



SERRANA ESTRADA SOBA
LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA
SECCIÓN BIOQUÍMICA - BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

**Expresión de transgenes
en cestodos: evaluación
de la utilidad del
promotor de tropomiosina
de *Mesocestoides corti*.**

Orientadora: Dra. Estela Castillo
Co-orientador: M.Sc. Uriel Koziol
Diciembre, 2011

Agradecimientos

Agradezco infinitamente a mis padres, a Lu, a mis abuelos, tíos y primos por el apoyo incondicional a lo largo de toda la carrera, por la motivación, el amor que me dieron, por compartir los momentos felices y los no tanto, siempre mostrándome lo positivo de cada situación e incentivándome a seguir adelante. No tengo palabras para agradecer (¡se me pinta un lagrimón!).

A Estela y a Uriel, eternamente agradecida por haberme aceptado como pasante de grado y haberme guiado en mis pasos dentro del laboratorio de una manera muy paciente y cálida, preocupándose de transmitirme todos sus conocimientos, aconsejándome y motivándome siempre en el trabajo diario.

A Fer, Ali, Sole, Germán, Lu, Gustavo, Virginia, Manu y Ana por estar siempre ahí, ya sea para compartir un rato de charla o para sacarme las mil dudas que me surgían día a día, explicándome con paciencia y dedicación.

A toda la Sección Bioquímica por abrirme las puertas y dejarme ser parte de ella.

A mis amigas/os de siempre y a las grandes amigas que conocí dentro de la facultad, que me apoyaron de manera incondicional a lo largo de la carrera, les estoy tremendamente agradecida y feliz de tenerlas conmigo.

A Pablo Smircich por aceptar corregirme la tesis de grado.

A todos, muchas muchas gracias!!!!

ÍNDICE

RESUMEN	5
1) INTRODUCCIÓN	6
1.1) Phylum Platyhelminthes	6
1.1.1) Clasificación	7
1.2) Introducción al modelo experimental - <i>Mesocestoides corti</i>	9
1.3) Tropomiosina.....	12
1.4) Estudio celular y molecular del desarrollo de helmintos parásitos.....	17
2) OBJETIVOS	19
2.1) Objetivo general.....	19
2.2) Objetivos específicos	19
3) ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	20
4) MATERIALES Y MÉTODOS	23
Determinación del inicio aproximado de la transcripción del gen de tropomiosina 1 (LMW) de <i>M. corti</i> mediante RT-PCR.	23
- Diseño de <i>primers</i>	23
- RT-PCR	23
Amplificación y clonado de la región promotora basal del gen de tropomiosina 1 (LMW) de <i>M. corti</i> en un vector con la luciferasa como gen reportero.	24
- Diseño de <i>primers</i>	24
- PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	24
- Digestión, vectores utilizados y ligación.....	25
- Transformación.....	25
- Obtención de ADN plasmídico.....	25
- Análisis de los clones obtenidos.....	26
Visualización de moléculas de ADN	26
Purificación de fragmentos de ADN.....	27
- Kits comerciales (“Ron’s DNA/RNA Purification Systems”; de Bioron, y “QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol”; de Qiagen).....	27
- Concentración de ADN.....	27
Secuenciación y análisis de las secuencias.....	27
Preparación de muestras stock.....	27
Estudio de la actividad promotora del gen de tropomiosina 1 (LMW) de <i>M. corti</i> en un sistema de cultivo celular heterólogo.	28
Estudio del patrón de expresión tropomiosina 1 (LMW) en <i>M. corti</i>	28
- PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	28
- Transcripción <i>in vitro</i> de sondas marcadas con digoxigenina-UTP (DIG-UTP).....	29
- Hibridación <i>in situ</i>	29
5) RESULTADOS.....	31
Determinación del inicio aproximado de la transcripción del gen de tropomiosina 1 (LMW) de <i>M. corti</i> mediante RT-PCR.	31
- RT-PCR	31

Amplificación y clonado de la región promotora basal del gen de tropomiosina 1 (LMW) de <i>M. corti</i> en un vector con la luciferasa como gen reportero.	36
Estudio de la actividad promotora del gen de tropomiosina 1 (LMW) de <i>M. corti</i> en un sistema de cultivo celular heterólogo.	42
Estudio del patrón de expresión tropomiosina 1 (LMW) en <i>M. corti</i>	45
6) DISCUSIÓN	49
Determinación del inicio aproximado de la transcripción del gen de tropomiosina 1 (LMW) de <i>M. corti</i> mediante RT-PCR.	49
Amplificación y clonado de la región promotora basal del gen de tropomiosina 1 (LMW) de <i>M. corti</i> en un vector con la luciferasa como gen reportero.	49
Estudio de la actividad promotora del gen de tropomiosina 1 (LMW) de <i>M. corti</i> en un sistema de cultivo celular heterólogo.	50
Estudio del patrón de expresión tropomiosina 1 (LMW) en <i>M. corti</i>	50
7) CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	52
APÉNDICE 1. <i>Primers</i>	53
APÉNDICE 2. Soluciones y medios	54
Hibridación <i>in situ</i>	54
BIBLIOGRAFÍA	55

RESUMEN

Las tropomiosinas son una familia de proteínas de unión a filamentos de actina, presentes en casi todos los eucariotas. En organismos bilaterales, es común que los exones 4, 5, 6, 7, 8 y/o 9 estén duplicados en tándem, de manera que a partir de cada gen de tropomiosina, a través de un inicio de transcripción desde promotores alternativos y de un proceso de *splicing alternativo* de exones mutuamente excluyentes, se pueden generar dos proteínas que en su ARNm correspondiente sólo comparten algunos exones (Koziol *et al.* 2011).

Las isoformas generadas de la tropomiosina tienen diferentes patrones de expresión; las formas musculares de tropomiosina tienen un rol bien caracterizado en la regulación de la contracción muscular, formando parte de los miofilamentos delgados, mientras que el rol de las formas no musculares es menos claro. Las diferencias más claras son entre las tropomiosinas de alto peso molecular (HMW, típicamente musculares) y las de bajo peso molecular (LMW, típicamente no musculares). Dichos patrones, incluyendo el número y tipo de las isoformas que se expresa en diferentes tipos de células, están estrictamente regulados espacial y temporalmente por mecanismos aún desconocidos (Alvite *et al.* 2009; Bryce *et al.* 2003; Koziol *et al.* 2011; Hooper *et al.* 2005).

En este trabajo se realizaron estudios sobre el gen de la tropomiosina 1 de bajo peso molecular (TPM1 LMW) de *Mesocestoides corti* con el fin de caracterizar su promotor. Se mapeó el inicio de la transcripción de la proteína en cuestión a través de RT-PCR, y a su vez se intentó hacerlo mediante el uso de programas bioinformáticos predictores. Mediante la primera estrategia mencionada se logró ubicar aproximadamente el inicio de transcripción proteica entre las bases 1029 y 1085 del ADNg, sin embargo, el uso de programas bioinformáticos predictores no fue una herramienta útil ya que los resultados obtenidos no fueron coherentes.

Se logró clonar la región promotora basal de la TPM1 LMW en un vector con la luciferasa como gen reportero, usándose posteriormente para el estudio de la actividad de dicho promotor en sistemas de cultivo celular heterólogo. Este estudio se realizó mediante electroporación, lográndose un claro aumento de la actividad de luciferasa en comparación con el control negativo.

Por otro lado, se realizaron hibridaciones *in situ* utilizando una sonda de ARN específica para estudiar el patrón de expresión de TPM1 LMW. Éste incluye la expresión proteica a nivel de las ventosas, y además a lo largo de la musculatura subtegumentaria y de la capa muscular interna, tal como era predecible por resultados obtenidos por ensayos de inmunohistoquímica previamente realizados.

La creación de este vector con el promotor de la TPM1 LMW es un primer paso hacia la optimización de la expresión de transgenes en *M. corti*, abriendo muchas puertas en la genómica funcional para el estudio de helmintos parásitos.

1) INTRODUCCIÓN

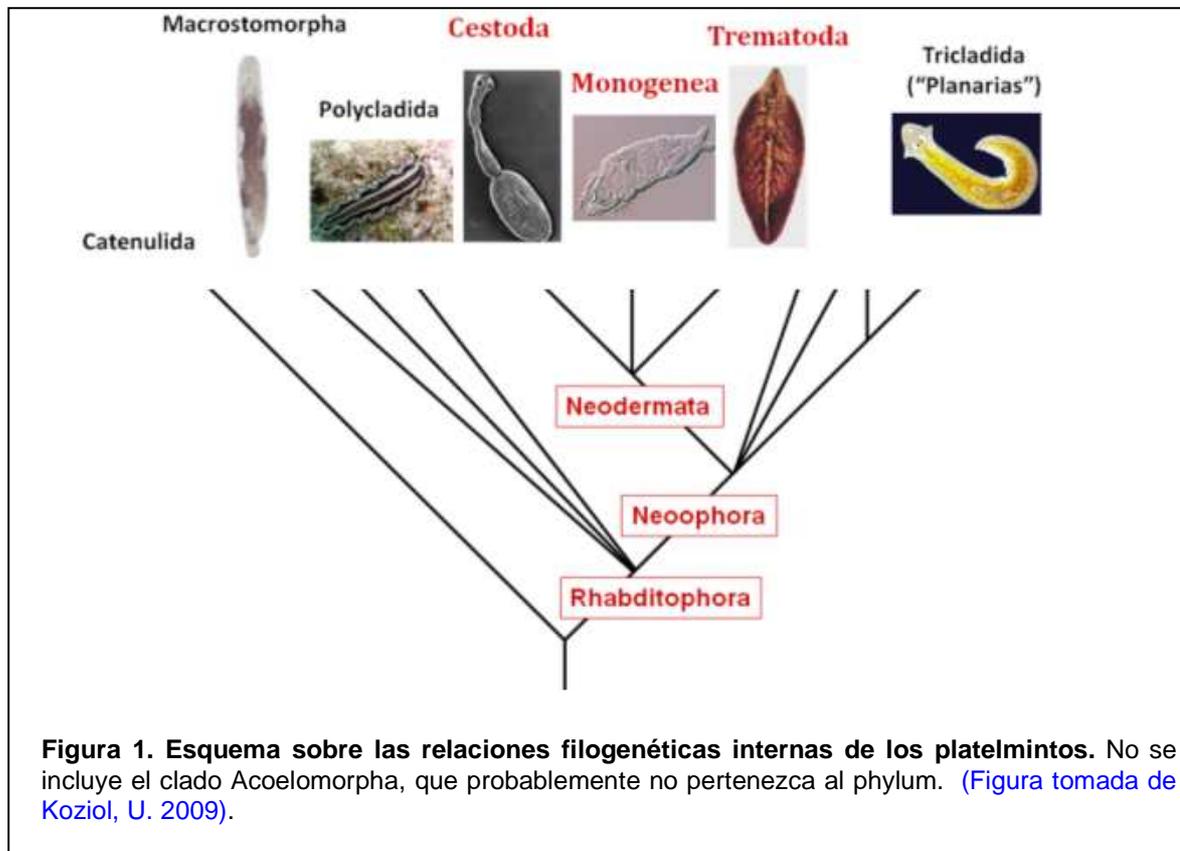
1.1) Phylum Platyhelminthes

El phylum Platyhelminthes (del griego platy, “plato”; helminth: “gusano”) comprende alrededor de 20000 especies de gusanos de vida libre y parásitos (Brusca & Brusca 2003). Estos animales se caracterizan por un cuerpo plano, de forma bilateral simétrica (Markell *et al.*, 1992). Pueden ser diminutos (menores de un milímetro o de pocos milímetros) más o menos cilíndricos; o más grandes (de varios centímetros, raramente metros) y aplanados dorsoventralmente, de acuerdo con su nombre de “platelmintos”. En cualquier caso, las distancias de difusión son cortas y los sistemas típicos de transporte de fluido (celoma y sistemas vasculares sanguíneos) están ausentes. (Ruppert *et al.*, 1996).

El tejido conjuntivo, llamado parénquima en los platelmintos, tiene células mesenquimáticas así como cuerpos de células cuyos ápices forman parte de la pared corporal y del intestino, además de células glandulares. Las células mesenquimáticas y la matriz extracelular están especialmente bien desarrolladas en las especies grandes. La boca es típicamente la única apertura del tubo digestivo, cuando éste existe. Normalmente tienen protonefridios como órganos excretores, y el sistema reproductor generalmente es hermafrodita (Ruppert *et al.*, 1996) pudiendo tener en muchos casos órganos reproductores complejos. Tienen una tendencia hacia la centralización del sistema nervioso, ya que poseen un ganglio cerebral anterior y (generalmente) cordones nerviosos longitudinales conectados por comisuras transversales (Brusca & Brusca 2003).

Tradicionalmente, y a causa de algunas de las características mencionadas anteriormente, los Platyhelminthes se ubicaban en una posición basal entre los animales bilaterales. Sin embargo, recientemente, luego de varios estudios moleculares y morfológicos (Ax, 1996; Bagnà y Riutort, 2004; Littlewood, 2006), esta clasificación ha cambiado y actualmente se distinguen tres grupos dentro de este phylum: Catenulida, Acoelomorpha, y Rhabditophora; cada uno de ellos es aceptado como monofilético en base a varias apomorfías morfológicas y a estudios moleculares, pero las relaciones entre sí son dudosas. (Figura 1). (Ax, 1996; Egger *et al.*, 2009b; Tyler y Hooge, 2004).

Los llamados “turbelarios” (clase Turbellaria en la clasificación tradicional) son los platelmintos de vida libre y comprenden a los Acoelomorpha, Catenulida, y a la mayor parte de los Rhabditophora. Esta clase es parafilética. La mayor parte de los platelmintos parásitos (las Clases Trematoda, Monogenea y Cestoda) pertenecen a un clado monofilético (llamado Neodermata) dentro de los Rhabditophora; en esto concuerdan estudios morfológicos y moleculares (Ax, 1996; Bagnà y Riutort, 2004; Littlewood, 2006).



1.1.1) Clasificación

- Clase Turbellaria. Incluye a los platelmintos de vida libre. Generalmente son pequeños, de simetría bilateral, con poca cefalización y un grado acelomado de organización corporal. La mayoría de estos organismos son marinos, pero también existen especies dulciacuícolas y algunas terrestres de ambientes húmedos. El movimiento es mediante cilios, aunque las especies más grandes completan la locomoción ciliar por medio de ondulaciones musculares. En general son depredadores y carroñeros, unos pocos son herbívoros, comensales o parásitos. Su pequeño tamaño, su forma aplanada y su intestino ramificado (en las formas grandes), hacen innecesario un sistema especial para el transporte interno y para el intercambio gaseoso. La mayoría presentan protonefridios. Son hermafroditas simultáneos y su sistema reproductor está adaptado para la fecundación interna y la oviposición (Ruppert *et al.*, 1996).

- Clase Trematoda. Esta clase incluye dos subclases estrechamente relacionadas: los Digenea y los Aspidogastrea. Están compuestas por organismos parásitos con importancia tanto económica como médica ya que varias de sus especies causan infecciones graves. La parasitosis más importante de este grupo es esquistosomiasis, producida por *Schistosoma mansoni*. El cuerpo está cubierto por un tegumento, con una o más ventosas como órganos

de fijación oral y ventral, carecen de proaptor y opistaptor. La mayoría tiene 2 o 3 hospedadores durante su ciclo de vida, pudiendo actuar el hombre como huésped definitivo albergando a la forma adulta del parásito, localizada generalmente en las venas, hígado, pulmón o tubo digestivo (Ruppert *et al.*, 1996; Brusca & Brusca 2003; Berenguer, 2006). El aparato digestivo es bifurcado y ciego. La mayoría de los parásitos pertenecientes a esta clase son hermafroditas, siendo el aparato reproductor la parte más desarrollada de éstos. La reproducción puede realizarse por autofecundación o por fecundación cruzada entre dos ejemplares (Berenguer, 2006).

- Clase Monogenea. La mayoría son ectoparásitos de vertebrados acuáticos, especialmente de peces pero también de anfibios y reptiles. Como se fijan a la piel de hospedadores de movimientos rápidos, los monogeneos están aplanados dorsoventralmente y presentan un opistaptor que le permite al parásito fijarse tenazmente al hospedador. El ciclo biológico de los monogeneos es diferente al de los digeneos, no hay hospedadores intermediarios y un huevo (que produce una larva ciliada, el oncomiracidio) da lugar a un único adulto, de aquí el nombre de monogenea, que significa “una generación”. Aunque la cabeza carece de ventosa oral, presenta glándulas adhesivas (órganos cefálicos). La fijación alternativa de órganos cefálicos y opistaptor permite reptar a los monogeneos; otros pueden fijarse permanentemente al hospedador. El cuerpo está cubierto por un tegumento sincitial. El sistema digestivo es similar al de los digeneos. Los monogeneos presentan protonefridios que se abren al exterior por dos poros dorsolaterales, y en algunas especies existe una vejiga urinaria asociada a cada poro. Al contrario de los digeneos que son endoparásitos, estos organismos por ser ectoparásitos tienen metabolismo aerobio (Ruppert *et al.*, 1996).

- Clase Cestoda. Los cestodeos, conocidos generalmente como tenias, constituyen la clase más diferenciada evolutivamente de los platelmintos. Las 3400 especies de cestodeos son endoparásitos. El cuerpo consiste en un órgano de fijación, escólex, y la estróbila, compuesta por una sucesión de segmentos denominados proglótides. El escólex aparece como una pequeña protuberancia con cuatro lados y dotada con ventosas o garfios para fijarse a la pared del intestino del hospedador. El cuerpo de estos organismos está cubierto por un tegumento sincitial como en los digeneos y monogeneos, pero los cestodeos presentan modificaciones específicas del tegumento asociadas con la absorción de nutrientes por éste, ya que carecen de aparato digestivo. Este tegumento tiene un rol importante en evitar la respuesta inmunitaria del hospedador. En los cestodos predomina el metabolismo anaeróbico, aunque no es el tipo exclusivo. Las capas musculares de los cestodos son las comunes de la musculatura circular y longitudinal, pero además, en el interior del parénquima aparecen fibras de musculatura longitudinal, transversal y dorsoventral. Los sistemas protonefridial y nervioso y la musculatura longitudinal se prolongan a lo largo de toda la cadena de proglótides. En cada proglótide hay un sistema reproductor completo que ocupa su mayor parte. La fecundación cruzada es probablemente la regla cuando hay más de una tenia en el intestino del hospedador, pero frecuentemente se da la autofecundación, en el mismo

estróbilo o incluso en el mismo proglótide (Ruppert *et al.*, 1996; Brusca & Brusca 2003).

