

Universidad ORT Uruguay
Facultad de Ingeniería

Desarrollo de herramientas biotecnológicas para el
enriquecimiento de genomas mitocondriales en el parásito
protozoario *Toxoplasma gondii*

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Josefina Bonomi – 210168

Tutoras: Luisa Berná y María Eugenia Francia

2024

Declaración de autoría

Yo, Josefina Bonomi, declaro que el trabajo que se presenta en esa obra es de mi propia mano.

Puedo asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba el trabajo final de la carrera Ingeniería en Biotecnología;
- Cuando he consultado el trabajo publicado por otros, lo he atribuido con claridad;
- Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente mía;
- En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, he explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por mí;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Josefina Bonomi

5 de marzo de 2024

Agradecimientos

Primero que nada, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis tutoras, las Dras. Maria Eugenia Francia y Luisa Berná, por su orientación, apoyo, dedicación y aliento anímico durante todo el proceso. Su experiencia, conocimiento y guía fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo.

A todos los integrantes del Laboratorio de Biología de Apicomplejos, por su colaboración y consejos. Siempre estuvieron dispuestos a evacuar mis dudas y darme una mano en lo que fuera. Prometo que un día de estos me voy a quedar a almorzar.

A mi familia, por su apoyo incondicional y su comprensión y paciencia durante los momentos de dedicación a esta investigación. Gracias por no desesperar cada vez que desaparecí en el laboratorio durante horas. Sin su apoyo, este logro no habría sido posible.

A mis amigos, por estar siempre presentes, por su ánimo, compañía y por brindarme momentos de distracción durante este proceso. Cada hora compartida fue fundamental para mantenerme motivada y enfocada.

A todas las personas que conocí en la Universidad ORT durante mi carrera, quienes de alguna manera u otra me impulsaron a seguir adelante. Agradezco su compañerismo y su inspiración. Mención especial a Cata, Sole, Tuti, Flope, Euge, Isa y Tami; en ellas encontré una amistad que actuó como refugio ante las dificultades de la carrera. Gracias por todas las mañanas cantando en el auto, por las meriendas compartidas al fondo de la clase y por las juntadas hasta altas horas de la noche.

Resumen

Toxoplasma gondii, apicomplejo protozoario unicelular, agente causal de la toxoplasmosis, infecta animales y humanos causando graves problemas de salud. Si es transmitido durante el embarazo puede causar toxoplasmosis congénita o pérdida fetal. En Uruguay, más del 50% de las mujeres embarazadas son portadoras crónicas del parásito; también es prevalente en ovinos.

Las mitocondrias son organelos importantes para el funcionamiento de las células eucariotas. Los genomas mitocondriales de los apicomplejos son particularmente divergentes en su estructura genómica y contenido génico. Dado que la mitocondria en apicomplejos es diferente de las mitocondrias en los hospederos que infectan, es un blanco validado para las drogas anti-apicomplejos. Estudiar el genoma mitocondrial y los mecanismos de generación de variabilidad en apicomplejos es importante para entender la biología de estos organismos y para el desarrollo de tratamientos efectivos contra ellos. Sin embargo, existen limitaciones técnicas para su estudio a nivel genómico fundamentalmente relacionadas a la obtención de escasas cantidades del organelo, y por tanto de su genoma.

En el trabajo se planteó desarrollar herramientas para enriquecer el material genético mitocondrial de *T. gondii* y posibilitar dicho estudio. Para ello se planteó como primer objetivo generar una línea reportera que permitiera el aislamiento de la mitocondria. Se comenzó con una nucleofección de la línea parasitaria ME49 con un plásmido de expresión de una proteína mitocondrial fluorescente, que permite una rápida identificación de la mitocondria bajo un microscopio de epifluorescencia. Se infiere que la nucleofección fue exitosa por la resistencia al antibiótico administrado, pero no se observó fluorescencia en el citómetro de flujo; no se logró obtener la línea de *T. gondii* de mitocondrias fluorescentes.

Por otro lado, se planteó optimizar un protocolo de enriquecimiento de mitocondrias por fraccionamiento subcelular. Primero se evaluó la utilidad de una línea celular de *T. gondii* con ensayos analíticos de biología molecular. Esta línea se sometió al protocolo de purificación de mitocondrias con el objetivo de optimizarlo para evaluar la variabilidad genética de cuatro poblaciones clonales. Se obtuvieron fracciones subcelulares, de las cuales se identificaron aquellas enriquecidas en mitocondrias mediante ensayos de Western blot. De las fracciones enriquecidas, se purificó el ADN mitocondrial y se comprobó su enriquecimiento relativo respecto al ADN nuclear con una PCR semicuantitativa. Mediante una secuenciación por ONT se realizó un análisis preliminar de secuencias de genoma mitocondrial y se confirmó el enriquecimiento de material genómico mitocondrial.

Gracias al desarrollo de este proyecto, ahora se cuenta con herramientas importantes para el estudio del ADN mitocondrial en *T. gondii*, lo que abrirá puertas para el entendimiento de la estructura y variabilidad del genoma mitocondrial en este parásito y futuro desarrollo de drogas anti-apicomplejos cuyo blanco farmacológico sea este organelo.

Palabras clave

Toxoplasma gondii, mitocondria, enriquecimiento mitocondrial, secuenciación, Nanopore.

Abreviaturas

% m/v - porcentaje masa sobre volumen, gramos por cada 100 mililitros.

°C - Grados Celsius

A - amperes

ADN - Ácido desoxirribonucleico

BLAST - Alineamiento de secuencias de tipo local (del inglés: *Basic Local Alignment Search Tool*)

BSA - seroalbúmina bovina (del inglés: *Bovine serum albumin*)

CAT - cloranfenicol acetiltransferasa

CO₂ - Dióxido de carbono

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol

DH5 α - bacterias *E. coli* quimiocompetentes

DMEM - Medio Eagle modificado de Dulbecco (del inglés: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DMSO - dimetilsulfóxido

EDTA - ácido etilendiaminotetraacético (del inglés: *ethylenediaminetetraacetic acid*)

EGTA - ácido de etileno glicol tetraacético (del inglés: *ethylene glycol-bis-tetraacetic acid*)

H2Bz - variante z de la histona canónica H2B

HA - hemaglutinina

HDF - fibroblastos dérmicos humanos (del inglés: *human dermal fibroblasts*)

HEPES - ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico (del inglés: *(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*)

IMC1 - complejo interno de membrana 1 (del inglés: *inner membrane complex 1*)

KOH - hidróxido de potasio

LB - caldo de lisogenia (del inglés: *lisogenia broth*)

mg - miligramos

ml - mililitros

mM - milimolar

NGS - secuenciación de nueva generación (del inglés: *next generation sequencing*)

nm - nanómetros

ON - durante la noche (del inglés: *overnight*)

ONT - Oxford Nanopore Technologies

pb - par de bases

PBS - solución amortiguadora fosfato salina (del inglés: *phosphate-buffered saline*)

PCR - reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: *polymerase chain reaction*)

ssh - protocolo de red de cápsula segura (del inglés: *secure shell*)

TAE - Tris-acetato-EDTA

TES - ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico

UP - ultrapura

Vero - línea celular epitelial de riñón del mono verde africano (del esperanto: *verda reno*)

μl - microlitros

μm - micrómetros

Índice

1. Introducción	12
1.1. Apicomplejos	12
1.1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> y toxoplasmosis	12
1.1.2. Genoma mitocondrial	16
1.2. Secuenciación de nueva generación	18
1.3. Justificación del proyecto	19
2. Objetivos	20
2.1. Objetivo general	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. Metodología	21
3.1. Cultivo celular	21
3.1.1. Descongelado y criopreservación de cepas de <i>T. gondii</i>	21
3.1.2. Infección y pasaje de <i>T. gondii</i>	22
3.1.3. Cepas de trabajo	22
3.1.4. Generación de poblaciones clonales	22
3.1.5. Escalado de producción de parásitos	23
3.1.6. Tratamiento de contaminación con micoplasma	23
3.2. Generación de línea transgénica fluorescente ME49-pTub_HSP60_RFP_SagCATSag	24
3.2.1. Transformación del plásmido pTub_HSP60_RFP_SagCATSag en bacterias DH5 α	24
3.2.2. Purificación con Maxiprep	24
3.2.3. Digestión del plásmido pTub_HSP60_RFP_SagCATSag	25
3.2.4. Nucleofección de la cepa ME49 con pTub_HSP60_RFP_SagCATSag circular y lineal	25
	9

3.2.5. Citometría de flujo y <i>sorting</i> de los parásitos ME49-pTub_HSP60_RFP_SagCATSag circular y lineal	26
3.3. Evaluación de la línea de trabajo de <i>T. gondii</i> para la purificación de mitocondrias	26
3.3.1. Inmunofluorescencia indirecta	27
3.3.2. Western blot	27
3.4. Purificación de mitocondrias por fraccionamiento subcelular	29
3.4.1. Preparación de <i>buffers</i>	29
3.4.2. Cosecha	30
3.4.3. Ruptura por descompresión de nitrógeno	31
3.4.4. Centrifugación diferencial	31
3.4.5. Gradiente de Percoll	31
3.4.6. Análisis de las fracciones	32
3.4.7. Obtención y Análisis del ADN obtenido por fraccionamiento subcelular	33
3.5. Secuenciación	35
4. Resultados y Discusión	37
4.1. Generación de línea transgénica fluorescente ME49-pTub_HSP60_RFP_SagCATSag	37
4.1.1. Citometría de flujo	37
4.2. Evaluación de la línea de trabajo de <i>T. gondii</i> para la purificación de mitocondrias	40
4.2.1. Inmunofluorescencia indirecta	40
4.2.2. Western Blot	41
4.3. Optimización del protocolo de purificación de mitocondrias por fraccionamiento subcelular y determinación de su enriquecimiento relativo.	43
4.4. Análisis de poblaciones clonales	48
5. Conclusiones	54
6. Referencias Bibliográficas	55
	10

7. Anexo	58
Anexo 1: Mapa de la secuencia del plásmido	58
Anexo 2: Composición de <i>buffers</i>	59
Anexo 3: Estrategia de gating y resultados para los parásitos ME49 <i>wild type</i> , utilizados como blanco en el análisis de citometría de flujo.	60
Anexo 4: Script y comandos utilizados en bash para el análisis de los resultados de secuenciación	62

1. Introducción

1.1. Apicomplejos

Los apicomplejos son un grupo diverso de protozoarios unicelulares pertenecientes al *phylum* Apicomplexa. Estos organismos son parásitos intracelulares obligados caracterizados por la presencia de un elemento evolutivamente único: el complejo apical, un grupo de organelos en la extremidad apical de la célula especializados en la invasión y manipulación de células hospederas (1).

Este grupo de parásitos es responsable de algunas de las enfermedades mundiales más importantes para la salud humana y animal. Se destacan las especies de *Plasmodium*, responsables de la enfermedad de la malaria que presenta 200 millones de nuevos casos al año en el mundo, siendo *P. falciparum* la especie más letal (2). Por otro lado, la neosporosis, causada por el parásito *Neospora caninum*, es la principal causa de abortos en bovinos de todo el mundo (3). En Uruguay, el porcentaje de rebaños infectados por este parásito aumentó de 69% en 2006 a 96% en 2020 (4, 5). Siendo el país uno de los principales productores cárnicos a nivel global, se esperan pérdidas económicas a manos de neosporosis año tras año, aunque la cifra asociada no se ha estimado aún (3). *Toxoplasma gondii*, el agente causal de la toxoplasmosis, posee la capacidad de infectar crónicamente a vertebrados de sangre caliente. Con una elevada transmisibilidad, se estima que un tercio de la población mundial está infectada con *T. gondii* (6, 7).

1.1.1. *Toxoplasma gondii* y toxoplasmosis

La infección por *T. gondii* es prevalente en el mundo gracias a su amplia variedad de organismos hospederos, desde humanos a animales domésticos, silvestres y de producción. Es un patógeno altamente oportunista y se reactiva en pacientes inmunodeprimidos, manifestándose a través de graves problemas de salud como encefalitis agudas, calcificaciones cerebrales, coriorretinitis, y ceguera (8). Además, el parásito tiene la capacidad de atravesar la barrera placentaria durante el embarazo e infectar al feto, causándole malformaciones, ceguera o hasta pérdida fetal (6, 8). Se estima que aproximadamente un tercio de los niños infectados por transmisión vertical prenatal desarrollarán una discapacidad visual en su vida (7). En Uruguay, la prevalencia de toxoplasmosis en embarazadas es de poco más del 50% (9). A nivel global, la incidencia de toxoplasmosis congénita es de 190.000 casos anuales, con la mayoría de los casos perteneciendo a América del Sur (10). En la producción animal, *T. gondii* ha sido

identificado como el agente causal de la toxoplasmosis ovina, enfermedad a la que en Uruguay se le atribuye hasta el 58% de las preñeces perdidas por causas infecciosas en ovinos (11).

El ciclo de vida heteroxeno de *T. gondii* implica una secuencia de eventos que se llevan a cabo en diferentes tipos de hospedadores (Figura 1). La reproducción sexual se da únicamente en miembros de la familia *Felidae*—como lo es el gato doméstico—por ser los hospederos definitivos. La reproducción asexual se desarrolla en hospedadores intermediarios: distintos mamíferos y aves como lo son las gallinas, los ovinos, y los humanos (7, 12).

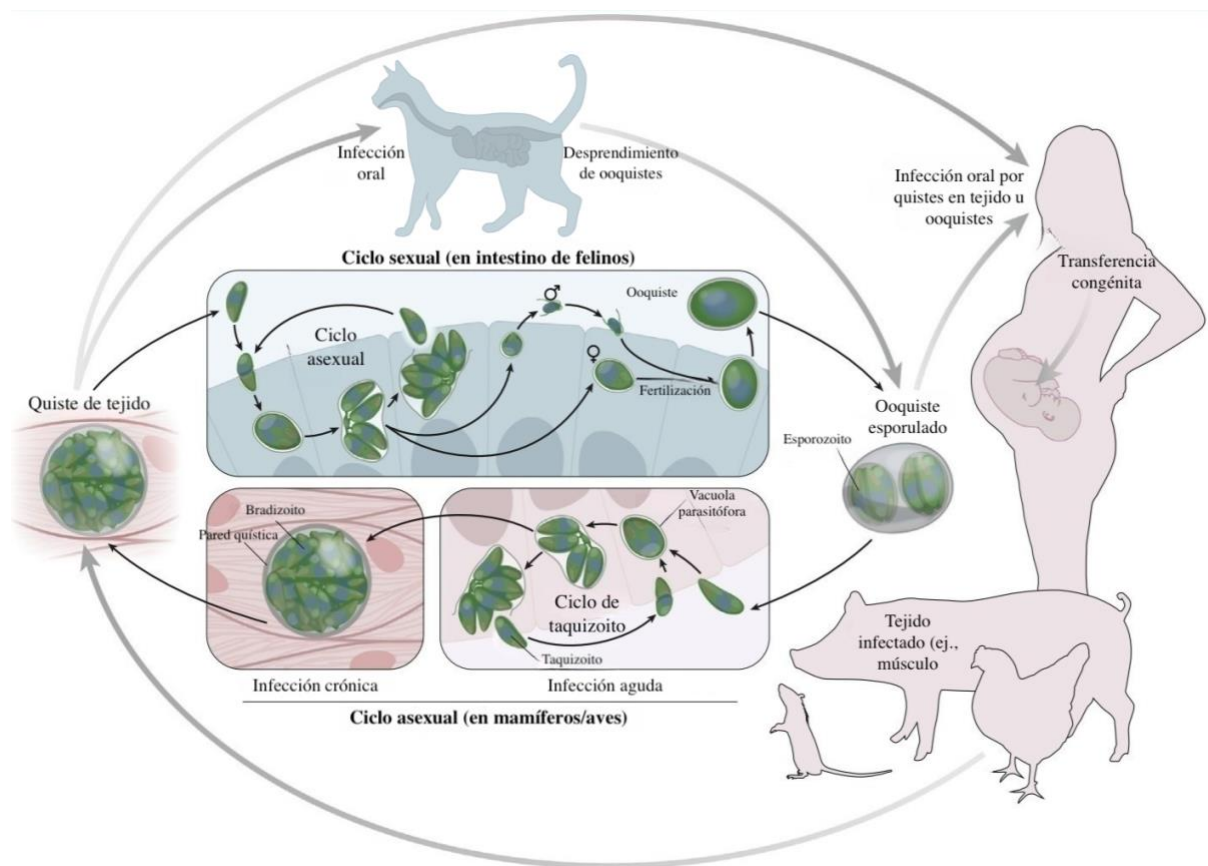


Figura 1. Ciclo reproductivo de *T. gondii*. Adaptado de Lourido (2019) “*Toxoplasma gondii*” (13).

La fase sexual del ciclo comienza cuando un felino ingiere tejidos de animales infectados con quistes tisulares de *T. gondii*. El parásito se encuentra en una forma denominada bradizoito por su lenta multiplicación dentro de los quistes tisulares (la palabra *brady* proviene del griego y significa lentitud) (14). En su pasaje por el intestino delgado, los bradizoitos son liberados del quiste y proceden a infectar y reproducirse asexualmente en las células epiteliales intestinales. Entonces, los parásitos se diferencian en dos tipos de células sexuales: los microgametos,

asociados a lo que conocemos como gametos masculinos; y los macrogametos, asociados a los gametos femeninos. Las dos clases de gametos se fusionan para dar lugar a cigotos diploides, que eventualmente formarán ooquistes, una estructura resistente en el ambiente de paredes gruesas. En esta etapa, los ooquistes son no esporulados, es decir, los gametos no dieron lugar a la maduración de los parásitos contenidos en el ooquiste. Los ooquistes se desprenden del felino en las heces y, fuera del hospedador, se da lugar a la esporulación, el proceso de maduración del ooquiste que puede tomar entre uno y cinco días. A partir de este proceso se obtienen ocho parásitos haploides e infectivos denominados esporozoitos (7, 12, 15–17). Debido a su resiliencia, los ooquistes son capaces de sobrevivir y retener su capacidad infectiva por hasta un año, contaminando agua, suelo y hortalizas (18). Los hospedadores intermediarios se ven expuestos a los ooquistes por condiciones sanitarias inadecuadas o pobres prácticas de higiene; la ingesta del mismo desencadena el inicio del ciclo asexual (19).

