxoplasma gondii*

strains: combination with isoenzymatic characters for determination of linkage groups. *Parasitol. Res.* **81**: 32-37.

Cristina, N., Liaud, M. F., Santoro, F., Oury, B., and Ambroise-Thomas, P.A. 1991a. A family of repeated DNA sequences in *Toxoplasma gondii*: Cloning, sequence analysis and use in strain characterization. *Exp. Parasitol.* **73**: 73-81.

Cristina, N., Oury, B., Ambrosie-Thomas, P., and Santoro, F. 1991b. Restriction fragment length polymorphism among *Toxoplasma gondii* strains. *Parasitol. Res.* **77**: 266-268.

De Bruin D., Lanzer M., and Ravetech J. V.. 1994. The polymorphic subtelomeric regions of *Plasmodium falciparum* chromosomes contain arrays of repetitive sequence elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:619-623.

Deveraux, J., Haerberli, P., and Smithies, O. 1984. A comprehensive set of sequence analysis program for the VAX. *Nucleic Acid Res.* **12**: 387-395.

Di Barttolomeis, S.M., Tartof, K.D., and Jackson F.R. 1992. A superfamily of *Drosophila* satellite related (SR) DNA repeats restricted to the X chromosome euchromatin. *Nucleic Acids Res.* **20**: 1113-1116.

Donald R.G.K. and Roos D.S. 1994. Homologous recombination and gene replacement at the dihydrofolate reductase-thymidilate synthase locus in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **64**:243-253.

Donald R.G.K. and Roos D.S. 1995. Insertional mutagenesis and marker rescue in a protozoan parasite: cloning of the uracil phosphoribosyltransferase locus from *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:5749-5753.

- Donald R.G.K., and Roos D.S. 1993. Stable molecular transformation of *Toxoplasma gondii*: a selectable dihydrofolate reductase-thymidilate synthase marker based on drug-resistance mutations in malaria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**:11703:11707.
- Donald R.G.K., Carter D., Ullman B., and Roos D.S. Insertional tagging, cloning and expression of the *Toxoplasma gondii* hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene. J. Biol. Chem. **271**:14010-14019.
- Dover G.A. 1986. Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. Trends Genet. **2**:159-165.
- Dubremetz J.F. (1995). Molecular Approaches to Parasitology, pages 345-358, Wiley-Liss, Inc.
- Dupon, M., J. Cazenave, J. Pellegrin, J. Ragnaud, A. Cheyrou, I. Fischer, B. Leng, and J. Lacut. 1995. Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and Tissue Culture in Cerebrospinal Fluid and Blood of Human Immunodeficiency Virus-Seropositive Patients. J. Clin. Microbiol. **33**: 2421-2426.
- Dupuoy-Camet, J., S. Lavareda de Souza, C. Maslo, A. Paugam, A. G. Saimot, R. Benarous, et al. 1993. Detection of *Toxoplasma gondii* in venous blood from AIDS patients by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. **31**:1866-1869.
- Ellis J., Griffin H., Morrison D., Johnson A.M. (1993). Analysis of dinucleotide frequency and codon usage in the phylum Apicomplexa. Gene **126**:163-170.
- Fichera M.E., Bhopale M.K., Roos D.S. 1995. In vitro assays elucidate peculiar kinetics of clindamycin action against *Toxoplasma gondii*. Antimicrob. Agents Chemoter. **39**:1530-1537.
- Filice, G. A., J. A. Hitt, C. D. Mitchell, M. Blackstad, and S. W. Sorensen. 1993. Diagnosis of *Toxoplasma* parasitemia in patients with AIDS by gene detection after amplification with polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. **31**:2327-2331.