1.2) Introducción al modelo experimental - *Mesocestoides corti*

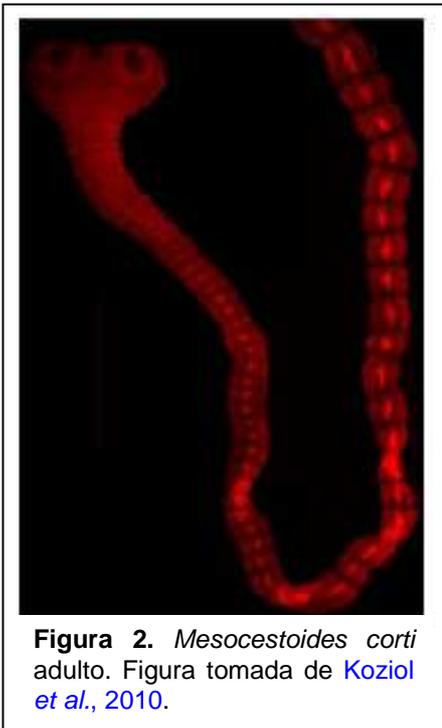
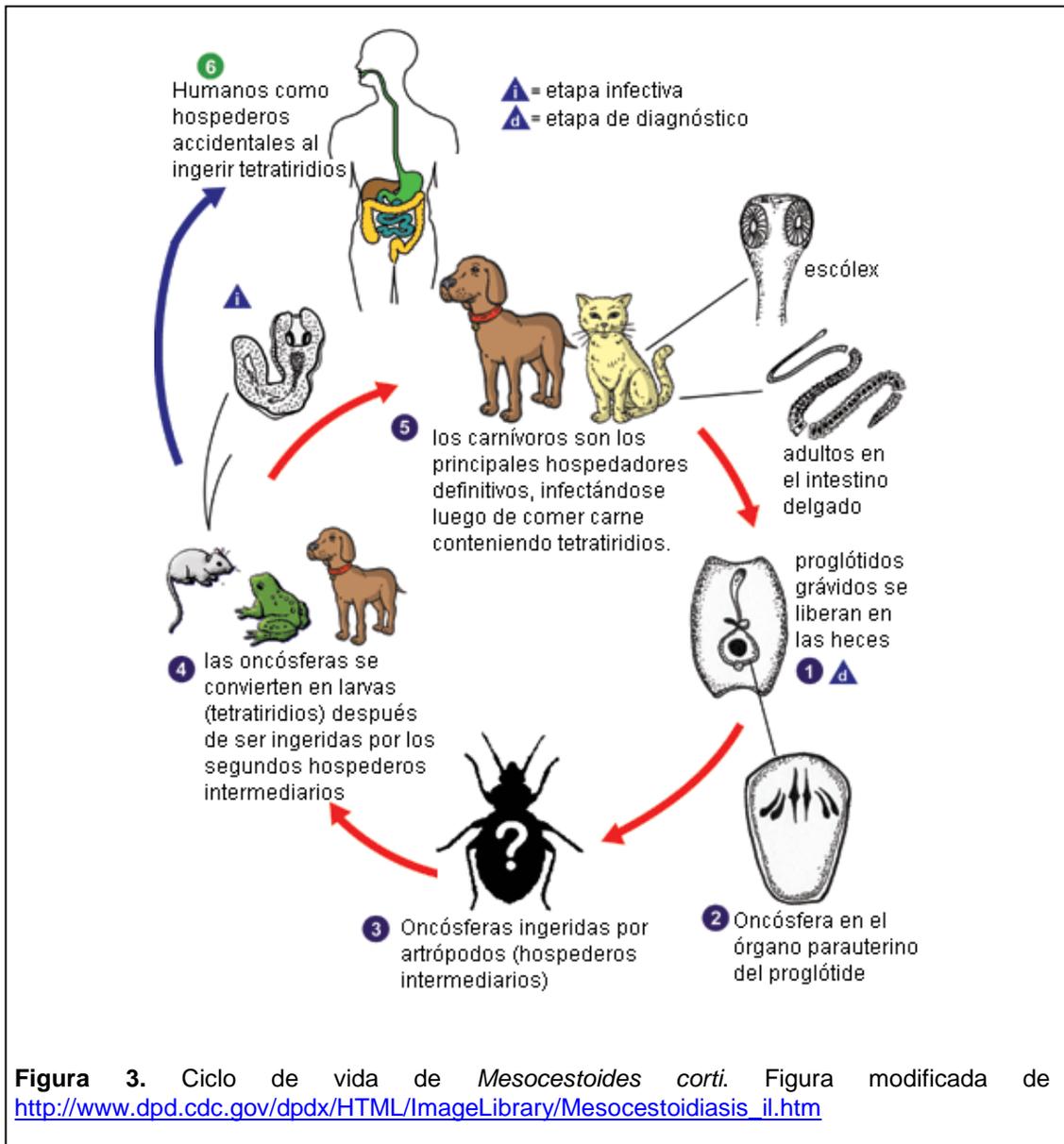


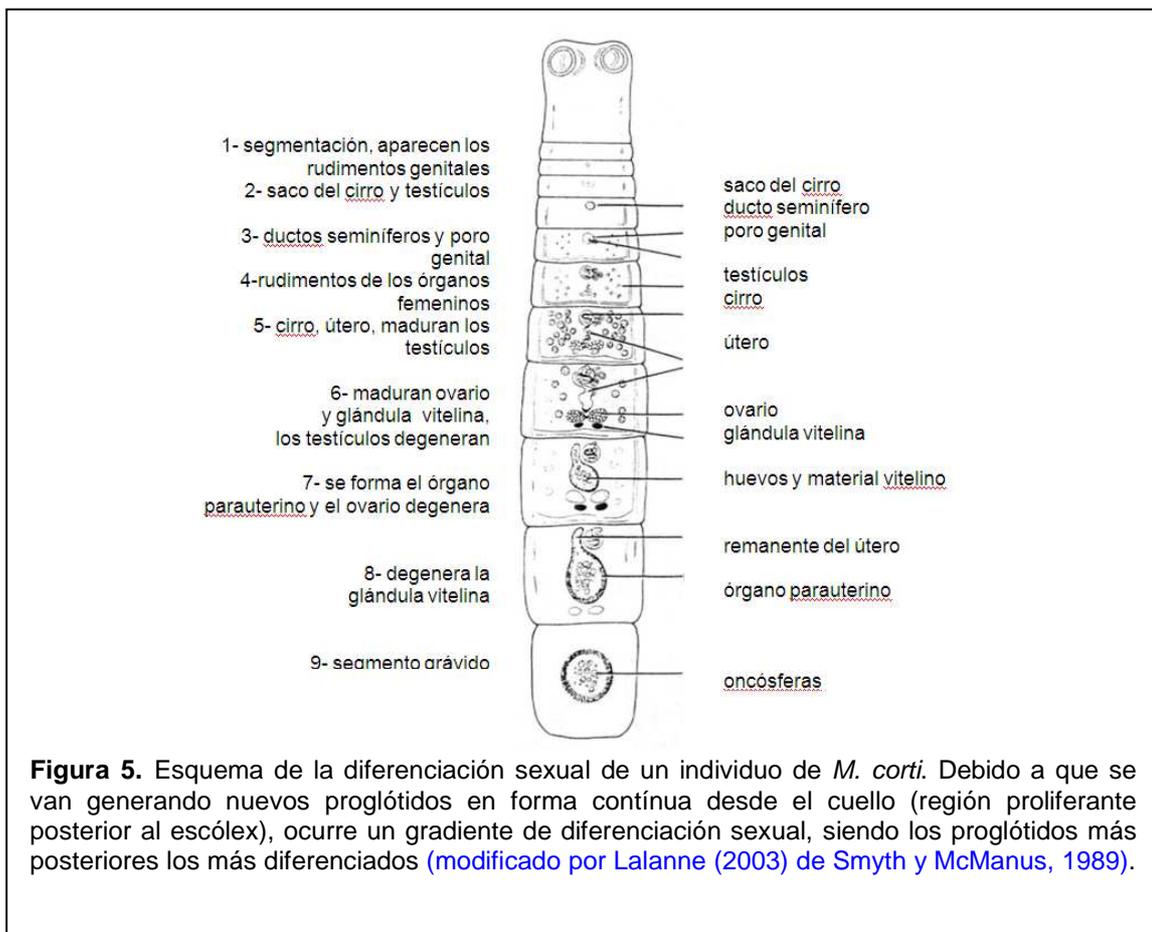
Figura 2. *Mesocestoides corti* adulto. Figura tomada de Koziol *et al.*, 2010.

Mesocestoides corti (orden Cyclophyllidea, familia Mesocestoididae) es un platelminto endoparásito perteneciente a la clase Cestoda (Figura 2). Este organismo tiene un ciclo de vida complejo, el cual no ha sido elucidado completamente (Figura 3). Éste incluye dos hospedadores intermedios y uno definitivo (Loos-Frank, 1991; Webster, 1949), lo cual es atípico entre los ciclofilídeos. El adulto es un típico cestodo segmentado, vive en el intestino de varios animales carnívoros incluyendo, aunque raramente, al ser humano (Kawamoto *et al.*, 1986; Choi *et al.*, 1967; Fuentes *et al.*, 2003). Produce huevos con oncósferas (embriones) que infectan al primer hospedador intermedio, el cual es probablemente un artrópodo (Webster, 1949, citado por Koziol, 2006). Éste sería entonces ingerido por el segundo hospedador intermedio; en este caso, una amplia gama de animales son capaces de alojarlo, como por ejemplo pollos (Keeseon *et al.* 1992), reptiles

(Choi *et al.*, 1967; Markoski *et al.*, 2003) y anfibios (Lalanne *et al.*, 2004; Markoski *et al.*, 2003). En la cavidad peritoneal del segundo hospedador se desarrollan como tetratiridios (estado larval), los cuales son similares al adulto en cuanto a que poseen un escólex con cuatro ventosas, pero no se encuentran aún segmentado ni posee rudimentos del aparato reproductor (Crosbie *et al.*, 2000). En estos hospedadores, *M. corti* es capaz de proliferar asexualmente mediante fisión longitudinal (un proceso único en platelmintos), característica inusual en las especies de este género (Padgett *et al.*, 2005). Finalmente, al ser ingeridos por el hospedador definitivo, que pueden ser zorros, gatos y perros, los tetratiridios se desarrollan como gusanos segmentados adultos en el intestino de los mismos (Lalanne *et al.*, 2004).



En 1965, Specht y Vogue describieron el aislamiento de tetratiridios a partir de la cavidad peritoneal de lagartijas, y demostraron que estos eran capaces de proliferar asexualmente por fisión longitudinal (Figura 4) al ser inyectados en el peritoneo de ratones (de este aislamiento original provienen los linajes de organismos utilizados en laboratorios de todo el mundo). Esto permite disponer de abundante material biológico en forma constante. Además, es posible llevar a la diferenciación sexual de los tetratiridios *in vivo* mediante infección de perros en condiciones experimentales controladas (y sin los peligros de bioseguridad asociados al desarrollo estrobilar de *Echinococcus spp.*). También es posible inducir *in vitro* tanto la reproducción asexual como la diferenciación al estado adulto sexuado (Figura 5).



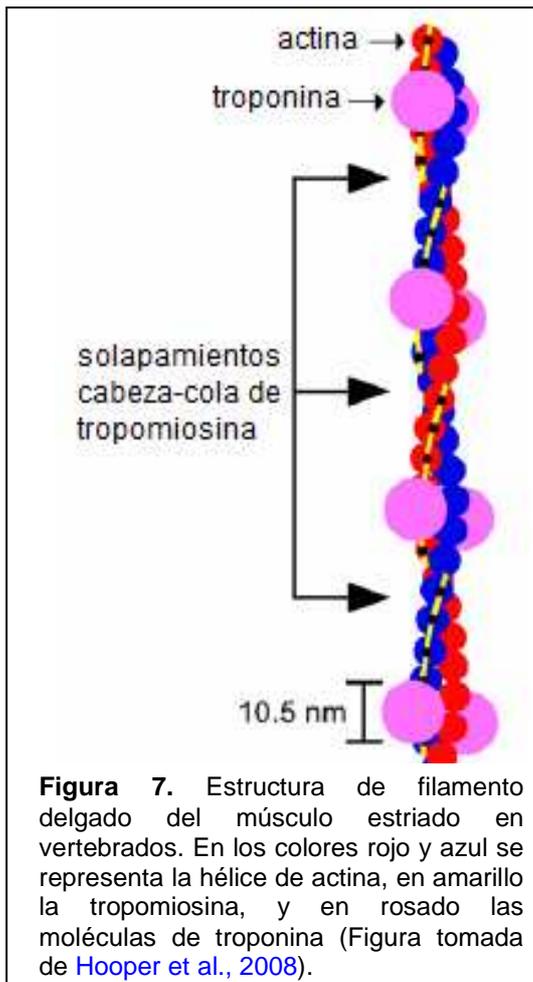
Es por las razones descritas anteriormente que *M. corti* es un modelo particularmente interesante para el estudio de la biología y desarrollo de cestodos (Barret *et al.*, 1982; Koziol y Castillo, 2011; Lalanne *et al.*, 2004).

En el laboratorio donde se llevó a cabo esta investigación se logró caracterizar la localización, morfología y abundancia de células proliferativas durante el desarrollo *in vitro* de *M. corti* desde el estado larval hasta el estado segmentado. A pesar de que existen algunas variaciones, parece existir un patrón conservado en la distribución de células proliferativas en los cestodos, por lo que concluimos que la localización y características de estas células entre *M. corti* y otros modelos de cestodos han sido conservadas a lo largo de la evolución (Koziol *et al.*, 2010). Las características de estas células sugieren que se tratan de células madre indiferenciadas, y que todas las células diferencias somáticas son postmitóticas, como ha sido sugerido previamente para otros cestodos y demostrado en platelmintos de vida libre (Koziol *et al.*, 2010). A partir de esos datos, el trabajo actual de dicho laboratorio consiste en el aislamiento y caracterización *in vitro* de células proliferantes de *M. corti* como primer paso hacia cultivos de líneas celulares de este organismo. Sin embargo, aún no existen herramientas desarrolladas para la manipulación génica en *M. corti*.

1.3) Tropomiosina

La red de microfilamentos de actina es un sistema primario de citoesqueleto involucrado en el desarrollo y mantenimiento de la morfología celular. La naturaleza dinámica de este sistema y su organización están diseñadas para regular cambios estructurales específicos en diferentes regiones celulares. Tanto la función como la forma de este citoesqueleto están determinadas en gran parte por proteínas de unión a la actina. (Bryce *et al.*, 2003).

La tropomiosina es una proteína compuesta por homo o heterodímeros, en el que el extremo C-terminal de un dímero se une al extremo N-terminal del siguiente formando una alfa-hélice coiled coil (Figura 6). Ésta se une de manera cooperativa mediante cargas electrostáticas al surco mayor de los filamentos de actina en células musculares y no musculares, de manera que una molécula de tropomiosina se extiende a lo largo de siete monómeros de actina (Figura 7). (Hitchcock-DeGregori *et al.*, 2010; Bryce *et al.*, 2003; Cooper, 2002 ; Koziol *et al.*, 2011 ; Gunning *et al.*, 2005). Estas dos proteínas son componentes integrales del citoesqueleto de microfilamentos, a pesar de que hay filamentos de actina que carecen de moléculas de tropomiosinas unidos a ellos. (Bryce *et al.*, 2003; Gunning *et al.*, 2005).



La función más caracterizada de la tropomiosina es su participación en la contracción del músculo estriado en vertebrados. Esta proteína interviene en el proceso calcio-dependiente de la regulación de la interacción entre los filamentos finos (actina) y los gruesos (miosina). Otras proteínas de unión a la actina, troponinas, controlan la posición de la tropomiosina a lo largo de los filamentos finos de actina; cuando el calcio se une a la troponina, la molécula de tropomiosina es desplazada permitiendo a las moléculas de miosina interactuar con las de actina. La estructura de los filamentos finos es similar en vertebrados e invertebrados (Hooper *et al.*, 2008), encontrándose así, el mismo sistema de control calcio-dependiente basado en moléculas de troponina y tropomiosina en músculos liso y estriado de estos últimos organismos (Hooper *et al.*, 2008). La tropomiosina también controla la migración celular y es un componente obligatorio del anillo contráctil que se forma para la citocinesis. (Alvite *et al.*, 2009; Hitchcock-DeGregori *et al.*, 2010).

En células no musculares, se ha propuesto que estas moléculas cumplen un rol en la estabilización de los filamentos de actina modulando la interacción con proteínas que son responsables de regular la dinámica de la actina. (Cooper, 2002). Un mecanismo por el cual la tropomiosina actúa es mediante el reclutamiento y / o regulación de las actividades de otras proteínas de unión a la actina. Lehman *et al.* (2000) demostró que las moléculas de tropomiosina se unen a diferentes sitios a lo largo de los polímeros de actina y han sugerido que esto puede regular la unión de otras proteínas de unión a la actina (Lehman *et al.*, 2000 – Citado por Bryce *et al.*, 2003). También, estudios *in vitro* han mostrado que estas tropomiosinas no musculares son capaces de proteger a la actina de la

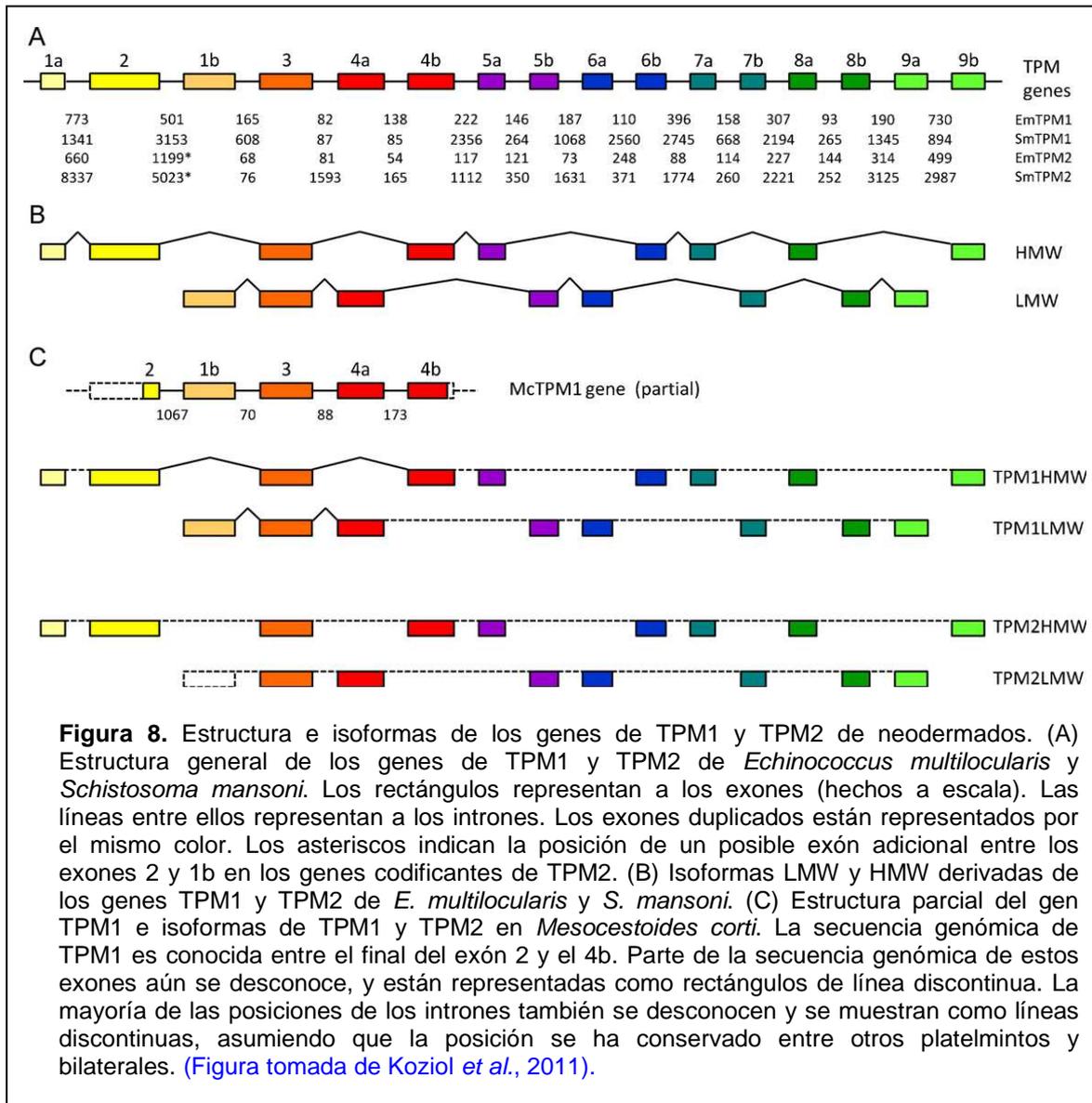
acción de la gelsolina y puede regular la actividad Mg-ATPasa de miosinas en diversos grados (Bryce *et al.*, 2003).