Con la infección del hospedador intermediario se da lugar a la fase asexual del ciclo reproductivo de *T. gondii*. De esta fase se distinguen dos etapas en las que la velocidad de crecimiento varía: infección crónica e infección aguda (17). La pared del ooquiste esporulado ingerido se disuelve en el intestino delgado y libera los esporozoitos, que penetran el epitelio intestinal y se diferencian a la forma activa y proliferativa de *T. gondii* designada taquizoito por su rápida multiplicación (la palabra *tachos* proviene del griego y significa rápido) (14). En esta etapa de infección aguda, los taquizoitos se replican con velocidad mediante endodiogenia dentro de las células en estructuras especializadas llamadas vacuolas parasitóforas (20). Una vez maduros y liberados de la célula, los taquizoitos se diseminan por el sistema vascular hasta lograr invadir la totalidad de los órganos en 6-10 días, incluyendo el cerebro (21). Es en la infección aguda que se puede dar la transmisión congénita, cuando los taquizoitos cruzan la placenta e infectan al feto (18). Los taquizoitos se diferencian a bradizoitos con la presión del sistema inmune del hospedero intermediario para formar quistes mayormente en tejidos como el cerebro, el corazón y los ojos, así sobreviviendo indefinidamente en el organismo en una etapa de infección crónica (17, 22). La ingesta de estos tejidos que contienen quistes, como puede ser consumir carne infectada cruda o de mala cocción, provoca, en otros hospederos intermediarios, el reinicio del ciclo asexual del parásito con la conversión de los bradizoitos a taquizoitos en el intestino delgado. En el hospedero definitivo, implica la compleción y reinicio del ciclo de vida de *T. gondii* (23, 24).

En la investigación, es común el mantenimiento de los parásitos *in vitro* en monocapas de células de mamíferos como las células Vero por su practicidad y bajo costo en comparación con utilizar animales. Por este método se obtienen taquizoitos de rápida reproducción que infectan las células vecinas hasta destruir la monocapa por completo (Figura 2).

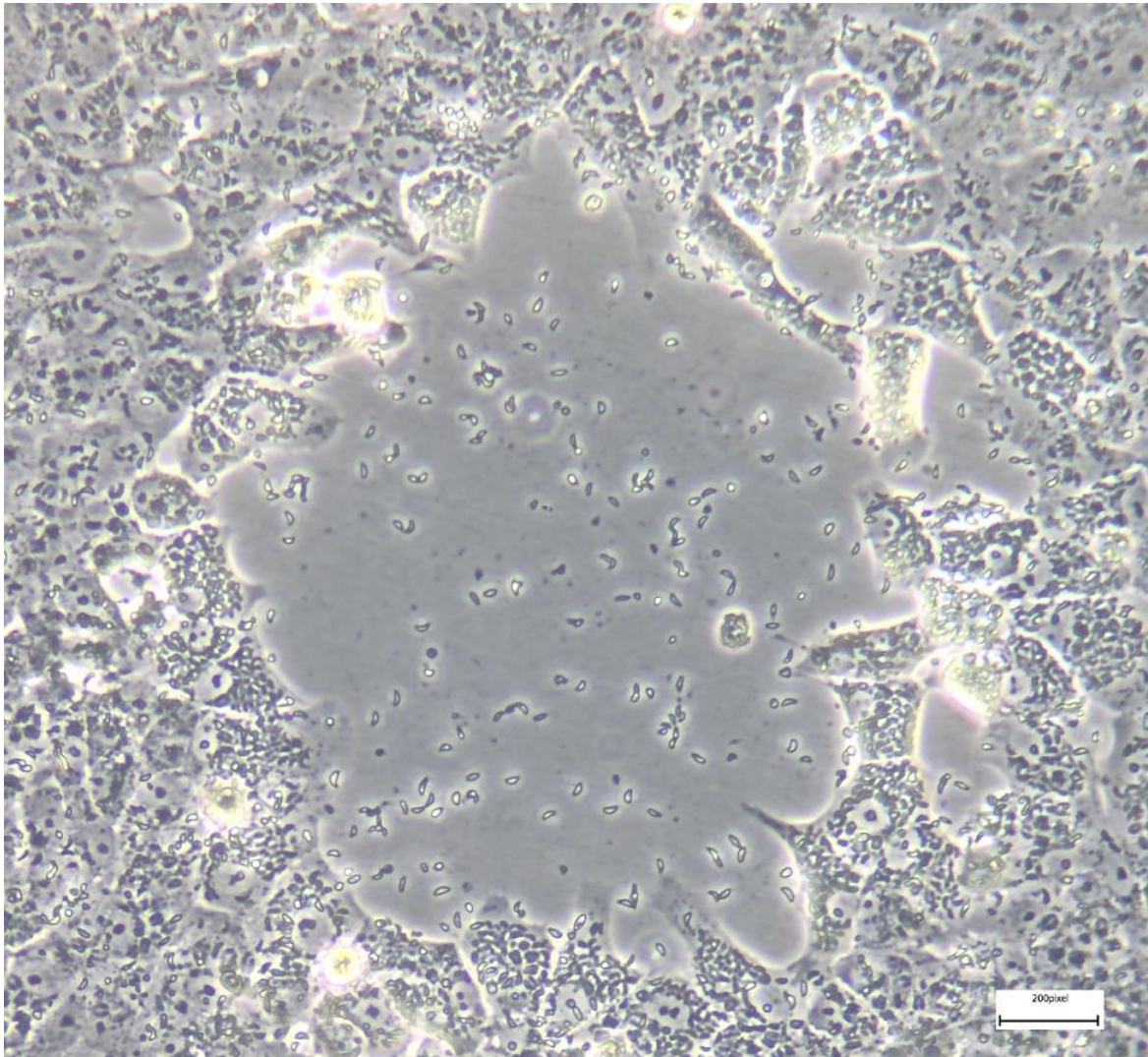


Figura 2. Placa de lisis de la línea Rieske-HA de *Toxoplasma gondii* en cultivo con células Vero.

Los taquizoitos tienen forma de medialuna de tamaño aproximado $2 \times 6 \mu\text{m}$, con un extremo anterior puntiagudo y un extremo posterior redondeado (Figura 3) (19). Poseen estructuras especializadas y organelos que desempeñan roles críticos en su ciclo de vida y metabolismo, como lo es el complejo apical, un grupo de estructuras esenciales para la movilidad y la adherencia e invasión del taquizoito a las células hospederas (25). También presentan un organelo denominado apicoplasto, adquirido como cloroplasto por endosimbiosis secundaria con un alga roja fotosintética previo a la divergencia de los dinoflagelados y los apicomplejos (26). Además, los taquizoitos contienen los organelos eucariotas universales: retículo endoplasmático, complejo de Golgi, mitocondria, centrosoma y núcleo (23).

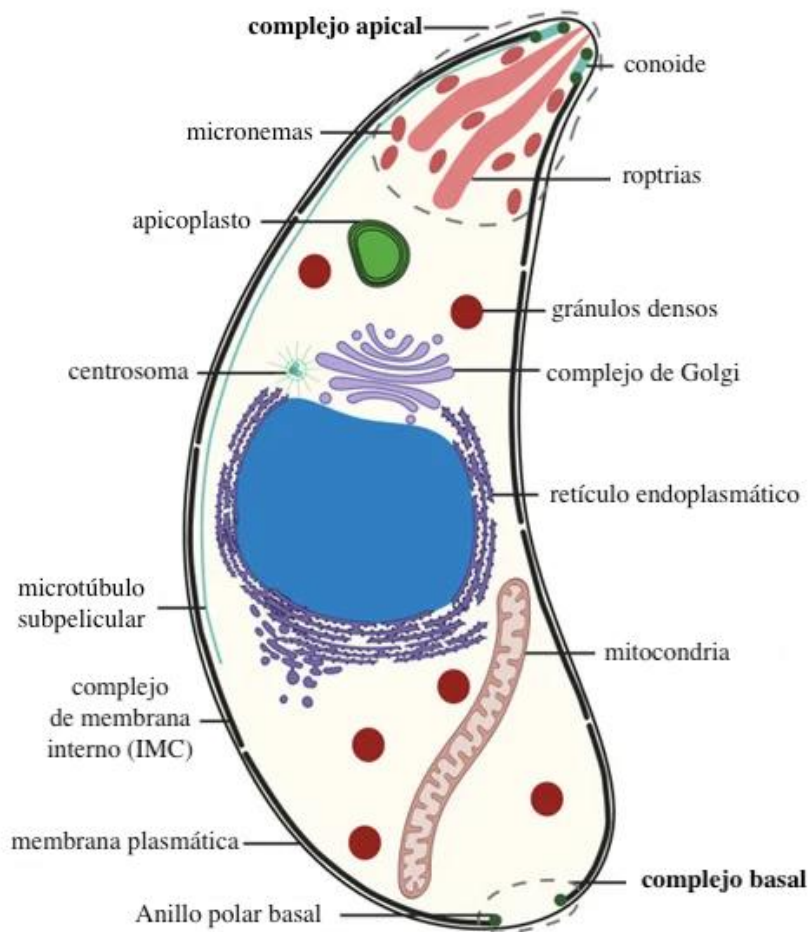


Figura 3. Componentes y estructura del taquizoito. Adaptado de Delgado et al. (2022) “The Apicomplexan Parasite *Toxoplasma gondii*” (27).

1.1.2. Genoma mitocondrial

Las mitocondrias son organelos esenciales en la mayoría de los eucariotas con una historia evolutiva que se remonta a 1.5 mil millones de años. La teoría prevalente plantea que a través de eventos de endosimbiosis entre una eucariota ancestral y una bacteria púrpura no del azufre fotosintética se dio origen a la maquinaria metabólica presente en las mitocondrias en la actualidad (28).

En Apicomplejos como *Plasmodium* y *T. gondii*, la mitocondria desempeña un papel esencial en la generación de energía y el metabolismo celular en todos los ciclos de vida estudiados, aunque su estructura y organización del genoma difiere en cada uno. El genoma mitocondrial en estos parásitos codifica únicamente tres genes que forman parte de la cadena de transporte de electrones: citocromo c oxidasa subunidad I (coxI), citocromo b (cob), y citocromo c oxidasa

subunidad III (coxIII) (29). En *Plasmodium*, el ADN mitocondrial contiene la secuencia codificante consecutiva para los tres genes. Por otro lado, *T. gondii* exhibe una estructura altamente fragmentada y compacta. Su secuencia consta de 21 bloques dispersos, con tamaños entre 40 y 1050 pares de bases, que codifican para proteínas y ARN ribosomal mitocondrial. Sin embargo, ninguno de estos bloques codifica una proteína o ARNr completo; múltiples bloques se ensamblan en configuraciones no aleatorias para formar genes funcionales y ARNr (Figura 4) (30–32).

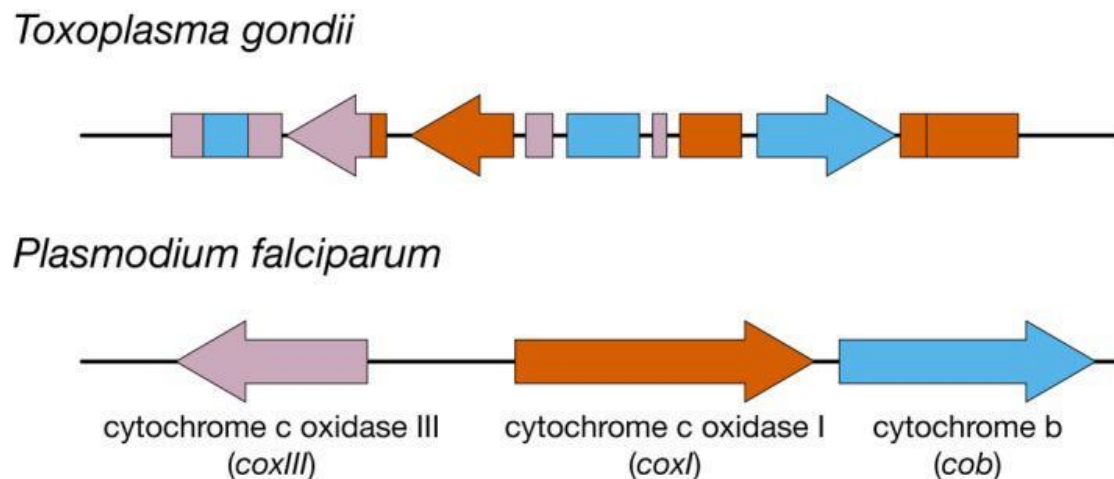


Figura 4. Organización del ADN mitocondrial en *Toxoplasma gondii* y *Plasmodium falciparum*. Cada flecha de color representa una secuencia codificante para uno de los tres genes mitocondriales. Extraído de Usey y Huet (2022) “Parasite powerhouse: A review of the *Toxoplasma gondii* mitochondrion” (30).

Siendo la cadena de transporte de electrones esencial para la proliferación de los apicomplejos, y contando con que las proteínas mitocondriales presentan divergencia respecto a las presentes en los hospederos que infectan, la mitocondria se considera un objetivo atractivo para el desarrollo de fármacos (33). En particular, coxIII ha sido identificado como un objetivo clave. Atovacuona, un fármaco utilizado en la profilaxis y tratamiento de la malaria y la toxoplasmosis, actúa al unirse al complejo citocromo bc1 de la cadena de transporte de electrones, bloqueando la oxidación de Coenzima Q y provocando la disminución del potencial de membrana mitocondrial y la inhibición de la fosforilación oxidativa (34–36). Sin embargo, la rápida evolución de la resistencia a la atovacuona, asociada a mutaciones en el gen coxIII, ha planteado desafíos significativos en el tratamiento (37). A pesar de esto, estudios recientes han demostrado que la combinación de atovacuona con otros fármacos que ataquen el mismo componente de coxIII son útiles para evitar la resistencia (2).

El hecho de que la mitocondria sea un blanco validado para drogas, junto con la resistencia a los fármacos como atovacuona, resalta la importancia de poder abordar en detalle el genoma mitocondrial de los apicomplejos. La investigación en este campo promete revelar nuevas estrategias terapéuticas y para el control de enfermedades parasitarias, así como prever y dilucidar los mecanismos de generación de resistencia.

Sin embargo, la caracterización del genoma mitocondrial en *T. gondii* ha sido complicada por su complejidad estructural y por la presencia de fragmentos de secuencias de ADN mitocondrial integrados en el genoma nuclear del parásito, conocidos como fragmentos de secuencias nucleares de origen mitocondrial (NUMTs). Estos fragmentos pueden interferir con los métodos de aislamiento y secuenciación del ADN mitocondrial, así como con los enfoques de ensamblaje *in silico* del genoma (30).

1.2. Secuenciación de nueva generación

Desde sus orígenes, la tecnología de lectura de secuencias de ADN ha experimentado una rápida evolución hacia lo que desde hace 20 años se conoce como secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés: *next generation sequencing*). En contraste con el método tradicional de secuenciación de Sanger, basado en la elongación terminal de cadenas de ADN, los métodos de NGS constituyen diversas estrategias que convergen en la secuenciación masiva de millones de fragmentos en simultáneo por cada corrida, permitiendo el análisis de genomas completos con una rapidez y asequibilidad comparativamente mucho mayores (38, 39).

Las primeras plataformas de NGS denominadas ‘segunda generación’, como por ejemplo Illumina y Ion Torrent, varían en su estrategia y en términos generales constan de fragmentación de ADN, reparación de los extremos del ADN, ligación de adaptadores, fijación a la superficie y amplificación *in situ* (40). El factor en común entre estas tecnologías es la lectura de *reads* de largos únicamente entre 35-800 pb, apodados por este motivo tecnologías de *short-reads*. Estos *reads* luego son ensamblados computacionalmente para reconstruir la secuencia de ADN. Por su tamaño, se consideran tecnologías precisas con bajas tasas de error, aunque presentan dificultades al momento de ensamblar regiones genómicas repetitivas o estructuralmente complejas (41).

Recientemente, el desarrollo de plataformas de ‘tercera generación’ de secuenciación ofrecen nuevos alcances que superan las limitaciones de las generaciones anteriores (38). Con tecnologías de Pacific Biosciences y Oxford Nanopore (ONT) se alcanzan *reads* de largos

rondando 10 kb con metodología de detección de secuencia por síntesis o por cambios de voltaje, sin necesidad de amplificación ni de fragmentación del ADN y en un menor tiempo (42). Aunque el margen de error para *reads* largos puede ser mayor si se compara con métodos de *reads* cortos, los NGS de tercera generación permiten una mayor profundidad de secuenciación y permite identificar estructuras complejas y/o con grandes cantidades de variantes (40, 43, 44).

1.3. Justificación del proyecto

En este proyecto se propone la optimización de protocolos de enriquecimiento para la obtención de fracciones mitocondriales de poblaciones clonales de *T. gondii*, la purificación de su ADN y su secuenciación por tecnologías de tercera generación. El proyecto propuesto surge de la necesidad de abordar la brecha crítica de la comprensión del genoma mitocondrial de *T. gondii*, el parásito causante de una enfermedad con gran incidencia en el mundo y en nuestro país. Dado que este genoma es un blanco validado para el desarrollo de drogas, y que la resistencia a los fármacos antiparasitarios representa un desafío significativo en el tratamiento de la toxoplasmosis, el estudio de la variabilidad genética a nivel de la mitocondria se vuelve crucial. La obtención de ADN mitocondrial a partir de poblaciones clonales del parásito habilita la posibilidad de examinar esta diversidad genética y compararla con la de poblaciones policlonales, algo que no se ha estudiado hasta el momento.

La aplicación de herramientas biotecnológicas para el enriquecimiento y la secuenciación del genoma mitocondrial de *T. gondii* permitirá una exploración más detallada de las características genéticas y evolutivas de este organismo. Además, el acceso a *reads* largos proporcionadas por tecnologías como ONT ofrece una ventaja significativa sobre los métodos de secuenciación de *reads* cortos, como Illumina, al permitir la resolución de los bloques que se encuentran repetidos y fragmentados en el genoma mitocondrial, mejorando así la calidad y la completitud de los datos obtenidos. Esta investigación promete impulsar avances significativos en la comprensión del genoma mitocondrial y en el diseño de estrategias terapéuticas más precisas, lo que podría tener un impacto considerable en el tratamiento de la toxoplasmosis tanto a nivel local como global.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Optimizar herramientas mediante manipulación genética y enfoques bioquímicos que permitan la obtención de fracciones enriquecidas en mitocondrias de *Toxoplasma. gondii*, con el fin de mejorar la obtención de ADN mitocondrial y su secuenciación por ONT.

