

UTILIZACION DEL PATRON DE RESTRICCION DEL DNA CODIFICANTE PARA EL RNA RIBOSOMAL DE LA SUBUNIDAD PEQUEÑA PARA LA CARACTERIZACION DE APICOMPLEXA

**ADELAIDA LÓPEZ¹, EUGENIO ANDRADE¹, NELSON ROYERO²
Y HUMBERTO CARVAJAL².**

1 Laboratorio de Biología Molecular. Departamento de Biología.
Universidad Nacional de Colombia. Santafé de Bogotá.

2 Departamento de Microbiología. Universidad del Valle. Cali.

RESUMEN

Los Apicomplexos constituyen un phylum de protozoarios que se caracterizan por ser parásitos obligados de una gran variedad de huéspedes vertebrados e invertebrados. Hoy en día hay fuertes polémicas en torno a su clasificación taxonómica, sus relaciones filogenéticas, y los patrones de coevolución con sus hospederos. El gen que codifica para el ARN ribosomal de la subunidad pequeña (ARN-SURp) se utiliza como marcador molecular para resolver estas inquietudes. A partir del ADN de las especies de la familia Sarcocystidae (*Sarcocystis cruzi*, *Sarcocystis* sp. de *Didelphis marsupialis* y *Sarcocystis* sp. de *Columbina talpacoti* y *Toxoplasma gondii*), y de especies de la familia Plasmodiidae (*Plasmodium* de *Anolis chloris*, *P. simium*, y *P. falciparum*), se amplificó por PCR el gen que codifica para el ARN de la subunidad ribosomal pequeña (ARN- SURp) usando los iniciadores P5-P3, 0009-2134 y 566R-567R. Se compararon los patrones de restricción Hind III, Eco RI, Sau 3AI y Alw 26I del DNA ribosomal. La prueba de *riboprint* mostró que además de discriminar entre familias permite caracterizar diferencias a nivel de género y especie.

SUMMARY

Apicomplexa is a Protozoa phylum in which all members are obliged parasites of a wide range of vertebrate and invertebrate hosts. There is an ongoing controversy on systematics, phylogenetic relationships and parasite - host coevolution patterns. The SSU ribosomal gen has been used as a molecular marker in order to solve these issues. From DNA of the species of the Sarcocystidae family (*Sarcocystis cruzi*, *Sarcocystis sp.* from *Didelphis marsupialis*, *Sarcocystis sp.* from *Columbina talpacoti* and *Toxoplasma gondii*), and from the species of the Plasmodiidae family (*Plasmodium* from *Anolis chloris*, *P. simium*, and *P. falciparum*), the SSU ribosomal DNA fragment was amplified by PCR, using the pair of primers P5-P3, 0009-2134 and 566R-567R. Hind III, Eco RI, Sau 3AI and Alw 26I restriction patterns were compared. It was shown that ribotyping analysis was able to discriminate between these Apicomplexa families and at the same time detected differences between genus and intraespecific variants.

Introducción

En las últimas décadas los Apicomplexos se han estudiado desde una perspectiva filogenética sustentada en caracteres moleculares, ya que estos permiten penetrar en terrenos no accesibles al análisis morfológico.

La gran diversidad morfológica y molecular observada en los protistos podría reflejar una explosión de diversidad evolutiva durante la aparición de las células eucariotas, o el hecho de que pudieron divergir relativamente tarde en la historia de las células nucleadas. En ambos casos podrían ser vistos como una agrupación de linajes parafiléticos en contraste con los hongos, las plantas y los animales que son grupos monofiléticos independientes (Sogin, M.L. 1989).

Haekel en 1892 propuso la ubicación de todas las formas microbianas en el reino Protista, y Whittaker en 1969, propuso la división de los seres vivientes en procariotes y eucariotes, dividiendo estos últimos en 4 reinos (Animalia, Plantae, Fungi, y Protista). Hoy en día la discusión en la definición de los linajes eucarióticos se ha incrementado (Sogin, M.L. 1989). En vista de que existe una gran variación fenotípica dentro de los Protistos, algunos autores proponían dividirlos en múltiples reinos, considerando además que representan el grupo más viejo y diverso de eucariotes. Se afirma que la extensión en la diversidad genética entre géneros de Protistos puede ser tan grande como la existente entre ranas y mamíferos (Johnson, A.M. & Baverstock, P.R. 1989).

El phylum Apicomplexa esta constituido por aproximadamente 300 géneros y se conocen cerca de 5.000 especies. Sus miembros se caracterizan por poseer organelos apicales complejos y ciclos de vida con alternancia de fase sexual y fase asexual (Noble, E.R. et al. 1989). Levine cataloga los Apicomplexa como parásitos unicelulares que tienen en algún estadio de su ciclo de vida un complejo

apical compuesto de anillos polares, rhotries, micronemas, microtúbulos subcorticales y un conoide (completo o incompleto) con una o más membranas subplasmiales (Cavalier-Smith, T. 1993).

Ciñéndose a la clasificación de Noble E.R. et al. (1989), el grupo Apicomplexa esta constituido por dos clases principales: Perkinsea y Sporozoea, esta última contiene 3 subclases: Gregarina, Coccidia y Piroplasmia. Levine sugirió introducir a los piroplasmidos en su propia clase –Conoidasida– excluyéndolos de la clase Sporozoea, pues ellos no tienen esporas y no hay conoides dentro de su complejo apical– (Gajadhar, A.A. et al. 1991). Lo anterior indica la importancia de llegar a un acuerdo sobre las características determinantes para la ubicación de los Apicomplexa. Algunas especies se hallan dentro del grupo porque poseen ciertas características que los separan con otros phylum, pero son de poca ayuda para determinar su ubicación dentro de los mismos Apicomplexa. Los diversos miembros de los Apicomplexa se han clasificado de acuerdo a sus características biológicas, tipo de huésped, tejido que parasita y especificidades de vector (Barta, J.R. 1989). No todos los miembros del phylum Apicomplexa poseen un complejo apical completo, algunos elementos de éste están ausentes en *Theileria* y *Babesia* (Gajadhar, A.A. et al. 1991). *Plasmodium*, los piroplasmidos y los coccidios en general han sido ubicados dentro de los Apicomplexa porque poseen al menos porciones de un complejo apical. Aunque estos grupos tienen fases sexuales y asexuales similares presentan muchas diferencias en bioquímica, fisiología, capacidad inmunogénica, especificidades de huésped y tejido que infectan. Por ejemplo *Theileria* y *Plasmodium* se parecen más en cuanto al ciclo de vida y morfología, pero el análisis de secuencia del ARN-SURp sugiere que *Theileria* y *Babesia* (piroplasmida) están más cercanas a *Sarcocystis muris* que a *Plasmodium* (Gajadhar, A.A. et al. 1991) (Ellis, J. et al. 1992). Esta topología obedece a una gran distancia mutacional que separa al género *Plasmodium* de otros apicomplexos, y podría sugerir que se le ha dado mucha importancia a la característica de poseer complejo apical. Los análisis de secuencias del ARN ribosomal pueden ayudar a probar la validez de las relaciones inferidas a partir de patrones de estructuras y ciclo de vida. La evolución morfológica y genómica no van de la mano, ya que similitudes morfológicas pueden encubrir divergencias a nivel genómico, fisiológico y bioquímico (Johnson, A.M., & Baverstock, P.R. 1989).