Los genes codificantes de estas proteínas son un caso interesante a estudiar debido a que combinan las dos posibles causas de aparición de nuevas funciones génicas: cambios en los patrones de expresión génica en diferentes condiciones ambientales, etapas de desarrollo, tejidos o localizaciones subcelulares; o aparición de nuevos productos génicos principalmente por la duplicación genómica y/o splicing alternativo. (Irimia *et al.*, 2010).

La diversidad de las isoformas de las tropomiosinas es generada por la combinación de genes parálogos altamente conservados, un inicio de transcripción desde promotores alternativos, y el proceso de splicing alternativo de exones mutuamente excluyentes. Tradicionalmente, las tropomiosinas de los animales se han dividido en isoformas de alto peso molecular (HMW) y bajo peso molecular (LMW), de aproximadamente 284 y 247 residuos aminoacídicos, respectivamente. Generalmente, estas isoformas se producen por el uso de diferentes promotores del mismo gen, las isoformas HMW lo hacen a partir del promotor *upstream* mientras que las isoformas LMW se generan a partir del promotor *downstream* (Bryce *et al.*, 2003; Irimia *et al.*, 2010). En mamíferos se generan alrededor de 40 isoformas de la proteína, de las cuales la mayoría son no-musculares (Bryce *et al.*, 2003).

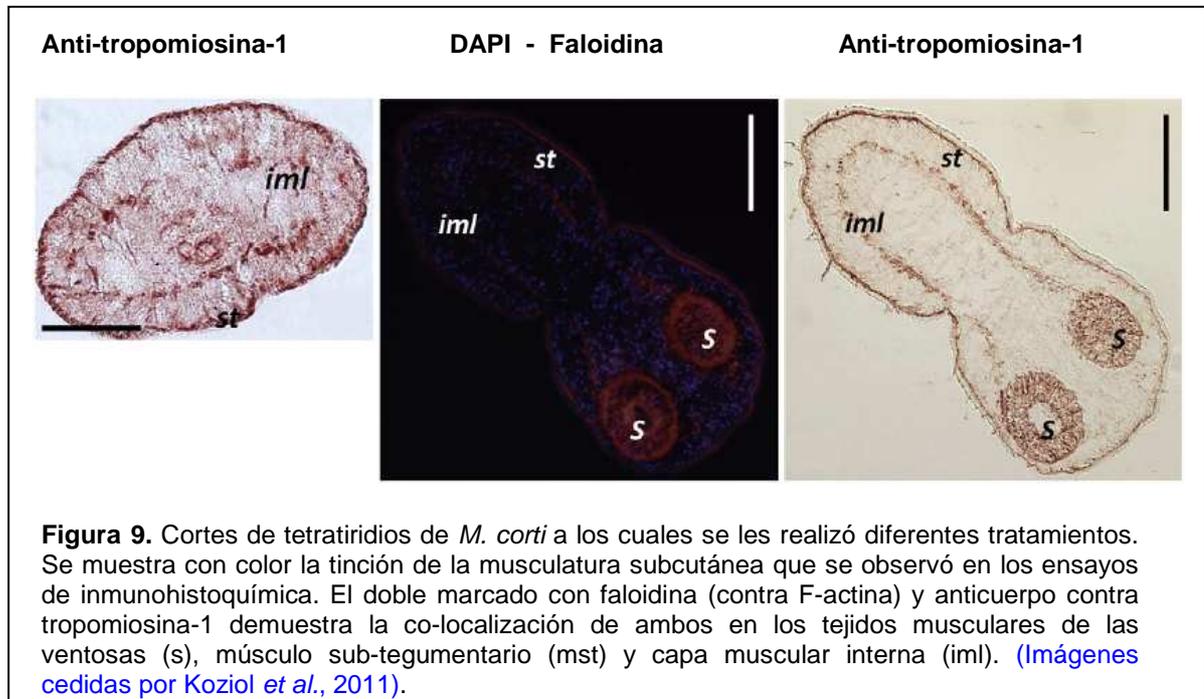
En organismos bilaterales, es común que los exones 4, 5, 6, 7, 8 y/o 9 estén duplicados en tándem, de manera que a partir de cada gen de tropomiosina y a través de los mecanismos descritos anteriormente, se pueden generar dos proteínas que en su ARNm correspondiente sólo comparten algunos exones (Figura 8) (Koziol *et al.*, 2011).

Las isoformas de la tropomiosina tienen diferentes patrones de expresión, haciéndolo en diferentes tipos celulares y durante diferentes etapas del desarrollo. Algunas isoformas se pueden encontrar en más de un tipo celular, sin embargo, otras tienen patrones de expresión más específicos. Dichos patrones, incluyendo el número y tipo de las isoformas que se expresa en diferentes tipos de células, están estrictamente regulados espacial y temporalmente por mecanismos aún desconocidos. (Alvite *et al.*, 2009; Bryce *et al.*, 2003; Koziol *et al.*, 2011; Hooper *et al.*, 2005).



En el laboratorio donde se llevó a cabo esta investigación se clonaron y caracterizaron dos genes parálogos codificantes para tropomiosinas en *Mesocestoides corti* (genes TPM1 y TPM2) (Koziol *et al.*, 2011), cada uno de los cuales genera isoformas HMW y LMW mediante los mecanismos ya mencionados de splicing alternativo mutuamente excluyente y el uso de promotores alternativos. Las tropomiosinas HMW se generan a partir de un promotor *upstream* como ya se mencionó, y contienen los exones 1a y 2 unidos al exón 3 y 9, mientras que las tropomiosinas LMW lo hacen a partir de un promotor *downstream* respecto al exón 2 y tienen unidos los exones 1b al 3 y al 9. Típicamente, las formas de bajo peso molecular son expresadas en un amplio rango de células y tejidos en animales (Koziol *et al.*, 2011; Gunning *et al.*, 2005; Alvite y Esteves, 2009; Gunning *et al.*, 2008; Irimia *et al.*, 2010), mientras que las

TPM HMW son en su mayoría exclusivas de las fibras musculares (Figura 9) (Koziol *et al.*, 2011).



Además, mediante RT-PCR, se ha confirmado la expresión de la tropomiosina de bajo peso molecular del gen TPM1 en larvas de *Mesocestoides corti* (Koziol *et al.*, 2011). También, se dispone en el laboratorio de la región del promotor basal entre los exones 2 y 1b de la forma de bajo peso molecular del gen TPM1 ya clonada, de aquí en más denominada “2-1b”; esta es una de las pocas regiones promotoras secuenciadas en *Mesocestoides corti* (GenBank: HQ229992.1). Por lo tanto, esta región promotora es un candidato interesante para dirigir la transcripción de transgenes en este organismo desde un promotor homólogo. Experimentos previos de transfección de *M. corti* con reporteros bajo promotores heterólogos de virus de células de mamífero como el SV40 o promotores del trematodo *Schistosoma mansoni* realizados en dicho laboratorio han dado resultados negativos, si bien la transfección con ARNm para el mismo reportero fue exitosa. Esto sugiere que estos promotores no son de utilidad en *M. corti*, recalcando la necesidad de utilizar promotores específicos de esta especie. La caracterización de este promotor en *Mesocestoides corti* es el primer paso hacia la expresión de transgenes en este organismo, ya sea en forma transitoria, o mediante integración estable en cultivos celulares.

1.4) Estudio celular y molecular del desarrollo de helmintos parásitos

Los platelmintos parásitos representan un grupo muy diverso de organismos responsables de infecciones tanto en humanos como en animales, causando un gran impacto negativo a nivel sanitario y económico. La mayoría de estas enfermedades tienen generalmente su mayor prevalencia en poblaciones con condiciones epidemiológicas, socio-económicas, culturales y ambientales desfavorables, con restringida accesibilidad a los servicios de atención médica. Es por esta razón que se han convertido en objeto de interés, siendo blanco de estudio para comprender aspectos básicos referidos a su biología, inmunología, y epidemiología.

Sin embargo, a pesar del conocimiento acumulado, ninguna de las estrategias diseñadas para erradicarlos ha funcionado por lo que es imprescindible profundizar en el conocimiento de su biología, estudiando las moléculas involucradas en la interacción del parásito con el organismo huésped y las estrategias de infección de éstos a nivel molecular. Para ello resulta imprescindible el desarrollo de modelos de cultivos *in vitro* para este tipo de parásitos.

Con este objetivo, a lo largo del tiempo se han desarrollado diferentes metodologías para este tipo de cultivos en cestodos, en especial para *Echinococcus spp.*, como son los sistemas de cocultivo y los cultivos axénicos. Debido al desarrollo alcanzado en este tipo de cultivos para *Echinococcus multilocularis* es que ha sido establecido como un modelo de laboratorio para estudiar las interacciones entre el parásito y el huésped, a nivel molecular (Spiliotis *et al.*, 2010; Brehm y Spiliotis, 2008). Sin embargo, aún no ha sido posible obtener cultivos celulares exitosos en otros cestodos.

El equipo con el cual se desarrolló este trabajo tiene como línea principal de investigación el estudio de los mecanismos moleculares del desarrollo en platelmintos parásitos. Uno de los temas de investigación dentro de esta línea es el aislamiento, caracterización y cultivo de células madre proliferantes del cestodo *Mesocestoides corti* (Proyecto Fondo Clemente Estable, responsable E. Castillo). Previamente se caracterizó estas células *in vivo* (Kozioł *et al.*, 2010) demostrando que poseen características típicas de células madre indiferenciadas.

La combinación de técnicas de cultivos *in vitro* de células y organismos parásitos, y de métodos para la transfección estable de transgenes, son los primeros pasos hacia la generación de cestodos transgénicos (Brehm y Spiliotis, 2008). La disponibilidad de técnicas transgénicas para agentes infecciosos como bacterias, virus, hongos, o protozoarios ha contribuido a la comprensión de los mecanismos moleculares en la interacción del patógeno con el huésped. En el caso de helmintos parásitos, sin embargo, las dificultades que se presentan a la hora de desarrollar cultivos *in vitro* han impedido la producción de parásitos transgénicos hasta ahora. A través de la implementación de técnicas de transfección con ARN y de interferencia mediadas por ARN doble cadena (ARNi) varios acercamientos prometedores en la expresión de genes heterólogos y silenciamiento génico han sido realizados en trematodos y nematodos (de Moraes Mourao *et al.*, 2009).

La transfección con genes reporteros que usan promotores endógenos ha sido exitosa en diferentes estados de *Schistosoma mansoni*, mientras que la electroporación como técnica de transformación también ha dado buenos resultados en *Schistosoma japonicum* y en *Fasciola hepática* (Correnti *et al.*, 2007; Rinaldi *et al.*, 2008). Para cestodos, recién se están desarrollando los primeros protocolos para estas técnicas (Brehm y Spiliotis, 2008; Koziol y Castillo 2011; Spiliotis *et al.*, 2008; Spiliotis *et al.*, 2010).

Una vez puesta a punto la metodología para introducir ADN foráneo en células, hay que estabilizar la integración de este ADN en el genoma de la célula. Esto se puede lograr mediante el uso de elementos génicos móviles como transposones o secuencias de inserción. Se han descrito algunos de estos elementos en planaria y tremátodos. Sin embargo en cestodos aún no ha sido posible. Mediante este mecanismo se podrían establecer líneas celulares de parásitos transgénicos. Al introducir estas células madre transgénicas en larvas de cestodos mantenidas *in vitro* y / o *in vivo*, es posible que células transgénicas se integren en la línea germinal, en forma análoga a lo realizado para obtener ratones transgénicos (Brehm y Spiliotis, 2008).

2) OBJETIVOS

2.1) Objetivo general

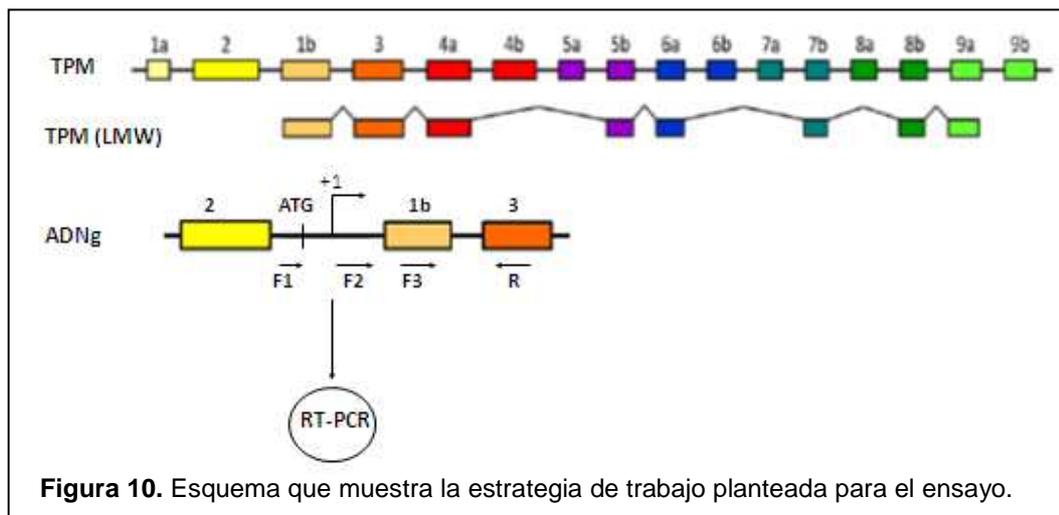
Caracterizar el promotor de tropomiosina 1 de bajo peso molecular y determinar su potencial uso para la expresión de transgenes en *Mesocestoides corti*.

2.2) Objetivos específicos

- Mapear el inicio aproximado de la transcripción del gen de tropomiosina 1 (LMW) de *M. corti*.
- Clonar la región promotora basal del gen de tropomiosina 1 (LMW) de *M. corti* en un vector con la luciferasa como gen reportero.
- Estudiar la actividad promotora del gen de tropomiosina 1 (LMW) de *M. corti* en un sistema de cultivo celular heterólogo.
- Estudiar el patrón de expresión de tropomiosina 1 (LMW) en *M. corti*.

3) ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La localización de la región aproximada del inicio de la transcripción del gen de TPM1 LMW de *M. corti* se llevó a cabo mediante la técnica de RT-PCR. El ARN fue extraído mediante el uso de Trizol y posteriormente fue tratado con una DNasa para eliminar posibles trazas de ADN. Se diseñaron una serie de *primers forward* en la región promotora posible y un único *primer reverse* en el exón 3. El diseño de los *primers* se hizo teniendo en cuenta que el tamaño promedio de la región 5'UTR es probablemente menor a 100 nucleótidos (Fernández *et al.*, 2002) y la ausencia de un triplete ATG río arriba del codón de inicio de la traducción (Kozak, 1989). Además, mediante métodos bioinformáticos se buscaron posibles candidatos del +1 de la transcripción de dicho gen. Ensayos de RT-PCR con diferentes combinaciones de *primers forward* y el *primer reverse* permitieron determinar la posición aproximada del inicio de la transcripción ya que si un *primer* se encuentra *upstream* del inicio de la transcripción, no se espera amplificación por RT-PCR, por lo que se deduce que el +1 debe estar *downstream*. Como control positivo del ensayo se hizo una PCR con ADNg a partir de los *primers* diseñados previamente (Figura 10).



Para la amplificación y posterior clonación de la región promotora basal del gen de tropomiosina 1 (LMW) de *M. corti* (previamente clonada en el vector pGEM-T-Easy), se diseñaron *primers* con adaptadores conteniendo sitios de restricción apropiados y luego, mediante el uso de enzimas de restricción y una ligasa, se ligó el producto amplificado al vector pGL3-Basic con la luciferasa como gen reportero. A continuación, con el resultado de la ligación se hizo una transformación en células DH5- α . Una vez realizado esto, se pudo estudiar la posible presencia del inserto en el vector con el gen reportero mediante *minipreps* de ADN plasmídico y a través de la aplicación de las técnicas de PCR y digestión con enzimas de restricción. El resultado fue confirmado mediante secuenciación (Figura 11).

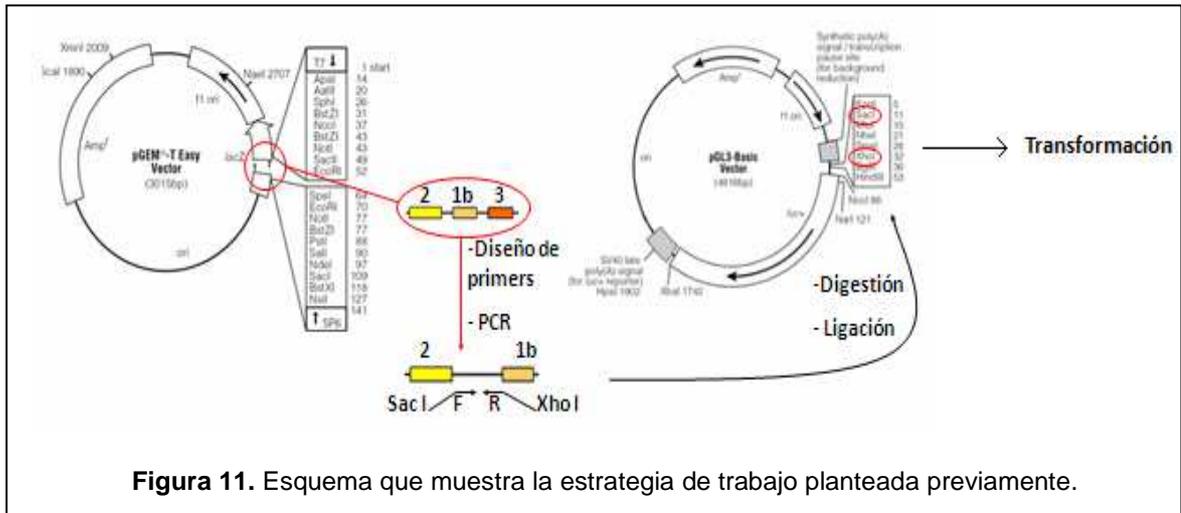


Figura 11. Esquema que muestra la estrategia de trabajo planteada previamente.