2.2. Objetivos específicos

- Generar una cepa transgénica que exprese una proteína mitocondrial fluorescente.
- Optimizar un protocolo de purificación de mitocondrias por fraccionamiento subcelular determinando las fracciones enriquecidas en mitocondrias.
- Purificar ADN mitocondrial y determinar su enriquecimiento relativo en fracciones subcelulares.
- Secuenciar por ONT y llevar a cabo un análisis preliminar de secuencias de genoma mitocondrial.
- Determinar preliminarmente la variabilidad intra-poblacional en el genoma mitocondrial secuenciando y analizando el genoma mitocondrial de poblaciones clonales.

3. Metodología

3.1. Cultivo celular

El mantenimiento de las diversas cepas de *T. gondii* utilizadas en este trabajo se llevó a cabo en la línea celular Vero, que se cultivó en botellas con filtro con medio DMEM de Gibco a 37°C en una atmósfera controlada de 5% CO₂ y humedad saturada. El medio se suplementó cada 500 ml del mismo con 50 ml de suero fetal bovino (10%), 5 ml de penicilina y estreptomicina y 5 ml de L-glutamina. La cantidad de DMEM en la botella depende de la superficie de la misma: en una botella T-25 se utilizó 5 ml de DMEM, para una botella T-75 se utilizó 12 ml, en una T-175 se utilizó 30 ml, y en una T-500 se utilizó 100 ml.

Al obtener una confluencia del 100%, es necesario realizar un pasaje celular para asegurar la viabilidad de la misma, de lo contrario es posible que las células pierdan adherencia a la botella. Para el pasaje, se retiró el DMEM, se lavó la botella con cantidad necesaria de PBS 1X acorde al tamaño de la botella (e.g. 4 ml de PBS 1X para una botella T-25), y se colocó una cantidad de tripsina al 0,25% acorde al tamaño de la botella (e.g. 300 µl de tripsina para una botella T-25). La botella se incubó a 37°C durante 2-5 minutos o hasta asegurar el desprendimiento total de la monocapa. Se neutralizó la acción de la tripsina con 1,7 ml de DMEM, y se resuspendió varias veces para asegurar la homogeneidad de las células suspendidas. Con el volumen resultante se aseguró el pasaje en la misma botella con opción a expandir la cantidad de botellas, o suplementar otros cultivos preexistentes con células Vero, o descartar el remanente.

3.1.1. Descongelado y criopreservación de cepas de *T. gondii*

Por cada cepa a utilizar se retiró el criovial del congelador a -80°C y se depositó en agua destilada a 37°C. Una vez líquido, se retiró el contenido (aprox. 1 ml) y se colocó en células Vero previamente llevadas a confluencia en una botella T-25. A las 24 horas se cambió el medio de cultivo por 5 ml de DMEM fresco. En los casos en que, al momento de cambiar el medio de cultivo, se observó al microscopio baja cantidad de células infectadas, el medio se centrifugó a 400 xg durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 5 ml de DMEM que se colocó en la T-25.

Para preservar las cepas de trabajo de *T. gondii*, se retiró el medio de cultivo de la botella y se rastrilló exhaustivamente para asegurar el completo desprendimiento de la monocapa. Se adicionó una mezcla de DMEM con 10% DMSO, y se colocó la totalidad en crioviales, 1 ml por criovial. Los crioviales fueron rotulados con el nombre de la cepa, la fecha de congelado,

el operador, y el número de criovial sobre el total de congelados. Se los colocó en el recipiente de congelación Mr. Frosty™ de Thermo Scientific™ el cual permite un congelamiento progresivo de 1°C por minuto, el cual se depositó en el congelador a -80°C. Transcurridas 24 horas, los crioviales se almacenaron permanentemente en cajones rotulados, facilitando la posterior búsqueda.

3.1.2. Infección y pasaje de *T. gondii*

La manutención de cada cepa de *T. gondii* se logró infectando una botella con Vero confluentes al 70-90%. El volumen para la infección depende de la densidad parasitaria de origen; para manutención se infectó con entre 50 – 300 µl. Una vez que los parásitos infectaron y lisaron la totalidad de las Vero, se infectó una nueva botella con Vero: a cada uno de estos ciclos se les llamó pasajes.

3.1.3. Cepas de trabajo

En el laboratorio se contó con diferentes cepas de *T. gondii* para trabajar. Dos de ellas están etiquetadas en la mitocondria: la línea Rieske-HA, proveniente del laboratorio liderado por la Dra. Lilach Sheiner en la Universidad de Glasgow, marcada en una subunidad proteica de coxIII; y la línea TgmS35-HA, proveniente del mismo laboratorio, marcada en una subunidad proteica mitoribosomal. La línea ME49, considerada una línea modelo por ser extensamente estudiada, altamente patogénica y de fácil manejo, también se obtuvo del laboratorio de la Universidad de Glasgow.

3.1.4. Generación de poblaciones clonales

Para obtener poblaciones clonales de la línea Rieske-HA de *T. gondii*, se utilizó el método de dilución límite. Se comenzó sembrando HDF con DMEM en una placa de 96 pocillos. Se empleó una línea celular distinta a las Vero para asegurar la viabilidad de las células al alcanzar el 100% de confluencia de la monocapa. Una vez alcanzada, se sembraron tres concentraciones diferentes en la placa: la primera concentración de 30 parásitos/ml (1,5 parásitos por pocillo) se sembró en 48 pocillos, la segunda concentración de 100 parásitos/ml (5 parásitos por pocillo) se sembró en 24 pocillos, y la tercera concentración de 200 parásitos/ml (10 parásitos por pocillo) se sembró en 24 pocillos. La placa se incubó dentro de la estufa a 37°C y atmósfera controlada a 5% de CO₂ durante una semana, asegurando que no fuera removida para evitar el movimiento del medio de cultivo. En el microscopio se marcaron todos los pocillos que contenían una sola placa de lisis y se incubó la placa una semana más. Luego, de los pocillos

marcados se eligieron los 4 clones más proliferadores y se escalaron a una placa de 24 pocillos con células Vero. Una vez que se observó la lisis total de los pocillos en dicha placa, se escaló a una botella T-25 con células Vero.

3.1.5. Escalado de producción de parásitos

Se comenzó con una T-25 infectada con la cepa elegida para ser escalada. Cuando la lisis fue total en la botella, se infectó, con todo el volumen, una nueva botella T-75 con células Vero en 100% de confluencia. Para escalar a una T-175, se necesitó nuevamente la lisis total o prácticamente total de las Vero. Para esto, se esperó entre 3-5 días, dependiendo de la densidad parasitaria. Cuando se produjo la lisis, se escaló a una T-175 con Vero en 100% de confluencia. De la misma manera, se escaló infectando una botella T-500 con Vero en 100% de confluencia. Nótese que fue posible escalar a botellas con Vero con confluencia menor al 100%, o escalar sin haber logrado la totalidad de la lisis de Vero, pero esto demostró afectar la densidad parasitaria final.



Figura 5. Representación gráfica del escalado; de izquierda a derecha: T-25, T-75, T-175, T-500.

3.1.6. Tratamiento de contaminación con micoplasma

En cultivos contaminados con micoplasma, se realizó un cambio de medio y se adicionó el antibiótico sparfloxacin utilizando 34 μ l por cada ml de DMEM de un stock a una concentración de 2 mg/ml en DMSO. Este antibiótico ha demostrado ser efectivo en el tratamiento de apicomplejos infectados con micoplasma (45). Con cada pasaje, el cultivo se trató hasta llegar a 4 pasajes, luego de los cuales el cultivo no presentó rastros significativos de micoplasma en el análisis por PCR.

3.2. Generación de línea transgénica fluorescente ME49-pTub_HSP60_RFP_SagCATSag

3.2.1. Transformación del plásmido pTub_HSP60_RFP_SagCATSag en bacterias DH5 α

Se comenzó purificando el plásmido pTub_HSP60_RFP_SagCATSag almacenado en papel de filtro proveniente del laboratorio liderado por la Dra. Sheila Nardelli (Instituto Carlos Chagas-FIOCRUZ). Se incubó un pequeño trozo del papel en un tubo de 1,5 ml con 1 ml de agua ultrapura durante 5 minutos a 37°C para permitir que el plásmido difunda. Con una alícuota de 25 μ l de bacterias DH5 α en hielo, se adicionó un volumen de plásmido previamente colocado en hielo equivalente al 10% de volumen de bacterias para cuidar la presión osmótica y se mezcló con la punta. Se incubó en hielo durante 5-15 minutos y se procedió a realizar un shock térmico durante 30 segundos a 42°C. Luego, se incubó con 500 ml de LB a 37°C en agitación durante 1 hora. Se realizó una centrifugación de 1 minuto a 4000 xg y se descartó el sobrenadante, dejando un poco de volumen para permitir el pipeteo. El volumen restante se resuspendió y plaqueó en placas de Petri con LB selectivo con ampicilina, y se incubó en estufa a 37°C durante 24 horas.

Entre mecheros, se trasvasó 100 ml de LB a un frasco cónico y se adicionó 100 μ l de ampicilina (1000X). De las placas de Petri, se escogió una colonia para escalar; se tocó la colonia con una punta y se mezcló dentro del frasco cónico. El frasco se cubrió con algodón y papel y se llevó al agitador a 37°C ON. Posteriormente, se trasvasó el medio a dos tubos de 50 ml y se centrifugó 10 minutos a 4000 xg, luego de la cual se descartó el sobrenadante.

3.2.2. Purificación con Maxiprep

La purificación del plásmido se llevó a cabo utilizando el kit PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep kit de Thermo Scientific™ y siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se adicionó 30 ml de *buffer* de equilibración a la columna de filtración y se dejó drenar por gravedad. Se adicionó 10 ml de *buffer* de resuspensión al pellet celular y se homogeneizó la suspensión sacudiendo suavemente el tubo. Luego, se agregó 10 ml de *buffer* de lisis y se mezcló invirtiendo suavemente el tubo, incubando la solución homogénea durante 5 minutos. Se añadió 10 ml de *buffer* de precipitado e inmediatamente se mezcló invirtiendo el tubo. El lisado precipitado se transfirió a la columna y se dejó filtrar por gravedad. Se lavó la columna con 50 ml de *buffer* de lavado y se descartó el percolado. Para eluir el plásmido, se colocó un tubo de 50 ml debajo de la columna, se completó la columna con 15 ml de *buffer* de elución y

se dejó drenar por gravedad. La precipitación del material genético se llevó a cabo agregando 10,5 ml de isopropanol al eluido, mezclando y centrifugando a 12.000 xg durante 30 minutos a 4°C. Al pellet sin sobrenadante se le adicionó 5 ml de etanol 70% y se centrifugó a 12.000 xg durante 5 minutos a 4°C. Finalmente, una vez removido el sobrenadante, se dejó secar el pellet durante 10 minutos y se agregó 200 µl de *buffer* TE.

El plásmido se llevó al espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 de Thermo Scientific para cuantificar. Se colocó primeramente 1 µl de *buffer* TE como blanco y luego se midió el contenido genético resultante de la purificación con 1 µl del precipitado.

3.2.3. Digestión del plásmido pTub_HSP60_RFP_SagCATSag

Para poder comparar la integridad del plásmido al ADN, se digirió el plásmido pTub_HSP60_RFP_SagCATSag para obtener al mismo linealizado. Primero se observó el mapa de la secuencia del plásmido con el programa ApE (A plasmid Editor) para escoger una enzima según el sitio de corte (Anexo 1). Se escogió la enzima NotI por tener un sitio de corte que no sobrelapa con el vector de interés, pero no cortar ninguna secuencia sensible presente en el plásmido y por ser una enzima que se encuentra disponible en el laboratorio: NotI-HF (High Fidelity) de New England Biolabs. En un tubo de 1,5 ml, se colocaron 5 µl de plásmido de concentración 2752 ng/ml, 2 µl de *buffer* rCutSmart™ de New England Biolabs, 2 µl de enzima NotI-HF y 11 µl de agua ultrapura. El total del volumen resultante se incubó a 37°C por 2 horas y se procedió con la precipitación, guardando antes 1 µl para un gel verificador de la digestión. Se agregó 180 µl de agua ultrapura, 400 µl de etanol 100% y 20 µl de acetato de sodio 3M y pH 5. El plásmido lineal precipitado se almacenó a -20°C; al momento de su utilización se centrifugó a 12000 xg durante 5 minutos y se adicionó 100 µl de etanol 70%.

3.2.4. Nucleofección de la cepa ME49 con pTub_HSP60_RFP_SagCATSag circular y lineal

La nucleofección se lleva a cabo en el 4D-Nucleofector™ de Lonza, con los materiales y reactivos correspondientes al kit P3 Primary Cell 4-D Nucleofector™ X Kit L. Se partió de un cultivo de parásitos tanto extracelulares como intracelulares de la cepa ME49. Se rastrilló la botella para desligar las células de la superficie, y se rompió las células usando una jeringa de 26 G de 1 ml, jeringueando tantas veces como por ml haya en el medio. En un tubo estéril, se colocó un filtro de 3 µm y se pasó el medio por el mismo para filtrar los restos celulares. Del medio resultante, se tomó 10 µl para contar en cámaras descartables Fast-Read® 102 de Biosigma. Para una nucleofección exitosa se necesita 1×10^7 parásitos por ml; en caso de tener

menos, se centrifuga y resuspende en el volumen necesario para concentrar. Se centrifugó para remover el medio de cultivo y se resuspendió en 80 µl de *buffer* P3 originario del kit comercial. Por otro lado, en un tubo de 1,5 ml se mezcló 20 µl de *buffer* P3 con 2 µl de plásmido circular o lineal, se añadió la resuspensión de parásitos y se mezcló para asegurar la integración de los componentes. Los 100 µl resultantes se colocaron dentro de la ranura de la nucleocubeta, la cual se cerró y se le dio suaves golpes para asegurar la ausencia de aire debajo de la ranura. La nucleocubeta se colocó en el equipo, el cual se programó con pulso de código EA-100. El pulso se corrió dos veces para asegurar una nucleofección efectiva. El volumen total se retiró y se incubó durante 24 horas con Vero de confluencia 70-80%. Posteriormente, se agregó 1 µl de cloranfenicol a 34 mg/ml cada 5 ml de DMEM para promover la selección de los parásitos transfectados, ya que el plásmido escogido posee resistencia al antibiótico. El proceso de selección debió atravesar como mínimo 5 pasajes para asegurar la selección.

3.2.5. Citometría de flujo y *sorting* de los parásitos ME49-pTub_HSP60_RFP_SagCATSag circular y lineal

Una vez que los parásitos se encuentran seleccionados, se procedió a realizar un análisis por citometría de flujo y posterior *cell sorting* en el BD FACSAria™ Fusion de BD Biosciences para obtener poblaciones parasitarias fluorescentes enriquecidas. Se partió de cultivos de los parásitos ME49-pTub_HSP60_RFP_SagCATSag circular, ME49-pTub_HSP60_RFP_SagCATSag lineal, y ME49 como control. Al estar en condiciones intra y extracelulares, se debió rastrillar, jeringuear y filtrar los cultivos. Se infectó botellas con Vero con los parásitos ME49-pTub_HSP60_RFP_SagCATSag lineal y circular para continuar con la línea parental previa al *sorting*. Los sobrenadantes con parásitos se colectaron en tubos con tapa a presión de fondo redondo de 8 ml, compatibles con los soportes del sorter. La manipulación y manejo del citómetro de flujo y *sorter* se llevó a cabo por Paula Céspedes, la técnica responsable del equipo.

3.3. Evaluación de la línea de trabajo de *T. gondii* para la purificación de mitocondrias

Para poder llevar a cabo el protocolo de purificación y analizar su rendimiento, se debe trabajar con una de las líneas con proteínas mitocondriales etiquetadas. Para poder escoger entre ambas, se sometieron a pruebas de Inmunofluorescencia Indirecta y Western Blot para confirmar la presencia del HA *tag* en las proteínas de interés y confirmar su correcta expresión.

3.3.1. Inmunofluorescencia indirecta

Para la Inmunofluorescencia Indirecta, se colocaron cubreobjetos circulares en dos pocillos de una placa de 6 pocillos, en los cuales se agregó 1 ml de DMEM con Vero. Transcurridas 24 horas, los pocillos se infectaron con 10-20 μ l de Rieske-HA y TgmS35-HA respectivamente y a las 24 horas se observó para confirmar la presencia de parásitos intracelulares en el cultivo. Se retiró el medio de cultivo, se lavó con 1 ml de PBS 1X y se fijó con 1 ml de metanol al 100% previamente enfriado en hielo. Pasados 5 minutos, se retiró el metanol y se lavó con 1 ml de PBS 1X. Para evitar las interacciones no específicas, se bloqueó con BSA 3% en PBS 1X durante 10 minutos. Retirada la solución de bloqueo, se diluyeron los anticuerpos primarios en solución de bloqueo: se coincubó durante 1 hora a temperatura ambiente Rabbit anti-H2Bz (cedido por la Dra. Laura Vanagas, del INTECH-Chascomús) en una dilución 1:1000 para localizar la membrana y Rabbit anti-HA (Cell Signaling, Cat #3724S) en una dilución 1:200 para localizar la proteína mitocondrial correspondiente. Se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno con 1 ml de PBS 1X para remover uniones inespecíficas. Luego, se coincubaron los anticuerpos secundarios diluidos en solución de bloqueo durante 1 hora y protegidos de la luz: se utilizaron los anticuerpos Goat anti-Rabbit AlexaFluor 488 (Invitrogen) y Goat anti-Mouse AlexaFluor 594 (Invitrogen) . Finalizada la incubación, se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno con 1 ml de PBS 1X y se retiraron los cubreobjetos cuidadosamente con una pinza y aguja. Cada cubreobjetos se colocó boca abajo en un portaobjetos con una gota de medio de montaje Fluoroshield™ with DAPI de Sigma-Aldrich. El DAPI en el medio de montaje asegura la tinción del ADN por su propiedad de unión a regiones ricas en adenina y timina del ADN. Cada cubre se observó al microscopio de epifluorescencia (Olympus) utilizando un objetivo de 100x y aceite de inmersión.

