



Facultad de Ciencias
Universidad de la República



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

TESINA DE GRADUACIÓN
LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ORIENTACIÓN BIOLOGÍA MOLECULAR
Sección Bioquímica – Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad de la República

Aislamiento y caracterización de genes
tipo *nanos* en platelmintos parásitos

Rodrigo Bizzozero

Orientación: *Dra. Estela Castillo*

Tribunal: *Gabriela Alvite, Gabriela Bedó*

Noviembre, 2010

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a Estela, por su paciencia y comprensión, que han sido sin duda, necesarios para poder concluir este trabajo. Por abrirme paso dentro del camino de la investigación científica. Por enseñarme tanto acerca de la biología molecular y bioquímica, como también acerca de los valores de vida.

Agradezco también a todos mis compañeros del laboratorio 313, que siempre me dieron un lugar en la mesada y en su amistad. Por compartir lindos días de trabajo y complicidad científica, y por apoyarme en todo momento. Especialmente quiero agradecer a Uriel, Alicia y Fernanda, que fueron de alguna manera mis “cotutores”, enseñándome y trabajando junto a mí en nombradas ocasiones. También quiero agradecer a Ana, Manuel, Santiago, Lucía, Cecilia, y Germán, por su disponibilidad para ayudar o, simplemente por compartir charlas, almuerzos, etc.

También quiero expresar mi reconocimiento a todos los investigadores/as y compañeros/as de la sección, que siempre estuvieron disponibles para brindar su ayuda en lo que fuera necesario.

En especial, agradezco a mi familia, por su amor incondicional. A mis padres, por su apoyo en mis estudios. Ellos han estado ahí todas las veces que he estado cerca de abandonar el camino debido a diferentes factores y dificultades. A mis hermanos Federico y Bruno, a Sabrina y Ailen. A mis primos/as y tíos/as (en especial a mi tía científica, Beatriz), y a mis abuelos/as.

Finalmente, no me olvido de todos mis amigos y amigas, que de diferentes formas han contribuido a que este trabajo pueda haber concluido.

RESUMEN

Se ha descubierto en *Dugesia japonica* y en *Schmidtea mediterranea* (Tricladida) que uno de los genes que se expresan en neoblastos durante la proliferación y diferenciación de las células germinales, es el gen ortólogo de *nanos*, llamados *Djnos* y *Smednos* respectivamente. Los ensayos de hibridación e interferencia en estos platelmintos, han permitido suponer que la expresión de este gen está relacionada con la proliferación y diferenciación de líneas celulares germinales en planarias y probablemente también lo esté en otros platelmintos.

En este trabajo se buscaron en diferentes bases de datos secuencias de genes tipo *nanos* en diversos organismos. A partir de una región altamente conservada de estos genes, se diseñaron cebadores degenerados que permitieron amplificar la misma en *Mesocestoides corti* y *Fasciola hepatica*. Posteriormente se aislaron los fragmentos amplificados y de acuerdo a respectivas secuencias, se identificaron al menos dos genes tipo *nanos*, uno para cada uno de los platelmintos de este estudio. Los mismos han sido denominados *Mcnos* y *Fhnos*, en *M. corti* y *F. hepatica* respectivamente. Una vez conocida la secuencia del fragmento para cada gen, se diseñaron cebadores específicos que permitieran amplificar los extremos 3' y 5' de estos genes, y se logró amplificar y secuenciar el extremo 3' del gen *Mcnos*. A partir de este último, se planteó el diseño de sondas específicas que hibriden con el extremo 3' del ARN mensajero de *Mcnos*, para realizar en un futuro posibles ensayos de hibridación. Por último, se realizó un análisis filogenético que comprende las nuevas secuencias de los fragmentos de estos genes descubiertos.

Este trabajo ha permitido por un lado; conocer la existencia de estos genes en dos platelmintos cuyo genoma no está disponible, y por otro; permitirá profundizar en el estudio del posible rol de este marcador durante la proliferación y diferenciación de líneas celulares germinales en estos parásitos.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| AGRADECIMIENTOS | 1 |
| RESUMEN | 3 |
| ÍNDICE | 5 |
| INTRODUCCIÓN | 9 |
| Generalidades del phylum Platyhelminthes (Platelmintos)..... | 10 |
| Platelmintos parásitos: <i>Mesocestoides corti</i> y <i>Fasciola hepatica</i> | 14 |
| <i>Mesocestoides corti</i> : Caracteres generales y ciclo de vida | 16 |
| <i>Fasciola hepatica</i> : Caracteres generales y ciclo de vida | 22 |
| Marcadores moleculares de neoblastos en platelmintos | 27 |
| Homología funcional y estructural de Nanos..... | 30 |
| Objetivos de este trabajo | 35 |
| Objetivo general..... | 35 |
| Objetivo específico | 35 |
| Abordaje y estrategia experimental para esta investigación..... | 36 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 39 |
| Búsqueda de secuencias de genes tipo <i>nanos</i> en bases de datos | 40 |
| Análisis de secuencias de genes tipo <i>nanos</i> encontradas..... | 40 |
| Alineamiento de las secuencias de genes tipo <i>nanos</i> encontradas..... | 40 |
| Análisis filogenéticos..... | 41 |
| Diseño de cebadores degenerados para realizar PCR..... | 41 |
| Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 42 |
| - PCR con cebadores degenerados sobre ADN copia y ADN genómico | 42 |
| - PCR con cebadores degenerados sobre ADN plasmídico (Mp) | 42 |
| - Condiciones de las etapas reacción | 43 |
| Electroforesis en gel de los fragmentos de ADN..... | 44 |
| - Geles de agarosa..... | 44 |
| - Geles de poliacrilamida..... | 44 |
| Purificación de los fragmentos amplificados por medio de PCR | 45 |