Para el estudio de la actividad promotora de la región *upstream* de tropomiosina 1 (LMW) de *M. corti* en un sistema de cultivo celular heterólogo se hizo una producción a gran escala del plásmido obtenido en el paso anterior de estrategia experimental y se realizaron ensayos de transfección en cultivos celulares de NIH3T3 de ratón (Gimba *et al.*, 2000) y Hek 293 (Figura 12).

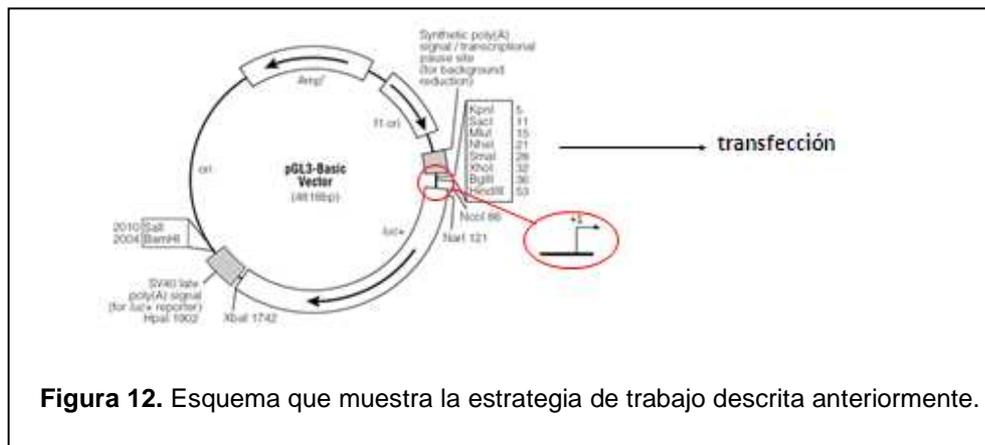
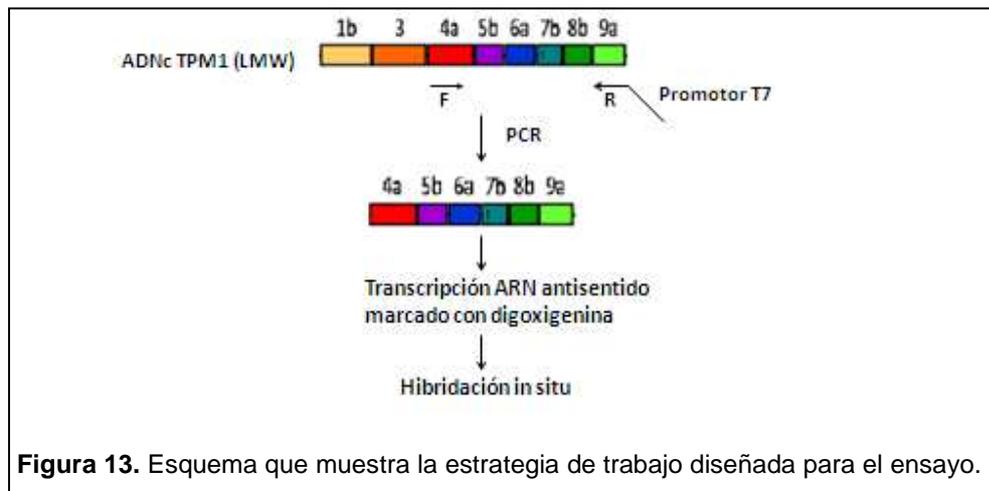


Figura 12. Esquema que muestra la estrategia de trabajo descrita anteriormente.

Para determinar si la expresión de TPM1 (LMW) es ubicua y constitutiva, como podría esperarse debido a la expresión de genes homólogos en otros animales, se realizaron experimentos de hibridación *in toto* e *in situ*. Se amplificó por PCR una región específica del ADNc de TPM1 LMW (exones 4a-9a) con promotor T7 incluido en el *primer* reverso. A partir de este molde se generaron sondas marcadas con digoxigenina con las cuales se realizaron los diferentes experimentos de hibridación (Figura 13).



4) MATERIALES Y MÉTODOS

Determinación del inicio aproximado de la transcripción del gen de tropomiosina 1 (LMW) de *M. corti* mediante RT-PCR.

- Diseño de *primers*

El mapeo del +1 de la transcripción del gen de tropomiosina 1 de bajo peso molecular de *Mesocestoides corti* [McTPM1 (LMW)] se realizó a través de la técnica de RT-PCR. Para ello se diseñaron 3 *primers* forward (McTPM125LMW, McTPM1+13LMW y McTPM1-81LMW) en la región promotora (entre los exones 2 y 1b) y se utilizó un único primer reverse (RvMcTropo5´) en el exón 3, del cual ya se disponía en el laboratorio.

Además, como análisis complementario al planteado previamente, mediante el uso de programas bioinformáticos de detección de promotores se buscaron posibles candidatos del +1 de la transcripción de dicho gen. Como controles positivos en este proceso se utilizaron dos promotores específicos ya caracterizados ([GenBank: AF321117.1](#) y [X66817.1](#)), comparando la posición exacta del +1 con la predicción de dichos programas. Éstos últimos son Promoter Scan (<http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan>), Center for biological sequence analysis (CBS) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter>) y Berkeley Drosophila Genomic Project (BDGP) (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html).

- RT-PCR

La síntesis de ADNc para el mapeo del inicio de la transcripción de TPM1 (LMW) fue realizada a partir de ARN perteneciente a tetratiridios de *M. corti* con un tiempo de cultivo de 5-6 días, en ausencia de taurocolato, tratado con ADNasa RQ1 (Promega). La reacción fue la siguiente: 1 µl de oligo dT (0,5 µg/µl), 7 µl de ARN, 1 µl de dNTPs (0,4 mM cada uno) y 4 µl de H₂Odd. Esta mezcla se incubó a 65°C por 5 minutos y luego se puso en hielo por 1-2 minutos. Inmediatamente se le agregó 4 µl de 5x First – Strand Buffer, 1 µl de 0,1 M DTT, 1 µl de ARNasa OUT (40 U/µl) y 1 µl de Super Script III Reverse Transcriptase (200 U/µl) (Invitrogen). La mezcla total se incubó durante 1 hora a 50°C.

El ADNc obtenido fue utilizado en la reacción de RT-PCR de 25 µl de volumen, bajo las siguientes condiciones de reacción: 2,5 µl de buffer de reacción 10x con MgCl₂, 1 µl de dNTPs 10 mM, 2 µl de *primers* 10 µM cada uno (en diferentes combinaciones), 0,2 µl de Utaq polimerasa (SBS, 5U/µl) y 3 µl del ADNc obtenido mediante la transcripción inversa. Como control de la reacción se

hizo una PCR en las mismas condiciones que la RT-PCR, a excepción del molde que en este caso se usaron 3 μ l ADN_g de *M. corti*.

Las condiciones de ciclado consistieron en una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, apareamiento a 60°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 1 minuto, seguidos por una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Amplificación y clonado de la región promotora basal del gen de tropomiosina 1 (LMW) de *M. corti* en un vector con la luciferasa como gen reportero.

- Diseño de *primers*

El diseño de los *primers* elaborados en este trabajo de investigación se hizo a través del programa Gene Runner usando la secuencia de ADN_g codificante de la TPM1 (LMW) de *M. corti* bajada de la base de datos NCBI (GenBank: HQ229992).

A través de este programa se diseñaron *primers* con adaptadores para amplificar, mediante la técnica de PCR, el fragmento intrónico de interés (entre los exones 2 y 1b) de ADN_g de McTPM1. Los adaptadores se diseñaron en función de enzimas de restricción buffer compatibles, las cuales no debían digerir el fragmento que se buscaba amplificar, pero sí lo debían hacer en el vector pGL3-Basic, en el que se pretende ligar el fragmento intrónico 2-1b.

En base a estas enzimas de restricción, se diseñaron 3 *primers* con adaptadores para amplificar la región intrónica entre el exón 2 y el 1b; dos forward con sitio de corte para la enzima de restricción SacI (McTPM1-21b-F28 y McTPM1-21b-F1) y otro reverse con sitio de corte para la enzima XhoI (McTPM1-21b-R) (ver información sobre *primers* en Anexo 1).

- PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Todas las PCR de este trabajo fueron realizadas en un termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400. La mezcla básica para esta reacción fue la siguiente: 5 μ l (conc. final 1x) de buffer 10x con MgCl₂, 1 μ l (conc. final 0,2 mM) de dNTPs (10 mM), 2 μ l (conc. final 0,4 mM) de c/u de los *primers* (10 μ M) (en diferentes combinaciones), 0,5 μ l de enzima Long Range PCR (Fermentas), 2 μ l de ADN_p pGEM-T-Easy conteniendo la región genómica entre el exón 2 y 3 del gen TPM1 diluído 1/10, y por último c.s.p. 50 μ l de H₂O doblemente desionizada (H₂O_{dd}).

Las condiciones de ciclado consistieron en una desnaturalización inicial de 3 minutos a 94°C, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, apareamiento a 54°C por 30 segundos, y extensión a 68°C por 90 segundos, seguidos por una extensión final a 68°C por 7 minutos.

- Digestión, vectores utilizados y ligación

Al momento de iniciar la investigación se disponía en el laboratorio de la región putativa del promotor basal de la forma de bajo peso molecular del gen TPM1 de *M. corti* ya clonada en el vector pGEM-T-Easy. Este fragmento de ADN_g incluye la región 2-1b de McTPM1, la cual, digestión mediante, se ligará en el vector pGL3-Basic.

Los productos de PCR obtenidos usando los *primers* con adaptadores diseñados previamente fueron doblemente digeridos con las enzimas *SacI* y *XhoI*. A su vez, el vector pGL3-Basic también fue tratado con las mismas enzimas. La mezcla de reacción fue la siguiente: 10 µl de Buffer Tango 10x (Fermentas), 3,5 µl de enzima *SacI* (Fermentas), muestra (en la digestión del vector pGL3-Basic se usaron 15 µl de éste, y en la digestión de los productos de PCR se usaron 10 µl) y c.s.p. 100 µl de H₂O. Esta mezcla se incubó durante dos horas a 37°C para luego agregarle 12,5 µl de Buffer Tango 10x y 3,5 µl de enzima *XhoI* (Fermentas). Luego, se incubó nuevamente en las mismas condiciones.

La ligación de los productos de PCR (región intrónica entre exones 2-1b) con el vector pGL3-Basic se realizó bajo las siguientes condiciones: 10 µl de vector pGL3-Basic (20 – 100 ng) (Promega), 4 µl inserto (relación molar 2:1), 2 µl de buffer 10x, 1 µl de T4 DNA ligasa (1U/µl) (Fermentas), y c.s.p. 20 µl de H₂O. Esta mezcla de ligación se incubó durante 1 hora a 22°C.

- Transformación

Se utilizaron células *E. coli* DH5- α químicamente competentes producidas mediante el protocolo de cloruro de calcio descrito en Sambrook *et al.* (1989) y conservadas a -80°C. La transformación de las células competentes se realizó según el siguiente protocolo: se descongelan las células en hielo, y se mezclan 100 µl de células y 10 µl de mezcla de ligación. Se incuban las células durante 20 minutos en hielo, y luego se realiza un shock térmico (2 minutos a 42°C y 2 minutos en hielo nuevamente). Se añade entonces 500 µl de medio LB precalentado a 37°C y se incuban las células durante 1 hora a 37°C con agitación constante.

Después del proceso de transformación, las células fueron plaqueadas en medio LB sólido conteniendo ampicilina (Sigma-Aldrich) (100 µg/ml) y se incubaron *over night* (o.n.) a 37°C.

- Obtención de ADN plasmídico

Los clones fueron inoculados en 3 ml de medio LB líquido – ampicilina (100 µg/ml) y cultivados durante 12 horas a 37°C con agitación constante. A partir de estos cultivos se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico

mediante el protocolo de lisis alcalina (según Sambrook *et al.*, 1989) o en algunos casos utilizando el kit Ron's Plasmid Mini Kit (Bioron), siguiendo las instrucciones del fabricante.

- Análisis de los clones obtenidos

Una vez realizadas las minipreps, se analizaron los clones con el fin de comprobar la presencia del inserto mediante los siguientes métodos: 1) mediante PCR utilizando el ADN plasmídico como molde y los mismos cebadores utilizados previamente para obtener el fragmento de PCR a ligar, 2) mediante digestión del plásmido con las enzimas de restricción nombradas anteriormente (*SacI* y *XhoI*), y 3) mediante digestión con la enzima de restricción *HindIII* (Fermentas).

La PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 2,5 μ l (conc. final 1x) de buffer 10x con $MgCl_2$, 0,5 μ l (conc. final 0,2 mM) de dNTPs (10 mM), 1 μ l (conc. final 0,4 mM) de c/u de los *primers* McTPM1-21b-F1 y McTPM1-21b-R (10 μ M), 0,25 μ l de enzima Long Range PCR, 1 μ l de ADNp diluído 1/10, y por último c.s.p. 25 μ l de H_2O . El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 3 minutos a 94°C, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, apareamiento a 54°C por 30 segundos, y extensión a 68°C por 90 segundos, seguidos por una extensión final a 68°C por 7 minutos.

La mezcla de reacción de digestión con *HindIII* fue la siguiente: 5 μ l de ADNp, 1 μ l de enzima *HindIII*, 2 μ l de buffer R, c.s.p. 20 μ l de H_2O . La mezcla se incubó durante 2 horas a 37°C.

La mezcla para la doble digestión con las enzimas *SacI* y *XhoI* se describe a continuación: 2 μ l de Buffer Tango 10x, 1 μ l de Enzima *SacI*, 5 μ l de ADNp y c.s.p. 20 μ l de H_2O . Esta mezcla se incubó durante dos horas a 37°C para luego agregarle 2,5 μ l de Buffer Tango 10x (Fermentas) y 1 μ l de Enzima *XhoI*. Luego se incubó nuevamente en las mismas condiciones.

Las muestras de ADN plasmídico de las cuales se podía deducir que contenían el fragmento intrónico 2-1b de ADNg TPM1 (LMW) de *M. corti* fueron enviadas al servicio secuenciador MacroGen para corroborar si el inserto correspondía al fragmento de interés.

Visualización de moléculas de ADN

Las muestras estudiadas en este trabajo fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa de una concentración entre 1% y 2% en buffer TAE 1x, según el tamaño de la muestra a visualizar. Las bandas obtenidas fueron visualizadas mediante tñido con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml) y exposición a la luz ultravioleta (UV: $\lambda = 240$ nm) en un transiluminador MacroVue UV-20 (Hoefer).

La comparación de los tamaños entre las bandas de las muestras analizadas y las de marcadores de peso molecular conocido y concentración conocida, permite estimar el tamaño y la concentración de dichas muestras.

Purificación de fragmentos de ADN

Se realizó mediante uno de los siguientes procedimientos:

- Kits comerciales (“Ron’s DNA/RNA Purification Systems”; de Bioron, y “QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol”; de Qiagen).

Estos kits pueden ser utilizados para purificar tanto ADN en solución como ADN obtenido a partir del recorte de banda en geles de agarosa. Los mismos, a través de diferentes soluciones, desnaturalizan las proteínas, disuelven la agarosa y promueven la unión del ADN a la matriz de una columna. Una vez logrado esto, las proteínas y los contaminantes son lavados y el ADN es recuperado por elución.

- **Concentración de ADN**

Se realizó la precipitación de la muestra de ADN mediante el añadido de 2,5 volúmenes de etanol absoluto y 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH 5,0) o cloruro de litio 4 M, e incubación o.n. a -20°C o por 20 minutos a -80°C. Luego, se centrifugó a 12000 RCF a 4°C durante 20 minutos, se lavó el pellet obtenido con etanol 70% y se resuspendió en agua doblemente desionizada.

Secuenciación y análisis de las secuencias

El proceso de secuenciación de las diferentes muestras fue realizado por el servicio del Institut Pasteur de Montevideo o por MacroGen (Korea).

Las secuencias obtenidas fueron analizadas y corregidas manualmente utilizando los programas Chromas (Technelysium) y Gene Runner 3,05 (Hastings Software, Inc.). Para determinar la existencia de similitud de secuencia, éstas fueron utilizadas como secuencias problema en la búsqueda dentro de la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando el programa Blastn.

Preparación de muestras stock

Se hacen stocks de las diferentes muestras y se guardan a -80°C. Éstas se preparan mediante el agregado de 500 µl de glicerol 50% previamente esterilizado, cuya función es la crioprotección, y 500 µl del cultivo de bacterias.

Estudio de la actividad promotora del gen de tropomiosina 1 (LMW) de *M. corti* en un sistema de cultivo celular heterólogo.

Para cumplir este objetivo se comenzó por realizar una producción a gran escala del plásmido pGL3-Basic con el inserto 2-1b obtenido previamente mediante el kit AxyPrep™ Plasmid Midiprep Kit (Axygen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Con la colaboración de la Dra. Mariela Bollati y la M.sc. Inés Tiscornia (ambas pertenecientes a la Unidad de Biología Celular del Institut Pasteur de Montevideo), se efectuaron ensayos de transfección en cultivos celulares de NIH3T3 de ratón y de Hek 293, con el plásmido preparado previamente.

El conteo de las células se realizó usando la cámara de Neubauer, y luego, trabajando con placas de 12 pocillos, se sembraron $2,16 \times 10^5$ células NIH3T3 y $3,0 \times 10^5$ células Hek 293 por pocillo. Una vez realizado esto, se procedió a transformar las células siguiendo el protocolo usado de rutina en ese laboratorio. Como controles negativos se usaron células sin transfectar y células transfectadas con lipofectamina, y como control positivo se transfectaron células con el vector pGL4.75(hRluc/CMV), sin embargo con este último no se lograron los resultados esperados.