Dentro de la subclase Coccidia encontramos las familias Sarcocystidae a la cual pertenece los géneros *Sarcocystis* y *Toxoplasma*, y Plasmodiidae donde se encuentra el género *Plasmodium*. Estas dos familias presentan un parentesco sin aclarar sujeto a debate (Johnson, A.M. et al. 1988). Algunos autores sostienen que los Apicomplexa, los Dinoflagelados y los Ciliados se constituyen como un grupo filogenético que según el análisis de secuencias de ARN-SURp, tienen un ancestro común. Sin embargo el orden en que se sucedieron las ramificaciones entre *Plasmodium*, *Sarcocystis* y *Theileria* es impreciso (Gajadhar, A.A. et al. 1991). Anteriormente se había postulado que *Toxoplasma* y *Sarcocystis* estarían

más relacionados con el dinoflagelado *Prorocentrum micans*, que con *Plasmodium* (Johnson, A.M. & Baverstock, P.R. 1989).

Por otra parte Johnson et al. (1988), determinó que *Toxoplasma* y *Sarcocystis* se constituyen como un grupo monofilético, sin resolver la cuestión sobre si el *Plasmodium* representa una taxa hermana o no. Comparando solamente *Toxoplasma* y *Plasmodium*, se mostró por el análisis de Fitch-Margoliash, de máxima parsimonia y la Distancia Wagner que estos géneros conforman un clade, mientras que por el análisis de compatibilidad máxima, el *Plasmodium* no se agrupa junto a los anteriores como un taxa hermano (Johnson, A.M. et al. 1987). Se muestra entonces que no hay consenso en las relaciones de estos grupos y podrían no estar muy relacionados.

Johnson, A.M et al (1990) reporta que el parásito entérico de animales y humanos, *Cryptosporidium* esta más relacionado con *Plasmodium* que con *Sarcocystis* de acuerdo al ARN ribosomal. Esto contradice a Barta, J.R. (1989), quien propone una mayor cercanía entre *Sarcocystis* y *Cryptosporidium* utilizando características biológicas.

El género *Plasmodium* presenta internamente desacuerdos en la clasificación, debido a que se han reportado especies que carecen de pigmento malárico y ausencia de esquizontes (Ayala, S. 1977). Los estudios sobre relaciones filogenéticas revelan hechos aparentemente insólitos como que *P. falciparum* esta más relacionado con *Plasmodium* de aves que con *Plasmodium* de primates (Brooks, D.R. & McLennan, D.A. 1992). Entre los estudios mencionados se propone la monofilia de *Sarcocystis* y *Toxoplasma* (Johnson, A.M. & Baverstock, P.R. 1989, Holmdahl; O.J.M. et al. 1994; Barta, J.R. et al. 1991). Por tanto se propone que las relaciones de la familia Sarcocystidae y los miembros del género *Plasmodium* están aún sin definir.

Los géneros *Plasmodium* y *Sarcocystide* pertenecen a la clase Coccidiasina y al orden Eucoccidiosa, se separan en dos subordenes: Haemosporina con la familia Plasmodiidae y Eimeriorina con la familia Sarcocystidae (Levine, N.D. 1986).

El *Sarcocystis* fue observado por primera vez en ratón por Miescher en 1843. Posteriormente Kühn designó con el nombre *Synchytrium miescherianum*, a un parásito similar encontrado en el cerdo. En 1899 Labbé lo renombró como *Sarcocystis miescherianum*. Posteriormente el *Sarcocystis* de ratón fue descrito por Blanchard en 1885 y llamado por Railliet, *Sarcocystis muris* (Dubey, J.P. et al. 1989). A partir de la fecha y hasta 1972, se le dio a cada parásito encontrado el nombre del huésped donde se hallaba ya que solo hasta este año se conoció el ciclo de vida, y se empezó a reevaluar la taxonomía del género. Heydorn en 1975 diferenció 3 especies de quistes sarcosporidianos en vaca, con sus respectivos estadios sexuales en perro, gato y humano, poniendo en evidencia que correspondían a tres distintas especies, que luego se llamarían *S. cruzi*, *S. hirsuta*, *S.*

hominis. Hoy en día se han reportado *Sarcocystis* alojados en músculos de aves, reptiles, y muchos grupos de mamíferos: hombres, monos, ballenas etc. indicando un amplio rango de distribución (Menlhorn, H. & Heydorn, A.D. 1978).

Debido a que los *Sarcocystis* que infectan aves y mamíferos presentan muy bajo grado de especificidad con el huésped definitivo y al desconocimiento de su ciclo de vida en algunos huéspedes (De Guise, S. et al. 1993), se han suscitado problemas de taxonomía, identificación, y caracterización de las distintas especies. La morfología de estos parásitos cambia durante el desarrollo de su ciclo, y por tanto no es un carácter definitivo en la clasificación. Los estudios de isoenzimas y la determinación de DNA cromosomal por electroforesis de campo pulsado se han empleado en la diferenciación de especies de *Sarcocystis* (Su Hung-Yi et al. 1992).

El estudio del ARN ribosomal de la subunidad pequeña (ARN-SURp), ha generado propuestas sobre sus relaciones filogenéticas entre una gran variedad de especies. El análisis del patrón de polimorfismos de restricción del DNA ribosomal amplificado por reacción en cadena de la polimerasa PCR (riboprinting), ha sido una valiosa herramienta en estudios de tipificación, diagnóstico y clasificación taxonómica de protozoarios, incluyendo ciertas líneas de *Toxoplasma* y coccidios estrechamente relacionados (Barta, J.R. et al. 1991). Del mismo modo esta metodología logró demostrar que algunas líneas de amebas que se consideraban estrechamente relacionadas con la *Entamoeba histolytica*, como la Laredo, pertenecen más bien al grupo de *E. moshkovskii*, distanciándose genótipicamente de la *E. histolytica* (Clark, C.G. & Diamond, L.S. 1991). El parásito *Neospora caninum* diagnosticado inicialmente como *Toxoplasma gondii* se constituyó en un nuevo género separado de este, como resultado del análisis de restricción del ARN-SURp con DdeI y ScrFI, que arroja patrones diferentes en dos sitios únicamente (Ellis, J. et al. 1994).

Este trabajo es una contribución a la discriminación a nivel genómico entre las familias Sarcocystidae y Plasmodiidae, las cuales han sido una preocupación importante en medicina veterinaria y humana por cuanto la gran mayoría de sus miembros son parásitos que invaden un alto número de huéspedes vertebrados e invertebrados.

Materiales y Métodos

Procedencia de las Muestras

El *Sarcocystis cruzi* se obtuvo a partir de músculo cardíaco bovino conseguido en matadero Frigorífico Guadalupe de Bogotá. Los *Sarcocystis* de *Didelphis marsupialis* y *Columbina talpacoti* se obtuvieron a partir de quistes musculares. Las muestras del ADN de *Plasmodium inui* y *P. simium* fueron donadas por Vladimir Corredor.

Las muestras del *Plasmodium spp.* fueron recolectadas en la región de Llano Bajo Buenaventura de sus hospederos *Anolis chloris* y *Columbina talpacoti*. Los cultivos de *P. falciparum* fueron realizados en la Sección de Parasitología del Instituto Nacional de Salud en Bogotá, según el método de Trager & Jensen 1974. El exudado de *Toxoplasma gondii* cepa RH fue donado por la Dra. María Mercedes Santacruz de la sección de Parasitología del Instituto Nacional de Salud de Santafé de Bogotá. El ADN de levadura *Saccharomyces sp.* y de células de riñón de mono verde africano fueron donados por la Dra. Rocio Barrios de la sección de Inmunogenética del INS. La sangre de *Bos taurus* fue colectada en ACD, a partir de terneros sanos de 3 meses de edad según Sambrook J. et al. (1989). El DNA de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* fue preparado en Lab. Biol. Mol. Dpto. Biología.