3.3.2. Western blot

Para el análisis por Western Blot, se comenzó elaborando un gel SDS-Page al 12% para la desnaturalización y separación de las proteínas a analizar. Se prepararon las soluciones de *stacking* y *resolving* según las cantidades que figuran en la Tabla 1. Los agentes polimerizantes TEMED y APS debieron ser adicionados justo antes de colocar las soluciones en el molde de vidrio para evitar la polimerización precoz.

Tabla 1. Receta de los componentes para la elaboración del gel SDS-Page 12% de 1 mm de espesor.

Compuesto	<i>Resolving</i>	<i>Stacking</i>
------------------	-------------------------	------------------------

Acrilamida 30%	6 ml	1,98 ml
Tris 1M pH 8,6		1,89 ml
Tris 1,5M pH 8.8	3,75 ml	
SDS 10% m/v	150 μ l	150 μ l
Agua UP	5,02 ml	10,89 ml
TEMED (adicionado último)	7,5 μ l	15 μ l
APS 10% m/v (adicionado último)	75 μ l	75 μ l

A pellets de muestras de TgmS35-HA, Rieske-HA y control negativo (cepa de *T. gondii* sin marcar) se les adicionó 50 μ l de agua y 150 μ l de *buffer* de carga 4X. El *buffer* de carga contiene *buffer* de lisis para degradar las muestras. Se agujeraron las tapas de los tubos con una aguja y se hirvieron las muestras 5 minutos a 100°C en el termobloque.

Se utilizó el sistema electroforético vertical de Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra System, que se ensambló con *buffer* de corrida 1X. Se procedió a cargar 20 μ l de las muestras por pocillo y 5 μ l del marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder de Thermo Scientific™. La composición del *buffer* de corrida, junto con la de los demás *buffers* y soluciones del protocolo, se encuentran en el Anexo 2. La fuente se configuró a 70 V hasta que el frente de corrida llegue al *resolving*, donde se aumentó a 120 V. La corrida se detuvo antes de que el frente de corrida se salga del gel.

Posterior a la corrida, se ensambló el sándwich de transferencia hidratado con *buffer* de transferencia y con la membrana dentro, asegurando la ausencia de burbujas. El gel se colocó sobre la membrana, se cerró el sándwich y se ubicó en la cuba. Para mantener el frío, se adicionaron bolsas de gel dentro de la cuba, que se situó dentro de una heladera de Telgopor para asegurar el frío. La fuente se configuró a 100 V y se dejó transferir por una hora. Luego, se tñió la membrana con rojo Ponceau para verificar la calidad de la transferencia y se lavó la tinción con sucesivos lavados de agua tibia hasta notar la decoloración de la membrana. Se bloqueó con la solución de bloqueo PBS 1X con 5% de leche durante 1 hora en el agitador y se hicieron 3 lavados de 15 minutos con solución de lavado. Después, se cortó la membrana a

la altura de 25 kDa. Esta fracción con proteínas de 25 KDa o más, se incubó ON a 4°C con el anticuerpo primario Rabbit anti-HA, a una dilución 1:1000. La fracción con proteínas menores a 25 kDa se incubó con el anticuerpo primario Rabbit anti-H2Bz en una dilución 1:2000. La incubación con Rabbit anti-H2Bz se emplea como control, ya que marca las histonas nucleares. Subsiguientemente, se hicieron 3 lavados de 15 minutos con solución de lavado y se procedió a incubar las dos fracciones durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario Goat anti-Rabbit HRP en una dilución 1:10000. La membrana se lavó 3 veces con solución de lavado durante 15 minutos y se procedió a visualizar la membrana en el Amersham ImageQuant™ 800.

3.4. Purificación de mitocondrias por fraccionamiento subcelular

El protocolo de purificación de mitocondrias de *T. gondii* se optimizó siguiendo el propuesto por el laboratorio liderado por la Dra. Lilach Sheiner de la Universidad de Glasgow (33).

3.4.1. Preparación de *buffers*

Para este protocolo, se utilizaron los *buffers* previamente establecidos por el protocolo anteriormente mencionado. La composición de cada *buffer* se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición de *buffers* para el protocolo de enriquecimiento de mitocondrias

<i>Buffer</i>	Componente
<i>Buffer de lisis</i>	50 mM HEPES-KOH ph 7,4
	210 mM D-manitol
	70 mM sacarosa
	1 mM EGTA
	5 mM EDTA
	10 mM KCl
	1 mM DTT (adicionado el día del experimento)

	1 tableta cOmplete™ Protease Inhibitor * (cada 50 ml) (adicionado el día del experimento)
Buffer de gradiente 2X	0,6 M D-manitol
	20 mM TES-KOH pH 7,5
	0,2% m/v BSA
Buffer de resuspensión y almacenamiento	20 mM HEPES-KOH pH 7,4
	2 mM EDTA
	250 mM sacarosa
Buffer de lavado	0,3 M sacarosa
	10 mM TES-KOH pH 7,5
Solución de lavado	PBS 1X
	0,05% Tween

* Roche

3.4.2. Cosecha

Se partió de dos botellas T-500 infectadas con Rieske y en lisis casi total de la monocapa de Vero. Se recolectó el sobrenadante en tubos de 50 ml, se tripsinizó con 15 ml de tripsina 0,25% por botella y luego de 5 minutos se neutralizó la tripsina con 15 ml de DMEM, recolectando la totalidad del medio líquido en tubos de 50 ml. Se realizó un lavado con 20 ml de PBS 1X para coleccionar los parásitos que permanecieran en las botellas. Todo sobrenadante coleccionado se disgregó con una jeringa de 26G y se filtró con un tamaño de poro de 3 µm para remover la mayor cantidad posible de detrito celular. Los tubos con medio se centrifugaron a 1500 xg durante 15 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. De este paso en adelante, los parásitos permanecieron en hielo en todo momento. Se resuspendieron los pellets en 5 ml de PBS 1X y se combinaron en un solo tubo de 50 ml. Se centrifugó nuevamente a 1500 xg por 15 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet resultante se pesó y se resuspendió en 20 ml de PBS 1X. Se extrajo una alícuota para hacer un recuento en una dilución 1:100. Se colocaron 10 µl en una cámara descartable Fast-Read® 102 de Biosigma, se contó y se calculó el número

de parásitos totales. Se repitió la centrifugación a 1500 xg durante 15 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. Luego se resuspendió en *buffer* de lisis respetando una relación de 1×10^9 parásitos por cada ml de *buffer* de lisis.

3.4.3. Ruptura por descompresión de nitrógeno

El aparato de descompresión de nitrógeno (de ahora en más cavitador) se ensambló de manera que el recipiente permanezca sumergido en hielo en todo momento. Los parásitos se colocaron dentro del cavitador y se incubaron durante 15 minutos a una presión de 2500 Psi, equivalente a 17200 kPa. Luego, se colocó un tubo de 50 ml a la salida del cavitador y se liberó la presión lentamente y con cautela. Se destinaron 10 μ l del lisado para contar los parásitos una cámara descartable Fast-Read® 102 de Biosigma y calcular el porcentaje de lisis mientras que el lisado se centrifugó a 1500 xg durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante, que contiene las mitocondrias, se trasvasó a un tubo de 50 ml y se mantuvo en hielo. El pellet se resuspendió en *buffer* de lisis fresco y se colocó nuevamente en el cavitador para repetir el proceso dos veces más, o hasta alcanzar un porcentaje de lisis de 95%. El pellet del último paso de centrifugación se almacenó a -20°C para su posterior análisis. El tubo conteniendo sobrenadante se centrifugó a 1500 xg durante 15 minutos a 4°C; en caso de observar pellet, se adicionó al pellet del último paso de centrifugación.

3.4.4. Centrifugación diferencial

El sobrenadante se colocó en un tubo JA25.50 de polialómero apto para altas velocidades preenfriado, y se centrifugó a 16000 xg durante 30-60 minutos a 4°C. El pellet resultante se resuspendió en 0,5 de *buffer* de lavado, o en caso de necesitar parar el protocolo, en *buffer* de resuspensión y almacenamiento.

3.4.5. Gradiente de Percoll

Se prepararon soluciones de Percoll al 18, 23 y 40% con el *buffer* de gradiente 2X. Se ensambló la gradiente por duplicado en tubos aptos para ultracentrífuga (poner nombre del tubo y especificaciones) con 4 ml de la solución al 40% en la base, 3 ml de la solución al 23% en el medio, y 4 ml de la solución al 18% por encima. La muestra se colocó en un único tubo, y se niveló el peso de los tubos con una sensibilidad de 0,0001 g. Se colocaron los tubos en el rotor SW41 Ti Swinging-Bucket de Beckman Coulter, y se centrifugaron en la ultracentrífuga Optima XPN-100 de Beckman Coulter a 18000 rpm (aprox. 40000 xg) durante 30 minutos a 4°C, con freno en nivel 8.

Con cuidado, se retiró el tubo con la muestra en el gradiente de Percoll y se pipetearon fracciones de 600 µl desde la parte superior del tubo a 20 tubos de 1,5 ml. Se adicionó *buffer* de lavado a completar el volumen de cada tubo y se lavó dos veces a 18000 xg durante 20 minutos a 4°C, o hasta obtener un pellet sólido y definido. Las fracciones se resuspendieron en 80 µl de *buffer* de lavado y se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

3.4.6. Análisis de las fracciones

Las fracciones se sometieron a un análisis por Western Blot para identificar aquellas con mayor proporción de ADN mitocondrial en relación con el ADN genómico. Se utilizó como *input* el pellet resultante del cavitador, y como control positivo a un pellet tomado de un cultivo de parásitos frescos. A ambos pellets se les adicionó 80 µl de *buffer* de lavado, y a todas las muestras sometidas se les agregó 150 µl de *buffer* de carga. En un gel de poliacrilamida 12% de 1 mm de espesor, se cargó 20 µl de cada muestra y 5 µl del marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder de Thermo Scientific™, y se corrió a 80 A. Una vez que se obtuvo la resolución deseada, se detuvo la corrida y se procedió a transferir el gel a una membrana de nitrocelulosa ON en cámara fría. Se bloqueó la membrana con solución de bloqueo durante 1 hora en el agitador, y se lavó tres veces con solución de lavado por 15 minutos. Se incubó la membrana con el anticuerpo primario Rabbit anti-HA en una dilución 1:1000 durante una hora. Posteriormente, se repitieron los tres lavados de 15 minutos y se incubó con el anticuerpo secundario Goat anti-Rabbit conjugado con HRP en una dilución 1:10000 durante una hora. Se lavó tres veces y se visualizó la membrana en el ImageQuant 800 (Amersham).

La membrana se volvió a incubar con el anticuerpo primario anti-H2Bz en una dilución 1:2000; previo a esto se bloqueó durante 1 hora en el agitador y se lavó tres veces por 15 minutos. Luego de la incubación con el anticuerpo primario, se repitió el proceso de lavado y se incubó con el anticuerpo secundario Goat anti-Rabbit conjugado con HRP en una dilución 1:10000 durante una hora. Previo al revelado se lavó la membrana tres veces durante 15 minutos.

Para poder estimar de manera semi-cuantitativa los resultados por Western blot, se cuantificó la intensidad óptica de las bandas correspondientes a la señal anti-HA y anti-H2Bz con la herramienta ImageJ (versión 1.53) para obtener una relación entre las señales (46). Con el programa se define la región de interés y mediante la herramienta rectangular se enmarca la banda más grande de la región. Este marco se utiliza para tomar la media del ‘valor gris’ de cada banda. Los datos se exportan a una planilla de trabajo para ser procesados y obtener un ratio para la cuantificación.

3.4.7. Obtención y Análisis del ADN obtenido por fraccionamiento subcelular

Las fracciones que se observaron con una mayor proporción de contenido proteico mitocondrial en relación con el contenido genómico fueron seleccionadas para una purificación de ADN y posterior análisis por PCR de los genes mitocondriales. También se seleccionó una fracción que presentara bajo contenido proteico, como control. La purificación se llevó a cabo utilizando el kit Quick-DNA™ Miniprep Plus kit de Zymo Research y siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, al volumen de 60 µl de cada fracción se adicionó 60 µl de *BioFluid & Cell Buffer* y 6 µl de Proteinasa K; en caso de tener un volumen mayor o menor se ajustaron proporcionalmente las cantidades. El contenido se mezcló y se incubó a 55°C durante 10 minutos. A la muestra digerida se agregó 1 volumen de *Genomic Binding Buffer* y se mezcló, para luego, transferir la mezcla a una columna Zymo-Spin™ con un tubo de recolección y centrifugar a 12000 xg durante 1 minuto. El tubo de recolección se cambió por uno nuevo y se agregó a la columna 400 µl de *DNA Pre-Wash Buffer* para volver a centrifugar a 12000 xg por 1 minuto. El tubo de recolección se vació, se adicionó 700 µl de *g-DNA Wash Buffer* a la columna y se centrifugó a 12000 xg por 1 minuto. Este paso se repitió con 200 µl de *g-DNA Wash Buffer*, y se descartó el tubo de recolección posterior al centrifugado. Se añadió 60 µl de agua UP en la columna, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, y se colocó la columna en un tubo de 1,5 ml para centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto y así eluir el ADN. Se cuantificó el ADN obtenido en el espectofotómetro NanoDrop™ 1000 de Thermo Scientific.

En caso que se obtengan concentraciones de ADN muy bajas y no sea posible alcanzar la concentración ideal para la secuenciación de 400 ng en 7,5 µl, se realizó un paso de precipitación de ADN. Primero se juntó el volumen de ADN de las fracciones en un solo tubo de 1,5 ml. Se adicionó al tubo 2 volúmenes de etanol absoluto y 0,1 volúmenes de acetato de sodio, y se incubó 2 horas a -20°C. Luego se centrifugó a máxima velocidad por 15 minutos a 4°C y se retiró el sobrenadante. El pellet de ADN se lavó con 1 ml de etanol 70% y se centrifugó a máxima velocidad por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró el sobrenadante, se dejó secar el pellet por 5-20 minutos a temperatura ambiente, y se adicionaron 20 µl de agua UP. Se cuantificó el ADN obtenido en el espectofotómetro NanoDrop™ 1000 de Thermo Scientific.

El ADN purificado se llevó al análisis por PCR semi-cuantitativa para determinar el enriquecimiento relativo del ADN mitocondrial. Se utilizaron *primers* que amplifican los tres

genes mitocondriales de *T. gondii*: *coxI*, *coxIII*, y *cob*, cuyas secuencias se encuentran detalladas en la Tabla 3. Como control del contenido de ADN genómico, se utilizaron *primers* de ADN nuclear *coc1* y *coc2*. Como control positivo se utilizó un pellet de parásitos.

Tabla 3. Secuencias de *primers* Fw y Rv para la amplificación de los genes mitocondriales

Primer	Secuencia
coxI	<i>primer forward</i> : 5' ATG ATT GCT GTA CAC CAC CAC 3'
	<i>primer reverse</i> : 5' GAG ATA GAA TGT AAC GTG GAT C 3'
cob	<i>primer forward</i> : 5' TGT CTT TTA TCG GTG TGC TCT 3'
	<i>primer reverse</i> : 5' GTA TAA GCA TAG AAC CAA TCC GG 3'
coxIII	<i>primer forward</i> : 5' ACA CTT TTA GCT GTC TTA AGC AG 3'
	<i>primer reverse</i> : 5' AAT AGA ACC AAT TGA ACA CCA TG 3'

Los componentes para cada muestra de la PCR se detallan en la Tabla 4. La cantidad de ADN molde a ser utilizada se calculó según la concentración de cada fracción, sin poner un volumen mayor a 8 µl. Se utilizó la configuración de ciclado detallada en la Tabla 5

Tabla 4. Componentes de la PCR semi-cuantitativa

Componente	Cantidad
MangoMix™*	10 µl
ADN molde	150 ng
<i>Primer Fw</i>	1 µl
<i>Primer Rv</i>	1 µl
Agua UP	A completar 20 µl

* Bioline

Tabla 5. Programa de PCR

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	2 minutos	1
Desnaturalización	94°C	30 segundos	
<i>Annealing</i>	50°C*	30 segundos	30
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	5 minutos	1

* La temperatura de annealing de los *primers* control se seteo a 55°C.

Una vez amplificado el ADN se visualizó mediante un gel de agarosa-TAE 1% m/v, donde se sembraron 10 µl de muestra en cada pocillo y 7 µl de marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb Plus. A partir de los resultados obtenidos se escogen las fracciones con mayor enriquecimiento relativo para proceder con la secuenciación

3.5. Secuenciación

Para la generación de la librería, se siguieron las especificaciones del kit ONT (SQK-NBD 114.24). En tubos de 0,2 ml se colocó 7,5 ml de ADN (a una concentración máxima de 400 ng) y se adicionó por cada muestra 2,5 ml una secuencia de *barcode* distinta, que contiene su propio mix de fragmentación. Se mezcló por *flicking*, evitando el pipeteo, y se bajó con un *spin* de 10 segundos para ser posteriormente incubado a 30°C por 1 minuto y 80°C por 1 minuto. Los tubos se retiraron y dejaron en hielo 5-10 minutos para enfriarlos. En un tubo de 1,5 ml, se juntaron las muestras colocando 10 µl cada una y se agregó 1 µl de Rapid Adapter (RAP). El tubo se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se llevó al hielo hasta su carga en la *flow cell*.

La secuenciación de la librería se llevó a cabo utilizando las *flow cells* (Flowcell R9.4), siguiendo el protocolo propuesto por ONT, en el equipo GridION. El basecalling se realizó con el software MinKNOW™ de ONT. Los datos fueron extraídos mediante ssh del servidor del secuenciador.

4. Resultados y Discusión

4.1. Generación de línea transgénica fluorescente ME49-pTub_HSP60_RFP_SagCATSag

4.1.1. Citometría de flujo

Con el objetivo de evaluar la generación de líneas transgénicas fluorescentes de inserto linealizado y no linealizado para un posterior enriquecimiento por *sorting*, las líneas se sometieron a citometría de flujo para confirmar que los parásitos seleccionados con antibiótico también presentan fluorescencia roja a nivel de la mitocondria. La estrategia de *gating* y los resultados por cada línea se visualizan en las figuras 6 y 7. Como blanco para el análisis, se tomaron parásitos de la línea ME49 *wild type* (Anexo 3).