Luego de realizada la transfección, y utilizando el kit Luciferase Assay System Technical Bulletin (Catálogo TB281 - Promega), se midió la actividad de la luciferasa. Con el fin de normalizar dichos valores, se hizo una cuantificación de la cantidad de proteína total usando BSA como estándar, haciendo uso del kit Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination (Catálogo: BCA 1-1KT).

Estudio del patrón de expresión tropomiosina 1 (LMW) en *M. corti*

- PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Para la obtención del molde de la sonda para la posterior hibridación *in situ*, se realizaron reacciones de PCR utilizando como molde ADN plasmídico el cual tenía inserto un fragmento de ADNc de TPM1 LMW de *M. corti*. Para ello se diseñaron dos *primers*, uno *forward* en el exón 4a (McTPM1-LF), y uno *reverse* en el exón 9a (McTPM1-LR-T7), con un promotor T7, dando así como producto una región amplificada específica de TPM LMW. La reacción se hizo bajo las siguientes condiciones: 2,5 μ l de buffer de reacción 10x con $MgCl_2$, 1 μ l de dNTPs 10 mM, 2 μ l de *primers* 10 μ M cada uno, 0,2 μ l de Taq polimerasa y 1 μ l del ADNp con inserto diluido 1/10, en un volumen final de 25 μ l.

El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 segundos, apareamiento a 55°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto, finalizando con una extensión final a 72°C por 7 min.

- Transcripción *in vitro* de sondas marcadas con digoxigenina-UTP (DIG-UTP)

Los productos de amplificación, luego de ser purificados, fueron utilizados directamente para la transcripción con ARN polimerasa T7 (Promega) para generar sondas *antisense* marcadas. La reacción de transcripción *in vitro* y marcado consistió en 20 µl de volumen en las siguientes condiciones: buffer de transcripción 1x, mezcla de rNTPs, DIG-UTP (Boehringer), inhibidor de ARNasa (40 U/µl) (Invitrogen), ADN molde, y ARN polimerasa T7 (20 U/µl) (Promega). La mezcla se incubó durante 2 horas a 37°C, siendo luego tratada con ADNasa RQ1 (1 U/µg; Promega) durante 15 minutos a 37°C y precipitada con etanol absoluto y LiCl. Las sondas generadas se resuspenden entonces en 50% formamida, y se cuantifican mediante *dot blot*, comparando con una sonda marcada con DIG-UTP de concentración conocida.

- Hibridación *in situ*

Ejemplares de *M. corti* cultivados durante 7 días fueron fijados durante 3 horas 50 minutos en PFA y posteriormente se le hicieron 3 lavados en PBS 1x de 10 minutos cada uno. Luego son dejados en sacarosa 30% o.n. a 4-8 ° C durante 48 horas. Los ejemplares fueron entonces embebidos en la resina de inclusión (Alton), congelados rápidamente con nitrógeno líquido, y cortados con un criostato en cortes de diferente grosor, montados sobre portaobjetos SilanePrep (Sigma-Aldrich). Los cortes se dejaron secar 2 horas a temperatura ambiente y se congelaron a -80°C hasta el momento de su uso.

El protocolo de hibridación *in situ* utilizado se describe a continuación. Las soluciones se describen en el Anexo 2.

1) Preparación de los cortes

- Descongelar los cortes 30 minutos a temperatura ambiente.
- Fijar en PFA /PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar 3 veces con PBS (5 minutos cada vez).
- Permeabilizar con 0,5% Tritón X-100 en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Hidrolizar con HCl 0,2 N durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Enjuague con PBS.
- Pre-hibridar con solución de pre-hibridación (Apéndice 1) durante 10 minutos a 60°C.
- Pre-hibridar con solución de pre-hibridación durante 120 minutos a 53°C.

2) Hibridación y lavados

- Aplicar la sonda sobre los preparados (0,1 ng/μl en solución de pre-hibridación, previamente desnaturalizada por 2 minutos a 80°C) y cubrir con un trozo de Parafilm.
- Hibridar en cámara húmeda a 53°C durante toda la noche.
- Sumergir los preparados en SSC 2x precalentado a 53°C con agitación hasta que se desprenda el Parafilm.
- Lavar en SSC 1x – 50% formamida – 0,1% Tween-20 durante 20 minutos a 53°C.
- Lavar en SSC 1x – 50% formamida durante 20 minutos a 53°C.

3) Incubación con anticuerpo y revelado

- Lavar los preparados en buffer MAB (Apéndice 1) dos veces (30 minutos cada vez) a temperatura ambiente.
- Bloquear con 0,5% reactivo de bloqueo (Boehringer), 1% seroalbúmina bovina y 5% suero de oveja (Sigma-Aldrich) en buffer MAB a temperatura ambiente.
- Incubar con anticuerpo monoclonal anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (Roche) en dilución 1:2000 en MAB con 0,5% reactivo de bloqueo y 1% seroalbúmina bovina durante 90 minutos a 37°C (en cámara húmeda).
- Lavar 6 veces en MAB con Tween-20 0,1% (15 minutos cada vez).
- Equilibrar 10 minutos los preparados en buffer AP.
- Aplicar reactivo NBT-BCIP (Roche) en buffer AP hasta que aparezca la señal (aproximadamente 4 horas)

4) Fijado y montado

- Detener la reacción con PBS con Tween-20 0,1%
- Fijar con PFA /PBS durante 20 minutos.
- Lavar con PBS y montar con PBS con glicerol 80 %.

Todas las soluciones que se describen para la hibridación *in situ* hasta el paso de incubación con el anticuerpo anti-digoxigenina fueron tratadas previamente con Dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1% durante toda la noche a temperatura ambiente y autoclavadas durante 40 minutos.

5) RESULTADOS

Determinación del inicio aproximado de la transcripción del gen de tropomiosina 1 (LMW) de *M. corti* mediante RT-PCR.

- RT-PCR

Para el mapeo aproximado del inicio de transcripción de TPM1 (LMW) de *M. corti* se diseñaron 3 *primers forward* (McTPM1-25LMW, McTPM1+13LMW y McTPM1-81LMW) y uno *reverse* (RvMcTropo5') (Figura 10), para luego hacer una RT-PCR con las 3 combinaciones posibles. Como control positivo de la reacción, se hizo una PCR en las mismas condiciones que la RT-PCR y con las mismas combinaciones de *primers*, pero partiendo de ADNg. Los tamaños esperados de los fragmentos amplificados y la posición en la que se encontraría el +1 dependiendo de los juegos de *primers* son los que se presentan en la tabla siguiente:

Tabla 1. Juegos de *primers* empleados para el mapeo del +1 de transcripción de la TPM1 (LMW) de *M. corti*, y los respectivos tamaños esperados de los fragmentos amplificados partiendo del uso de diferentes moldes. También se muestra entre qué pb se encontraría el +1 dependiendo de los juegos de *primers*.

<i>Primers</i>	ADNc	ADNg	Ubicación (pb)
McTPM1-81LMW / RvMcTropo5'	261	331	1029 - 1359
McTPM1-25LMW / RvMcTropo5'	205	275	1085 - 1359
McTPM1+13LMW / RvMcTropo5'	168	238	1122 - 1359

Esta diferencia de tamaños entre los fragmentos amplificados a partir de ADNc y ADNg se debe a la existencia de intrones, los cuales sólo van a ser amplificados en la reacción de PCR con ADNc como molde si el promotor está ubicado en esa región.

El resultado de estas reacciones puede observarse en la siguiente figura.

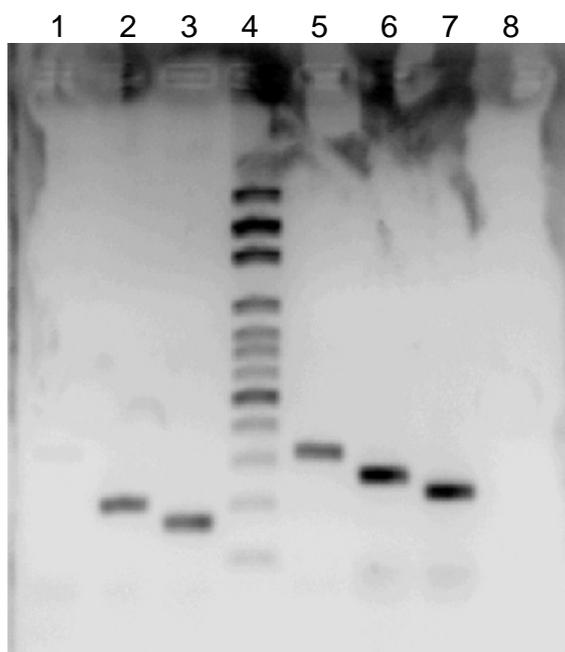


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa 2%, buffer TAE 1x, de los productos de RT-PCR. Carril 1, 2 y 3: RT-PCR con *primers* McTPM1-81LMW/RvMcTropo5', McTPM1-25LMW/RvMcTropo5' y McTPM1+13LMW/RvMcTropo5', respectivamente. Carril 4: Marcador de peso molecular (100 pb) de Axygen. Carril 5, 6 y 7: PCR a partir de ADNg con *primers* McTPM1-81LMW/RvMcTropo5', McTPM1-25LMW/RvMcTropo5' y McTPM1+13LMW/RvMcTropo5', respectivamente.

En la figura anterior se puede ver que se obtuvo una amplificación a partir de ADNg con los 3 juegos de *primers* usados, sin embargo, a partir de ADNc sólo se logró amplificación con los juegos de *primers* que tienen los *forward* en una posición más interna. Esto es un indicio de que el +1 estaría ubicado entre la región de ADNg complementaria a los *primers* McTPM1-81LMW y McTPM1-25LMW.

Luego de la electroforesis mostrada en la figura anterior, se procedió a la purificación de todas las muestras, a excepción del fragmento de amplificación obtenido por RT-PCR con los *primers* McTPM1-81LMW/RvMcTropo5'.

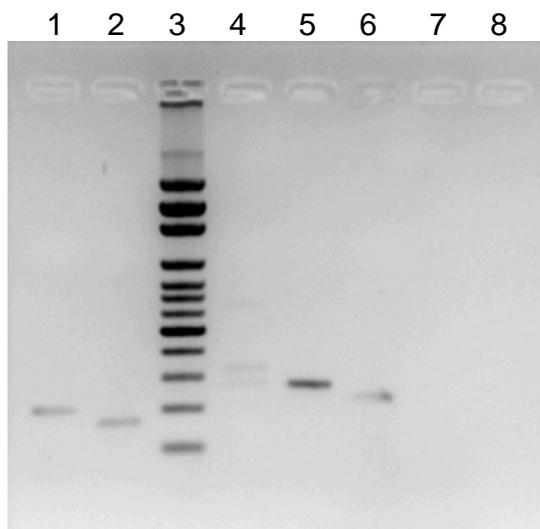


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa 2%, buffer TAE 1x, de los productos de RT-PCR purificados. Carril 1 y 2: RT-PCR con *primers* McTPM1-25LMW/RvMcTropo5´ y McTPM1+13LMW/RvMcTropo5´, respectivamente. Carril 3: Marcador de peso molecular (100 pb) de Axygen. Carril 4, 5 y 6: muestras purificadas obtenidas mediante PCR a partir de ADNg con *primers* McTPM1-81LMW/RvMcTropo5´, McTPM1-25LMW/RvMcTropo5´ y McTPM1+13LMW/RvMcTropo5´, respectivamente.

Los fragmentos purificados obtenidos mediante RT-PCR y PCR a partir de la combinación de *primers* McTPM1-25LMW/RvMcTropo5´ y McTPM1+13LMW/RvMcTropo5´ fueron enviados a secuenciar al Institut Pasteur de Montevideo. Las secuencias y el blast realizado a partir de ellas se muestran a continuación:

Tabla 2. Secuencias obtenidas con diferentes juegos de *primers*, usando como molde ADNc y ADNg de la TPM1 (LMW) de *M. corti*.

<p>ADNc con McTPM1+13LMW y RvMcTropo5' a partir de McTPM+13LMW TCNGAAGACGTTTANAAGANAAATTGCTCTTAAAACGATGATATTGAATTGAGCGACGAAAAAAGG AGGCTGCTGAAGCTGAAGTTGCAGCCATGACCCGCCGCATTTCGTCTTAA</p>
<p>ADNc con McTPM1+13LMW y RvMcTropo5' a partir de RvMcTropo5' TTGGCTCCGCGACTGTTGAAACTGTCAAGTCTAAGATTTTGGCTATGACCTCGGAGAAGGAGCGT TTAGAAAAGAGAAATTGCTCTTAAAACGATGATATGAAATGAG</p>
<p>ADNc con McTPM1-25LMW y RvMcTropo5' a partir de McTPM-25LMW GTCAGTCTANATTTTGGCTATGACCTCGGAGAAGGAGCGTTTAGAAAAGAGAAATTGCTCTTAAAA CGATGATATTGAAATTGAGCGACGAAAAAAGGAGGCTGCTGAAGCTGAAGTTGCAGCCATGACCC GCCGCATTTCGTCTTAA</p>
<p>ADNc con McTPM1-25LMW y RvMcTropo5' a partir de RvMcTropo5' CTTCCAGTTGGTGCGCCATTCAAAGTTAATGAAAATGGAAGGCTCCGCGACTGTTGAAACTGTCAA GTCTAAGATTTTGGCTATGACCTCGGAGAAGGAGCGTTTAGAAAAGAGAAATTGCTCTAAAAACGAT GATAAAGANAGT</p>
<p>ADNg con McTPM1+13LMW y RvMcTropo5' a partir de McTPM+13LMW CTCNGAAGACGTTTANAAGANANTTGTCTTAAACGATGATATTGAAATTGAGCGACGAAAAAAGG AGGCTGTAATTTATATGATAATTACAAGAATTATTTAAATCGATGTGCTATCTAACACTAAGTTATC TATGCAGGCTGAAGCTGAAGTTGCAGCCATGACCCGCCGCATTTCGTCTNAA</p>
<p>ADNg con McTPM1+13LMW y RvMcTropo5' a partir de RvMcTropo5' TTGGNTCCGCGACTGTTGAAACTGTCAAGTCTAAGATTTTGGCTATGACCTCGGAGAAGGAGCGT TTAGAAAAGAGAAATTGCTCTTAAAACGATGATATTGAAATTGAGCGACGAAAAAAGGAGGCTGTA ATTTATATGATAATTACAAGAATTATTTAAATCGATGTGCTATNTAAC</p>
<p>ADNg con McTPM1-25LMW y RvMcTropo5' a partir de McTPM-25LMW GGTTGACTGTCAGTCTANANTTTGGCTATGACCTCGGANAAGGAGCGTTTAGAAAAGAGAAATTGCT CTTAAAAACGATGATATTGAAATTGAGCGACGAAAAAAGGAGGCTGTAATTTATATGATAATTACAA GAATTATTTAAATCGATGTGCTATCTAACACTAAGTTATCTATGCAGGCTGAAGCTGAAGTTGCAG CCATGACCCGCCGCATTTCGTCTAAAA</p>
<p>ADNg con McTPM1-25LMW y RvMcTropo5' a partir de RvMcTropo5' TTCCAGTTGGTGCGCCATTCAAAGTTAATGAAAATGGAAGGCTCCGCGACTGTTGAAACTGTCAAG TCTAAGATTTTGGCTATGACCTCGGAGAAGGAGCGTTTAGAAAAGAGAAATTGCTCTTAAAACGAT GATATTGAAATTGAGCGACGAAAAAAGGAGGCTGTAATTTATATGATAATTACAAGAATTATTTAA TCGATGTGCTATNTAACNNTTANTTTTT</p>

Figura 16. Blast realizado a partir de las secuencias obtenidas con diferentes juegos de *primers*, usando como molde ADNc y ADNg de la TPM1 (LMW) de *M. corti*.

ADNc con McTPM1+13LMW y RvMcTropo5' a partir de McTPM+13LMW						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
HQ230017.1	Mesocestoides corti tropomyosin 1 low molecular weight isoform mRNA	172	172	90%	3e-40	95%
HQ230018.1	Mesocestoides corti tropomyosin 1 high molecular weight isoform mRNA	80.5	80.5	37%	2e-12	100%
HQ229992.1	Mesocestoides corti tropomyosin 1 gene, partial cds, alternatively sp	78.7	78.7	36%	7e-12	100%

ADNc con McTPM1+13LMW y RvMcTropo5' a partir de RvMcTropo5'						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
HQ230017.1	Mesocestoides corti tropomyosin 1 low molecular weight isoform mRNA	187	187	98%	1e-44	98%
HQ229992.1	Mesocestoides corti tropomyosin 1 gene, partial cds, alternatively sp	187	187	98%	1e-44	98%

ADNc con McTPM1-25LMW y RvMcTropo5' a partir de McTPM-25LMW						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
HQ230017.1	Mesocestoides corti tropomyosin 1 low molecular weight isoform mRNA	255	255	98%	4e-65	97%
HQ229992.1	Mesocestoides corti tropomyosin 1 gene, partial cds, alternatively sp	180	258	98%	2e-42	100%
HQ230018.1	Mesocestoides corti tropomyosin 1 high molecular weight isoform mRNA	80.5	80.5	29%	3e-12	100%

ADNc con McTPM1-25LMW y RvMcTropo5' a partir de RvMcTropo5'						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
HQ229992.1	Mesocestoides corti tropomyosin 1 gene, partial cds, alternatively sp	241	241	92%	1e-60	99%
HQ230017.1	Mesocestoides corti tropomyosin 1 low molecular weight isoform mRNA	195	195	75%	9e-47	99%

ADNg con McTPM1+13LMW y RvMcTropo5' a partir de McTPM+13LMW						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
HQ229992.1	Mesocestoides corti tropomyosin 1 gene, partial cds, alternatively sp	285	285	85%	7e-74	98%
HQ230017.1	Mesocestoides corti tropomyosin 1 low molecular weight isoform mRNA	82.4	159	48%	9e-13	100%
HQ230018.1	Mesocestoides corti tropomyosin 1 high molecular weight isoform mRNA	76.8	76.8	22%	4e-11	100%

ADNg con McTPM1+13LMW y RvMcTropo5' a partir de RvMcTropo5'						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
HQ229992.1	Mesocestoides corti tropomyosin 1 gene, partial cds, alternatively sp	313	313	97%	3e-82	98%
HQ230017.1	Mesocestoides corti tropomyosin 1 low molecular weight isoform mRNA	230	230	69%	3e-57	100%

ADNg con McTPM1-25LMW y RvMcTropo5' a partir de McTPM-25LMW						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
HQ229992.1	Mesocestoides corti tropomyosin 1 gene, partial cds, alternatively sp	381	381	96%	1e-102	97%
HQ230017.1	Mesocestoides corti tropomyosin 1 low molecular weight isoform mRNA	178	255	65%	1e-41	100%
HQ230018.1	Mesocestoides corti tropomyosin 1 high molecular weight isoform mRNA	76.8	76.8	18%	6e-11	100%

ADNg con McTPM1-25LMW y RvMcTropo5' a partir de RvMcTropo5'						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
HQ229992.1	Mesocestoides corti tropomyosin 1 gene, partial cds, alternatively sp	387	387	94%	2e-104	99%
HQ230017.1	Mesocestoides corti tropomyosin 1 low molecular weight isoform mRNA	257	257	61%	2e-65	100%

Además de mapear el sitio aproximado de inicio de la transcripción de esta proteína a través de RT-PCR, mediante el uso de programas bioinformáticos de detección de promotores se buscaron posibles candidatos del +1 de la transcripción de dicho gen. Como controles positivos en este proceso se utilizaron promotores específicos ya caracterizados, comparando la posición exacta del +1 con la predicción de dichos programas.