Obtención de Sarcocystis Cruzi

El aislamiento de *Sarcocystis cruzi* se realizó por digestión triptica y separación por percoll, a partir del músculo cardíaco bovino de acuerdo con una modificación del método descrito por Azumendi J.L. (1994). A 2 g. de músculo finamente picado se le añadieron 2 ml de solución de tripsina al 1% en PBS pH: 7.2. Se incubó a 37°C durante una hora con agitación suave, y una vez ocurrida la digestión se filtró. El sobrenadante se centrifugó a 2.500 rpm por 15 minutos. Se descartó el sobrenadante, al sedimento se lavo con PBS, y se comprobó la presencia de parásitos por observación al microscopio. La suspensión de parásitos se centrifugó en cojín de Percoll a una densidad de 1.074 g/ml diluido con NaCl 1.5M y agua estéril. Se retiró el sobrenadante que contiene el tejido contaminante y el resto del Percoll dejando el sedimento lo más seco posible. Este se lavó 3 veces con solución salina NaCl al 0.9%. Se realizó una lámina para verificar la pureza de la extracción. Los parásitos se lavaron con PBS y se resuspendieron en 500 ml de buffer de digestión y se llevan al congelador a -40°C. El rendimiento de la extracción se determinó por conteo en cámara de Newbauer. Por fijación en glutaraldehído al 2%, 16 hr. a 4°C, el sedimento fue mezclado con agar al 2%, previa inclusión en epon-araldita para preparación de laminas para microscopía de luz.

Purificación de DNA:

Extracción fenólica: los parásitos se suspendieron en SDS 0.5%, EDTA 0.2M y proteinasa K 1mg/ml. Se dejó incubando por 2 horas a 56°C seguido de una hora con RNAsa a 37°C. Se efectuó extracción fenol-cloroformo 2 veces y luego 2 veces con 1V de cloroformo. El ADN se precipitó con acetato de amonio y etanol, o con acetato de sodio e isopropanol, y se lavó con etanol al 70%. El precipitado se secó a vacío y se resuspendió en TE.

Extracción con Chelex-100: el sedimento de parásitos se resuspendió en agua destilada y se dejó a temperatura ambiente por 30 minutos. Se agregó un volumen

de Chelex-100 al 5%. Se incubó a 56°C por 30 minutos y luego a 92°C por 8 minutos. Luego se resuspendió con vortex por 10 segundos, y se centrifugó por 3 minutos a 14.000 rpm. El ADN quedó en el sobrenadante del cual se tomaron de 2 a 10 ml para realizar reacciones de PCR. La sangre se procesó modificando el protocolo de Sambrook J. et al (1989), para aislamiento de ADN a partir de células sanguíneas de mamífero.

Amplificación ADN:

La amplificación del gen que codifica para el ARN ribosomal de la subunidad pequeña, 18 S, se llevó a cabo mediante PCR. Las concentraciones de los componentes de reacción fueron las siguientes:

Los ciclos térmicos fueron: 5 minutos desnaturalización a 92°C seguidos de 35 ciclos de: desnaturalización, 1 min. a 92°C; reasociación: 1 min. temperaturas de 55°C a 67°C (dependiendo de las parejas de cebadores); extensión: 2 min. a 72°C, y una incubación final de 10 min. a 72°C.

Las parejas de cebadores empleados en las reacciones fueron las siguientes:

P5: 5'ggaagcttatctggtgatcctgccagta 3'(+)

P3: 5'gggatcctgatcctccgcaggtcacctac 3'(-)

REACTIVOS	CONCENTRACION
Buffer TAQ 10x(HCl 10mM pH: 8.3) KCl 50mM)	1 X
MgCl ² 25mM	1.0mM - 2.5mM
dNTPs 25mM	0.05mM - 0.2mM
Cebador 1 10mM Cebador 2 10mM	0.5mM - 1.0mM
Enzima Tag ADN polimerasa	2 U
ADN	10 ng
Agua estéril	Hasta 50ml
Aceite mineral	50ml

0009: 5'tgatcttgccagtagtcatat 3'(+)

2134: 5'tcacctacggaaccttgta 3'(-)

566R: 5'ggataactacgaaaagctgtagc 3'(+)

567R: 5'gtcaagattaataatgcaataatctatccc 3'(-)

Los cebadores fueron explorados por medio del programa Macaw versión 2.0.3 win 16 (1994), entre las secuencias del gen ribosomal 18 S reportadas en el GenBank para determinar la especificidad.

Clonación

Los fragmentos amplificados fueron purificados por el sistema "Wizard" (Promega). Los extremos se emparejaron por acción del fragmento Klenow. La clonación se efectuó en el plásmido pCR-Script de STRATAGENE (2961pb), utilizando el siguiente protocolo de ligación: 10 ml (50 ng) de fragmento emparejado, 1ml de Plásmido 10ng/ml, 1 ml de Buffer 10X (500 mM Tris.HCl pH: 7.6, 100 mM MgCl₂, 10mM espermidina, 100 mM DTT, 500 mg/ml BSA) 0.5 ml de ribo-ATP 10mM, 0.5 ml de enzima SrfI 6U 1 ml de T4 ADN ligasa 4U Weiss. Esta reacción se efectuó por 2 horas a temperatura ambiente, y luego por 12 h. a 4°C. Se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa DH5a previamente hechas competentes según Sambrook et al.(1989). Las bacterias transformadas se seleccionaron en ampicilina, X-gal e IPTG. El DNA plasmídico recombinante se obtuvo siguiendo el Protocolo (minipreps) de lisis por ebullición según Sambrook et al. (1989).

Análisis de Restricción

Para comprobar la presencia del inserto en el plásmido este se liberó por acción de las enzimas NotI y XhoI. Los insertos purificados fueron cortados con las enzimas: Hind III, Eco RI, Sau 3AI, Alw 26I, Hae III, Alu I, DdeI, MspI, Hinc II, Bam HI, PstI. Para tal efecto se tomaron 2 ml (500 ng) de inserto purificado, BSA 1X, Buffer de la enzima correspondiente 1X, agua estéril para completar un volumen de 10ml y 2U de enzima incubando a 37°C durante 16 hr. Las diferentes restricciones fueron visualizadas en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

Los valores teóricos de los fragmentos a partir de digestiones con las diferentes enzimas, de secuencias reportadas en el GenBank fueron obtenidos con los programas: Digest versión 1.0 (1992) y Macaw versión 2.0.3 win 16 (1994). Los tamaños de los fragmentos de digestiones obtenidos experimentalmente fueron estimados con Gel-JML versión 1.1β (1992) y Frag-Lenght III (1988).

Secuenciamiento

Un clon proveniente de ligación con fragmento de ADN amplificado de *Sarcocystis cruzi* se secuenció a partir del primer T3 usando el método de Sanger.

Resultados

Extracción de Parásitos

La única fuente de parásito fue el músculo cardíaco de *Bos taurus* y muscular de *Didelphis sp.* y *Columbina sp.* El rendimiento de la extracción se calculó a

partir de 50 gramos de músculo digerido, del cual resultaron 60 ml de sedimento de bradizoitos, a partir del cual se realizó una dilución 1:100 para conteo en cámara de Neubauer. El resultado promedio del conteo fue de 231.000 parásitos/ml, es decir que de 50g de músculo cardíaco se pueden obtener 13'860.000 parásitos. Se hizo necesario repetir varios procesos de extracción para aumentar la cantidad de parásitos disponibles. Es de resaltar que la parasitemia varía de acuerdo con el tiempo de postinfección que para el caso no se podía estimar dado que la carne no provenía de ejemplares de experimentación, sino de muestras de matadero. En todas las extracciones realizadas a partir de muestra de un ejemplar adulto de *Bos taurus*, hubo presencia de parásito.