- Forsyth M. H., Geary S. J.. 1996. The Repetitive Element Rep MP 1 of *Mycoplasma pneumoniae* Exists as a Core Element with a Larger, Variable Repetitive Mosaic. *Journal of Bacteriology*, **178**:917-921.
- Frenkel J.K. (1973). Toxoplasmosis. A parasite life cycle, pathology, and immunology. In "The Coccidia" (D. M. Hammond ed.) pp. 343-410. University Park Press, Baltimore, MD.
- Frenkel J.K. and Ambroise-Thomas P. 1997. Genomic drift of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res.* **83**:1-5.
- Fuentes I., Rodriguez M., Domingo C. J., del Castillo F., Juncosa T., and Alvar J.. 1996. Urine Sample Used for Congenital Toxoplasmosis by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **35**:2368-2371.
- Gimwood J., and Smith J.E. (1996). *Toxoplasma gondii*: the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion. *Int J Parasitol* **26**:169-173.
- Gray, I.C., and Jeffreys, A.J. (1991). Evolutionary transience of hypervariable minisatellites in man and the primates. *Proceedings of the Royal Society of London.* **243**: 244-253.
- Grenier E., Castagnone-Sereno P., Abad P. 1997. Satellite DNA sequences as taxonomic markers in Nematodes of agronomic interest. *Parasitol. Today* **13**:398-401.
- Gros, U., A. Roggenkamp, K. Janitschke, and J. Heesemann. 1992. Improved sensitivity of the polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii* in biological and human clinical specimens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **11**:33-39.
- Gross U. 1996. *Toxoplasma gondii* research in Europe. *Parasitology Today*, **12**:1-4.
- Grover, C. M., P. Thulliez, J. S. Remington, and J. C. Boothroyd. 1990. Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection using polymerase chain reaction in amniotic fluid. *J. Clin. Microbiol.* **28**:2297-2301.

- Guy, E. C., and H. M. Joynson. 1995. Potential of the polymerase chain reaction in the diagnosis of active *Toxoplasma* infection by detection of parasite in blood. *J. Infect. Dis.* **172**:319-322.
- Hankel T., Rohwedder A., Weich B., and Schmidt E. R.. 1994. Transposition of ministatellite-like DNA in *Chironomus* midges. *Genome*, **37**: 542-549.
- Harding, R.M., Boyce, A.J., and Clegg, J.B. (1992). The evolution of tandemly repetitive DNA Recombination rules. *Genetics* **132**, 847-859.
- Hirning, U., Schulz, W.A., Just, W., Adoph, S., and Vogel, W. 1989. A comparative study of the heterochromatin of *Apodemus sylvaticus* and *Apodemus flavicollis*. *Chromosoma* **98**: 450-455.
- Holliman R.E. 1994. Recent developments in the diagnosis of toxoplasmosis. *Serodiagn. Immunother. Infect. Disease.* **6**: 5-16.
- Howe D.K. and Sibley L.D. 1994. *Toxoplasma gondii*: analysis of different laboratory stocks of RH strain reveals genetic heterogeneity. *Exp. Parasitol.* **78**:242-245.
- Howe D.K. and Sibley L.D. 1995. *Toxoplasma gondii* is comprised of three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* **172**:1561-1566.
- Ho-yen, D. O., A. W. Joss, A. H. Balfour, E. T. M. Smyth, D. Baird, and J. M. W. Chatterton. 1992. Use of polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma gondii* in human blood samples. *J. Clin. Pathol.* **45**:910-3.
- Jamilena, M., Ruiz Rejon, C., and Ruiz Rejon, M. 1993. Repetitive DNA sequences in *Crepis capillaris*. *Chromosoma* **102**: 272-278.
- Joss A. W. L. and D. O. Ho-Yen.. 1997. The effects of sample storage on polymerase chain reaction-based detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluids. *J. Med. Microbiol.* **46**:92-96.

- Kapila R., Das S., Srivastava P. S., Lakshmikumaran M.. 1996. A novel species-specific tandem repeat DNA family from *Sinapis arvensis*: detection of telomere-like sequences. *Genome*, **39**:758-766.
- Khalifa, K. El-S., A. Roth, B. Roth, K. N. Arasteh, and K. Janitschke. 1994. Value of PCR for evaluating occurrence of parasitemia in immunocompromised patients with cerebral and extracerebral toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* **32**:2813-2819.
- Kim K., Soldati D., and Boothroyd J.C. 1993. Gene replacement in *Toxoplasma gondii* with chloranphenicol acetyltransferase as selectable marker. *Science* **262**:911-914.
- Kohler S., Delwiche CF., Denny P W., Tilney LG., Webster P., Wilson RJM, Palmer JD, Roos DS. (1997). A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science*, **275**: 1485-1489.
- LaVolpe, A., Ciaramella, M., and Bazzicalupa, P. 1988. Structure, evolution and properties of a novel repetitive DNA family in *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res.* **16**: 8213-8231.
- Lavrard, I., C. Chouaid, P. Roux, J. L. Poirot, M. Marteau, B. Lamarchand, M. C. Meyohas, and J. L. Olivier. 1995. Pulmonary toxoplasmosis in HIV-infected patients: usefulness of polymerase chain reaction and cell culture. *Eur. Respir. J.* **8**:697-700.
- Levine N.D. 1973. Introduction, history and taxonomy: the Coccidia, Eimeria, Isospora, *Toxoplasma* and related-genera. (D.M. Hanumod, P.L. Long, comps.) Baltimore: University Park Press.
- Levine N.D. 1988. Progress in taxonomy of Apicomplexan protozoa. *J. Protozool.* **35**:518-520.
- Luft, B. J., and J. S. Remington. 1992. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin. Infect. Dis.* **15**:211-222.