Tabla 3. Tabla comparativa que muestra la predicción de 3 programas informáticos del inicio de transcripción de genes ya caracterizados.

	+1 transcripción	Promoter Scan ^[1]	Center for biological sequence analysis (CBS) ^[2]	Berkeley Drosophila Genomic Project (BDGP) ^[3]
ADNg Mesocestoides corti tropomyosin 1 gene (HQ229992)	----	495	1500	start 416 - end 466
Echinococcus granulosus fatty acid binding protein FABP2 gene, complete cds (AF321117.1)	2679	614	1500 Highly likely prediction - 2300 Marginal prediction	start 2619 - end 2669
Echinococcus granulosus Hbx1 gene (X66817.1)	319	No promoter regions where predicted	1000 Highly likely prediction - 200 Marginal prediction	start 787 - end 837

Amplificación y clonado de la región promotora basal del gen de tropomiosina 1 (LMW) de *M. corti* en un vector con la luciferasa como gen reportero.

Para la amplificación del fragmento intrónico 2-1b que contiene el promotor de TPM1 (LMW) se diseñaron *primers* con adaptadores y se realizó la PCR con el vector pGEM-T-Easy con el inserto 2-3 como molde.

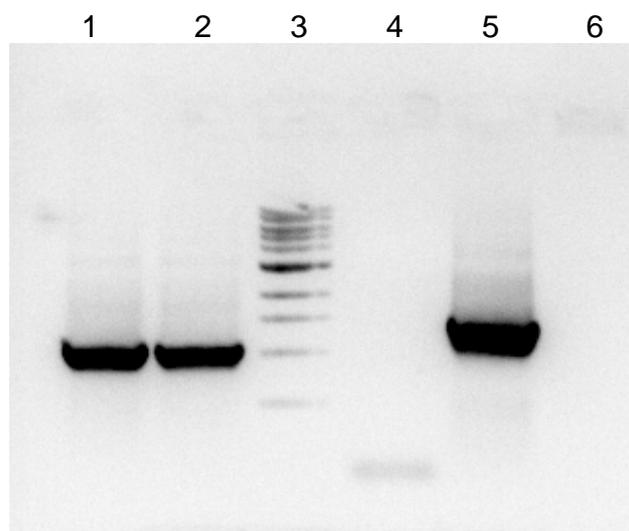


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa 1%, buffer TAE 1x, de los productos de PCR obtenidos a partir del vector pGEM-T-Easy con el inserto 2-3 como molde. Carril 1: amplificación del fragmento intrónico 2-1b mediante el juego de *primers* McTPM1-21b-F1/ McTPM1-21b-R. Carril 2: producto de PCR logrado mediante los *primers* McTPM1-21b-F28/ McTPM1-21b-R. Carril 3: Marcador de peso molecular (1 kb) de Fermentas. Carril 4: reacción de PCR sin molde, usando el juego de *primers* McTPM1-21b-F1/ McTPM1-21b-R (control negativo). Carril 5: reacción de PCR realizada como control positivo.

Luego de realizada dicha reacción de amplificación, se purificó la muestra amplificada por los *primers* McTPM1-21b-F1/ McTPM1-21b-R.

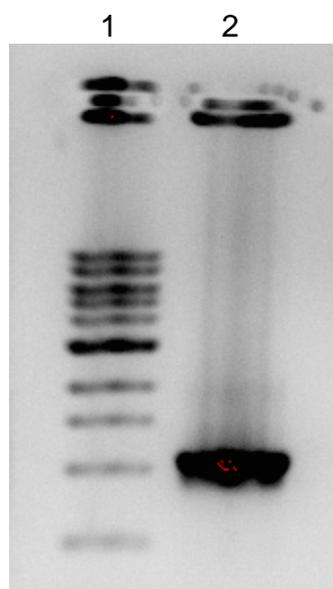


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa 1%, buffer TAE 1x, de producto de PCR. Carril 1: Marcador de peso molecular (1 kb) de Fermentas. Carril 2: producto de PCR purificado logrado por los *primers* McTPM1-21b-F1/ McTPM1-21b-R.

Para la ligación del producto de PCR en el vector pGL3-Basic, fue necesario hacer una doble digestión con las enzimas *SacI* y *XhoI* (enzimas en función de las cuales se diseñaron previamente los *primers* con adaptadores) tanto del producto de PCR a ligar (fragmento intrónico 2-1b), como del vector.

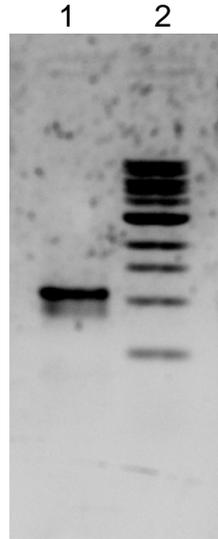


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa 1%, buffer TAE 1x, de producto de PCR digerido. Carril 1: producto de PCR 2-1b doblemente digerido con las enzimas *SacI* y *XhoI*, y posteriormente purificado. Carril 2: Marcador de peso molecular (1 kb) de Fermentas.

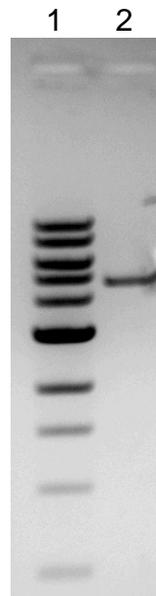


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa 1%, buffer TAE 1x, de plásmido digerido. Carril 1: Marcador de peso molecular (1 kb) de Fermentas. Carril 2: vector pGL3-Basic doblemente digerido con las enzimas de restricción *SacI* y *XhoI*.

Una vez hecha la doble digestión del producto de PCR y del vector pGL3-Basic, se procedió a su ligación y posterior transformación en células DH5- α . Luego de realizado esto, se hicieron *minipreps* para el análisis de los vectores.

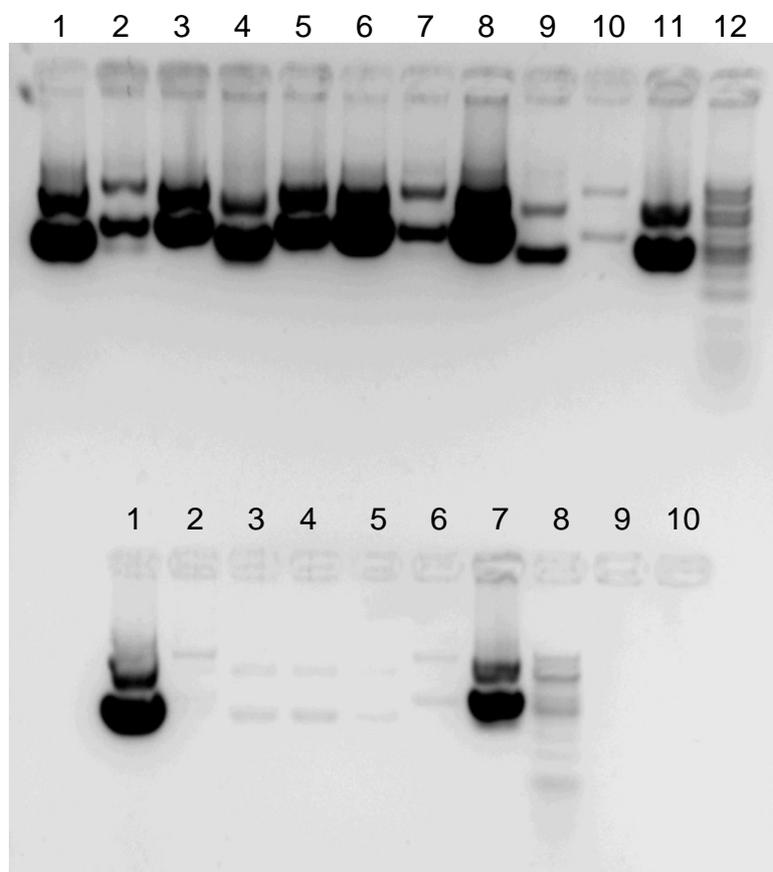


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa 1%, buffer TAE 1x, de plásmido obtenido por minipreps. Carriles superiores. Carril 1: vector pGL3-Basic. Carril 2 – 11: vector pGL3-Basic obtenido por las minipreps realizadas a los clones 1 – 10, respectivamente. Carril 12: Marcador de peso molecular (1 kb) de Axygen. Carriles inferiores. Carril 1: vector pGL3-Basic. Carril 2 – 6: vector pGL3-Basic obtenido por las minipreps realizadas a los clones 12 – 16, respectivamente. Carril 7: vector pGL3-Basic obtenido por la miniprep realizada al clon 11. Carril 8: Marcador de peso molecular (1 kb) de Axygen.

Para hacer una aproximación más acertada a la simple evaluación del tamaño de los plásmidos obtenidos en el gel anterior, se realiza una digestión con la enzima *HindIII* la cual corta en la posición 53 del sitio de clonado múltiple y en la posición 325 del inserto 2-1b, liberando un fragmento de 772pb.

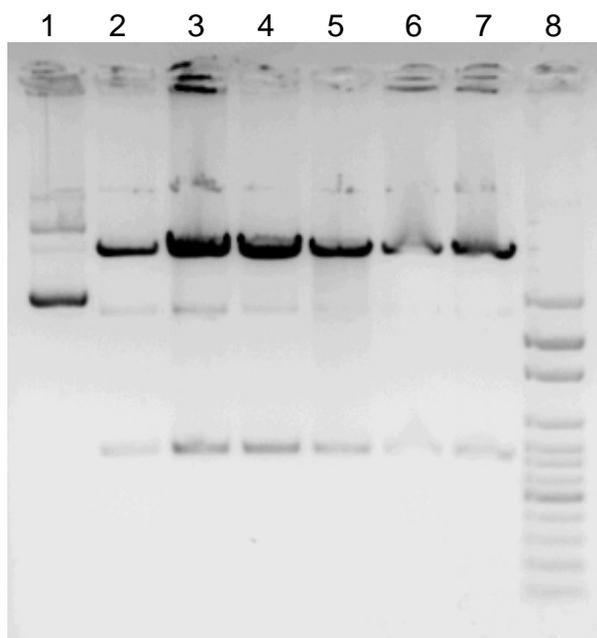


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa 1%, buffer TAE 1x, de las reacciones de digestión con la enzima *Hind*III. Carril 1: vector pGL3-Basic. Carril 2 – 7: vector pGL3-Basic con inserto obtenido por las *minipreps* realizadas a los clones 1, 2, 4, 5, 6 y 11, respectivamente, digerido con la enzima de restricción *Hind*III. Carril 8: Marcador de peso molecular (100 pb) de Axygen.

Los vectores pGL3-Basic correspondientes a los clones 1, 4 y 5 se enviaron a secuenciar al Institut Pasteur de Montevideo. Las secuencias y el blast realizado a partir de ellas, se muestran a continuación:

Tabla 4. Secuencia de los clones de pGL3-Basic con el promotor 2-1b de TPM1 (LMW) de *M. corti*.**Clon 1**

TTCAGNGGCATGTTANTTTCTTACTACCTTCTACTAAAATATATTTAATATTGTTAAAGGGCTTTAGATAAAAATTGCAGAATCTGGTGGTAAATTCATGTCAGCAAAGTAGAAGATTAGCAAATATTTGAACTTGGCTTAGTCAATCATGTTTCATGTTATGCCTTATTTAAAATTGGATACAAATAAATACAAACAAATAACAATAAGCAATAAGTCAATACATTTCTAGATTGGCACAGTTCTGTGACATGCTCACACACATCACCGGATTTATTACATGCATGCCCGCTCCGTAACCTGCAAGCTTTACTGCCACAGCATCAATCACATATGCTGTAAAAAAGCAACCCATTTAACACTTTACCCGTACTTGATATATAAAAATTCACCACGGTGGGATGTCTTTTTGCATAGACCTTTAGAAAATGTAATAAAAAGTCAGCACTAGTTTTTTAAACATTTACAACAGACACTTATATTTGTTCCATTAATCCTTAATATTACTTTATTAATAAAAATACGTTTGTTGATACATTGTTGTACGTTTATCGCTTTGCATTTACGANACTTAACAAAATCAATGAATTGTTGCCCTGGCCACA AAACTCNAATTGACTATACCTGANANCATTTTAGTATTTTCAATTAATAAAAATTTCAATGGAGTTCAAT TTCACATTTTAAAAAAGCAACTGCAATTCCAATACCGAGGACTTTATGTTTTAAAATTAAGTATTGATGCCAAGCAATGTGTGTGTAGCACAAAATTTGAAAAGACGTGTGGTATATCAACTTCCCACGAAAT GCGACACATCTGCATCGACCCCATCCAGGTCACCGTCTGACTCATGAATCATTTCGGTAAAAAGA CGAGTAAACTACACTTTAAGAGGAATCAAGAAAATTAACGTTTGTATTTGCGTAATAACTTGTATT GTGCGTTTGCACATTGATTCATAAAAATTCAGCAGCT

Clon 4

TTCAGNGGCANGTTATTTCTTACTACCTTCTACTAAAATATATTTAATATTGTTAAAGGGCTTTAGATAAAAATTGCAGAATCTGGTGGTAAATTCATGTCAGCAAAGTAGAAGATTAGCAAATATTTGAACTTGGCTTAGTCAATCATGTTTCATGTTATGCCTTATTTAAAATTGGATACAAATAAATACAAACAAATAACAATAAGCAATAAGTCAATACATTTCTAGATTGGCACAGTTCTGTGACATGCTCACACACATCACCGGATTTATTACATGCATGCCCGCTCCGTAACCTGCAAGCTTTACTGCCACAGCATCAATCACATATGCTGTAAAAAAGCAACCCATTTAACACTTTACCCGTACTTGATATATAAAAATTCACCNCGGTGGGATGTCTTTTTGCATAGACCTTTAGAAAATGTAATAAAAAGTCAGCACTAGTTTTTTAAACATTTACAACAGACACTTATATTTGTTCCATTAATCCTTAATATTACTTTATTAATAAAAATACGTTTGTTGATACATTGTTGTACGTTTATCGCTTTGCATTTACGAGACTTAACAAAATCAATGAATTGTTGCCCTGGCCACA AAACTCGAATTGACTATACCTGAAGATCATTTTAGTATTTTCAATTAATAAAAATTTCAATGGAGTTCAA TTTACATTTTAAAAAAGCAACTGCAATTCCAATACCGAGGACTTTATGTTTTAAAATTAAGTATTGATGCCAAGCAATGTGTGTGTAGCACAAAATTTGAAAAGACGTGTGGTATATCAACTTCCCACGAAA TCGACACATCTGCATCGACCCCATCCAGGTCACCGTCTGACTCATGAATCATTTCGGTAAAAAG ACGAGTAAACTACACTTTAAGAGGAATCAAGAAAATTAACGTTTGTATTTGCGTAATAACTTGTATT GTGCGTTTGCACATTGATTCATAAAAATTCAGCAGCT

Clon 5:

TTAATTTCTTACTACCTTCTACTAAAATATATTTAATATTGTTAAAGGGCTTTAGATAAAAATTGCAGATACTGGTGGTAAATTCATGTCAGCAAAGTAGAAGATTAGCAAATATTTGAACTTGGCTTAGTCAATCATGTTTCATGTTATGCCTTATTTAAAATTGGATACAAATAAATACAAACAAATAACAAATAAGCAATAA GTCAATACATTTCTAGATTGGCACAGTTCTGTGACATGCTCACACACATCACCGGATTTATTACATGCATGCCCGCTCCGTAACCTGCAAGCTTTACTGCCNCAGCNTCAATCACATATGCTGTAAAAAAGCA ACCATTTTAACTTTTACCCGTACTTGATATATAAAAATTCACCACGGTGGGATTGTCTTTTTGCATAGACCTTTAGAAAATGTAATAAAAAGTCAGCACTAGTTTTTTAAACATTTACAACAGACACTTATATTTG TTCCATTAATCCTTAATATTACTTTATTAATAAAAATACGTTTGTTGATACATTGGTTGTACGTTTATCGCTTTGCATTTACGAGACTTAACAAAATCAATGAATTGTTGCCCTGGCCACAAAATCGAATTGT ACTATACCTGAAGATCATTTTAGTATTTTCAATTAATAAAAATTTCAATGGAGTTCAATTTTCAATTTTAAA AAAGCAACTGCAATTCCAATACCGAGGACTTTATGTTTTAAAATTAAGTATTGATGCCAAGCAATGTGTGTGTAGCACAAAATTTGAAAAGACGTGTGGTATATCAACTTCCCACGAAATGCGACACATCTGCATCGACCCCATCCAGGTCACCGTCTGACTCATGAATCATTTCGGTAAAAAGACGAGTAAACTAC ACTTTAAGAGGAATCAAGAAAATTAACGTTTGTATTTGCGTAATAACTTGTATTGTGCGTTTGCACATTGATTCATAAAAATTCAGCAG

Clon 1						
Sequences producing significant alignments:						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
HQ229992.1	Mesocestoides corti tropomyosin 1 gene, partial cds, alternatively sp	1757	1757	100%	0.0	98%

Clon 4						
Sequences producing significant alignments:						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
HQ229992.1	Mesocestoides corti tropomyosin 1 gene, partial cds, alternatively sp	1755	1755	100%	0.0	99%

Clon 5						
Sequences producing significant alignments:						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
HQ229992.1	Mesocestoides corti tropomyosin 1 gene, partial cds, alternatively sp	1755	1755	100%	0.0	99%

Figura 23. Blast realizado a los clones de pGL3-Basic con el promotor 2-1b de TPM1 (LMW) de *M. corti*.

Estudio de la actividad promotora del gen de tropomiosina 1 (LMW) de *M. corti* en un sistema de cultivo celular heterólogo.

Para hacer las transfecciones celulares con el vector pGL3-Basic con el inserto con el promotor de interés (2-1b), se hizo una producción a gran escala del mismo. Para ello se llevó a cabo una midiprep a partir de dos colonias de células DH5- α transformadas con el vector, a través del kit AxyPrepTM Plasmid Midiprep Kit (Axygen).