Por medio del método de digestión trípica y purificación por percoll, se garantizó la separación del parásito del tejido muscular bovino.

Identificación de Especie

Según Dubey et al. (1989), *S. cruzi* es la única especie que se encuentra en el músculo cardíaco bovino, y según Freyre et al. (1988), el resultado de la distribución de quistes sarcosporidianos en músculos de novillos, indica que el miocardio es el tejido de elección para detectar la infección de *S. cruzi* en el 100% de los casos. Adicionalmente, las observaciones microscópicas constataron que se trataba de *Sarcocystis* debido a las siguientes características: forma de banana de los bradizoitos, tamaño de los bradizoitos (10-15 micras), y forma ovoide de los metrocitos (Dubey, J.P. et al. 1989) (Figura 1). Sin embargo estos autores sostienen que caracteres como: la estructura de organelos (mitocondrias, roptries y micronemas), no son un buen criterio taxonómico y no son fiables, porque dependen del tiempo de fijación, de la osmolaridad del medio usado en la fijación, mas aún si provienen de zoitos liberados por digestión, que no tienen la protección del quiste. No obstante, comparando los tamaños de los bradizoitos de *Toxoplasma* y *Sarcocystis*, los segundos son siempre más grandes (10-15m), esta observación contribuye a la identificación del parásito (Soulsby, E.J.L. 1968). La estructura de la pared del quiste es un criterio de más confianza para determinar la especie (Clark, C.G. & Diamond, L.S. 1991).

Otro indicio de que tratamos con *S. cruzi* se encuentra en el hecho de que las especies de *Sarcocystis* son mucho más específicas con respecto a sus huéspedes intermediarios, que con respecto a sus huéspedes definitivos, el hecho de que nuestra muestra proceda de músculo del huésped intermediario da mayor seguridad respecto a su identificación (Dubey, J.P. et al. 1989). Observaciones adicionales de las láminas fueron realizadas por el parasitólogo y veterinario José Luis Azumendi, quien confirmó la identificación de la especie.

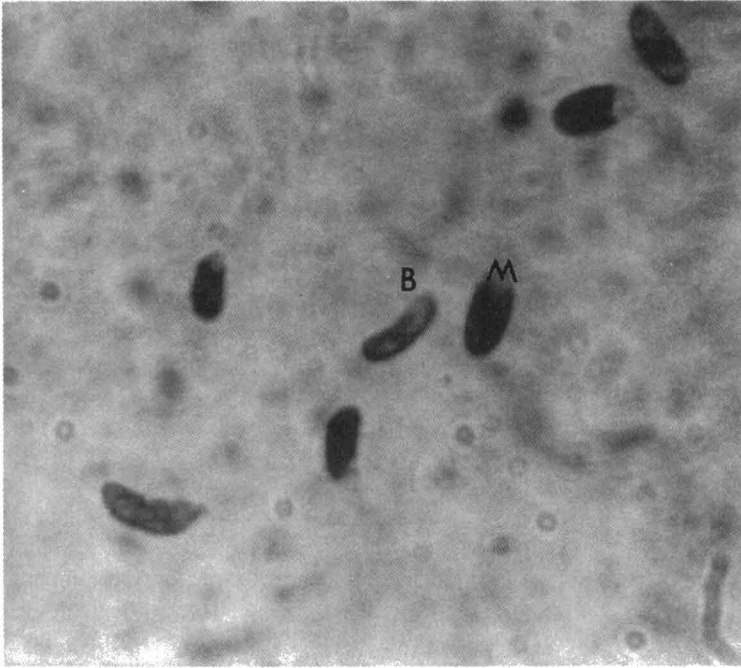


FIGURA No. 1 *Sarcocystis cruzi*: bradizoitos (B) y metrocitos (M) extraídos con digestión triptica y gradiente de percoll a partir de corazón bovino. Aumento 40X y 100X. Parásitos en agar con inclusión en epon-araldita y tinción con Azul de Toluidina 1 %.

Extracción de DNA:

Según Cornelissen, A.W.C.A. et al. (1983), *S. cruzi* contiene aprox. 0.2 pg/núcleo lo que indica que con la extracción a partir de 50 g de músculo (13'860.000 parásitos), se alcanzarían a recobrar aproximadamente 2,772 mg de DNA para un 100% de recuperación. En la práctica el rendimiento obtenido es del 70%.

Amplificación de DNA por PCR:

Las condiciones óptimas de amplificación de las regiones ribosomales de *Sarcocystis sp.* son 100uM dNTPs, 2.0 mM de MgCl₁ y temperatura de reasociación de 59°C, utilizando tanto los cebadores P5-P3 como la pareja 0009-2134. Los cebadores P3-P5 flanquean la región del ARN-SURp en eucariotes, escogidos por Medlin, L. et al. (1988), a partir de regiones conservadas del ARN ribosomal 18S de algas, hongos, y protozoos. Estos cebadores fueron rastreados por Macaw 2.0.3. en genes ribosomales de diferentes especies, comprobándose el carácter universal eucariótico de los mismos (Figura 2). Los cebadores 0009 y 2134 fueron

originalmente deducidos de *Plasmodium* pero igualmente por Macaw se pudo determinar que 2134 es de más amplio espectro incluyendo mamíferos, mientras que 0009 se restringe a eucariotes inferiores (Corredor, V. & Enea, V. 1994) (Figura 2a). Los cebadores 566R y 567R fueron escogidos porque son específicos de género *Plasmodium* (Mathiopoulos, K. et al. 1993). Sin embargo la exploración de los mismos constató que 567R se encuentra en *Sarcocystis*. Por tanto el 566R confiere el carácter género-específico al *Plasmodium* (Figura 2c). En todas las reacciones de amplificación se usaron controles negativos que incluían ADN de *Escherichia coli*, *Sacharomyces sp.* y *Fusarium oxysporum*, y de *Bos taurus* y *Homo sapiens*, para constatar la especificidad de los cebadores. Igualmente se corrieron en paralelo controles negativos de reacción como blancos.

La adición de Chelex-100 durante la extracción del DNA, contribuyó a mejorar la especificidad de las amplificaciones (Walsh, P.S. et al. 1991). La concentración de $MgCl_2$, de dNTPs, y de cebadores es crucial para la eficiencia de la reacción (Sitaraman, K. & Rashtchian, A. 1994), por esta razón se hicieron varios ensayos para ajustar las concentraciones del $MgCl_2$, las temperaturas de reasociación (55°C, 57°C, 59°C, 60°C, 62°C, 65°C, y 67°C), concentración del $MgCl_2$ y dNTPs. Las temperaturas óptimas para amplificación por PCR a partir de los cebadores 0009 -2134 y P5- P3 es de 59°C, y de 57°C para amplificar a partir de la pareja 566R y 567R, manteniendo una concentración de 100 mM de dNTPs, 2.0 mM de $MgCl_2$.