- Maeda N., and Smithies O. 1986. The evolution of multigene families: human haptoglobin genes. *Annu. Rev. Genet.* **20**:81-108.
- Maniatis, T., Fritsch, E., and Sambrook, J. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.
- Martinez-Soriano, J.P., Wong, W.M., Van Ryk, D.I., and Nazar, R.N. 1991. A widely distributed "CAT" family of repetitive DNA sequences. *J. Mol. Biol.* **217**: 629-635.
- Morisaki, J.H., Heuser, J.E., Sibley, L.D. (1995). Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *J. Cell Sci* **108**:2457-2464.
- Ohtsubo H., Ohtsubo E.. 1994. Involvement of transposition in dispersion of tandem repeat sequences (trsa) in rice genomes. *Mol. Gen Genet.*, **245**:449-455.
- Ossorio, P.N., Sibley, L.D., and Boothroyd, J.C. 1991. Mitochondrial-like DNA sequences flanked by direct and inverted repeats in the nuclear genome of *Toxoplasma gondii*. *J. Mol. Biol.* **222**: 525-536.
- Pfeffercorn E.R. 1981. *Toxoplasma gondii* and the biochemistry of intracellular parasitism. *Trends Biochem Sci* **6**:311-313.
- Pfefferkorn E.R., Pfefferkorn L.C. 1980. *Toxoplasma gondii*: genetic recombination between drug resistant mutants. *Exp. Parasitol.* **50**:305-316.
- Robert F, Ganivet M.F., Tourte-Schaefer C., Dupuoy-Camet J. 1996. Interest et limites de la polymerase chain reaction dans le diagnostic de la toxoplasmose. *Immunoanal. Biol. Spec.* **11**:176-182.
- Rodriguez J. C., Martinez M. M., Martinez A. R. And Royo G.. 1997. Evaluation of different techniques in the diagnosis of *Toxoplasma* encephalitis. *J. Med. Microbiol.* **46**:597-601.

- Roos D.S. (1993). Primary structure of the fused dihydrofolate reductase/thymidylate synthase gene from *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* **268**:6269-6280.
- Ross R., Hankel T., Schmidt E. R. 1997. Complex evolution of tandem-repetitive DNA in the *Chironomus thummi* species group. *J. Mol. Evol.*, **44** (3): 321-326.
- Sanger, F., Wicklen, S., and Coulson, A.R 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.-USA* **74**: 5463-5467.
- Schwab, J.C., Beckers, C.J., Joiner, K.A. (1994). The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:509-513.
- Seeber F. And Boothroyd J.C. 1996. Escherichia coli beta-galactosidase as an in vitro and in vivo reporter enzyme and stable transfection marker in the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Gene* **169**:39-45.
- Shirley, M.W. 1994. The genome of *Eimeria tenella*: further studies on its molecular organization. *Parasitol. Res.* **80**: 366-373.
- Sibley L.D., and Howe D.K. 1996. Genetic basis of pathogenicity in toxoplasmosis. *Curr. Top. Micro. Immunol.* **219**:1-15.
- Sibley L.D., Leblanc Allen J., Pfefferkorn E.R., and Boothroyd J.C. 1992. Generation of restriction fragment length polymorphism linkage map for *Toxoplasma gondii*. *Genetics* **132**:1003-1015.
- Sibley L.D., Messina M., and Niesman I.R. 1994. Stable DNA transformation in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii* by complementation of tryptophan auxotrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:12540:12544.