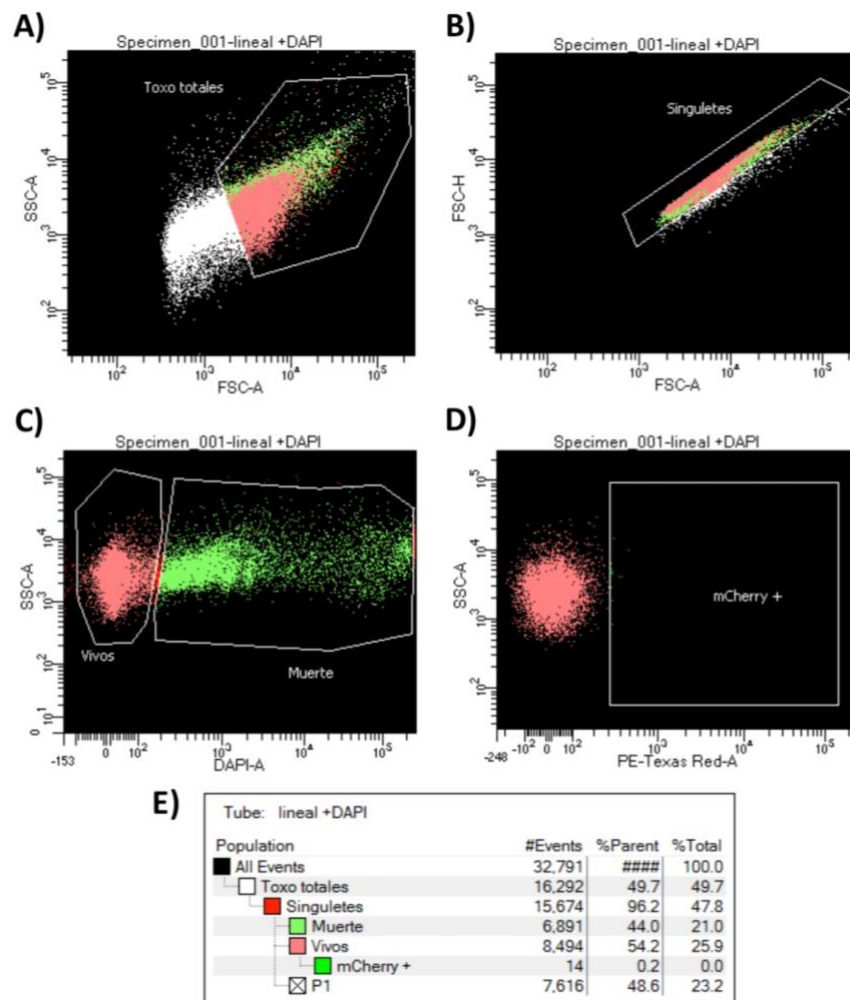


Figura 6. Estrategia de *gating* y resultados del análisis por citometría de flujo de la línea ME49-pTub_HSP60_RFP_SagCATSag lineal. A) Dot plot de *side scatter* (SSC-A) y *forward scatter* (FSC-

A) para ordenar por complejidad y poder seleccionar los parásitos y excluir restos celulares. B) Dot plot de *forward scatter* de altura (FSC-H) y *forward scatter* de área (FSC-A) para seleccionar únicamente singletes. C) Dot plot de SSC-A y DAPI-A para seleccionar lo que corresponde a parásitos vivos, en rojo. D) Dot plot de SSC-A y fluorescencia roja, para seleccionar los parásitos vivos que presentan fluorescencia roja (etiquetados como mCherry +). E) Resultados porcentuales y numéricos de cada *gating* aplicado.

Cada población de parásitos transfectados se separó en función de complejidad y tamaño, eliminando restos celulares y dobletes. Se utilizó el agente intercalante DAPI como marcador de viabilidad para poder separar entre parásitos vivos y muertos, y finalmente se excitó a una longitud de onda de 595 nm y se detectó la emisión de fluorescencia a 617 nm para poder dilucidar entre los parásitos con mitocondria fluorescente roja.

En la figura 6A, se observa una pronunciada presencia de detrito celular en la muestra pese a contar con pasos de jeringueo y filtración previo al análisis. La información en 6E comprueba que aproximadamente el 50% de la muestra se estimó como restos celulares, una cifra elevada para los estándares que se acostumbra manejar. Por más que sea posible el análisis gracias a la estrategia de *gating*, partir de una muestra con tanto detrito puede tener repercusiones en el resto del análisis. Es posible que los filtros de 3 μm utilizados no se hayan encontrado en las mejores condiciones al momento de filtrar, lo que incidiría en la presencia de contaminantes, o que los restos celulares detectados fueran menores a este tamaño.

El dot plot de la figura 6C presenta una viabilidad del 54,2% de los parásitos analizados. Una posible explicación que justifique tanta presencia de parásitos muertos es que los mismos acabaran de atravesar un arduo proceso de selección con el antibiótico cloranfenicol y comenzaron a proliferar nuevamente no muchos días antes del análisis de citometría de flujo, por lo que la numerosa presencia de parásitos muertos en el medio de cultivo podría ser normal. Así mismo, lo detectado podría corresponder a restos de célula hospedera.

La figura 6D ilustra cómo, a pesar de tener más de 8000 parásitos vivos que sobrevivieron a la selección con cloranfenicol, la cantidad de estos, que presenta fluorescencia roja es prácticamente nula. El hecho que hayan perdurado a través de numerosas rondas de selección, permite pensar que la nucleofección fue exitosa en la inserción de la resistencia a cloranfenicol, pero que no se haya insertado la fluorescencia. Alternativamente, podría considerarse que la expresión constitutiva de una proteína fluorescente puede resultar deleterea para los parásitos, por lo que podrían “silenciar” la expresión de la HSP60_RFP por medio de mecanismos epigenéticos incorporando de todas maneras el gen de resistencia. También es posible que los

parásitos hayan incorporado por sí solos la resistencia a cloranfenicol (desarrollando resistencia espontánea).

Con tan escasa cantidad de parásitos que presentan fluorescencia, se optó por no continuar con el *sorting*, ya que es posible que no se obtenga un enriquecimiento si se parte de cantidades semejantemente bajas.

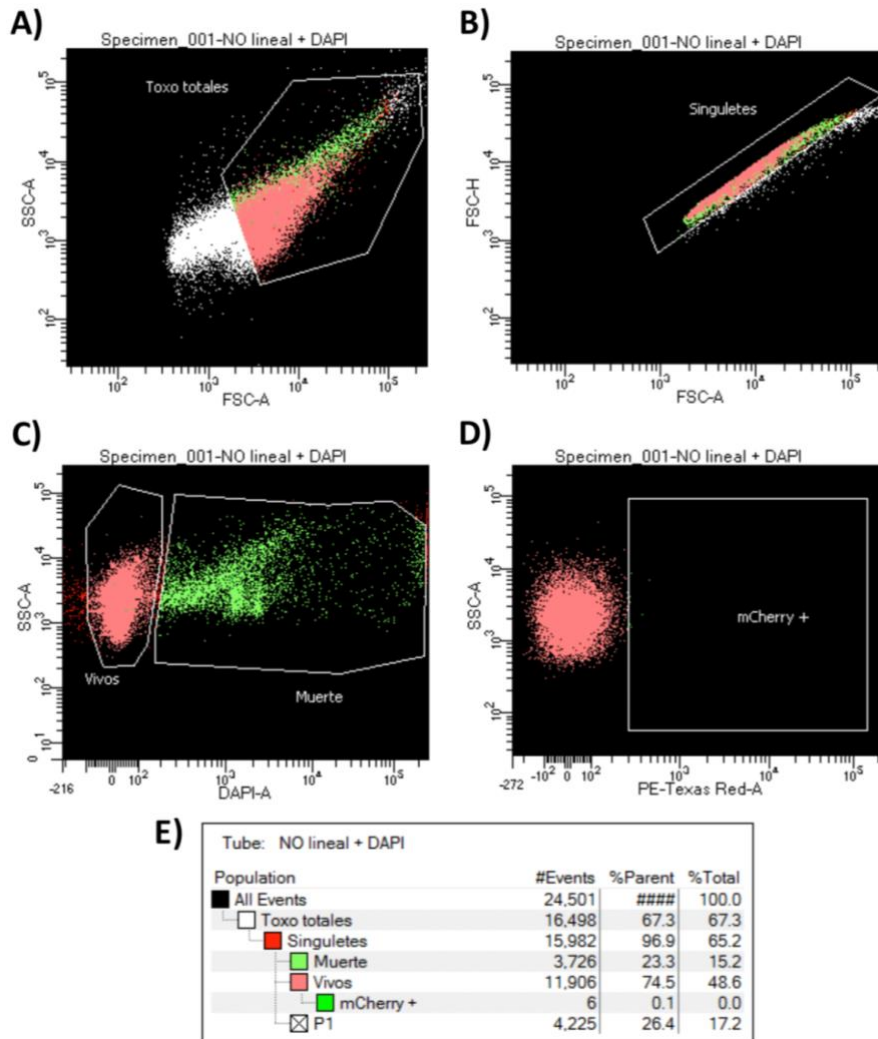


Figura 7. Estrategia de *gating* y resultados del análisis por citometría de flujo de la línea ME49-pTub_HSP60_RFP_SagCATSag circular. A) Dot plot de *side scatter* (SSC-A) y *forward scatter* (FSC-A) para ordenar por complejidad y poder seleccionar los parásitos y excluir restos celulares. B) Dot plot de *forward scatter* de altura (FSC-H) y *forward scatter* de área (FSC-A) para seleccionar únicamente singuletes. C) Dot plot de SSC-A y DAPI-A para seleccionar lo que corresponde a parásitos vivos, en rojo. D) Dot plot de SSC-A y fluorescencia roja, para seleccionar los parásitos vivos que

presentan fluorescencia roja (etiquetados como mCherry +). E) Resultados porcentuales y numéricos de cada *gating* aplicado.

Para la línea transfectada con un plásmido circular (Figura 7), se obtuvieron resultados similares a los de la línea transfectada con un plásmido lineal (Figura 6), salvo leves diferencias numéricas. Notablemente, partiendo de la misma cantidad de *T. gondii* totales, se obtuvo una mayor cantidad de parásitos vivos con la línea de plásmido circular, aunque la cantidad de parásitos que presentan fluorescencia es menor. Por esta razón, se sacan las mismas conclusiones que las declaradas anteriormente: o solo se dio la inserción de la resistencia a cloranfenicol, o los parásitos desarrollaron esta resistencia de manera espontánea.

Lamentablemente, y a pesar de reiterados intentos, no fue posible generar una línea fluorescente de *T. gondii* utilizando tanto plásmido circular como plásmido linealizado, ni diferenciar si existe algún beneficio al utilizar uno de estos plásmidos sobre el otro en la nucleofección.

4.2. Evaluación de la línea de trabajo de *T. gondii* para la purificación de mitocondrias

4.2.1. Inmunofluorescencia indirecta

Como primer paso de evaluación para escoger la línea de trabajo de *T. gondii*, se llevó a cabo una inmunofluorescencia con las líneas Rieske-HA y TgmS35-HA. Este ensayo permite verificar la presencia del tag de HA en cada línea por su fluorescencia observada en el microscopio de epifluorescencia (Olympus) y poder comparar la especificidad de unión del anticuerpo primario en cada caso. En la figura 8, se observan los resultados para la inmunofluorescencia indirecta de la línea celular Rieske-HA.

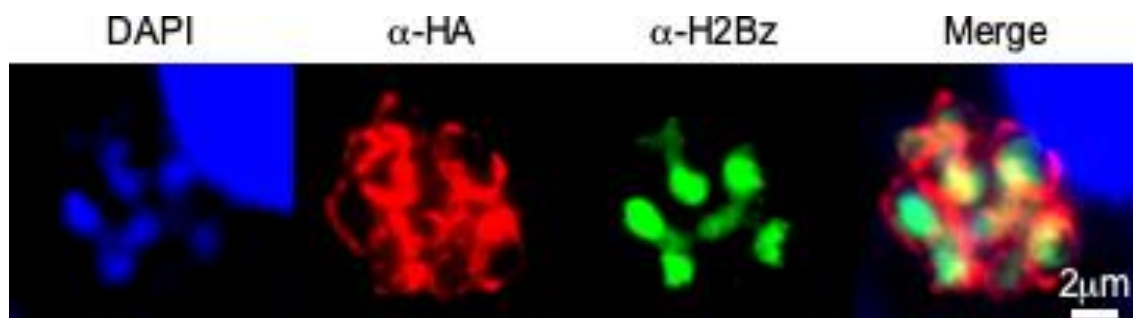


Figura 8. Visualización del ensayo de inmunofluorescencia indirecta en Rieske-HA. En azul, el tinte DAPI indicando ADN nuclear; en rojo, el tag de HA indicando las mitocondrias; en verde, el núcleo marcado por el anticuerpo anti-H2Bz.

La figura 8 no solo confirma la presencia del *tag* de HA en la línea Rieske, sino que también demuestra que el anticuerpo primario Rabbit anti-HA se conjugó específicamente con él. Se distingue la ubicación de la proteína mitocondrial Rieske en rojo, permitiéndonos apreciar la forma de lazo de la mitocondria en la periferia del parásito, tal como describe la literatura (47). El anticuerpo anti-H2Bz y el tinte DAPI fueron empleados para localizar el núcleo y el material genético, respectivamente. El uso de un anticuerpo que marca una estructura conocida, nos permite corroborar que la inmunofluorescencia indirecta fue realizada correctamente. Cabe destacar que la imagen de la inmunofluorescencia indirecta realizada con la línea TgmS35-HA no fue incluida en el trabajo por la baja señal observada en la misma, donde se dificulta distinguir la mitocondria, implicando que la unión del anticuerpo primario al *tag* de HA no fue buena o que el nivel de expresión de la proteína es demasiado baja para su detección por IFI. Esto a su vez sugiere que para los propósitos de esta tesis, la línea celular Rieske-HA, es más apropiada.

4.2.2. Western Blot

La inmunofluorescencia indirecta sugiere que la línea celular Rieske-HA presenta mejor señal. Sin embargo, dado que la detección de la proteína mitocondrial de interés por Western blot es un paso importante para el protocolo de purificación, es imperativo evaluar y escoger aquella línea de *T. gondii* cuya proteína mitocondrial etiquetada garantice un análisis claro y sencillo. Por este motivo, se evaluaron ambas líneas frente a un Western blot, como se observa en la figura 9. La membrana se incubó con dos anticuerpos primarios distintos: uno para la detección de las proteínas etiquetadas con HA, las cuales tenían un peso molecular conocido mayor a 25 kDa, y uno para la detección de la proteína nuclear H2Bz como control positivo, con un peso molecular de 17 kDa.

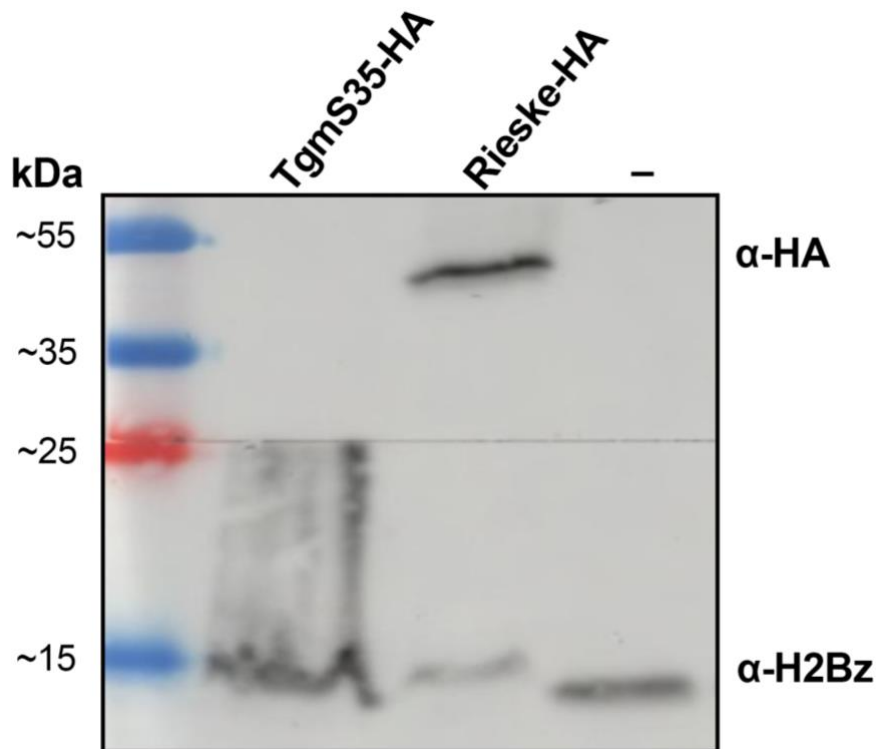


Figura 9. Western blot de las proteínas mitocondriales TgmS35-HA y Rieske-HA. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular PageRuler™ de Thermo Scientific™, con los pesos moleculares correspondientes a la izquierda. El segundo carril corresponde a la línea de *T. gondii* TgmS35-HA; el tercero, a la línea Rieske-HA. En el cuarto carril se utilizó como control negativo la línea SAG2A.

El resultado del Western blot realizado presentó una banda en los carriles 2-4 a la altura aproximada de 15 kDa que representa el control positivo de una proteína nuclear, por lo que se confirmó que la transferencia de proteínas a la membrana fue exitosa. En la fracción de la membrana incubada con anticuerpo primario Rabbit anti-HA se observó una banda de aproximadamente 50 kDa en un único carril, el carril 3 correspondiente a la línea Rieske-HA. Esto demostró que, con los anticuerpos utilizados a disposición en el laboratorio, la proteína Rieske-HA fue fácilmente detectable y que las condiciones experimentales fueron correctas para su detección. Por otro lado, el carril 2 correspondiente a la línea TgmS35-HA no presentó ninguna banda de conjugación con HA. Este resultado puede implicar que el protocolo propuesto no fue el óptimo para la conjugación del anticuerpo utilizado con la proteína TgmS35-HA, que la transferencia exitosa de esta proteína a la membrana requiere de condiciones bioquímicas diferentes, o que los niveles de expresión de esta proteína no son suficientes para detectarla por WB. Cabe resaltar que es posible que la detección de dicha proteína sea posible intercambiando el anticuerpo primario por otro o ajustando las

concentraciones utilizadas. Por otro lado, este resultado también podría implicar que el nivel de expresión de la proteína TgmS35 es demasiado bajo para permitir su detección por Western blot, bajo las condiciones de análisis utilizadas.