| | |
|---|----|
| Concentración del ADN purificado..... | 45 |
| Clonado en vector plasmídico: Ligación y Transformación..... | 46 |
| - Ligación..... | 46 |
| - Transformación | 47 |
| Obtención de ADN plasmídico | 48 |
| Secuenciación - Análisis de secuencias | 49 |
| Digestión con enzimas de restricción..... | 49 |
| - Digestión de vectores con enzimas de restricción HaeIII y Accl | 49 |
| - Digestión de vectores con enzima de restricción EcoRI | 50 |
| Amplificación rápida de los extremos de ADN copia (RACE) | 51 |
| - Transcripción Inversa (RT)..... | 51 |
| - Diseño de cebadores específicos F y R..... | 51 |
| - Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 53 |
| - Condiciones de las etapas reacción | 53 |
| Aislamiento y secuenciación de los extremos amplificados | 55 |
| Diseño de sondas para hibridación <i>in situ</i> | 55 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 56 |
| Búsqueda de secuencias de genes tipo <i>nanos</i> en bases de datos | 57 |
| Análisis de las secuencias de ADN genómico en <i>E. multilocularis</i> | 57 |
| Alineamiento de las secuencias de genes tipo <i>nanos</i> encontradas..... | 61 |
| Diseño de cebadores degenerados para realizar PCR..... | 63 |
| PCR con cebadores degenerados sobre ADN copia y ADN genómico | 65 |
| Búsqueda de genes tipo <i>nanos</i> en <i>M. corti</i> y <i>F. hepatica</i> | 66 |
| Búsqueda de genes tipo <i>nanos</i> en <i>M. corti</i> y <i>F. hepatica</i> | 67 |
| - Serie A | 67 |
| - Clonación | 67 |
| - Secuenciación..... | 69 |

ÍNDICE

| | |
|---|------------|
| - Digestión con enzimas de restricción..... | 71 |
| Búsqueda de genes tipo <i>nanos</i> en <i>M. corti</i> y <i>F. hepatica</i> | 76 |
| - Serie C | 76 |
| Búsqueda de genes tipo <i>nanos</i> en <i>M. corti</i> y <i>F. hepatica</i> | 81 |
| - Selección final de clones recombinantes para secuenciación..... | 81 |
| - Preparaciones de ADN plasmídico con insertos de interés | 81 |
| - Digestión de vectores con enzima de restricción EcoRI | 83 |
| - Selección de clones a secuenciar | 85 |
| Diseño de cebadores específicos para RACE..... | 94 |
| PCR de extremos 3' de <i>Mcnos</i> y <i>Fhnos</i> | 96 |
| Aislamiento del extremo 3' <i>Mcnos</i> | 97 |
| Caracterización del extremo 3' <i>Mcnos</i> | 100 |
| Diseño de las sondas para hibridación <i>in situ</i> en <i>M. corti</i> | 105 |
| Análisis filogenético..... | 108 |
| CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS | 111 |
| ANEXO..... | 114 |
| (1) Secuencias descargadas de las bases de datos | 115 |
| (2) Herramientas informáticas utilizadas | 116 |
| (3) Marcadores de Peso Molecular (MPM) | 117 |
| (4) Cebadores utilizados para secuenciación | 118 |
| (5) Secuencias específicas de reconocimiento de HaeIII y Accl | 118 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 119 |

INTRODUCCIÓN

Generalidades del phylum Platyhelminthes (Platelmintos)

El phylum Platyhelminthes (del griego; *platy*, “plato”; *helminth*, “gusano”) comprende un gran número de especies vivientes que presentan diversas formas corporales. Estos organismos incluyen numerosos parásitos y formas de vida libre. Los platyhelminthes son organismos metazoarios de simetría bilateral. Su cuerpo es aplanado dorso-ventralmente y de aspecto vermiforme, sin verdadera segmentación. A partir del mesodermo se originan capas musculares bien desarrolladas, incluyendo fibras longitudinales y circulares, y los órganos reproductivos. Son acelomados y el espacio entre los órganos se encuentra relleno de un parénquima poco compacto. Su sistema digestivo es incompleto y en general es muy ramificado, con boca pero sin ano, y ausente en los cestodos. El sistema excretor está compuesto por numerosas células flamígeras conectadas con los protonefridios que culminan en un poro en la región posterior. No poseen sistema esquelético, ni circulatorio, ni respiratorio. El sistema nervioso está formado por un par de ganglios anteriores o un anillo nervioso que conecta de uno a tres pares de nervios longitudinales con comisuras transversas. Son en general monoicos y cada sistema reproductor se encuentra encerrado dentro de una cubierta junto con varias células vitelinas. Pueden presentar desarrollo directo o con una o varias fases larvarias. Exteriormente están cubiertos por una epidermis blanda y ciliada en los turbelarios de vida libre, o por una cutícula con ventosas y/o ganchos externos para adherirse al huésped en las demás clases parásitas (Brusca and Brusca 2003).

Ideas acerca del origen de los platelmintos, sus relaciones filogenéticas con otros taxones, y la evolución dentro del grupo, han sido debatidas durante décadas. Algunos autores asumen que el ancestro común a los platelmintos original era similar a un platelminto de vida libre, aunque no se asigna necesariamente el mismo a otros órdenes extintos. Diferentes autores han presentado varias versiones de este arquetipo hipotético. De estas versiones han surgido dos ideas muy diferentes acerca del origen de los platelmintos que son relevantes en el estudio de la evolución (Brusca and Brusca 2003).

En una de ellas el ancestro común es de forma plana, diblástico y de simetría radial. Aunque hay varias versiones de esta idea, todas comparten un aspecto en común, y es que los primeros organismos triblásticos de simetría bilateral fueron similares a este gusano plano. Este punto de vista implica que la condición de acelomado es un carácter ancestral en los organismos triblásticos de desarrollo espiral, revelando la posición basal de los platelmintos entre los animales bilaterales (Brusca and Brusca 2003).