Se obtuvo la secuencia de los 178 nucleótidos a partir del extremo 5' que confirman por comparación con secuencias reportadas en el GeneBank la especificidad de los cebadores 0009 - 2134 para *Sarcocystis*:

GCCAGTAGTC	ATATGCTTGT	CTTAAAGATT	CCCATGAT	TCTAAGTAT
AAGCTTTTAA	TACGGCGAAA	CTGCGAATGG	CTCATTAATA	AGTTATAGT
RTTATTTGATA	GTCATATCAG	ATGAAAATCT	ACATGGATAA	CCGTGTAATT
CTAGGCTAAT	ACATGCGCAA	TATCCTTT		

Patrón de Restricción

Los patrones de restricción para los amplificados de las regiones del ARN-SURp ribosomal correspondientes a la subunidad pequeña 18S se resumen en la tabla No. 1 de la siguiente página y en las figuras 3, 4, 5 y 6.

En las digestiones se incluyeron como controles: *Saccharomyces sp.* y *Fusarium oxysporum*. Los patrones de digestión producidos por Sau3AI, HindIII, EcoRI y Alw26I mostraron diferencias significativas. Mientras que PstI, HaeIII y HincII no mostraron diferencias relevantes. La enzima BamHI no corta con ningún inserto.

La digestión con Sau3AI muestra un patrón de restricción que agrupa los géneros *Sarcocystis* y *Toxoplasma*, diferenciándolos claramente del género *Plasmodium* (Fig. 3).

Restricción de DNA codificante 31

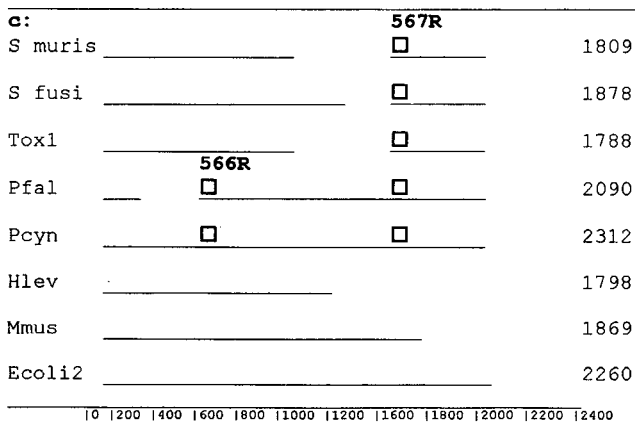
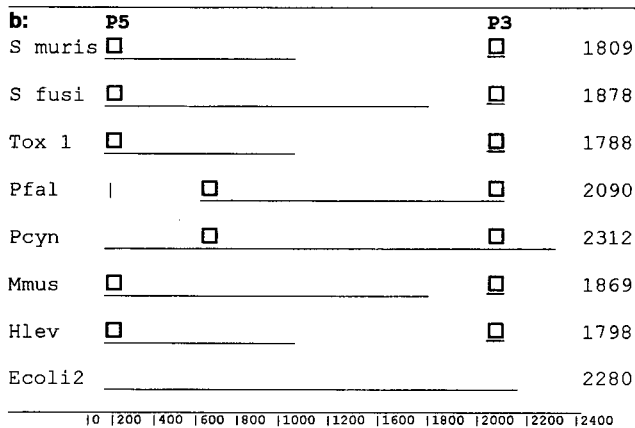
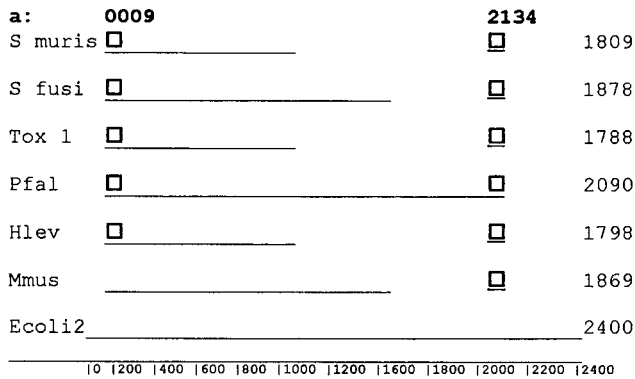


FIGURA No. 2 a. Ubicación de los cebadores 0009-2134 en las secuencias reportadas.
b. Ubicación de los cebadores P5-P3 en las secuencias reportadas.
c. Ubicación de los cebadores 566R-567R en las secuencias reportadas.
 Sfusis: *S. fusiformis*, Tox1: *Toxoplasma gondii*, Pfal: *Plasmodium falciparum*,
 Pcyn: *P. cytomolgi*, Hlev: *Saccharomyces sp.*, Mmus: *Mus musculus*, Ecoli2: *Escherichia coli*.

Los cuatro primeros fragmentos producidos por restricción con Sau 3AI, corresponden al inserto total de *S. cruzi* y a restricciones parciales, los cuatro fragmentos restantes coinciden con las posiciones 711/441/351/258 deducidas teóricamente para *S. muris*, los fragmentos esperados de 8 y 9 p.b. se pierden en la corrida electroforética. De igual forma sucede con *P. falciparum*, donde el tamaño de los fragmentos coinciden con los valores teóricos. Es importante destacar, que se observaron polimorfismos en los patrones para las especies del género *Plasmodium*.

El patrón de restricción que se obtiene con HindIII, aporta información para distinguir las dos familias, pues *P. inui*, *P. simium* y *Plasmodium sp.* de *Anolis chloris* presentan un sitio de corte que produce fragmentos del tamaño esperado con *P. falciparum* (1617 pb) y (237 y 288 p.b.). El fragmento amplificado de *S. cruzi* no presenta corte con esta enzima. *S. muris* produce un fragmento muy pequeño (67 pb) que de haberse producido en *S. cruzi* se perdería dado su tamaño (Fig. 4).

EcoRI discrimina entre las dos familias, pues *Plasmodium falciparum*, *P. inui*, *P. simium* y *Plasmodium sp.* de *Anolis chloris* no presentan sitio de reconocimiento para esta, mientras que *S. cruzi* y *T. gondii* producen dos fragmentos que coinciden con los esperados en las secuencias reportadas (Fig. 5). De igual forma Alw26I presenta un patrón de bandas diferente que separa los dos géneros (Fig. 4).

Afirmamos que los patrones de restricción observados discriminan claramente entre las familias: Sarcocystidae y Plasmodiidae. Los patrones de restricción (riboprints) con las cuatro enzimas apoyan el planteamiento que sostiene que los parásitos malariales, no tienen una relación cercana con *Sarcocystis* y *Toxoplasma* aunque pertenecen a la misma subclase (Barta, J.R. et al. 1991). Estos resultados apoyan también el cuestionamiento sobre la separación de los géneros *Sarcocystis* y *Toxoplasma*, y en la ubicación de los mismos en diferentes subfamilias dentro de la familia Sarcocystidae (Tenter, A.M. et al. 1992). Así mismo se apoya el carácter monofilético de estos dos últimos géneros (Johnson, A.M. & Baverstock, P.R. 1989; Johnson, A.M. et al. 1988). Una mayor diferencia se reportó entre los riboprint hallados para *P. berghei* y *S. cruzi* que entre éste y *T. gondii* usando DdeI, MboI, ThaI, y MaeII (Brindley, P.J. et al. 1993). Las diferencias en los patrones de digestión con Sau3AI presentes en las especies de *Plasmodium* muestran que existe una gran diversidad al interior del género que impide determinar una separación contundente entre las familias Plasmodiidae y Sarcocystidae, al menos con esta enzima. Sin embargo al comparar *T. gondii*, *S. cruzi* y *P. falciparum* los dos primeros presentan un mismo patrón de bandas que difiere del *Plasmodium*, usando Sau 3A (Fig. 6). Por tanto se postula que el nivel de discriminación obtenido por medio del "riboprint" además de distinguir entre las familias Sarcocystidae y Plasmodiidae, permite ubicar variantes al interior de cada