- Sibley, L.D., and Boothroyd, J.C. 1992. Construction of a molecular karyotype for *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol. **51**: 291-300.
- Sibley, L.D., Pfefferkorn E.R., Boothroyd J.C. (1993). Development of genetic systems for *Toxoplasma gondii*. Parasitology today **9**:392-395.
- Singer, M., and Berg, P. 1991. Genes and Genomes: a changing perspective. University of Science Books, California. pp. 696-703.
- Smith D. 1996. Unusual mechanisms of gene expression. The Biochemist Feb/Mar 1996.
- Smith J.E. (1995). A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. Int. J. Parasitol. **25**: 1302-1309.
- Smith J.E., Boothroyd J.C., Hunter C., and Petersen E. 1997. Progress in toxoplasmosis research. Parasitol. Today **13**:245-247.
- Smits H.L., Hartskeerl R.A. 1995. PCR amplification reactions in parasitology. J. Microbiol. Methods **23**:41-54.
- Soldati D. 1996. Molecular genetic strategies in *Toxoplasma gondii*: close in on a successful invader. FEBS Lett. **389**:80-83.
- Soldati D. And Boothroyd J.C. 1993. Transient transfection and expression in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. Science **60**:349-351.
- Soldati D., Kim K., Kampmeier J., Dubremetz J.F. and Boothroyd J.C. 1995. Complementation of a *Toxoplasma gondii* Rop1 knock-out mutant using phleomycin selection. Mol. Biochem. Parasitol. **74**:87-97.
- Spohr, G., Reith, W, and Sures, I. 1981. Organization and sequence analysis of a cluster of repetitive DNA elements from *Xenopus laevis*. J. Mol. Biol. **151**: 573-592.

- Stephan W. And Cho 1994. Possible Role of Natural Selection in the Formation of Tandem-Repetitive Noncoding DNA. *Genetics* **136**:333-341.
- Strachan T., Webb D., Dover G.A. 1985. Transition stages of molecular drive in multi copy DNA families in *Drosophila*. *EMBO J.* **4**:1701-1708.
- Tourmente S., Deragon J. M., Lafleur J., Tutois S., Pélissier T., Cuvullier C., Espagnol M. C. And Picard G.. 1994. Characterization of minisatellites in *Arabidopsis thaliana* with sequence similarity to the human minisatellite core sequence. *Nucleic Acids Research*, **22**:3317-3321.
- Traut, W. 1987. Hypervariable Bkm DNA loci in a moth, *Ephestia kuehniella* : does transposition cause restriction fragment length polymorphisms? *Genetics* **115**: 493-498.
- Traut, W., Epplen, J.T., Weichenhan, D., and Rohwedel, J. 1992. Inheritance and mutation of hypervariable (GATA)_n microsatellite loci in a moth, *Ephestia kuehniella*. *Genome* **35**: 659-666.
- Vazquez M. P., Schijman A. G., Levin M. J.. 1994. A short interspersed repetitive element provides a new 3' acceptor site for *trans*-splicing in certain ribosomal P2 δ protein genes of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **64**:327-336.
- Vignoli, R., Rijli, F.M., Batistoni, R., Fratta, D., Cremisi, F., and Barsacchi, G. 1991. Two dispersed highly repeated DNA families of *Triturus bulgaris meridionalis* (*Amphibia*, *Urodela*) are widely conserved among *Salamandridae*. *Chromosoma* **100**: 87-96.
- Warburton P. E., Waye J. S., and Willard H. F..1993. Nonrandom Localization of Recombination Events in Human Alpha Satellite Repeat Unit Variants: Implications for Higher-Order Structural Characteristics within Centromeric Heterochromatin. *Molecular and Cell Biology*, **13**:6520-6529.

- Xia X., Rocha P. S., Selvaraj G., Bertrnad H.. 1994. Genomic organization of the canrep repetitive DNA in *Brassica juncea*. *Plant./ Mol. Biol.*, **26**:817-832.
- Yu-Jing Zhang, Kamnert I., López C., Cohn M., and Edstrom J.E. 1994. A Family of Complex Tandem DNA Repeats in the Telomeres of *Chironomus pallidivittatus*. *Molecular and Cellular Biology*. **14**: 8028-8036.
- Zhang Y. J., Kamnert I., López C. C., Cohn M., and Edstrom J. E.. 1994. A Family of Complex Tandem DNA Repeats in the Telomeres of *Chironomus pallidivittatus*. *Molecular and Cell Biology*, **14**:8028-8036.