Sin embargo, en forma relativamente reciente, existe la tendencia a ubicarlos no como los animales bilaterales más basales, si no dentro de éstos, como un grupo basal entre los protostomados de desarrollo espiral. Esta tendencia es clara en los estudios moleculares (Baguna and Riutort 2004; Littlewood, Lockyer et al. 2006) en los que los platelmintos forman parte del clado Lophotrochozoa, que incluye a los protostomados espirales y a los lofoforados, y también ocurre en varios estudios de base morfológica recientes (Nielsen 1995; Ax 1996). Una posible apomorfía es la presencia en todos los casos estudiados de neoblastos (células totipotentes que originan las nuevas células somáticas diferenciadas en el adulto, ya que éstas no se dividen) (Ax 1996; Tyler and Hooge 2004; Egger, Steinke et al. 2009).

La incertidumbre acerca del origen de los platelmintos crea dificultades en el análisis filogenético del phylum. La filogenia interna ha sido objeto de variados estudios moleculares y morfológicos (Ax 1996; Baguna and Riutort 2004; Littlewood, Lockyer et al. 2006); existe un consenso limitado acerca de la posición de los diferentes grupos (figura 1.1). Tradicionalmente, se distinguen tres grupos dentro de este filo: Catenulida, Acoelomorpha, y Rabditophora; cada uno de ellos es aceptado como monofilético en base a varias apomorfías morfológicas y a estudios moleculares, pero las relaciones entre sí no son claras, poniendo en duda la monofilia de los platelmintos (Wilmer 1990; Rohde, Hefford et al. 1993; Campos, Cummings et al. 1998). Estos problemas están representados por la ausencia de claras sinapomorfias definiendo estos animales. Una posible apomorfía podría ser la ausencia de mitosis en células somáticas en todos los estadios post-

embrionarios, y la posesión de células epidérmicas multiciliadas carentes de centriolos (Ehlers 1986). El primer rasgo está basado en la evidencia sugiriendo que el crecimiento somático (como durante la regeneración) está provisto por células “madre” indiferenciadas y totipotenciales (neoblastos) más que por la proliferación de las mismas ya diferenciadas (Ax 1996; Tyler and Hooge 2004; Egger, Steinke et al. 2009). El segundo carácter está basado en la asunción de que los platelmintos comparten un ancestro común con los organismos del phylum Gnathostomulida, los cuales poseen células epidérmicas monociliadas, interpretando así a la condición multiciliada como un carácter derivado.

Estas y otras ideas están en estadios de análisis aún y su aceptación debe ser tentativa en el presente. En una aproximación aún conservadora, los platelmintos siguen carentes de sólidas sinapomorfias, apoyando la idea de que algún platelminto ancestral fue no sólo el precursor de las formas modernas, sino también de todos los protostomados. Claramente, esta visión sugiere que el phylum Platyhelminthes como ha sido definido, es un grupo parafilético (Brusca and Brusca 2003).

Análisis recientes basados en datos moleculares han sugerido que los Acoelomorpha se ubican en una posición basal a todos los otros animales bilaterales y podrían distinguirse del resto de los platelmintos, quizás garantizando un phylum propio por separado (Ruiz-Trillo, Riutort et al. 1999; Ruiz-Trillo, Riutort et al. 2004). Este phylum (Acoelomorpha) se encontraría entre los phyla diblásticos (Cnidaria, Ctenophora) y los triblásticos. Por otro lado, estos análisis filogenéticos confirman al resto de los platelmintos (Catenulida + Rhabditophora) como un grupo monofilético.

Los llamados “turbelarios” (clase Turbellaria en la clasificación tradicional) son los platelmintos de vida libre; por lo tanto, comprenden a los Acoelomorpha, Catenulida, y a la mayor parte de los Rhabditophora, siendo esta clase 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; Baguna and Riutort 2004; Littlewood, Lockyer et al. 2006).

INTRODUCCIÓN

La posición exacta del clado Neodermata dentro de los Rhabditophora es discutida, si bien es claro que pertenecen junto a varios grupos de vida libre (por ejemplo “planarias” (Tricladida)) al clado Neophora, caracterizado por la producción que huevos ectolecitos.

Además, la naturaleza del tegumento en platelmintos no turbelarios ha sido vista por zoólogos como una de las mayores importancias filogenéticas dentro del phylum (Ehlers 1986). Usualmente presentan un ciclo de vida indirecto, con una forma larval con reproducción asexual en un hospedero intermediario y una forma adulta con reproducción sexual en un hospedero definitivo (Storer, Usinger et al. 1986).