Al momento de escoger la línea celular, no solo se consideraron los resultados de la inmunofluorescencia indirecta y del Western blot, sino que también se tuvo en cuenta la velocidad de multiplicación como parámetro objetivo. Esto se debe a que una alta tasa de replicación simplifica el escalado de los parásitos. Esta evaluación se realizó observando diariamente el crecimiento de cada línea en su respectiva botella. Durante esta evaluación la línea TgmS35-HA se destacó con una multiplicación altamente superior a la de Rieske-HA, quien presentó una multiplicación sumamente lenta. De hecho, este lento crecimiento fue llamativo, lo que derivó en la hipótesis de una posible contaminación. A través de una PCR específica se confirmó que la línea Rieske-HA estaba contaminada con micoplasma, lo cual interfería con sus capacidades de reproducción. Visto que la línea Rieske-HA posee una proteína mitocondrial cuya detección resultó exitosa tanto por inmunofluorescencia indirecta como por Western blot, se optó por continuar utilizando esta línea no sin antes realizar un tratamiento contra micoplasma para optimizar la capacidad reproductiva de los parásitos.

4.3. Optimización del protocolo de purificación de mitocondrias por fraccionamiento subcelular y determinación de su enriquecimiento relativo.

Como se mencionó anteriormente, el protocolo para obtener fracciones enriquecidas en mitocondrias se adaptó del optimizado por el laboratorio de la Universidad de Glasgow a cargo de Lilach Sheiner (33). Este protocolo, detallado en la sección 3.4., consta de colectar los parásitos frescos (es decir, parásitos que lisaron ese mismo día), romper su membrana disolviendo grandes cantidades de nitrógeno a una presión alta, que al ser liberada repentinamente, genera que el nitrógeno escape en forma de burbujas en expansión que causan la liberación del contenido celular. Por último, se debe separar el detrito celular mediante un gradiente de Percoll que permita recolectar la fracción que contiene mitocondrias. Este protocolo fue realizado varias veces. En una primera instancia fue realizado a partir de una población heterogénea de la línea Rieske-HA con el objetivo de optimizar el protocolo. Una vez optimizado el protocolo, se realizó la purificación mitocondrial a un total de cuatro poblaciones clonales de la misma línea, para de esta forma poder determinar la variabilidad intra-poblacional del genoma mitocondrial.

El gradiente de Percoll sometida a una ultracentrifugación permitió separar el lisado de muestra entre las fases de 18%, 23% y 40% de Percoll, como lo muestra la figura 10. De esta forma se

obtuvieron 20 fracciones de 600 μ l recolectadas del gradiente de Percoll. Para poder determinar cuál o cuáles de las fracciones contiene una mejor proporción de ADN mitocondrial:ADN genómico, todas las fracciones fueron evaluadas por Western blot. Para este ensayo semicuantitativo, se incubó cada Western blot con un anticuerpo primario Rabbit anti-HA y con su correspondiente anticuerpo secundario. Luego de la obtención de señal, las membranas se sometieron al proceso conocido como *stripping*, en el cual se removieron los anticuerpos y se permitió la reincubación con otro anticuerpo primario, el anticuerpo Rabbit anti-H2Bz. De esta manera, es posible contrastar la señal obtenida para la proteína mitocondrial Rieske versus la proteína nuclear H2Bz, que evidencia las proporciones relativas de estos organelos presentes en cada fracción.

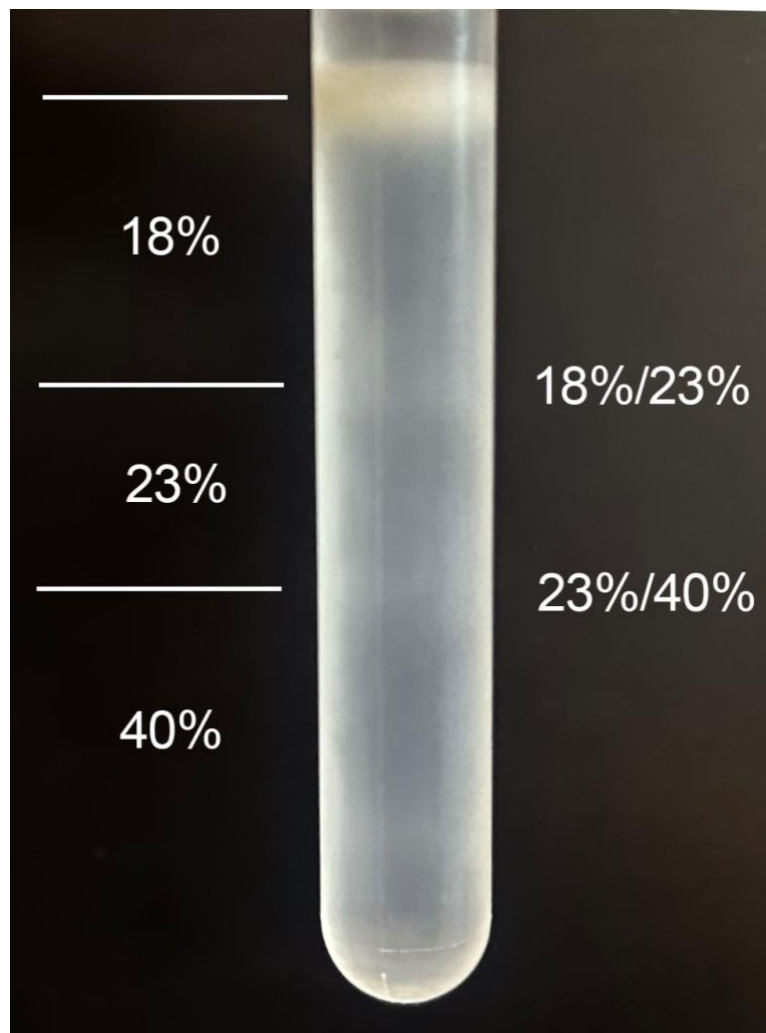


Figura 10. Gradiente de Percoll posterior a la ultracentrifugación. A la izquierda se indican las concentraciones de Percoll de cada fase, a la derecha, las interfases.

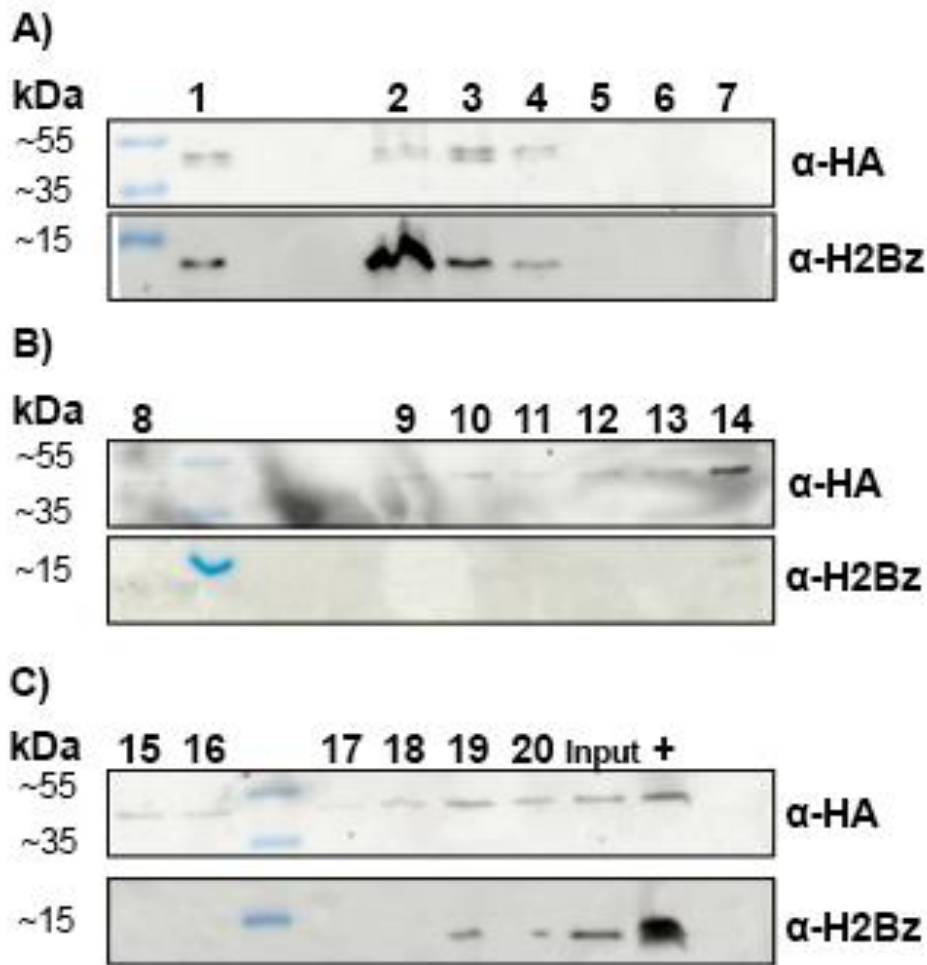


Figura 11. Western blots de las proteínas Rieske-HA y H2Bz en las fracciones colectadas (A, B, C). Se indica la fracción sembrada en cada carril. Como *Input*, se utilizó el pellet resultante de la cavitación, es decir, los parásitos que no fueron disgregados en la cavitación. Como control positivo, se sembró una muestra de parásitos frescos sin tratamiento previo.

Según la bibliografía se conoce que la interfase de Percoll entre 23%/40% es donde se encuentran preferencialmente las mitocondrias de *T. gondii* (33), por lo tanto, se esperó obtener bandas de mayor intensidad en dichas fracciones, que corresponden a las recolecciones número 13 a 17. Los Western blots en la figura 11B y 11C confirman esta hipótesis, ya que se observaron bandas de mayor intensidad para la proteína Rieske-HA que para la proteína H2Bz. Una estimación semi cuantitativa con el programa ImageJ otorgó el mejor ratio de señal anti-HA:señal anti-H2Bz a la fracción 13, con un ratio de 55, seguido por la fracción 15 con ratio de valor 10 y la fracción 14 con ratio de valor 8. Las fracciones 1-4, 19 y 20 muestran cierto contenido de proteínas mitocondriales, sin embargo, el ratio con respecto a las proteínas nucleares es muy bajo, por lo que no son fracciones de interés con las que se desea trabajar.

A partir de estos resultados se escogen las fracciones 13, 14 y 15 que cuentan con una mejor proporción de proteínas mitocondriales contra proteínas nucleares, para realizar la purificación de ADN y su posterior análisis semicuantitativo por PCR. También se escogió una fracción cuya relación haya sido muy pobre, como la fracción 8, como control negativo del método. Como control positivo, se utilizó una muestra de ADN de parásitos intactos. La PCR se consideró semicuantitativa por haber utilizado la misma concentración de ADN para cada muestra. Se utilizaron pares de *primers* para cada gen mitocondrial: *coxI*, *cob* y *coxIII*. Se adicionaron *primers* control para un gen nuclear (*primers* *coxI* y *coc2*) a cada muestra. Se visualizaron los productos de PCR en un gel de agarosa 1% (Figura 12).

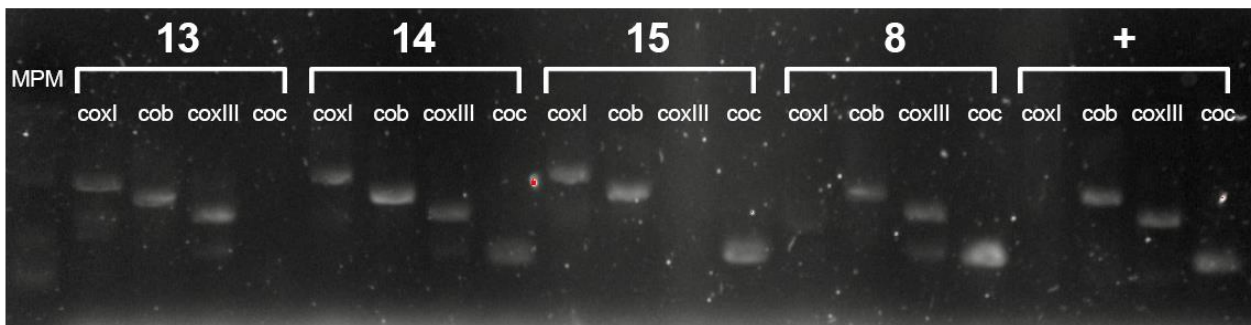


Figura 12. Gel de agarosa 1% con los resultados de la PCR semicuantitativa. En la primera columna, el marcador de peso molecular. Por cada fracción, se sembró según los *primers* utilizados en orden: *coxI*, *cob*, *coxIII*, *coc*.

Observando la figura 12, notamos la diferencia de intensidades entre bandas de amplicones mitocondriales versus bandas de amplicones genómicos. En el caso de la fracción 13, se observa una banda de buena intensidad por cada carril correspondiente a un par de *primers* de genes mitocondriales, y una ausencia de banda en el carril del gen nuclear. Esta observación puede estar indicando que para la fracción 13 la relación de ADN mitocondrial:ADN genómico es muy favorable, ya que la cantidad de ADN genómico parecería ser nula puesto que no se visualiza la banda correspondiente al gen nuclear. Por otro lado, puede que se trate de una amplificación que no funcionó por temas técnicos asociados a la PCR, como muy probablemente sucedió en el carril de *coxIII* de la fracción 15, o en el carril de *coxI* de la fracción 8 y del control positivo. No obstante, el Western blot es consistente con el resultado obtenido por PCR. Las fracciones 14 y 15 no presentaron una relación muy marcada a favor del ADN mitocondrial. Aunque observando el carril de ADN nuclear de la fracción 14 que contiene una banda difusa, es posible que esta fracción posea una mejor relación. El ratio de señal *cob*:*coc* estimado con ImageJ otorgó un valor de 2,45 para la fracción 14 y de 1,32 para la fracción 15, indicando que la relación de ADN mitocondrial:ADN genómico es más

favorable para la fracción 14. La fracción 8, escogida como control negativo de contenido mitocondrial por su baja intensidad general de bandas en el Western blot (Figura 11B), demostró contener cantidades mucho mayores de ADN genómico. El ratio de señal cob:coc estimado para esta fracción es de 0,55, casi 5 veces menor al de la fracción 14. El control positivo no provocó grandes contrastes entre intensidades de bandas. En algunos carriles, como el de *coxI* y *coxIII* de la fracción 13, y el de *coxIII* de la fracción 14 y de la fracción 8, se observa una banda más pequeña de menor intensidad. Una posible explicación es que sean bloques mayoritarios de la secuencia del gen que no lo completan del todo, pero que contienen los sitios de unión a los primers, y por eso se expresa como un fragmento de menor tamaño.

Con estos resultados en cuenta, se escogieron las fracciones 13 y 14 para secuenciar el ADN mediante ONT. Primeramente, se debió preparar una librería adicionando secuencias de *barcode* a cada fracción, que permitió el análisis de ambas fracciones en una sola *flow cell*. Los resultados de la secuenciación se compararon con el genoma nuclear de *T. gondii* y secuencias conocidas de la mitocondria de *T. gondii* (i.e. los 21 bloques de secuencia definidos por Namasivasham et al (31)). Para esto se utilizó principalmente la herramienta BLAST y se usaron distintos comandos en bash para analizar las tablas de salida, que se pueden ver en el Anexo 4. A su vez, se incorporaron al análisis, resultados previos de secuenciación mediante ONT de dos genomas completos de *T. gondii*, denominados Uru1 y Uru2. Los resultados obtenidos y su comparación se resumen en la tabla 6.

Tabla 6. Resultados de la secuenciación de *reads* largos de ONT y su posterior análisis.

	Fracción 13	Fracción 14	Uru1	Uru2
<i>reads</i> totales	24338	28977	-	-
<i>reads</i> vs genoma nuclear	1041	3052	120671	102593
<i>reads</i> vs secuencias conocidas mitocondriales	122	350	2957	2305
Ratio mitocondrial:nuclear	0,1171	0,1147	0,02450	0,02247

La secuenciación de las fracciones devolvió, para la fracción 13, un total de 24338 *reads*, y para la fracción 14, 28977 *reads*. Observando la tabla 6, se muestra que el total de *reads* que

mapean contra el genoma nuclear y/o contra secuencias conocidas mitocondriales es considerablemente menor. Si bien una diferencia entre estos dos valores es esperable por la presencia de contaminantes como restos celulares, esta diferencia tanto mayor puede ser debida a la contaminación con micoplasma de los cultivos.

El ratio de *reads* que mapean con secuencias mitocondriales vs *reads* que mapean con genoma nuclear para las dos fracciones analizadas es de 0,1171 y 0,1147, respectivamente. Por otro lado, el ratio de *reads* para los dos genomas completos es de 0,02450 y 0,02247. En otras palabras, los *reads* de las fracciones contienen 5 veces más *reads* mitocondriales que nucleares. Este resultado demuestra que las fracciones producidas a partir del protocolo de purificación de mitocondrias por fraccionamiento subcelular fueron efectivamente enriquecidas en material genético mitocondrial, y deja en evidencia la aptitud del protocolo puesto a punto.

4.4. Análisis de poblaciones clonales

Como se mencionó anteriormente, el protocolo de purificación se reiteró con cada una de las cuatro poblaciones clonales. A continuación, el análisis durante el proceso.

A partir del análisis de los resultados previos, se optó por analizar 6 fracciones de cada clon, usando las fracciones entre 12-17, dependiendo del pipeteo de la banda de interés del gradiente de Percoll. En la figura 13 se muestran los Western blots para las fracciones de dos de los cuatro clones.