TABLA No. 1 DIGESTIONES ENZIMATICAS DE LOS INSERTOS CORRESPONDIENTES A LA REGION DEL ARN RIBOSOMAL DE LA SUBUNIDAD PEQUEÑA 18S						
ENZIMA	VALORES TEORICOS		NUMERO Y TAMAÑO APROXIMADO DE FRAGMENTOS DIGERIDOS			TIPO DE DIGESTION
Sau3AI ↓GATC	S. muris:	711/441/351/258/ 31/9/8	Sarco	(7):	1829/1595/1400/101/777/ 414/323/273	Parcial
	P. fal:	1054/653/366/9/8	P. fal	(4):	2019/1467/1049/651	Parcial
	T. gondii:	730/456/353/254/8/7	Toxo	(7):	1865/1528/1467/1049/797 /458/345	Parcial
	S. cere	976/639/113/43/10/9/ 8	Lav	(3):	1723/960/797	Parcial
			Fus	(3):	1723/960/797	Parcial
			P. flo ₁	(9):	1718/1500/1290/1160/920 /801/401/380/135	Parcial
			P. flo ₂	(9):	1718/1520/1353/1270/104 5/870/490/930/140	Parcial
			P. sim	(8):	1910/1657/1259/1107/ 580/363	Parcial
		P. inui	(8):	1589/1233/101/890/724/62 5/376/273	Parcial	
HindIII A↓AG CTT	S. muris:	1742/67	Sarco	(1):	1829	Parcial Parcial Parcial
	P. fal:	1617/473	P. flo	(3):	1718/1534/237	
	T. gondii:	1723/65	P. inui	(3):	1819/1668/237	
	S. cere:	No corta	P. sim	(3):	1993/1694/288	
EcoRI G↓AA TTC	S. muris:	1118/691	Sarco	(3):	1814/1038/700	Parcial
	P. fal:	No Corta	P. fal	(1):	2019	.
	T. gondii	1108/680	Toxo	(2):	1169/700	Total
	S. cere:	1573/225	Lev	(1):	1631/267	Total
			Fus	(1):	1814	.
			P. inui	(1):	1819	.
			P. flo	(1):	1718	.
		P. sim	(1):	1910	.	
Alw26I GTC TCn↓nn	S. muris:	1333/476	Sarco	(3):	1829/1408/553	Parcial
	F. fal:	1106/945/39	P. flo	(2):	1707/898	Parcial
	T. gondii:	1317/471	P. inui	(2):	1859/829	Parcial
	S. cere:	1280/479/39				

Los valores teóricos corresponden a las digestiones realizadas con el programa Digest versión 1.0, de secuencias reportadas en el GenBank:
Smuris: *Sarcocystis muris* (M64244) P. fal: *Plasmodium falciparum* (M19172)
T. gondii: *Toxoplasma gondii* (X65508) S. cere: *Saccharomyces cerevisiae* (M27607)

Especies con las que se hallaron los valores experimentales:
Sarco: *Sarcocystis cruzi* / Toxo: *Toxoplasma* / Lev: *Saccharomyces cerevisiae*
Fus: *Fusarium oxysporum* / P. inui: *Plasmodium inui* / P. flo: *Plasmodium floridensis*
P. sim: *Plasmodium simium*

Los valores en **negrilla**: Inseto total, subrayados: dig. Parcial sin subrayar: fragmentos de digestión total.

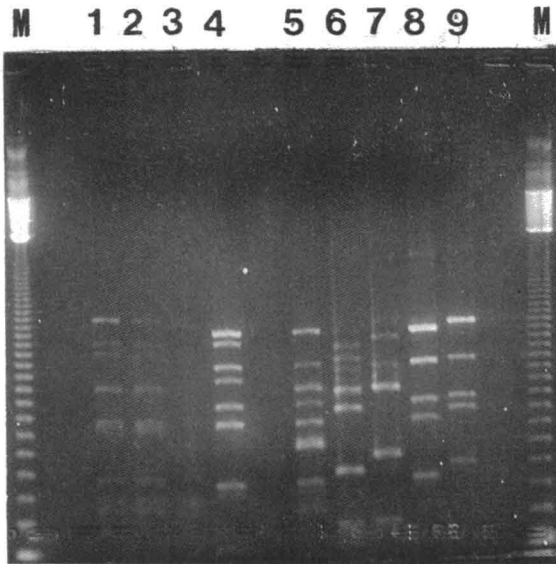


FIGURA No. 3 Digestión de los insertos con la enzima Sau3AI corrida en electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1 y 2: *Sarcocystis cruzi*, carril 3: *Saccharomyces sp.* carriles 4 y 6: *Plasmodium floridensis*, carril 5: *Plasmodium inui*, carril 7: *Plasmodium simium*, carril 8: *Dactilosoma sp.*, carril 9: *Plasmodium columbae*.
M: Marcador de peso molecular escalera de múltiplos de 123 pb.

una de ellas, es decir en diferentes familias se presentan patrones similares de variación.

El análisis de secuencias de genes clonados a partir de especies de *Plasmodium* y *Babesia bigemina* ha evidenciado microheterogeneidades de secuencia entre copias individuales de genes del ARN-SURp presentes en los genomas de esos organismos, esta misma heterogeneidad se ha detectado entre líneas de *Toxoplasma* cuyas secuencias están reportadas en el GenBank y al alinearlas presentan pequeñas diferencias nucleotídicas con *Neospora caninum*, susceptibles de ser detectadas por *riboprint*. Esto podría ser la explicación a los polimorfismos hallados en los *Plasmodium* cuando se digieren con Sau3AI, sin embargo, puede existir una variación genética intraespecífica como sucede entre cepas virulentas de *Toxoplasma* cuyos polimorfismos de longitud en fragmentos de restricción (RFLP) difieren de aquellos pertenecientes a cepas no virulentas (Ellis, J. et al. 1994). De Jonckheere, J.F. (1994), determinó en *Naegleria spp.* que la presencia de un intrón en el gen ARN-SURp impide establecer un árbol filogenético basado en los patrones de restricción de este inserto. Este fenómeno descrito para amebas difícilmente puede explicar el alto polimorfismo observado en *Plasmodium*.

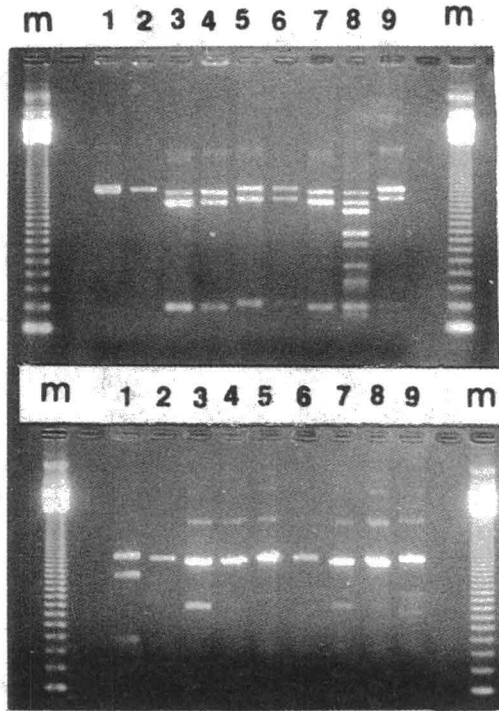


FIGURA No. 4 Digestiones con HindIII y Alw26I de los genes ribosomales 18S corridas en electroforésis en gel de agarosa al 1%.