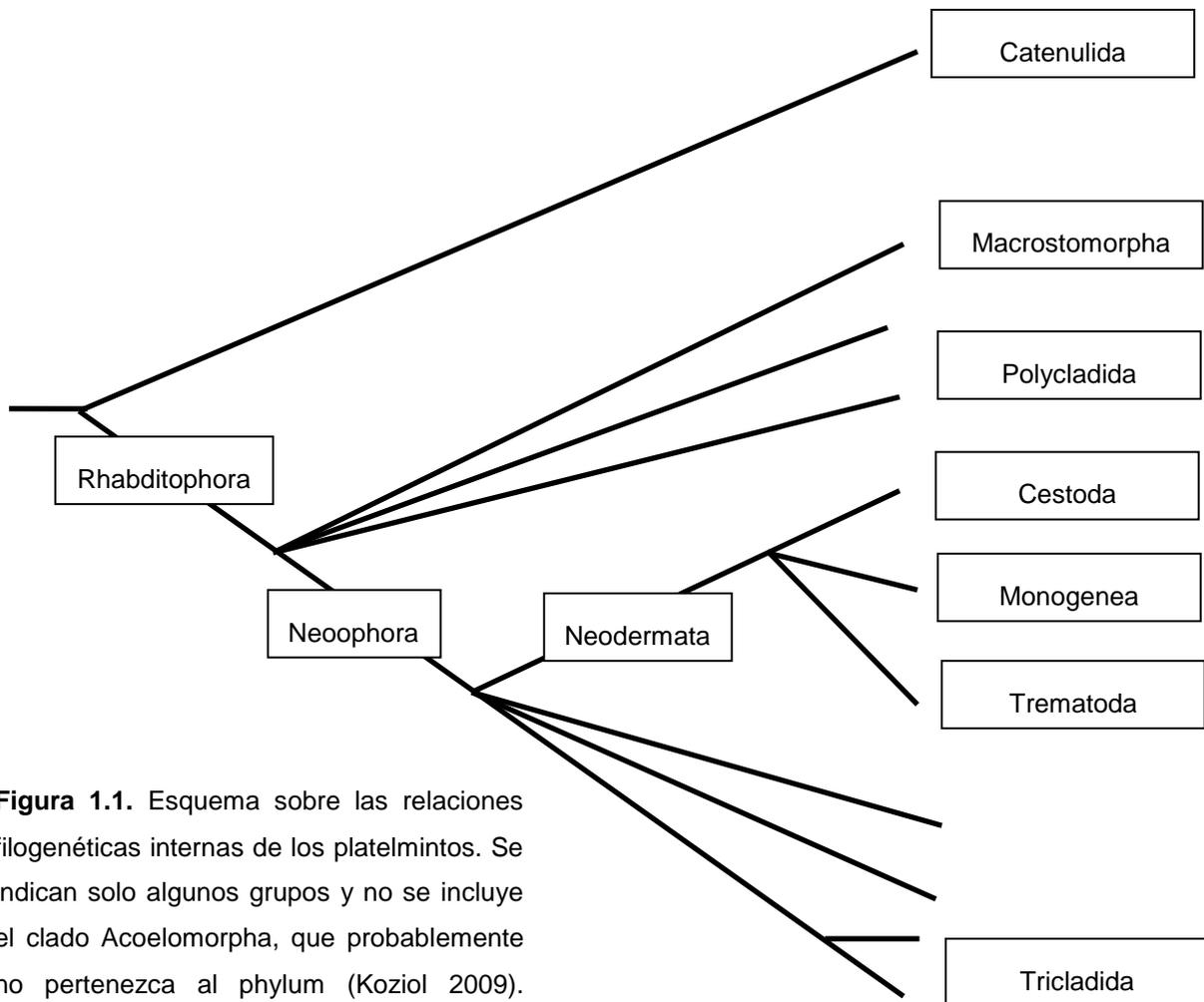


Figura 1.1. Esquema sobre las relaciones filogenéticas internas de los platelmintos. Se indican solo algunos grupos y no se incluye el clado Acoelomorpha, que probablemente no pertenezca al phylum (Koziol 2009). Adaptado de Koziol 2009.

Platelmintos parásitos: *Mesocestoides corti* y *Fasciola hepatica*

Los platelmintos parásitos son organismos responsables de infecciones en humanos y animales. Debido a su impacto sanitario y económico han sido estudiados buscando dilucidar aspectos básicos de su biología, inmunología, y epidemiología. Sin embargo, pese al conocimiento acumulado, ninguna de las estrategias diseñadas para erradicarlos han funcionado por lo que es imprescindible profundizar en el conocimiento de su biología.

El equipo de trabajo con el cual se desarrolló esta investigación tiene como línea principal de investigación el estudio de los mecanismos moleculares del desarrollo en platelmintos parásitos. Uno de los temas dentro de esta línea en el que se ha profundizado es la proliferación celular. Esto es de suma importancia; por un lado, debido al rol central de la proliferación celular durante las diferentes etapas y transiciones de sus ciclos de vida, y, por el otro, por su interés como modelos de proliferación celular continua a partir de células indiferenciadas. Es de remarcable interés el énfasis que se ha hecho sobre tres platelmintos parásitos en particular: *Echinococcus granulosus*, *Mesocestoides corti*, y *Fasciola hepatica*.

Echinococcus granulosus constituye un problema importante de salud pública en humanos y una causa de pérdidas económicas en la industria ganadera. En las últimas décadas, una cantidad importante de trabajo se ha consagrado al estudio de *E. granulosus*. A pesar de la incidencia que tiene la hidatidosis en Uruguay, la obtención de material parasitario en mataderos presenta dificultades. Además, es necesario recurrir a la infección experimental de perros para lograr gusanos adultos, procedimiento que presenta riesgo para el operario. Por esta razón, en varios laboratorios, *Mesocestoides corti* está siendo incorporado como modelo alternativo de estudio en la biología de cestodos, debido a sus múltiples ventajas para reproducir su ciclo de vida *in vitro* (Voge and Seidel 1968; Barrett, Smyth et al. 1982; Thompson, Jue Sue et al. 1982; Ong and Smyth 1986; Espinoza, Galindo et al. 2005). En el laboratorio donde se desarrolló esta investigación se han optimizado las condiciones para su cultivo (Britos 2000) y es

INTRODUCCIÓN

utilizado desde hace un tiempo para el estudio de genes potencialmente involucrados en los eventos de su ciclo de vida que implican la invasión al hospedero y su desarrollo (Lalanne, Britos et al. 2004; Koziol, Marin et al. 2008). *M. corti* se mantiene en el laboratorio por infección de ratas y ratones. El cultivo in vitro de *M. corti*, induce en las larvas la segmentación y la formación de las gónadas.

Fasciola hepatica es un trematodo que parasita varios mamíferos. Ocasionalmente puede parasitar al hombre. Es el agente responsable de la fasciolosis; con impacto económico por las pérdidas que genera en la producción ganadera vacuna y ovina, y con impacto sanitario por los brotes epidémicos y miles de casos esporádicos a nivel mundial. La OMS estima que existen en el mundo 2.4 millones de personas afectadas y otros 180 millones corren riesgo de infección (WHO Study Group 1995).