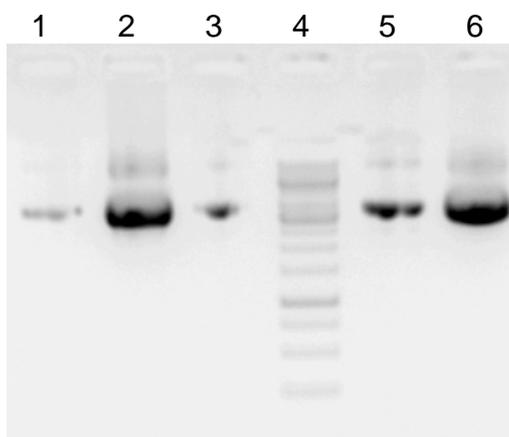


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa 1%, buffer TAE 1x, de los productos de midiprep obtenidos con AxyPrepTM Plasmid Midiprep Kit (Axygen). Carril 1: elución 1 del plásmido pGL3-Basic (2-1b) obtenido a partir de la colonia 1. Carril 2: elución 2 del mismo vector obtenido a partir de la colonia 1. Carril 3: elución 1 del mismo vector correspondiente a la colonia 1. Carril 4: Marcador de peso molecular (1 kb) de Fermentas. Carril 4: elución 1 del plásmido pGL3-Basic (2-1b) obtenido a partir de la colonia 2. Carril 5: elución 2 del plásmido pGL3-Basic (2-1b) obtenido a partir de la colonia 2.

Como control positivo de la reacción, se empleó el vector pGL4.75(hRluc/CMV), si bien luego no se obtuvieron los resultados esperados. A continuación se muestra una figura de dicho vector.

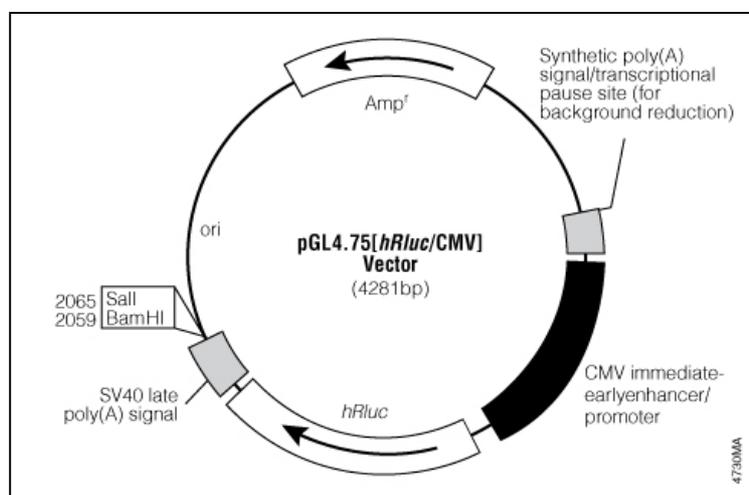


Figura 25. Vector pGL4.75(hRluc/CMV) de Promega, con la luciferasa como gen reportero. Fue utilizado en el ensayo, en principio, como control positivo, aunque luego no se observaron los resultados esperados.

En el Institut Pasteur de Montevideo y con la colaboración de la Dra. Mariela Bollati y la Msc. Inés Tiscornia, se efectuaron ensayos de transfección en cultivos celulares de NIH3T3 de ratón y de Hek 293, con los vectores mencionados anteriormente. Se midió la actividad de la luciferasa a diferentes tiempo para ambos tipos celulares (24, 48 y 72 horas), normalizándose dichos valores mediante la concentración de proteína total. La tabla siguiente muestra los datos obtenidos.

Tabla 5. Tabla de valores obtenidos del ensayo de transfección en diferentes líneas celulares. Se muestran los datos recogidos durante el ensayo en células NIH3T3 y Hek 293 a las 24, 48 y 72 horas de realizada la transfección, bajo diferentes condiciones. Cada ensayo se realizó por duplicado. Abreviaciones: sin transf: células sin transfectar; promotor mc: células transfectadas con el vector pGL3-Basic con el promotor de *M.corti*; control +: células transfectadas con el vector pGL4.75(hRluc/CMV); lipo: células transfectadas con lipofectamina.

		conc prot		prot mg/mL	luz 2s	luz 5s	luz 2s/prot	luz 5s/prot
NIH 3T3 48 Hrs.	sin transf	221.38	1550	1.5	217		140.03	
	sin transf	834.92	5844	5.8	232		39.70	
	promotor mc	795.08	5566	5.6	240		43.12	
	promotor mc	842.88	5900	5.9	281		47.63	
	control +	743.28	5203	5.2	212		40.75	
	control +	571.97	4004	4.0	210		52.45	
NIH 3T3 24 Hrs.	sin transf	822.96	5761	5.8	242		42.01	
	sin transf	723.36	5064	5.1	231		45.62	
	promotor mc	1002.25	7016	7.0	225		32.07	
	promotor mc	842.88	5900	5.9	265		44.91	
	control +	1062.01	7434	7.4	225		30.27	
	control +	954.44	6681	6.7	272		40.71	
HEK 293 48 Hrs.	lipo	885.64	6199	6.2		554		89.00
	lipo	1302.67	9119	9.1		514		56.00
	sin transf	958.42	6709	6.7	249	537	37.11	80.04
	sin transf	910.61	6374	6.4	230	591	36.08	92.72
	promotor mc	774.98	5425	5.4	439	1182	80.92	217.79
	promotor mc	902.07	6314	6.3	694	1442	109.91	228.28
	control +	857.53	6003	6.0	240	561	39.98	93.46
	control +	873.47	6114	6.1	247	527	40.40	86.19
HEK 293 24 Hrs.	sin transf	492.29	3446	3.4	242	553	70.23	160.47
	sin transf	723.36	5064	5.1	226	582	44.63	114.94
	promotor mc	711.41	4980	5.0	302	816	60.64	163.86
	promotor mc	938.50	6570	6.6	556	1264	84.63	192.40
	control +	910.61	6374	6.4	252	532	39.53	83.46
	control +	950.45	6653	6.7	242	553	36.37	83.12
HEK 293 72 Hrs.	lipo	1075.20	7526	7.5		515		68.43
	lipo	1027.81	7195	7.2		512		71.16
	promotor mc	909.34	6365	6.4		1375		216.01
	promotor mc	776.64	5437	5.4		1239		227.90
	control +	809.82	5669	5.7		514		90.67
	control +	824.03	5768	5.8		485		84.08

La gráfica siguiente muestra la actividad de la luciferasa lograda en las transfecciones en células Hek 293. Para las transfecciones realizadas en células NIH3T3 no se obtuvieron resultados positivos de actividad luciferasa.

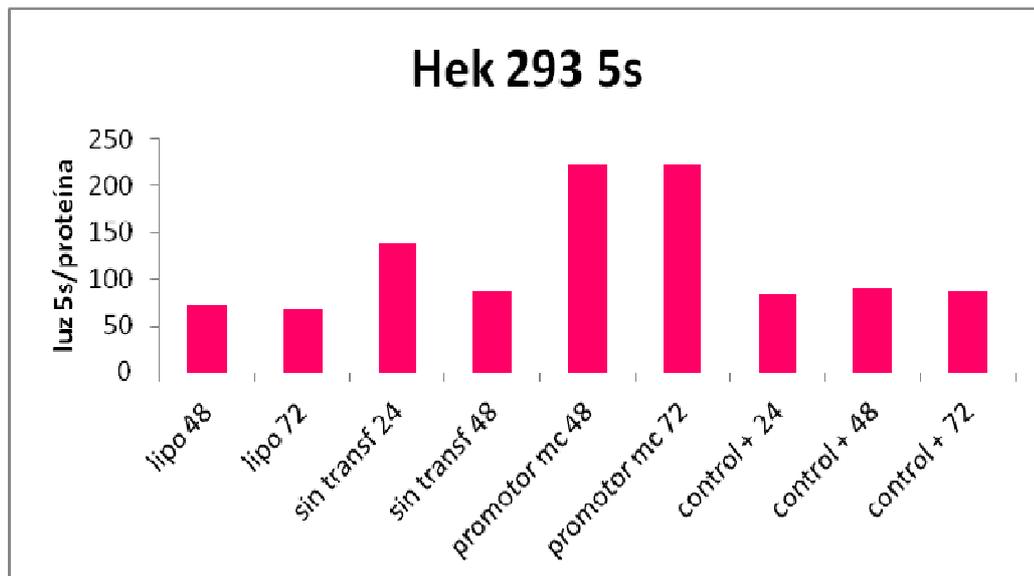


Figura 26. Gráfico que indica la variación de los valores promedio de la actividad de la luciferasa a las 24, 48 y 72 horas de realizada la transfección de células Hek 293 bajo diferentes condiciones. En las transfecciones de células NIH 3T3 no se registró actividad de la luciferasa.

Estudio del patrón de expresión tropomiosina 1 (LMW) en *M. corti*.

Con el fin de estudiar el patrón de expresión de la TPM1 (LMW) en *M. corti*, se decidió amplificar una región de su ADNc exclusivo de esta isoforma, diseñándose así *primers* para obtener la región entre los exones 4a (primer McTPM1-LF) y 9a (primer McTPM1-LR-T7) de su ADNc. El tamaño del fragmento esperado es de 389 pb más el promotor T7. Luego de dicha amplificación, se procedió a la purificación del fragmento de interés.



Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa 1%, buffer TAE 1x, del producto de PCR purificado. Carril 1: producto purificado resultado de la amplificación por PCR a partir de ADNc con *primers* McTPM1-LF y McTPM1-LR-T7. Carril 2: Marcador de peso molecular (100 pb) (Axygen).

Una vez purificado el fragmento de ADNc de 4a - 9a, se realizó la transcripción *in vitro* con el fin de obtener la sonda marcada para la hibridación *in situ* posterior. Durante la transcripción, se extrajeron alícuotas en diferentes etapas del proceso para evaluar el estado de la muestra.

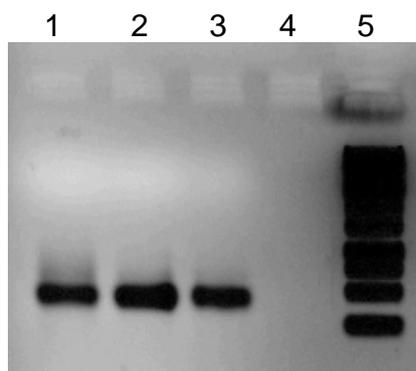


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa 1%, buffer TAE 1x, del producto de PCR purificado. Carril 1: sonda transcrita precipitada. Carril 2: sonda transcrita sin tratamiento con DNAsa. Carril 3: sonda transcrita tratada con DNAsa. Carril 4: libre. Carril 5: Marcador de peso molecular (100 pb) de Axygen.

Luego de la transcripción *in vitro* de la sonda y de su cuantificación por Dot Blot, se procedió a realizar la hibridación *in situ*, mostrándose su resultado a continuación:

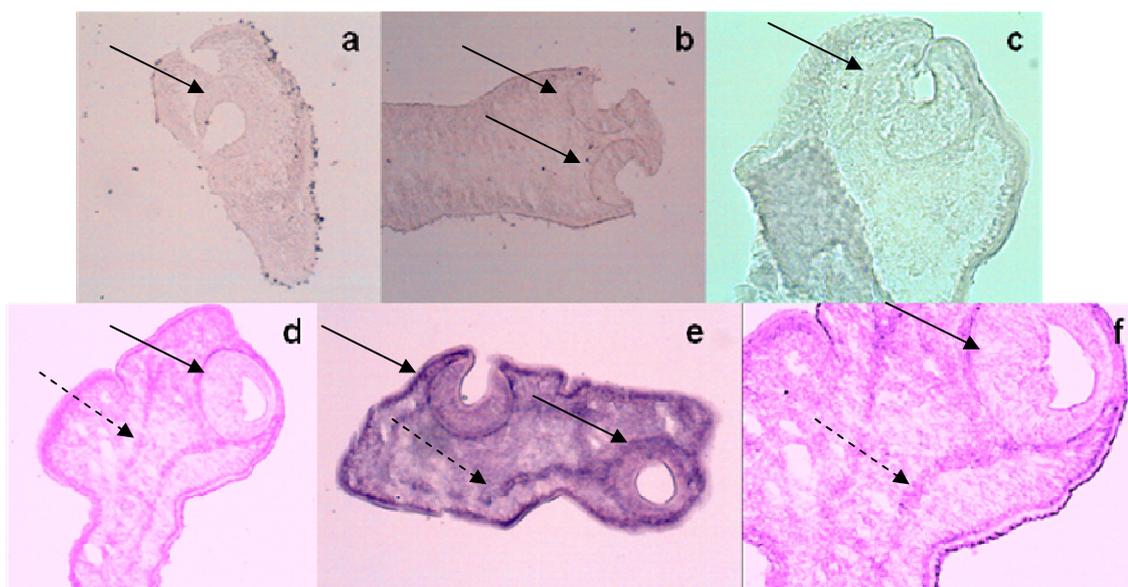


Figura 29. Hibridación *in situ* de sobre *M. corti*. **a-c)** Control sin sonda a 10x, 10x y 20x, respectivamente. **d-f)** Tratamiento de *M. corti* con una sonda antisentido de la TPM1 (LMW) de *M. corti* a 10x, 10x y 20x, respectivamente. Con las flechas continuas se indican las ventosas, y con las semicontinuas la capa muscular interna.

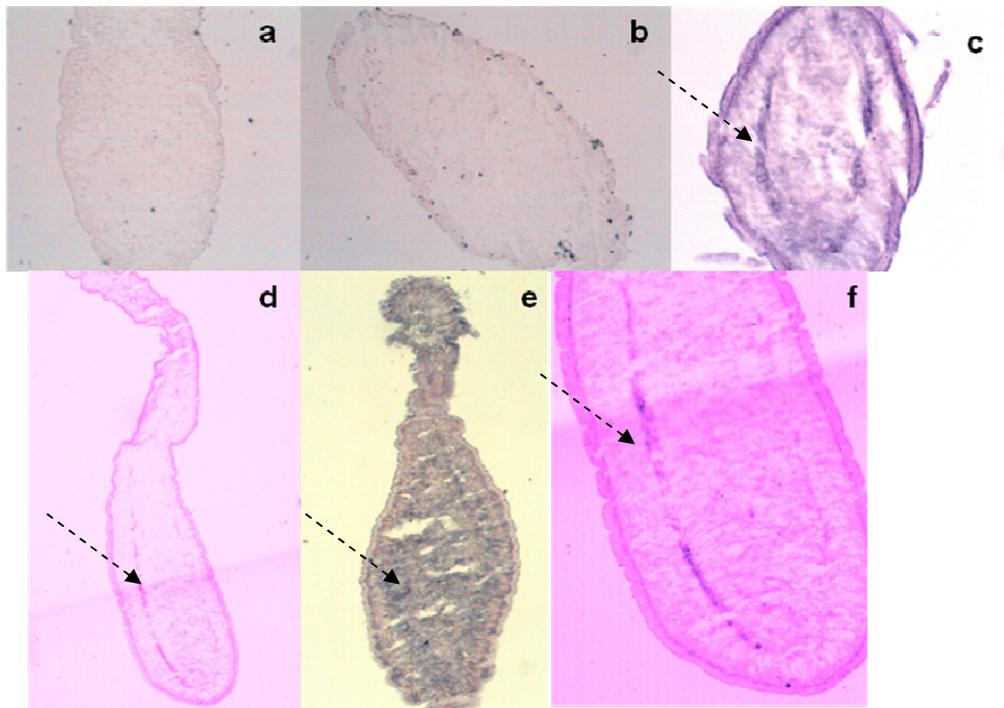


Figura 30. Hibridación *in situ* de sobre *M. corti*. **a-b)** Control sin sonda a 10x. **c-f)** Tratamiento de *M. corti* con una sonda antisentido de la TPM1 (LMW) de *M. corti* a 10x a excepción de la figura d) que es a 4x. Con las flechas semicontinuas se indica la capa muscular interna.

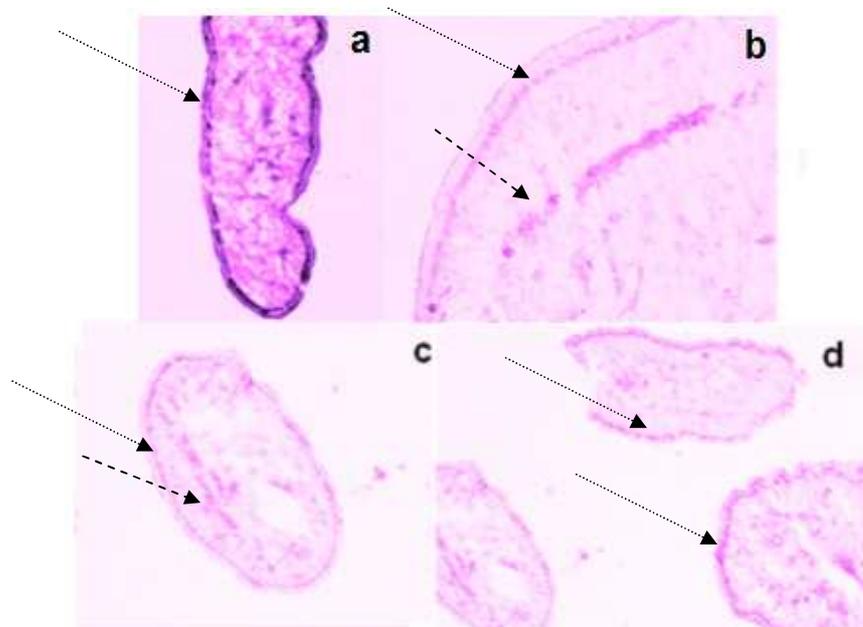


Figura 31. Hibridación *in situ* de sobre *M. corti*. **a-d)** Tratamiento de *M. corti* con una sonda antisentido de la TPM1 (LMW) de *M. corti* a 10x a excepción de la figura b) que es a 4x. Con las flechas semicontinuas se indica la capa muscular interna y con las flechas punteadas la musculatura subtegumentaria.

6) DISCUSIÓN

Determinación del inicio aproximado de la transcripción del gen de tropomiosina 1 (LMW) de *M. corti* mediante RT-PCR.

En este trabajo se intentó determinar mediante dos métodos independientes el inicio aproximado de la transcripción de la TPM1 (LMW) de *M. corti*.

La búsqueda realizada como una primera aproximación experimental del inicio de transcripción de la proteína a través de los programas bioinformáticos ya mencionados, no sería una buena estrategia ya que las posiciones de inicio de transcripción génica predichas por los diferentes programas no son similares a las posiciones ya caracterizadas para otros genes, así como tampoco son comparables entre sí respecto a un mismo gen. Esto se debe a que estos programas bioinformáticos han sido entrenados para detectar promotores con organismos muy distantes evolutivamente de *M. corti*.