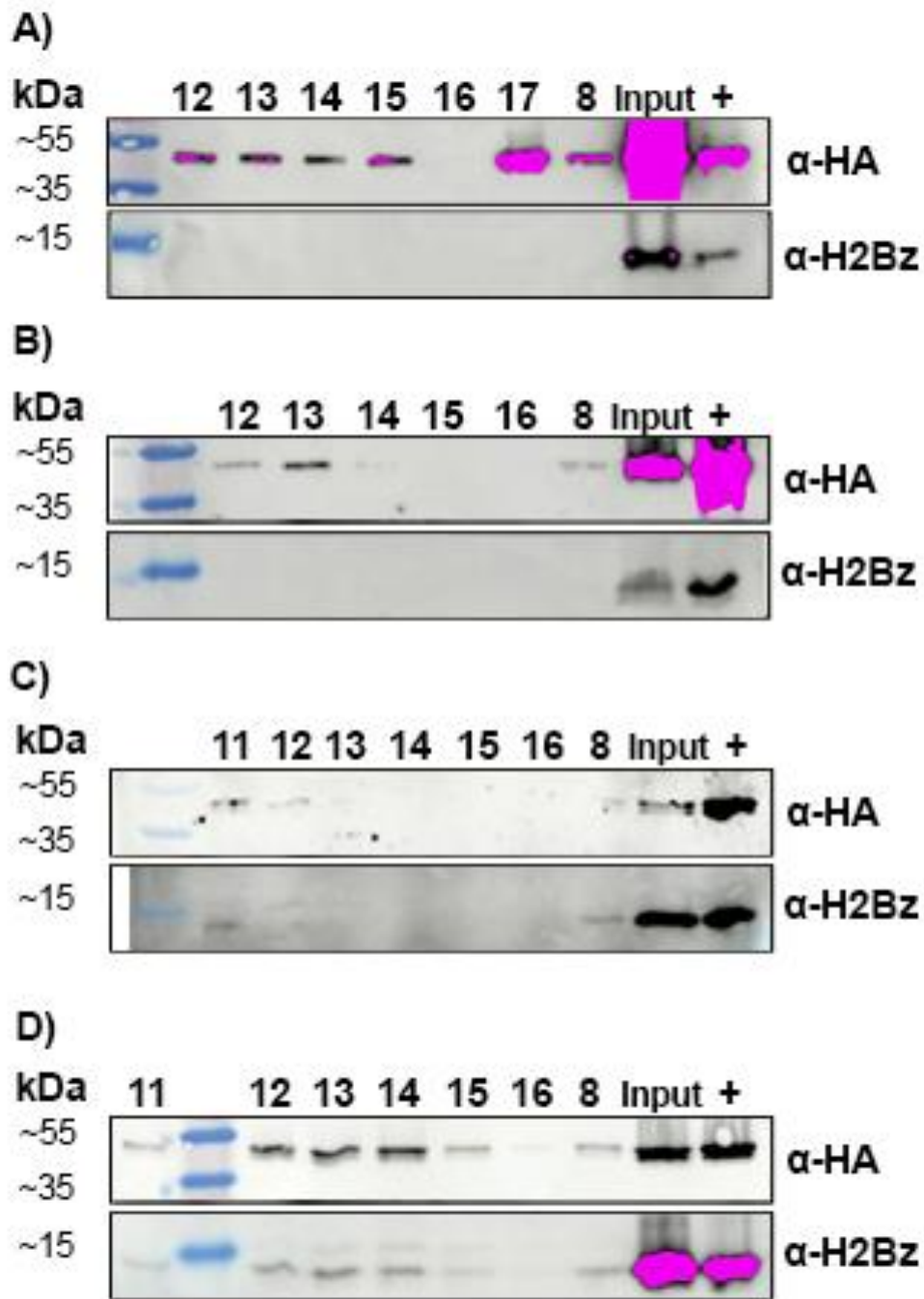


Figura 13. Western blots de las proteínas Rieske-HA y H2Bz para las fracciones. Las bandas sobreexpuestas se coloran de fucsia debido al *software* del visualizador de membranas Amersham ImageQuant™ 800 A) Clon E3. Se analizaron las fracciones 12-17 y 8, junto con el Input (pellet de la cavitación de cada parásito) y el control positivo (parásitos sin tratamiento previo). B) Clon G4. Se analizaron las fracciones 12-16 y 8, junto con el Input y el control positivo. C) Clon F4. Se analizaron las fracciones 11-16 y 8, junto con el Input y el control positivo. D) Clon E4. Se analizaron las fracciones 11-16 y 8, junto con el Input y el control positivo.

Para los clones E3 y G4, el análisis de las fracciones por Western blot (figura 13A y 13B) demostró altas cantidades de la proteína mitocondrial Rieske-HA, y ausencia de la proteína nuclear H2Bz, con excepción de los controles. Estas condiciones a simple vista son prometedoras. No obstante, llama la atención que la fracción 8 no sólo no presentó una mayor proporción de proteína nuclear, sino que no presenta banda alguna, indicando la ausencia de contenido nuclear. Esto puede deberse a que, al momento de hacer el stripping, previo a la incubación con el anticuerpo Rabbit anti-H2Bz, se haya también lavado cierta cantidad de proteína de las membranas. Si esto ocurriera, la señal sería débil o inexistente para las fracciones pero se mantendría en el Input y el control positivo dado que estos carriles presentan grandes cantidades de proteína. Para análisis futuros, se tendrá en cuenta teñir la membrana con rojo Ponceau luego del stripping como paso verificador de la cantidad de proteínas en la membrana. También es necesario destacar que, en el caso de la fracción 16 del clon E3 y las fracciones 14-16 del clon G4, se observa la ausencia de bandas. Esto se debe a que al sembrar las muestras en el gel SDS-PAGE al 12%, la mayoría o la totalidad del volumen se precipitó y salió del pocillo. Por otro lado, es posible que el fraccionamiento varíe levemente entre una purificación y otra y no se obtengan exactamente los mismos perfiles de fraccionamiento fracción a fracción para muestras obtenidas en días diferentes.

En el caso del clon F4 (figura 13C), el Western blot presentó dificultades en su lectura, ya que no es posible observar las bandas con claridad, menos por las fracciones de Input y control positivo. Curiosamente, tanto el gel SDS-PAGE para este clon como la membrana se desarrollaron junto con el clon E4, cuyos resultados son claros y legibles (figura 13D). No obstante, considerando que los resultados de los otros tres clones validan el método previamente puesto a punto, se optó por no repetir el análisis para este clon y suponer que también existe enriquecimiento de proteína mitocondrial en comparación a la nuclear en las fracciones analizadas.

Para el clon E4 (figura 13D), se observan bandas de mayor intensidad para Rieske-HA que para H2Bz en todas las fracciones analizadas a excepción de la fracción 8, escogida a modo de control, y el Input y el control positivo. Estos resultados son los deseables, ya que implican una mayor cantidad de contenido mitocondrial en comparación al nuclear.

Con estos resultados, para los clones E3 y G4 se escoge continuar con todas las fracciones a la purificación de ADN y posterior amplificación por PCR, mientras que para los clones F4 y E4 se escogieron las fracciones 11-14.

Para facilitar el análisis semicuantitativo por PCR para las fracciones seleccionadas, en vez de trabajar con los tres pares de *primers* que amplifican los genes mitocondriales de *T. gondii*, se escogió trabajar únicamente con los *primers* que amplifican el gen *cob*. Esto se debe a que en la optimización del protocolo se demostró que fue el único par de *primers* de los tres en amplificar la totalidad de las fracciones analizadas (figura 12).

La purificación de ADN de las fracciones de cada clon tuvo como resultado concentraciones más bajas de lo esperado, lo cual presentó dificultades para proseguir con el protocolo. A causa de esto, se realizaron modificaciones en algunos puntos de la PCR. Para empezar, para amplificar las fracciones de los clones E3 y G4, al momento de preparar la PCR se adicionó el volumen máximo de ADN permitido. Por un lado, esto impide que estas PCR sean consideradas semi-cuantitativas, pero como todas las fracciones tenían tan bajas concentraciones de ADN por igual, aún se puede sacar conclusiones a partir de los resultados. Por otro lado, para la amplificación de las fracciones escogidas de los clones F4 y E4, se tomó como concentración límite aquel que corresponde al de la fracción menos concentrada en el volumen máximo permitido de ADN para la amplificación, para entonces poder mantener la “semi-cuantitatividad” de la PCR. Los resultados se dilucidan en la figura 14.

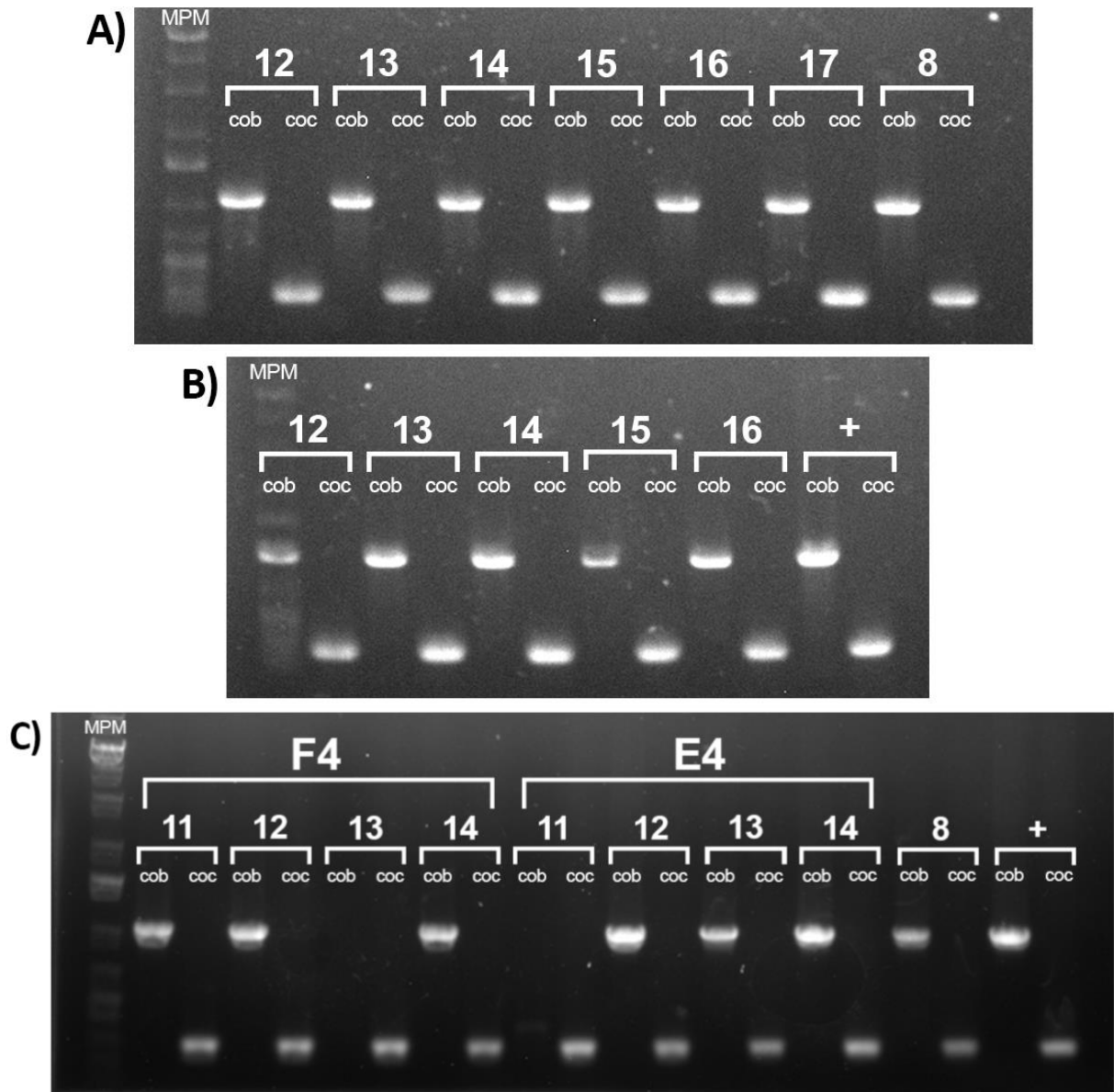


Figura 14. Gel de agarosa 1% con los resultados de la PCR semicuantitativa. Por cada fracción, se sembró según los *primers* utilizados en orden: cob, coc. A) Gel correspondiente a los resultados de las fracciones del clon E3. B) Gel correspondiente a los resultados de las fracciones del clon G4. C) Gel correspondiente a los resultados de los clones F4 y E4.

En el caso de los clones E3 y G4 (Figura 14A y 14B), no se observaron diferencias de intensidades notorias entre bandas de *primers* mitocondriales comparadas con las bandas de *primers* nucleares. Cabe destacar que para la fracción 12, la amplificación de cob se sembró en el mismo carril que el marcador de peso molecular, que puede estar interfiriendo con la visualización. El hecho que para estos clones se visualicen todas las bandas implica que ambos

pares de *primers* amplifican el ADN de cada fracción; esto puede ser evidencia tanto de la sensibilidad de la PCR como de la calidad del ADN relativa en cada fracción.

En la figura 14C, se observa que la amplificación del gen mitocondrial no fue posible para la fracción 13 del clon F4 y tampoco para la fracción 11 del clon E4. El resto de las fracciones, con la excepción de la fracción 8, demuestran leves a moderadas diferencias de intensidad que favorecen el ratio de ADN mitocondrial:ADN nuclear. En cuanto al ratio de señal de cob:coc, el clon E4 obtuvo los mejores valores en comparación con el clon F4. Se destaca la fracción 12 del clon E4, cuyo ratio de señal de cob:coc es de 1,87, el más elevado en general. Las fracciones 13 y 14 del mismo clon obtuvieron un ratio de 1,45 y 1,53, respectivamente. Mientras tanto, el ratio para la fracción 8 es de 1,15. La fracción 14 obtuvo el ratio más elevado entre las fracciones del clon F4, con un valor de 1,54, y le siguieron las fracciones 12 y 11 con valores de 1,41 y 1,22, respectivamente. Lamentablemente, no fue posible calcular el ratio para las fracciones cuya amplificación mitocondrial no tuvo éxito. Aún así, es posible observar que la mayoría de las fracciones tienen un ratio de señal de gen mitocondrial contra señal de gen nuclear elevado y mayor al de los controles.

A raíz de las bajas concentraciones de ADN obtenidas en la purificación, se realizaron modificaciones para poder proceder con la secuenciación por ONT. Si bien una amplificación por PCR es posible, la secuenciación requiere de una concentración óptima de 400 ng en 7,5 μ l, que no es posible de alcanzar con las concentraciones de ADN logradas. Por este motivo, se realizó un paso de precipitación de ADN, donde se juntó el ADN de las fracciones correspondientes para cada clon y se precipitó para obtener una mayor concentración del mismo. Como perspectivas a futuro, se considera tomar el volumen total de la interfase 23%/40% de la gradiente de Percoll en lugar de dividirlo en varias fracciones. También es relevante notar que escalando el cultivo se puede obtener un mejor rendimiento en cuanto a cantidad de ADN mitocondrial obtenido del protocolo propuesto.

Actualmente, la secuenciación y análisis de las cuatro poblaciones clonales se encuentra en proceso.

5. Conclusiones

En base a los objetivos planteados al comienzo del trabajo, no se logró generar una cepa transgénica cuya expresión de la proteína mitocondrial HSP60 fluorescente fuese estable. Se observa que la nucleofección de los parásitos con el plásmido de expresión fue posible por la evidente resistencia al antibiótico administrado, pero al llevarlos al citómetro de flujo, no se observó la fluorescencia roja esperada. Aún así, hay posibilidades que los parásitos no hayan sido transfectados pero hayan adquirido la resistencia al antibiótico naturalmente.

Se logró poner a punto y optimizar un protocolo de purificación de mitocondrias por fraccionamiento subcelular para poder determinar aquellas fracciones enriquecidas en mitocondrias de *T. gondii*. Ahora, este protocolo es fácilmente reproducible con los equipos y materiales que se encuentran en el Laboratorio de Biología de Apicomplejos del Institut Pasteur de Montevideo. Dada la naturaleza de los estudios del laboratorio, este protocolo es aprovechable en muchas de las investigaciones que aquí se realizan. Obtener fracciones purificadas en mitocondrias no sólo permite el análisis del ADN mitocondrial, sino que el protocolo puede ser útil para el estudio de proteínas mitocondriales y su sensibilidad a drogas, entre otros.

Se alcanzó optimizar la obtención de ADN mitocondrial a partir de las fracciones enriquecidas en mitocondrias, obteniéndose un marcado enriquecimiento relativo en relación al ADN nuclear.

Se logró secuenciar por Nanopore y analizar las secuencias mitocondriales para comparar su enriquecimiento relativo. Gracias a esta tecnología, se pudo afirmar que existe enriquecimiento del genoma mitocondrial, validando las herramientas desarrolladas en el proyecto. Aún no fue posible determinar la variabilidad intra-poblacional del genoma, dado a la baja concentración de ADN obtenido por el método. Esto sería posible de alcanzar escalando el cultivo de parásitos y trabajando con una alícuota total de mitocondrias purificadas en lugar de contar con varias fracciones.

Considerándolo todo, se podría decir que con este trabajo ahora se cuenta con herramientas cruciales que podrán facilitar el análisis del ADN mitocondrial para poder seguir estudiando y potencialmente evaluando el desarrollo de drogas anti-apicomplejos cuyo blanco farmacológico sea la mitocondria, así como el análisis del ADN mitocondrial en casos, por ejemplo, de resistencia frente a los fármacos de uso clínico con los que actualmente se dispone para tratar la infección por *Toxoplasma gondii* en humanos y ganado ovino.