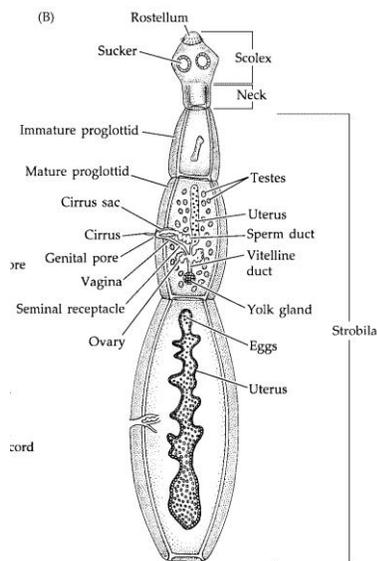


Figura 1.2.
Echinococcus granulosus, un cestodo causante de la hidatidosis. El cuerpo del adulto (estrobilo) está formado por pocas proglótidos. Adaptado de Brusca and Brusca 2003.

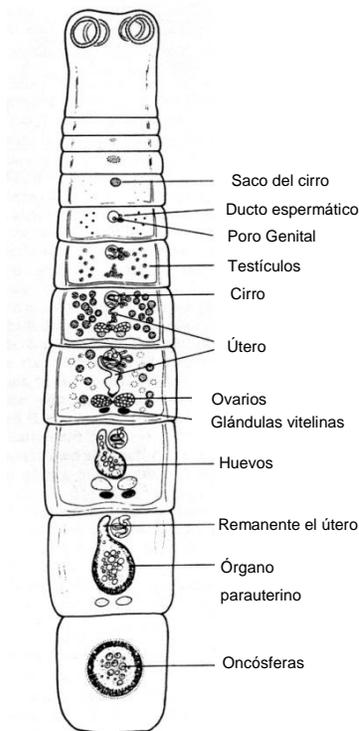


Figura 1.3.
Mesocestoides corti, un cestodo utilizado como modelo de estudio de esta clase de platelmintos. Esquema del gusano adulto mostrando el gradiente de maduración a lo largo de los proglótidos. Adaptado de Barret et al. 1981.

***Mesocestoides corti*: Caracteres generales y ciclo de vida**

Mesocestoides corti es un cestodo de la subclase Eucestoda, del Orden Cyclophyllidea, y perteneciente a la familia Mesocestoididae (Rausch 1994, citado por Britos, 2000). Existen diversos estudios sobre la sistemática de cestodos, aunque no hay un acuerdo sobre las relaciones de las familias dentro del orden. En base a estudios filogenéticos se ha visto que la familia Mesocestoididae aparece como una rama muy basal dentro de los Ciclofilídeos basado en caracteres morfológicos, o incluso por fuera del orden cuando se analizan caracteres morfológicos y moleculares (revisado por Koziol 2006). El desconocimiento de la totalidad de su ciclo de vida dificulta una clasificación taxonómica definitiva (Loos-Frank 1991).

La subclase Eucestoda comprende cestodos que son endoparásitos hermafroditas, patógenos comunes de humanos y otros vertebrados. No tienen sistema digestivo, absorben los nutrientes activamente a través de la pared corporal vía un tegumento sincitial. La membrana plasmática externa del tegumento forma un tipo especial de microvellosidades, los microtricos, que amplían la superficie del tegumento.

El gusano adulto en *M. corti* es un típico cestodo segmentado, compuesto por un escólex anterior con cuatro ventosas y una estróbila formada por varios segmentos o proglótides en distintos estadios de maduración, siendo los segmentos anteriores inmaduros (en general más anchos que largos) y los posteriores maduros (en general más largos que anchos) (figura 1.3).

Los parásitos del género *Mesocestoides* presentan un ciclo de vida complejo, con al menos tres hospedadores, y a pesar de que hace más de 60 años que se investiga el ciclo de vida de los mismos, aun no se ha podido determinar completamente. Se ha postulado que el ciclo de vida incluye al menos tres hospederos, siendo dos de ellos intermediarios y el tercero definitivo. Si bien se pueden reconstituir todas las etapas del ciclo de vida *in vitro* (Voge and Coulombe 1966; Voge and Seidel 1968; Thompson, Jue Sue et al. 1982), no se ha observado completamente *in vivo*. En el ciclo de vida propuesto, los huevos con

oncósferas (embriones) producidos por el gusano adulto son ingeridos por el primer hospedero intermediario, que probablemente sea un artrópodo pero la identidad del mismo es aún desconocida. En este primer hospedero se desarrolla la larva cisticercoide (Webster 1949), que continua su desarrollo a larva tetratiridia en la cavidad peritoneal del segundo hospedero, cuando es ingerido por el primero. El segundo hospedero comprende una amplia gama de animales, como por ejemplo lagartijas, serpientes, ratones, y cánidos. Cuando el hospedero definitivo ingiere al segundo hospedero, el tetratiridio se desarrolla a gusano adulto, sexualmente maduro, que genera los huevos para cerrar el ciclo. El adulto reside en el intestino de vertebrados carnívoros, como perros (Eckert, Von Brand et al. 1969), coyotes (Crosbie, Nadler et al. 2000), zorrillos (Eckert, Von Brand et al. 1969) y zorros (Padgett and Boyce 2005). En este hospedero se observa la coexistencia de tetratiridios con gusanos adultos. Éstos, además de coexistir, son capaces de multiplicarse asexualmente (Eckert, Von Brand et al. 1969).

Los tetratiridios se encuentran indiferenciados y son aplanados dorso-ventralmente. En general presentan una ligera curvatura hacia el lado proliferativo y miden en promedio unos 2 mm. Como todos los organismos del género *Mesocestoides*, carecen de róstelo, y su escólex invaginado es aplanado y presenta cuatro ventosas musculares separadas de a pares por el surco apical. Su cuerpo sólido consiste en tegumento, parénquima (con numerosos corpúsculos calcáreos y células almacenadoras de glucógeno) y músculos internos. Se observa un sistema excretor compuesto por una vesícula excretoria y cuatro canales que terminan en el poro excretor en la región posterior y el sistema nervioso. No presenta ningún esbozo de aparato reproductor (Hess 1980; Barrett, Smyth et al. 1982). Son capaces de infectar una gran variedad de vertebrados, tanto anfibios, reptiles, aves o mamíferos (Eckert, Von Brand et al. 1969).