El estudio mediante la técnica de RT-PCR usando diferentes combinaciones de *primers* diseñados teniendo en cuenta la ausencia de un ATG río arriba del codón de inicio de la traducción de la proteína y que el tamaño promedio de la región 5'UTR es probablemente menor a 100 nucleótidos, fue más concluyente. En éste se logró determinar la localización aproximada del +1 de transcripción de la proteína ubicándola en la región intermedia entre las secuencias complementarias a los *primers* McTPM1-81LMW y McTPM1-25LMW. A pesar de que en el carril 1 de la figura 43 se observa una banda de baja intensidad, se considera que ésta corresponde a contaminación con ADN_g amplificado con los *primers* McTPM1-81LMW / RvMcTropo5'. Esto es así debido a que presenta un tamaño muy similar a la banda de ADN_g amplificada con el mismo juego de *primers*, y no de 261 pb como se esperaría.

Amplificación y clonado de la región promotora basal del gen de tropomiosina 1 (LMW) de *M. corti* en un vector con la luciferasa como gen reportero.

En la reacción de amplificación del fragmento intrónico 2-1b que contiene el promotor de TPM1 (LMW) se lograron los resultados esperados con los dos juegos de *primers* previamente diseñados, indicando su especificidad para amplificar la región deseada.

Comparando los resultados de las minipreps realizadas a diferentes colonias, podemos decir que gran parte de ellas presentaban el vector con un inserto ligado ya que por su mayor tamaño, presentan una menor migración en la electroforesis.

Se hizo una primera aproximación mediante enzimas de restricción para analizar si el inserto ligado al vector era el inserto de interés y resultó que todos los vectores estudiados dieron como productos de digestión fragmentos de los tamaños esperados de acuerdo a la enzima utilizada (*HindIII*).

Posteriormente, se confirmó mediante secuenciación del vector extraído de algunas colonias, que el inserto ligado a éste se trataba efectivamente del fragmento de interés (región promotora basal de TPM1 (LMW) de *M. corti*).

Estudio de la actividad promotora del gen de tropomiosina 1 (LMW) de *M. corti* en un sistema de cultivo celular heterólogo.

El vector empleado como control positivo de la reacción de transfección (pGL4.75(hRluc/CMV) Promega) fue elegido por su similitud con el vector pGL3-Basic (Promega) en el cual se ligó el promotor del gen de TPM1 (LMW) de *M. corti* y, además, por poseer un promotor enhancer para la alta expresión del gen de luciferasa. Éste fue usado en concentraciones variables en los ensayos realizados, no obstante, no se observó expresión de luciferasa en ninguna de las líneas celulares empleadas y estos resultados fueron invariables en el tiempo. Una de las posibles causas puede ser que determinados factores de transcripción interaccionen de manera incorrecta con el *enhancer*, o que esta región no sea reconocida por la maquinaria de transcripción de ninguna de las dos líneas celulares.

En los ensayos de transfección realizados en las células NIHT3T, además de no obtenerse resultados con el vector empleado como control positivo, como ya se mencionó anteriormente, tampoco se registró actividad de luciferasa con el vector con la región promotora basal de la TPM1 (LMW) de *M. corti*. Sin embargo, en las células Hek 293 se observó una variación en la expresión del gen reportero respecto a las células tratadas únicamente con lipofectamina, y a medida que transcurrió el tiempo, esta variación se amplió. Esto demuestra que el proceso de transfección fue correcto y que el hecho de que no se hayan registrado resultados en las células NIHT3T se debería a una causa interna. Una de las razones posibles puede ser que los factores de transcripción presentes en este tipo de células no reconozcan o no se puedan unir a la región promotora transfectada, impidiendo así la transcripción del gen de luciferasa.

Estudio del patrón de expresión tropomiosina 1 (LMW) en *M. corti*

Comparando los resultados obtenidos en la hibridación *in situ* entre los tratamientos con sonda antisentido y sin sonda (tratamientos control), vemos que se pudo identificar un patrón de expresión de la TPM1 (LMW) de *M. corti* ya que los resultados muestran una clara señal generada por la sonda a nivel subtegumentario, en la capa muscular interna y en alrededor de las ventosas de estos organismos.

Este patrón de expresión de la proteína es coherente con los resultados esperados, teniendo en cuenta que están asociadas a las células musculares debido a la función que cumplen. Los resultados obtenidos de la hibridación *in situ* comparten además, parte del patrón de expresión de proteínas mostrado por la inmunohistoquímica realizada con un anticuerpo que reconoce ambas TPM (1 y 2) (Koziol *et al.*, 2011).

Cabe mencionar que los patrones de expresión de la proteína obtenidos han sido logrados consistentemente en nuevos ensayos realizados en el laboratorio. Sin embargo sería oportuno repetir el experimento añadiendo un control con una sonda *sense* o con una sonda irrelevante. También sería interesante hacer un estudio de los niveles de expresión de la proteína a diferentes tiempos, pudiendo analizar si se trata de un buen candidato para un control interno para experimentos de hibridación tanto *in toto* como *in situ*.

7) CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- El uso de los programas bioinformáticos empleados con el fin de localizar aproximadamente el sitio de inicio de la transcripción del gen de TPM1 (LMW) no fue una herramienta útil de trabajo, ya que los resultados logrados en los controles positivos no son comparables entre sí.

- La estrategia de trabajo plateada para mapear el sitio aproximado del inicio de transcripción de TPM1 (LMW) de *M. corti* funcionó, pudiéndose comprobar la especificidad de los *primers* mediante la PCR y ubicando el +1 de transcripción en una posición intermedia entre la región complementaria a los *primers* McTPM1-25LMW y McTPM1-81LMW.

- Se logró clonar la región promotora basal del gen de TPM1 (LMW) de *M. corti* en un vector con la luciferasa como gen reportero.

- Los ensayos de transfección fueron exitosos, notándose un claro aumento de la actividad de la luciferasa en las células Hek 293 transfectadas con el promotor TPM1 (LMW) de *M. corti*.

- Fue posible determinar un patrón de expresión para la TPM1 (LMW) de *M. corti*, localizando su ARNm a nivel de las ventosas, en la musculatura subtegumentaria y en la musculatura interna de los organismos.

- Pensamos que la caracterización del promotor de TPM1 (LMW) en *M. corti* es sumamente importante para un organismo donde no hay un genoma secuenciado y son casi inexistentes los promotores caracterizados. Esto es un primer paso hacia la optimización de la expresión de transgenes en este organismo, ya sea en forma transitoria, o mediante integración estable en cultivos celulares, ya que tampoco hay vectores descritos para ser usados. Para ello, uno de los posibles caminos a seguir sería el estudio de la actividad promotora del fragmento 2-1b en *M. corti* mediante electroporación.

APÉNDICE 1. Primers.

Nombre	Secuencia (5' - 3')	T _m
McTPM1-21b-F28	TAGAGCTCCATTGAGTACGTTAATATTTCAAGTGGC	67,2°C
McTPM1-21b-R	TATCTCGAGTAACTTTGAATGGCGCACCAAC	66,8°C
McTPM1-21b-F1	TAGAGCTCGTAAGTTAACACCATTTTGACGTCATTG	67,2°C
McTPM1-LF	TCAACAGGGTGCTGATGAGC	59,4°C
McTPM1-LR-T7	TCTAATACGACTCACTATAGGGAGGAGAGGGTTTCTTTGACTCG	64,7°C
McTPM1-25LMW	CCAGTTGGTGCGCCATTCAAAG	62,1°C
McTPM1-+13LMW	GGCTCCGCGACTGTTGAAACTG	64,0°C
McTPM1-81LMW	GTGCGTTTGCACATTTGATTCATTA	58,1°C
RvMcTropo5'	AAGACGAATGCGGCGGGTTCATG	61,3

APÉNDICE 2. Soluciones y medios

Hibridación *in situ*

- SSC 20 X

NaCl	3 M
Citrato trisódico	0,3 M

Ajustar pH a 7,0

- Solución de Denhardt 50X

Ficoll 400	1 % w/v
Polyvinilpyrolidona	1% w/v
Seroalbúmina bovina	1% w/v

- MAB

Ácido maleico	100 mM
NaCl	150 mM

- Solución de pre-hibridación

SSC	5 X
Formamida desionizada	50 % v/v
Dextrán sulfato	10 % w/v
ARNt de levadura	1 mg/ml
Solución de Denhardt	1 X

- Buffer AP

Tris Base	100 mM
MgCl ₂	25 mM
NaCl	150 mM

Ajustar a pH 9,5 con HCl

BIBLIOGRAFÍA

Ax, P., 1996. *Multicellular Animals - A New Approach to the Phylogenetic Order in Nature* – Vol I Springer Verlag, Berlin.

Alvite, G., Esteves, A. (2009). *Echinococcus granulosus* tropomyosin isoforms: From gene structure to expression analysis. *Gene* 433: 40–49.

Baguñà, J., Riutort, M., 2004. Molecular phylogeny of the Platyhelminthes. *Can. J. Zool.* 82: 168-193.

Barrett, N. J., Smyth, J. D., Ong, S. J. (1982). Spontaneous sexual differentiation of *Mesocestoides Corti* tetrathyridia *in vitro*. *Int. J. Parasitol.* 12 (4): 315-322.

Berenguer, J. (2006). *Manual de Parasitología: Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario*. I Edición de la Universidad de Barcelona. Barcelona, España.

Brehm, K., Spiliotis, M. (2008). Recent advances in the *in vitro* cultivation and genetic manipulation of *Echinococcus multilocularis* metacestodes and germinal cells. *Exp. Parasitol.* 119 : 506–515

Brusca, R. C., Brusca, G. J. (2003). *Invertebrates*. Sunderland, Mass., Sinauer Associates.

Bryce, N. S., Schevzov, G., Ferguson, V., Percival, J. M., Lin, J. J. C., Matsumura, F., Bamburg, J. R., Jeffrey, P. L., Hardeman, E. C., Gunning, P., Weinberger, R. P. (2003). Specification of Actin Filament Function and Molecular Composition by Tropomyosin Isoforms. *Molecular Biology of the Cell.* 14: 1002–1016.

Choi, W. Y., Kim, B. C., Choi, H. S. (1967). The first case of human infection with tapeworms of the genus *Mesocestoides* in Korea. *Kisaengchunghak Chapchi*, 5 (1): 60-64. (Resumen).

Cooper, J. A. (2002). Actin Dynamics: Tropomyosin Provides Stability. *Current Biology.* 12: 523-525.

Correnti, J. M., Jung, E., Freitas, T. C., Pearce, E. J. (2007). Transfection of *Schistosoma mansoni* by electroporation and the description of a new promoter sequence for transgene expression. *Int. J. Parasitol.* doi:10.1016/j.ijpara.2007.02.011

Crosbie, P. R., Nadler, S. A., Platzer, E. G., Kerner, C., Mariaux, J., Boyce, W. M. (2000). Molecular systematics of *Mesocestoides* spp (cestoda: mesocestoididae)

from domestic dogs (*Canis familiaris*) and coyotes (*Canis latrans*). *J. Parasitol.*, 86 (2): 350 – 357.

De Moraes Mourao, M., Dinguirard, N., Franco, G. R., Yoshino, T. P. (2009). Phenotypic screen of early-developing larvae of the blood fluke, *Schistosoma mansoni*, using RNA interference. *PLoS Negl Trop Dis* 3 (8): e502. doi: 10.1371/journal.pntd.0000502

Egger, B., Steinke, D., Tarui, H., De Mulder, K., Arendt, D., Borgonie, G., Funayama, N., Gschwentner, R., Hartenstein, V., Hobmayer, B., Hooge, M., Hrouda, M., Ishida, S., Kobayashi, C., Kuales, G., Nishimura, O., Pfister, D., Rieger, R., Salvenmoser, W., Smith, J., Technau, U., Tyler, S., Agata, K., Salzburger, W., Ladurner, P., 2009b. To be or not to be a flatworm: the acoel controversy. *PLoS One* 4, e5502.

Fernández, C., Gregory, W. F., Loke, P., Maizels, R. M. (2002). Full-length-enriched cDNA libraries from *Echinococcus granulosus* contain separate populations of oligo-capped and trans-spliced transcripts and a high level of predicted signal peptide sequences. *Molecular & Biochemical Parasitology* 122: 171-180.

Fuentes, M. V., Galan-Puchades, M. T., Malone, J. B. (2003). Short report: a new case report of human *Mesocestoides* infection in the United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 68 (5): 566-567.

Gimba, E. R. P., Chemale, G., Farias, S. S., Zaha, A. (2000). Cloning and characterization of *Echinococcus granulosus* (Cestode). EgactI and EgactII actin gene promoters and their functional analysis in the NIH3T3 mouse cell line. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 33: 1283-1292.

Gunning, P., O'Neill, G., Hardeman, E. (2008). Tropomyosin-Based Regulation of the Actin Cytoskeleton in Time and Space. *Physiol. Rev.* 88: 1–35.

Gunning, P. W., Schevzov, G., Kee, A. J., Hardeman, E. C. (2005). Tropomyosin isoforms: divining rods for actin cytoskeleton function. *Trends in Cell Biology*. 15 (6): 332-341.

Hitchcock-DeGregori, S. E., Singh, A. (2010). What makes tropomyosin an actin binding protein? A perspective. *Journal of Structural Biology* 170: 319–324.

Hooper, S. L., Thuma, J. B. (2005). Invertebrate Muscles: Muscle Specific Genes and Proteins. *Physiol. Rev.* 85: 1001–1060.

Hooper, S. L., Hobbs, K. H., Thuma, J. B. (2008). Invertebrate muscles: Thin and thick filament structure; molecular basis of contraction and its regulation, catch and asynchronous muscle. *Progress in Neurobiology*. 86: 72–127.

- Irimia, M., Maeso, I., Gunning, P. W., Garcia-Fernandez, J., Roy, S. W. (2010). Internal and external paralogy in the evolution of tropomyosin genes in metazoans. *Mol. Biol. Evol.* 27: 1504-17.
- Kawamoto, F., Fujioka, H., Mizuno, S., Kumada, N., Vogt, M. (1986): Studies on the post-larval development of cestodes of the genus *Mesocestoides*: shedding and further development of *M. lineatus* and *M. corti* tetrathyridia *in vivo*. *Int. J. Parasitol.* 16 (4): 323-331.
- Kozak, M. (1989) The scanning model for translation: an update. *J. Cell. Biol.* 108: 229–241
- Keeseon, S. *et al.* (1992). Second case of human infection with *Mesocestoides lineatus* in Korea. *Korean J. Parasitol.*, 30 (2): 147-150.
- Koziol, U. (2006). *Estudio sobre genes LIM-HD en platelmintos*. Tesis de Grado en Ciencias Biológicas, Orientación Zoología de Invertebrados. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- Koziol, U. (2009). *Caracterización de células proliferantes en Mesocestoides corti (Cestoda), y de genes pumilio como posibles marcadores moleculares de las mismas*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- Koziol, U., Castillo, E. (2011). Cell proliferation and differentiation in cestodes. *Transworld Research Network*. 37/661 (2).
- Koziol, U., Costábile, A., Domínguez, M. F., Iriarte, A., Alvite, G., Kun, A., Castillo, E. (2011). Developmental expression of high molecular weight tropomyosin isoforms in *Mesocestoides corti*. *Molecular & Biochemical Parasitology* 175: 181–191.
- Koziol, U., Dominguez, M.F., Marin, M., Kun, A. and Castillo, E. (2010). Stem cell proliferation during *in vitro* development of the model cestode *Mesocestoides corti* from larva to adult worm. *Front. Zool.*, 7:22.
- Koziol, U., Iriarte, A., Castillo, E., Soto, J., Bello, G., Cajarville, A., Roche, L., Marín, M. (2009). Characterization of a putative hsp70 pseudogene transcribed in protoscoleces and adult worms of *Echinococcus granulosus*. *Gene* 443: 1–11.
- Lalanne, A.I., 2003. Estudios moleculares del desarrollo de cestodos: genes Hox y LIM-homeobox de *Echinococcus granulosus* y *Mesocestoides corti*. Tesis de maestría. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- Lalanne, A. I., Britos, L., Ehrlich, R., Castillo, E. (2004). *Mesocestoides corti*: a LIM-homeobox gene upregulated during strobilar development. *Exp. Parasitol.* 108 (3-4): 169-175.

- Lehman, W. *et al.* (2000). Tropomyosin and actin isoforms modulate the localization of tropomyosin strands on actin filaments. *J. Mol. Biol.* 302: 593–606.
- Littlewood, D.T.J., 2006. The evolution of parasitism in flatworms. In: Maule, A.G., Marks, N.J. (Eds.), *Parasitic Flatworms. Molecular Biology, Biochemistry, Immunology, Physiology*, CABI Publishing, Oxfordshire.
- Loos-Frank, B., 1991. One or two intermediate hosts in the life of *Mesocestoides* (Cyclophyllidea, Mesocestoididae)? *Parasitol Res* 77, 726-728.
- Markell, E. K., Vogge, M., John, D. T. (1992). *Medical Parasitology*. 7^a ed. México, W. B. Saunders Company.
- Markoski, M. M., Bizarro, C. V., Farias, S., Espinoza, I., Galanti, N., Zaha, A., Ferreira, H. B. (2003). Vitro segmentation induction of *Mesocestoides corti* (Cestoda) tetrathyridia. *J. Parasitol.* 89 (1): 27-34. (Resumen).
- Novak, M. (1972). Quantitative studies on the growth and multiplication of tetrathyridia of *Mesocestoides corti* Høeppli, 1925 (Cestoda: Cyclophyllidea) in rodents. *Can. J. Zool.*, 50 (9): 1189-1196.
- Padgett, K.A., Boyce, W.M., 2005. Ants as first intermediate hosts of *Mesocestoides* on San Miguel Island, USA. *J Helminthol* 79, 67-73.
- Rinaldi, G., Morales, M. E., Cancela, M., Castillo, E., Brindley, P. J., *et al.* (2008). Development of Functional Genomic Tools in Trematodes: RNA Interference and Luciferase Reporter Gene Activity in *Fasciola hepatica*. *PLoS Negl Trop Dis* 2(7): e260. doi:10.1371/journal.pntd.0000260
- Ruppert, E., Barnes, R. (1996). *Zoología de los invertebrados*. 6^a ed. España, Mc Graw-Hill Interamericana.
- Spiliotis, M., Lechner, S., Tappe, D., Scheller, C., Krohne, G., Brehm, K. Transient transfection of *Echinococcus multilocularis* primary cells and complete *in vitro* regeneration of metacestode vesicles. (2008) *Int. J. Parasitol.* 38 : 1025–1039.
- Spiliotis, M., Mizukami, C., Oku, Y., Kiss, F., Brehm, K., Gottstein, B. (2010). *Echinococcus multilocularis* primary cells: Improved isolation, small-scale cultivation and RNA interference. *Molecular & Biochemical Parasitology* 174: 83–87.
- Tyler, S., Hooge, M., 2004. Comparative morphology of the body wall of flatworms (Platyhelminthes). *Can. J. Zool.* 82: 194–210.

Bibliografía

Webster, J. D. (1949). Fragmentary studies on the life history of the cestode *Mesocestoides latus*. *J. Parasitol.*, 35: 83-90.