6. Referencias Bibliográficas

1. Morrison DA. Evolution of the Apicomplexa: where are we now? *Trends in Parasitology*. 2009;25(8):375–382. doi:10.1016/j.pt.2009.05.010
2. Oberstaller J, Otto TD, Rayner JC, Adams JH. Essential Genes of the Parasitic Apicomplexa. *Trends in Parasitology*. 2021;37(4):304–316. doi:10.1016/j.pt.2020.11.007
3. Da Silva Silveira C, Armendano JI, Moore DP, Cantón GJ, Macías-Rioseco M, Riet-Correa F, Giannitti F. Comparación de ELISAs comerciales para la detección de anticuerpos en la investigación diagnóstica del aborto asociado a *Neospora caninum* en rodeos lecheros de Uruguay. *Revista Argentina de Microbiología*. 2020;52(2):107–114. doi:10.1016/j.ram.2019.06.004
4. Bañales P, Fernandez L, Repiso MV, Gil A, Dargatz DA, Osawa T. A nationwide survey on seroprevalence of *Neospora caninum* infection in beef cattle in Uruguay. *Veterinary Parasitology*. 2006;139(1–3):15–20. doi:10.1016/j.vetpar.2006.03.004
5. Macchi MV, Suanes A, Salaberry X, Fernandez F, Piaggio J, Gil AD. Epidemiological study of neosporosis in Uruguayan dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*. 2020;179:105022. doi:10.1016/j.prevetmed.2020.105022
6. Jeffers V, Tampaki Z, Kim K, Sullivan WJ. A latent ability to persist: differentiation in *Toxoplasma gondii*. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2018;75(13):2355–2373. doi:10.1007/s00018-018-2808-x
7. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*. 2000;30(12–13):1217–1258. doi:10.1016/S0020-7519(00)00124-7
8. Sullivan WJ, Jeffers V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiology Reviews*. 2012;36(3):717–733. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00305.x
9. Conti Díaz I, Freyre Á, Queiruga G, Noya C, Méndez J, Gedda C, Reig B, Acosta M, López Jordi J, Gonzáles Banfi A. Estudio de toxoplasmosis en la Unidad de Perinatología del BPS en el período 1991-1996. *Revista médica del Uruguay*. 1998;14(3):226–235.
10. Torgerson PR, Mastroiacovo P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. *Bulletin of the World Health Organization*. 2013;91(7):501–508.

doi:10.2471/BLT.12.111732

11. Dorsch MA, Francia ME, Tana LR, González FC, Cabrera A, Calleros L, Sanguinetti M, Barcellos M, Zarantonelli L, Ciuffo C, et al. Diagnostic Investigation of 100 Cases of Abortion in Sheep in Uruguay: 2015–2021. *Frontiers in Veterinary Science*. 2022;9:904786. doi:10.3389/fvets.2022.904786
12. Ajioka JW, Sibley LD. Development and Application of Classical Genetics in *Toxoplasma gondii*. In: *Toxoplasma Gondii*. Elsevier; 2007. p. 367–389. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123695420500167>. doi:10.1016/B978-012369542-0/50016-7
13. Lourido S. *Toxoplasma gondii*. *Trends in Parasitology*. 2019;35(11):944–945. doi:10.1016/j.pt.2019.07.001
14. Frenkel JK. *Toxoplasma* in and around Us. *BioScience*. 1973;23(6):343–352. doi:10.2307/1296513
15. Montoya J, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *The Lancet*. 2004;363(9425):1965–1976. doi:10.1016/S0140-6736(04)16412-X
16. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998;11(2):267–299. doi:10.1128/CMR.11.2.267
17. Black MW, Boothroyd JC. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2000;64(3):607–623. doi:10.1128/MMBR.64.3.607-623.2000
18. Al-Malki ES. Toxoplasmosis: stages of the protozoan life cycle and risk assessment in humans and animals for an enhanced awareness and an improved socio-economic status. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2021;28(1):962–969. doi:10.1016/j.sjbs.2020.11.007
19. Dubey JP. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press; 2021. <https://www.taylorfrancis.com/books/9781003199373>. doi:10.1201/9781003199373
20. Speer CA, Dubey JP. Ultrastructure of early stages of infections in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Parasitology*. 1998;116(1):35–42. doi:10.1017/S0031182097001959
21. Kim K, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *International Journal for Parasitology*. 2004;34(3):423–432. doi:10.1016/j.ijpara.2003.12.009

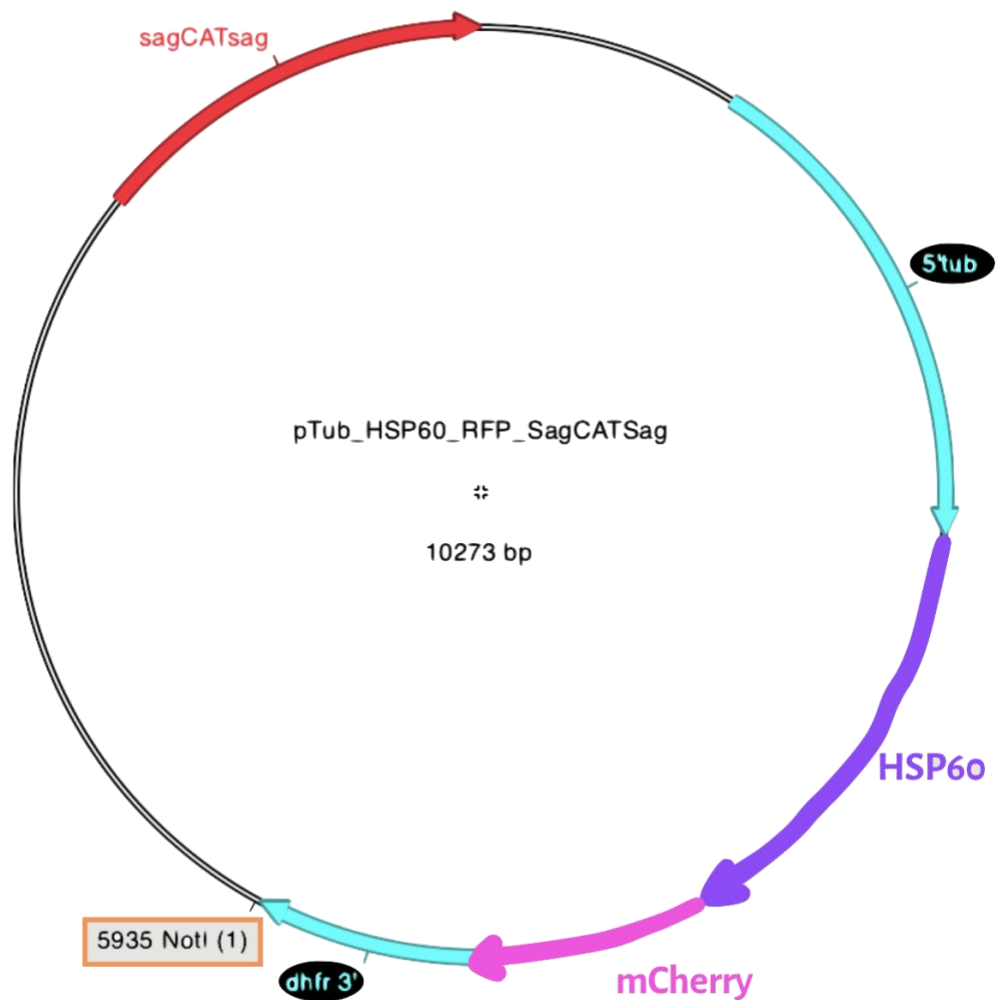
22. Miller CM, Boulter NR, Ikin RJ, Smith NC. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*. 2009;39(1):23–39. doi:10.1016/j.ijpara.2008.08.002
23. Robert-Gangneux F, Dardé M-L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2012;25(2):264–296. doi:10.1128/CMR.05013-11
24. Attias M, Teixeira DE, Benchimol M, Vommaro RC, Crepaldi PH, De Souza W. The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. *Parasites & Vectors*. 2020;13(1):588. doi:10.1186/s13071-020-04445-z
25. Katris NJ, Van Dooren GG, McMillan PJ, Hanssen E, Tilley L, Waller RF. The Apical Complex Provides a Regulated Gateway for Secretion of Invasion Factors in *Toxoplasma* Sibley LD, editor. *PLoS Pathogens*. 2014;10(4):e1004074. doi:10.1371/journal.ppat.1004074
26. McFadden GI, Yeh E. The apicoplast: now you see it, now you don't. *International Journal for Parasitology*. 2017;47(2–3):137–144. doi:10.1016/j.ijpara.2016.08.005
27. Delgado ILS, Zúquete S, Santos D, Basto AP, Leitão A, Nolasco S. The Apicomplexan Parasite *Toxoplasma gondii*. *Encyclopedia*. 2022;2(1):189–211. doi:10.3390/encyclopedia2010012
28. Cavalier-Smith T. Origin of mitochondria by intracellular enslavement of a photosynthetic purple bacterium. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2006;273(1596):1943–1952. doi:10.1098/rspb.2006.3531
29. Hikosaka K, Kita K, Tanabe K. Diversity of mitochondrial genome structure in the phylum Apicomplexa. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2013;188(1):26–33. doi:10.1016/j.molbiopara.2013.02.006
30. Usey MM, Huet D. Parasite powerhouse: A review of the *Toxoplasma gondii* mitochondrion. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2022;69(6):e12906. doi:10.1111/jeu.12906
31. Namasivayam S, Baptista RP, Xiao W, Hall EM, Doggett JS, Troell K, Kissinger JC. A novel fragmented mitochondrial genome in the protist pathogen *Toxoplasma gondii* and related tissue coccidia. *Genome Research*. 2021;31(5):852–865. doi:10.1101/gr.266403.120
32. Berná L, Marquez P, Cabrera A, Greif G, Francia ME, Robello C. Reevaluation of the

- Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* genomes reveals misassembly, karyotype differences, and chromosomal rearrangements. *Genome Research*. 2021;31(5):823–833. doi:10.1101/gr.262832.120
33. Maclean AE, Bridges HR, Silva MF, Ding S, Ovciarikova J, Hirst J, Sheiner L. Complexome profile of *Toxoplasma gondii* mitochondria identifies divergent subunits of respiratory chain complexes including new subunits of cytochrome bc1 complex. *PLoS Pathogens*. 2021;17(3):e1009301. doi:10.1371/journal.ppat.1009301
34. Birth D, Kao W-C, Hunte C. Structural analysis of atovaquone-inhibited cytochrome bc1 complex reveals the molecular basis of antimalarial drug action. *Nature Communications*. 2014;5(1):4029. doi:10.1038/ncomms5029
35. Alday H, Doggett J. Drugs in development for toxoplasmosis: advances, challenges, and current status. *Drug Design, Development and Therapy*. 2017;Volume11:273–293. doi:10.2147/DDDT.S60973
36. Srivastava IK, Morrisey JM, Darrouzet E, Daldal F, Vaidya AB. Resistance mutations reveal the atovaquone-binding domain of cytochrome *b* in malaria parasites. *Molecular Microbiology*. 1999;33(4):704–711. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01515.x
37. Nixon GL, Moss DM, Shone AE, Lalloo DG, Fisher N, O'Neill PM, Ward SA, Biagini GA. Antimalarial pharmacology and therapeutics of atovaquone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013;68(5):977–985. doi:10.1093/jac/dks504
38. Satam H, Joshi K, Mangrolia U, Waghoo S, Zaidi G, Rawool S, Thakare RP, Banday S, Mishra AK, Das G, et al. Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. *Biology*. 2023;12(7):997. doi:10.3390/biology12070997
39. Metzker ML. Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics*. 2010;11(1):31–46. doi:10.1038/nrg2626
40. Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*. 2021;82(11):801–811. doi:10.1016/j.humimm.2021.02.012
41. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*. 2016;17(6):333–351. doi:10.1038/nrg.2016.49

42. Eren K, Taktakoglu N, Pirim I. DNA Sequencing Methods: From Past to Present. *The Eurasian Journal of Medicine*. 2023;54(Supp1):S47–S56.
doi:10.5152/eurasianjmed.2022.22280
43. Mantere T, Kersten S, Hoischen A. Long-Read Sequencing Emerging in Medical Genetics. *Frontiers in Genetics*. 2019;10:426. doi:10.3389/fgene.2019.00426
44. Wang Y, Zhao Y, Bollas A, Wang Y, Au KF. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nature Biotechnology*. 2021;39(11):1348–1365.
doi:10.1038/s41587-021-01108-x
45. Malave-Ramos DR, Kennedy K, Key MN, Dou Z, Kafsack BFC. Safe, Effective, and Inexpensive Clearance of *Mycoplasma* Contamination from Cultures of Apicomplexan Parasites with Sparfloxacin Muralidharan V, editor. *Microbiology Spectrum*. 2022;10(5):e03497-22. doi:10.1128/spectrum.03497-22
46. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. 2012;9(7):671–675. doi:10.1038/nmeth.2089
47. Nishi M, Hu K, Murray JM, Roos DS. Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Cell Science*. 2008;121(9):1559–1568.
doi:10.1242/jcs.021089

7. Anexo

Anexo 1: Mapa de la secuencia del plásmido



pTub: promotor de tubulina

HSP60: proteína mitocondrial

mCherry: proteína fluorescente

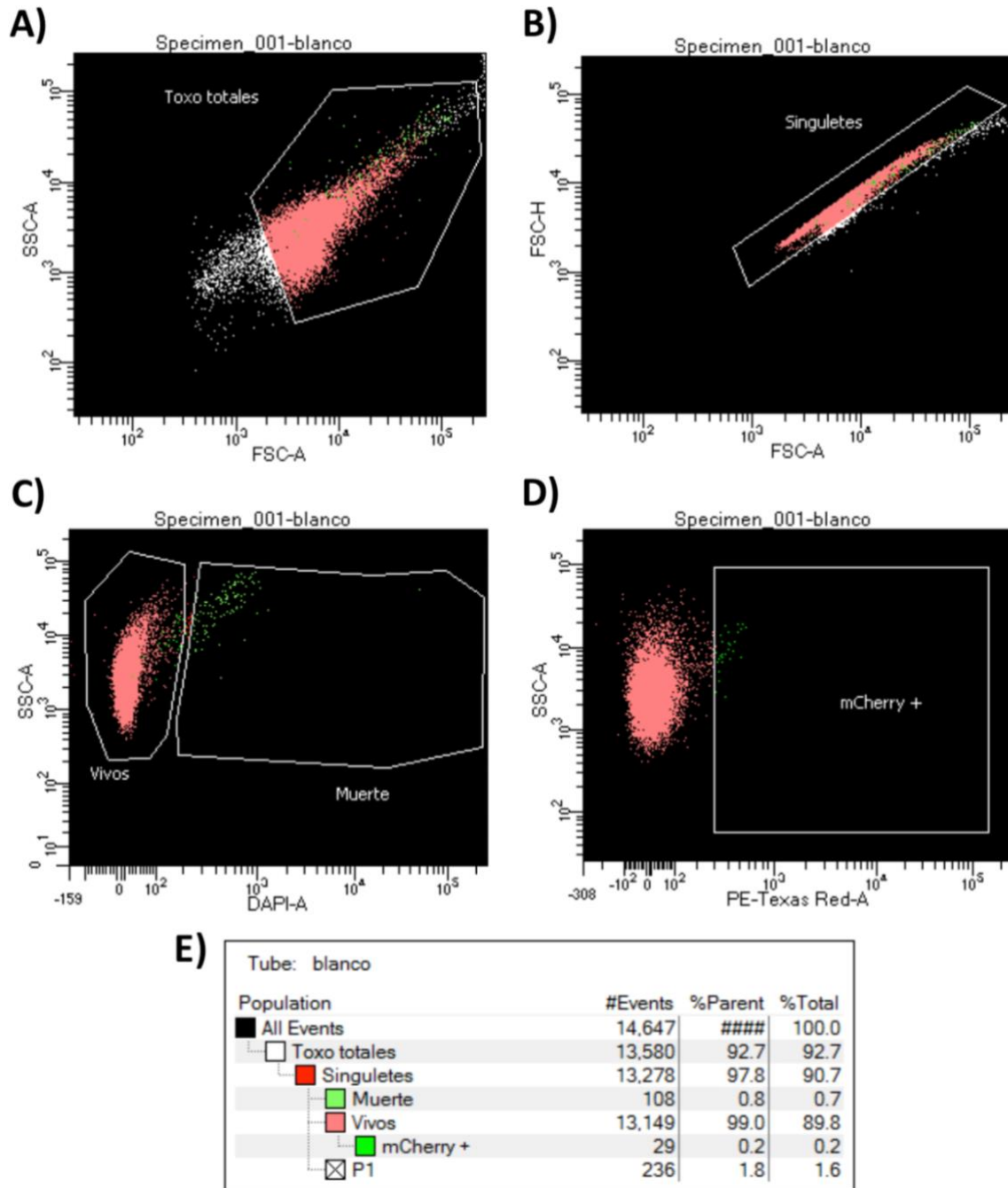
CAT: resistencia a cloranfenicol

NotI: enzima de digestión, cuyo sitio de corte se indica con un recuadro anaranjado.

Anexo 2: Composición de *buffers*

<i>Buffer</i>	Componente
<i>Buffer de carga 4X</i>	0,2 M Tris-HCl
	8% m/v SDS
	0,4 M DTT
	6 mM azul de bromofenol
	4,3 M de glicerol
<i>Buffer de corrida</i>	25 mM Tris
	190 mM glicina
	0,1% m/v SDS
<i>Buffer de transferencia</i>	25 mM Tris
	190 mM glicina
	20% metanol
Tinción rojo Ponceau	0,2% m/v Ponceau S
	5% ácido acético glacial
Solución de lavado	PBS 1X
	0,05% Tween

Anexo 3: Estrategia de *gating* y resultados para los parásitos ME49 wild type, utilizados como blanco en el análisis de citometría de flujo.



A) Dot plot de *side scatter* (SSC-A) y *forward scatter* (FSC-A) para ordenar por complejidad y poder seleccionar los parásitos y excluir restos celulares. B) Dot plot de *forward scatter* de altura (FSC-H) y *forward scatter* de área (FSC-A) para seleccionar únicamente singuletes. C) Dot plot de SSC-A y DAPI-A para seleccionar lo que corresponde a parásitos vivos, en rojo. D) Dot plot de SSC-A y fluorescencia

roja, para seleccionar los parásitos vivos que presentan fluorescencia roja (etiquetados como mCherry +). E) Resultados porcentuales y numéricos de cada *gating* aplicado.

Anexo 4: Script y comandos utilizados en bash para el análisis de los resultados de secuenciación

Para el mapeo de los *reads* contra los bloques de secuencia mitocondriales de *T. gondii*:

```
blastn -subject Blocks_Namasivayam.fa -query barcode09_ALL.fasta -  
outfmt '6 std qlen slen' -out bar09_vs_Blocks_blastn.blast -task  
blastn
```

Para filtrar los resultados del mapeo:

```
more bar09_vs_Blocks_blastn.blast |awk '$15=$4/$14, $16=$4/$13' |awk  
'$4>45' |awk '$15>0.5 || $16>0.5 {print $1}' |sort|uniq -c |wc
```

Para el mapeo de los reads contra el genoma nuclear de *T. gondii*:

```
blastn -subject TgRH.fa -query barcode09_ALL.fasta -outfmt '6 std qlen  
slen' -out bar09_vs_Toxo.blast
```