En estos hospederos son capaces de multiplicarse asexualmente. Este fenómeno ha sido estudiado en ratones infectados experimentalmente y se proponen dos formas: mediante fisión longitudinal, luego de multiplicar las ventosas, o mediante brotamiento a partir de yemas generadas posteriormente al escólex (Specht and Vogé 1965). Novak realizó un estudio detallado de las

distintas etapas de multiplicación (Novak 1972), concluyendo que las yemas observadas son la consecuencia de la separación de la larva hija, más que una forma de multiplicación (figura 1.4).

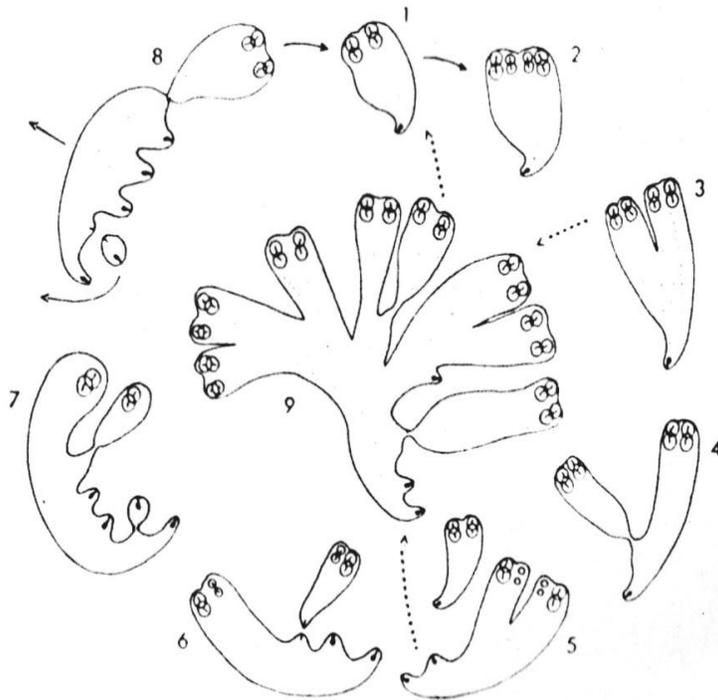


Figura 1.4.

Multiplicación asexual del tetratiridio de *M. corti*. Primero el surco apical se profundiza (1) generando un surco longitudinal. Luego (2), en cada mitad del escólex en división comienza a observarse un esbozo del nuevo par de ventosas. A medida que las ventosas aumentan su tamaño (3), el surco longitudinal se profundiza. Una vez (4) multiplicadas las estructuras nerviosas y los canales excretores, la división en dos larvas se encuentra avanzada. Cuando la larva hija se separa, deja su extremo posterior en la larva parental, formándose de esta manera yemas sobre el lado proliferativo parental (5).

La larva parental se elonga y comienza otro evento de multiplicación. La nueva larva hija se separa dejando otra yema en el lado proliferativo parental (6). A medida que avanza la cantidad de eventos de multiplicación, el proceso se acelera, de modo tal que los escólices de la larva parental e hija presentan un solo par de ventosas, desarrollándose el segundo par luego de comenzada la división del escólex (7). Luego de múltiples eventos de multiplicación, se produce una larva alargada, que presenta numerosas yemas en el lado proliferativo. En ocasiones, varias yemas se separan del individuo, formando fragmentos acéfalos. De la misma manera, puede separarse el escólex y parte de la región anterior, formando un tetratiridio de apariencia normal y un fragmento acéfalo que se degenera (8). También se observan fragmentos policefálicos (9). Adaptado de Novak 1972.

Estudios realizados por Hart (Hart 1968), muestran que los fragmentos acéfalos generados en la reproducción asexual del tetratiridio no son capaces de generar un escólex. Típicamente, al comienzo de la división asexual, se duplican las estructuras anteriores, exteriormente observable por la presencia de 8 ventosas apicales, separadas en dos grupos de 4 por el surco apical (Figura 1.4). Sin embargo en ciertos casos la división puede comenzar en forma previa a la duplicación de las estructuras, resultando en tetratiridios con únicamente dos o incluso una sola ventosa ((Kawamoto, Fujioka et al. 1986); (Novak 1972)). Tras proseguir la fisión, los individuos deben finalmente separarse; diferenciándose un individuo “hijo”, de otro “progenitor”, ya que en este último se forma un segundo poro excretor lateral en el último punto de división entre ambos (Hart, 1967; Novak, 1972). A medida que se suceden ciclos de reproducción asexual, todas las divisiones culminan de un mismo lado del cuerpo (el lado proliferativo), acumulándose estos crecimientos laterales en ese mismo lado. Eventualmente, estos crecimientos laterales pueden separarse individualmente, o varios juntos, como extremos acéfalos (Hart, 1967; (Hart 1968); Novak, 1972), incapaces de regenerar el escólex y por lo tanto estériles (Hart, 1968).

Los tetratiridios al ingresar al hospedero definitivo se elongan y adquieren una forma vermiforme. Suelen aparecer varios segmentos simultáneamente, denominados proglótidos, siendo el desarrollo más acelerado en los posteriores. En paralelo con el desarrollo de los proglótides aparecen nuevos segmentos en la región anterior. El proceso de maduración puede determinarse cuando se analizan los segmentos sucesivos (figura 1.3). Al tiempo que aparecen los segmentos, se observa el rudimento del sistema reproductor masculino, que se diferenciará en el saco del cirro y los testículos. El sistema reproductor femenino se desarrolla levemente después que el masculino, y comienza por la aparición del rudimento femenino. El segmento maduro incluye dos canales excretorios laterales, conectados por una comisura transversal, y los sistemas reproductores masculino y femenino. El sistema reproductor masculino está compuesto por los testículos ubicados lateralmente, conectados a vasos deferentes que desaparecen una vez que el testículo vació su contenido; y el saco del cirro, que contiene un cirro

enrollado. El femenino, por su parte; está compuesto por un ovario bilobular, con dos glándulas vitelinas pequeñas, el cual se conecta con el útero ubicado en la línea media. En el extremo posterior del útero existe una masa oscura de células que darán lugar al órgano parauterino, claramente visible en los segmentos más posteriores. Este comienza a desarrollarse cuando los ovarios y glándulas parauterinas degeneran, una vez que el útero está lleno de óvulos y células vitelinas. Surge por la proliferación de las células de la región posterior del útero, diferenciándose en una capsula fibrosa de paredes delgadas. En estos segmentos ya no se observan los canales excretorios. En los segmentos grávidos se observan en el órgano parauterino las oncósferas, que se identifican por los 6 ganchos y la cubierta fina protectora del huevo (Barrett, Smyth et al. 1982; Thompson, Jue Sue et al. 1982).