La parte superior corresponde a la digestión con HindIII y la inferior con Alw26I. Para los dos casos los carriles son:

1: *Sarcocystis cruzi*; 2: *Saccharomyces sp.*; 3,4: *Plasmodium floridensis*;

5: *P. simium*; 6,7: *P. inui*; 8: *Dactilosoma* (HindIII + Sau3AD); 9: *P. columbae*. M: marcador de peso molecular 123 pb.

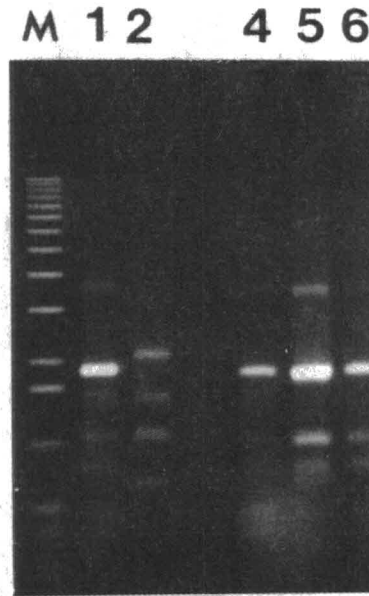
Estudios detallados usando mayor número de enzimas sobre las especies de *Plasmodium* probadas aquí proporcionarían pruebas más claras sobre estas diferencias. Es de resaltar que este trabajo proporciona una separación a nivel de familia, y que para realizar discriminaciones a niveles de género y especie, se deben usar mayor número de restricciones con un amplio rango de enzimas que reconozcan sitios de corte poco comunes. La metodología del "riboprint" en trabajos anteriores ha contribuido a separar especies que son indistinguibles morfológicamente, como es el caso de la discriminación con patrones de restricción



FIGURA No. 5 Digestión enzimática con EcoRI, en electroforesis en gel de agarosa al 1%. Foto A: carril 1: *Sarcocystis cruzi* amplificado con 0009-2134. carril 2: *S. cruzi* amplificado con P5-P3; carril 3: *Plasmodium falciparum* amplificado con 0009-2134; carril 4: *P. falciparum* amplificado con P5-P3. Foto B: carril 1: *Toxoplasma gondii* amplificado con P5-P3; carril 2: *Saccharomyces sp.* amplificado con 0009-2134; carril 3: *Fusarium oxysporum* amplificado con 0009-2134. M: marcador de peso molecular 1Kb.

dados por la enzima Alu I entre la amoeba no patógena *Naegleria lovaniensis*, y la forma patógena *Naegleria fowleri* (De Jonckheere, J.F. 1994).

Adicionalmente, la amplificación del gen ARN-SURp de ADN de *Sarcocystis sp.* de *Columbina talpacoti* (torcaza) y *Sarcocystis sp.* de *Didelphis marsupialis* usando los mismos cebadores y las enzimas: AluI, DdeI, HaeIII y MspI; mostró



FIGURANO. 6 Digestión con *Sau3AI* de los fragmentos del gen ARN-SURp. Carril 1: Inseto de *Sar...* *cruxi* amplificado con 0009-2134; carril 2: Fragmento de *Plasmodium falciparum* amplificado con 0009-2134; carril 4: Fragmento de *Toxoplasma gondii* amplificado con P5-P3; carril 5: Fragmento de *Saccharomyces sp.* amplificado con 0009-2134; carril 6: Fragmento de *Fusarium oxysporum* amplificado con 0009-2134. M: marcador de peso molecular 1Kb. Corridos en electroforesis en gel de agarosa al 1%.

que entre las dos especies hay diferencias apreciables que indican que también existen heterogeneidades al interior de la familia Sarcocystidae (Fig. 7).

En este caso se observaron variaciones intraespecíficas similares a las observadas entre cepas virulentas de *Toxoplasma* cuyos RFLPs difieren de aquellos pertenecientes a cepas no virulentas (Ellis, J. et al. 1994). De aquí la gran validez de esta metodología aplicable a grupos de especies donde sea pertinente aclarar sus relaciones.

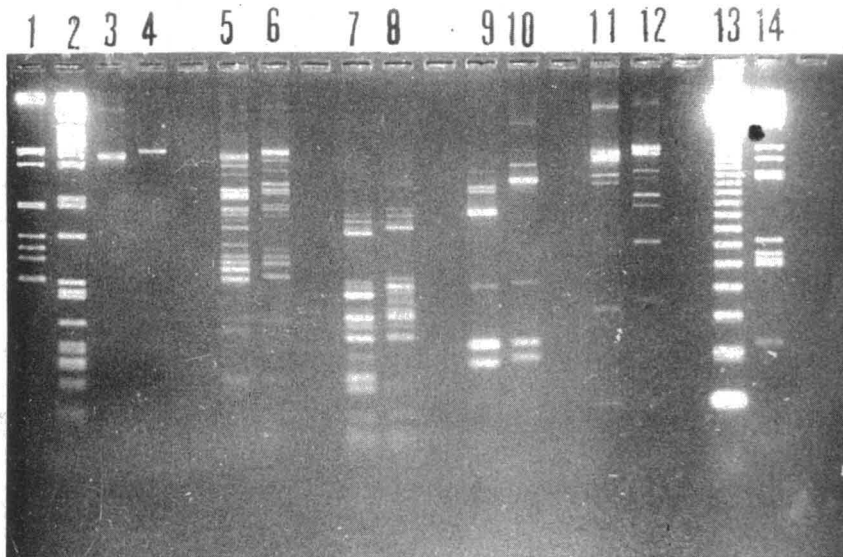


FIGURA No.7 Digestión con HaeIII, AluI, DdeI y MspI de Fragmentos de ARN-SURp amplificados con 0009-2134 de *Sarcocystis sp.* de *Columbina talpacoti-torcaza*-(Sct) y de *Sarcocystis sp.* de *Didelphis marsupialis* (Sd). carriles 1: Lambda NsiI. 2: Lambda PstI. 3: Fragmento de Sct. 4: Fragmento Sd. 5: Sct AluI. 6: Sd AluI. 7: Sct DdeI. 8: Sd DdeI. 9: Sct HaeIII. 10: Sd HaeIII. 11: Sct MspI. 12: Sd MspI. 13: Marcador escalera múltiplos de 123 pb. 14: Lambda Eco RII.

Conclusiones

El par de cebadores 0009-2134 son específicos de eucariotes unicelulares se utilizaron con éxito para amplificación específica del gen ARN-SURp de *Sarcocystis sp.*

El fragmento SRP de *Plasmodium sp.* no tiene sitio de reconocimiento para EcoRI, hecho que lo separa de *S.cruzi* y *T.gondii* que presentan dos fragmentos. Igualmente, las enzimas Hind III y Alw 26I discriminan entre los dos géneros. La digestión del gen ARN-SURp realizada con la enzima Sau3AI muestra un patrón que agrupa a *S.cruzi* y *T.gondii*, diferenciándolos claramente del género *Plasmodium*. Sin embargo, cuando se comparan las especies de *Plasmodium* de *Anolis chloris* y *P.simum* y se incluyen las especies de *Sarcocystis sp.* de *Didelphis marsupialis* y de *Columbina talpacoti* se observan polimorfismos de los patrones de restricción al interior de cada género.

En diferentes familias se presentan patrones similares de variación detectables por RLFP.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por COLCIENCIAS, dentro del marco del proyecto # 1101-05-105-90.