Como se mencionó anteriormente, no se conoce con certeza la identidad del primer hospedero intermediario, capaz de ser infectado por las oncósferas producidas por el gusano adulto. Algunos autores (Soldatova 1944; Webster 1949; Loos-Frank 1991) plantean que el primer hospedero intermediario debe de ser un invertebrado predador, capaz de ingerir un segmento grávido entero, o al menos el órgano parauterino, ya que cuando se liberan las oncósferas de su cubierta se disecan rápidamente. Padgett (Padgett and Boyce 2005), reportó la presencia de ADN procedente de *Mesocestoides* en hormigas que co-habitan con hospederos definitivos infectados. Sin embargo, estas hormigas no eran capaces de infectar al segundo hospedero intermediario. Estas observaciones llevaron a pensar que no sería necesario un hospedero intermediario. Varios autores (Henry 1927; Witenberg 1934; Srivastava 1939; citados por Loos-Frank, 1991; Webster 1949) intentaron infectar anfibios, reptiles y roedores con huevos del parásito. Al no obtenerse infección, se muestra que es indispensable un primer hospedero intermediario para completar el ciclo.

Sin embargo, se ha podido obtener tetratiridios totalmente desarrollados a partir de oncósferas mantenidas en cultivo *in vitro* (Voge and Seidel 1968). Si bien es necesario comparar las distintas etapas del desarrollo obtenidas de esta

manera con el desarrollo *in vivo*, esta es una buena aproximación para conocer el patrón de desarrollo post-embrionario. Para iniciar el ciclo se parte de oncósferas eclosionadas, liberadas de órganos parauterinos obtenidos de infecciones naturales (figura 1.5). Una vez culminado el desarrollo post embrionario *in vitro* se obtienen organismos similares a tetratiridios pequeños, a los cuales Voge llamó tetratiridios jóvenes (Voge 1967). Estos difieren de los tetratiridios completamente desarrollados en la presencia del órgano apical y en el escaso desarrollo de las ventosas. Posteriormente, Voge y Seidel perfeccionaron las condiciones de cultivo, obteniendo tetratiridios completamente desarrollados a partir de oncósferas (Voge and Seidel 1968). Cuando transfieren los tetratiridios jóvenes a un medio sólido con sangre, aumentan progresivamente su tamaño y desarrollan sus ventosas, desapareciendo el órgano apical. Cuando estos organismos se transfieren al medio utilizado por Voge y Coulombe comienzan a multiplicarse asexualmente (Voge and Coulombe 1966).

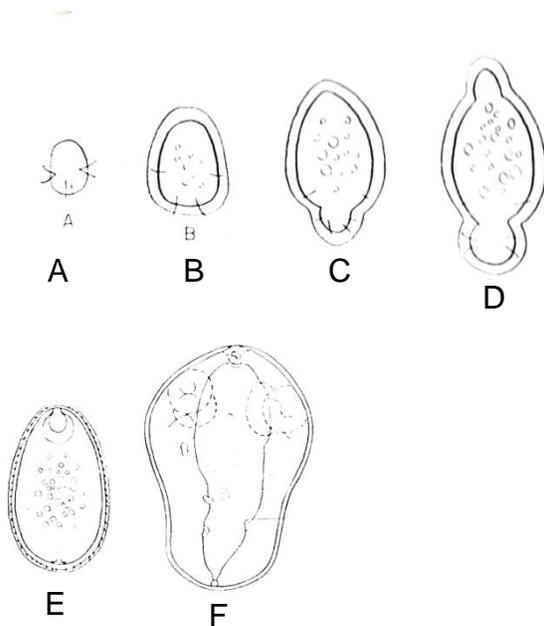


Figura 1.5. Desarrollo post-embrionario de *M. corti* obtenido *in vitro*. Las oncósferas eclosionadas (A) crecen rápidamente y los ganchos se distribuyen dispersos (B). A los pocos días de cultivo, comienza a observarse una pequeña cola en forma del bulbo que contiene la mayoría de los ganchos de la oncósfera (C). La totalidad del cuerpo se encuentra envuelta de una pequeña cubierta frágil y amorfa. Luego de unos días se diferencia en la región anterior una estructura de forma bulbar (D), la cual se retrae al final de la tercera semana, al tiempo en que desaparece la cola (E). A las 6 semanas se rasga la cubierta que la recubría, y una semana después se observan corpúsculos calcáreos. Hacia las 8 semanas se observan esbozos de ventosas y una pequeña zona en forma de copa abierta al exterior en la región en la que previamente había surgido la estructura bulbar anterior. Esta última está llena de gránulos grandes y se denomina órgano apical (F). Adaptado de Voge, 1967.

Como se afirmó anteriormente, en el laboratorio donde se desarrolló esta investigación se ha logrado reproducir parte del ciclo de vida *in vitro*, desde tetratiridios hasta gusanos adultos. Cabe destacar que los tetratiridios utilizados actualmente para el cultivo provienen del aislamiento inicial de Specht y Voge de tetratiridios en lagartijas (*Sceloporus occidentalis biseriatus*) infectadas naturalmente, los que fueron mantenidos por pasaje seriado en ratas y ratones de laboratorio (Voge and Coulombe 1966); (Voge and Seidel 1968). Luego puede lograrse el desarrollo estrobilar y la maduración desde el tetratiridio hasta alcanzar el estadio adulto (Barrett, Smyth et al. 1982; Thompson, Jue Sue et al. 1982). Esto, sumado a la facilidad de obtener material parasitario en grandes cantidades a partir de ratones infectados experimentalmente, constituye una de las principales ventajas para la adopción de este organismo como modelo de estudio de cestodos.