BIBLIOGRAFIA

- ANDREWS, C.D., FAYER, R. & DUBEY, J.P. 1990. Continuous *in vitro* cultivation of *Sarcocystis cruzi*. J. Parasitol. 76(2): 254-255.
- AYALA, S. 1977. Plasmodia or Reptiles. Parasitic Protozoa Academic Press, edited by Jullius Kreier vol III pp. 267-309.
- AZUMENDI, J.L. 1994. (Comunicación personal).
- BARTA, J.R. 1989. Phylogenetic analysis of the class Sporozoa (phylum Apicomplexa Levine 1970): evidence for the independent evolution of heteroxenous life cycles. J. Parasitol. 75:195-206.
- BARTA, J.R., JENKINS, M.C., & DANFORTH, H.D. 1991. Evolutionary relationships among apicomplexan protozoa: Monophyly of the Apicomplexa is supported. Mol. Biol. Evol. 8 (3):345-355.
- BRINDLEY, P.J., GAZZINELLI, R.T., DENKERS, E.Y., DAVIS, S.W., DUBEY, J.P., BELFORT, Jr., R., MARTINS, M.-C., SILVEIRA, C., JAMRA, L., WATERS, A.P. & SHER, A. 1993. Differentiation of *Toxoplasma gondii* from closely related coccidia by riboprint analysis and a surface antigen gene polymerase chain reaction. Am. J. Trop. Med. Hig. 48(3):447-456.
- BROOKS, D.R., & McLENNAN, D.A. 1992. The evolutionary origin of *Plasmodium falciparum*. J. Parasitol. 78(3):564-566.
- CAVALIER-SMITH, T. 1993. Kingdom Protozoa and It's 18 phyla. Microbiol. Rev. Dec. 953-994.
- CLARK, C.G. & DIAMOND, L.S. 1991. The laredo strain and other *Entamoeba histolytica*-like amoebae are *Entamoeba moshkovskii*. Mol. Biochem. Parasitol. 46: 11-18.
- CORNELISSEN, A.W.C.A., OVERDULVE, J.P. & PLOEG, M. Van Der. 1984. Cytochemical studies on nuclear DNA of four eucoccidian parasites, *Isoospora (Toxoplasma) gondii*, *Eimeria tenella*, *Sarcocystis cruzi* and *Plasmodium berghei*. Parasitology 88:13-25.
- CORREDOR, V. & ENEA, V. 1994. The small ribosomal subunit RNA isoforms in *Plasmodium cynomolgi*. Genetics 136:857-865.
- DE GUISE, S., LAGACE, A., GIRARD, C. & BELAND, P. 1993. Intramuscular *Sarcocystis* in two beluga whales and an Atlantic white-sided dolphin from the St. Lawrence estuary, Quebec, Canada. J. Vet. Diagn Invest 5: 296-300.
- De JONCKHEERE, J.F. 1994. Riboprinting of *Naegleria* spp.: small-subunit versus large-subunit rDNA. Parasitol. Res. 80:230-234.
- DUBEY, J.P., SPEER, C.A., FAYER, R. 1989. Sarcocystosis of animals and man. CRC Press, Boca Raton, FL. 215pp.
- ELLIS, J., HEFFORD, C., BAVERSTOCK, P.R., DALRYMPLE, B.P. & JOHNSON, A.M. 1992. Ribosomal DNA sequence comparison of Babesia and Theileria. Mol. Biochem. Parasitol. 54:87-96.

- ELLIS, J., LUTON, KIM., BAVERSTOCK, P.R., BRINDLEY, P.J., NIMMO, K.A., & JOHNSON, A.M. 1994. The phylogeny of *Neospora caninum*. Mol. Biochem. Parasitol. 64:303-311.
- FREYRE, A., PEDROFF, E. & MATTOS, J. 1988. *Sarcocystis bovicanis* y *S. bovifelis* en ganado vacuno: identificación, patogénesis y colonización preferencial. Rev. Lat. Microb. 30:253-258.
- GAJADHAR, A.A., MARQUARDT, W.C., HALL, R., GUNDERSON, J., ARIZTIA-CARMONA, E.V., & SOGIN, M. 1991. Ribosomal RNA sequences of *Sarcocystis muris*, *Theileria annulata* and @BIBLITEX = *Cryptocodium cohnii* reveal evolutionary relationships among apicomplexans, dinoflagellates, and ciliates. Mol. Biochem. Parasitol. 45:147-154.
- HOLMDAHL, O.J.M., MATTSSON, J.G., UGGLA, A., & JOHANSSON, K-E. 1994. The phylogeny of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* based on ribosomal RNA sequences. FEMS Microbiology Letters 119:187-192.
- JOHNSON, A.M., MURRAY, P.J. ILLANA, S. & BAVERSTOCK P.J. 1987. Rapid nucleotide sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA of *Toxoplasma gondii* evolutionary implications for the apicomplexa. Mol. Biochem. Parasitol. 25:239-246.
- JOHNSON, A.M., ILLANA, S., HAKENDORF, P., & BAVERSTOCK, R. 1988. Phylogenetic relationships of the apicomplexan protist *Sarcocystis* as determined by small subunit ribosomal RNA comparison. J. Parasitol. 74 (5):847-860.
- JOHNSON, A.M. & BAVERSTOCK, P.R. 1989. Rapid ribosomal RNA sequencing and the phylogenetic analysis of protists. Parasitology Today, 5(4):102-105.
- JOHNSON, A.M., FIELKE, R., LUMB, R., & BAVERSTOCK, P.R. 1990. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* determined by ribosomal RNA sequence comparison. Int. J. Parasitol. 20(2):141-147.
- LEVINE, N.D. 1986. The taxonomy of *Sarcocystis* (Protozoa, Apicomplexa) species. J. Parasitol. 72(3):372-282
- MATHIOPOULOS, K. BOUARE M, McCONKEY, G. & McCUTCHAN, T. 1993. Protocol 4.3. PCR Detection of *Plasmodium* Species in blood and mosquitoes. pp 462-467.
- MEDLIN, L., ELWOOD, H.J., STICKEL, S. & SOGIN, M.L. 1988. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. Gene 71:491-499.
- MENLHORN, H. & HEYDORN, A.O. 1978. The Sarcosporidia (Protozoa, Sporozoa): Life Cycle and Fine Structure. Adv. Parasitol. 16:43-71.
- NOBLE, E.R., NOBLE, G.A., SCHAD, G.A. & MacINNES, A.J. 1989. Parasitology. The biology of animal parasites. Lea & Febiger. sexta edición. Philadelphia London. pp 79-125.
- SAMBROOKS, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2a Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, NY.
- SITARAMAN, K. & RASHTCHIAN, A. 1994. Efficient PCR amplification: application to limited template and large DNA fragments. FOCUS 16(2):55-57.

- SOGIN, M.L. 1989. Evolution of eukaryotic microorganisms and their small subunit ribosomal RNAs. *Am. Zool.* 29:487-489.
- SOULSBY, E.J.L. 1968 *Helminths, Arthropods & Protozoa of domesticated animals*. 6ª edición. Mönig.
- SU HUNG-YI, TENTER, A.M. & JOHNSON, A.M. 1992. Genomic analysis of *Sarcocystis* by contour-clamped homogeneous electric fields. *J. Protozool. Res.* 2, 16-24.
- TENTER, A.M., BAVERSTOCK, P.R. & JOHNSON, A.M. 1992. Phylogenetic relationships of *Sarcocystis* species from sheep, goats, cattle and mice based on ribosomal RNA sequences. *Int. J. Parasitol.* 22(4):503-513.
- WALSH, P.S. METZGER, D.A., & HIGUCHI, R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10 (4):506-513.
- WOESE, C.R. et al. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:4576-4579.