***Fasciola hepatica*: Caracteres generales y ciclo de vida**

Uno de los primeros agentes infecciosos en ser descubiertos e implicados en causar enfermedades fue sin duda *Fasciola hepatica*. Además, ocupa un lugar especial en la parasitología por la virtud de ser el primer trematodo para el cual se conoció el ciclo de vida por completo (Minot 1883; Reinhard 1957). *Fasciola hepatica* es un trematodo de la subclase Digenea, del orden Echinostomida, y perteneciente a la familia Fasciolidae. La familia Fasciolidae es relativamente pequeña y comprende solo nueve especies reconocidas, sin embargo es conocida por la importancia en la salud humana y la significancia veterinaria. Aunque la mayoría de estas especies parasita mamíferos herbívoros, tres especies, dentro de las cuales se encuentra *F. hepatica*, infectan regularmente a los humanos (Mas-Coma, Esteban et al. 1999). Así como existen algunos fasciolidos que han mantenido distribuciones geográficas restringidas, existen otros como por ejemplo *F. hepatica*, que se han vuelto cosmopolitas (Mas-Coma 2005).

INTRODUCCIÓN

F. hepatica es un parásito de gran tamaño, su cuerpo ancho y aplanado dorso ventralmente tiene forma de hoja (foliáceo), con una cutícula espinosa y con dos ventosas, una oral y otra ventral (figura 1.6). La extremidad anterior presenta en su centro una prolongación estrecha y cónica, el cono cefálico, separado del resto del cuerpo por una región más ancha en forma de hombros. El parásito adulto es de tamaño variable, de 2 a 3 cm de longitud por 1 a 1,5 cm en su porción más ancha. Los estados adultos pueden encontrarse parasitando diferentes vertebrados incluido el ser humano, por lo general en sus conductos biliares, aunque erráticamente también pueden encontrarse en los pulmones. En cambio, la especificidad de las formas larvarias es muy estrecha. La larva de estos platelmintos presenta una epidermis ciliada al menos para parte de su cuerpo. Sin embargo la misma es perdida y los estadios post larvales desarrollan una cubierta corporal sincitial, la neodermis o tegumento. Este fenómeno no ocurre en otros animales, y como se ha mencionado anteriormente es una de las sinapomorfias que unen a trematodos, monogeneos, y cestodos, en el taxón monofilético llamado Neodermata, en referencia a la “nueva” piel de estos animales (Ax 1996; Baguna and Riutort 2004; Littlewood, Lockyer et al. 2006).

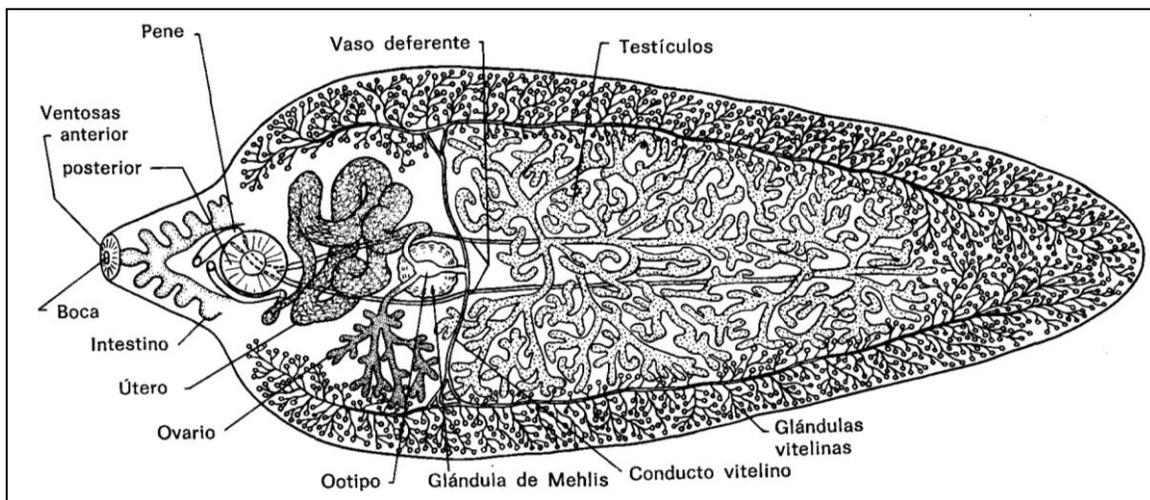


Figura 1.6. *Fasciola hepatica*. Sistema reproductivo visto ventralmente y sistema digestivo representado solo en el extremo anterior. Tomado de Storer 1986.

Tienen un aparato reproductor masculino y femenino, es decir que son hermafroditas (figura 1.6). La reproducción opera como un proceso sexuado normal con fusión de gametos de sexos opuestos, seguida de la formación de un cigoto. Lo más frecuente es una fecundación cruzada realizada entre dos individuos hermafroditas. Los espermatozoides son introducidos por el cirro hacia la vagina, pasan por el útero hasta el receptáculo seminal en donde se acumulan y esperan la maduración del gameto femenino y después pasan al ootipo en donde se realiza la fusión de gametos y la formación del huevo (Romero 1990).

En el desarrollo embrionario, el cigoto forma dos células diferentes, una pequeña o célula propagatriz y otra grande o célula ectodérmica, a través de un proceso de divisiones sucesivas y diferenciación se desarrolla el embrión que recibe el nombre de Miracidio (figura 1.7). El ectodermo está formado por varias placas cubiertas de cilios que tienen una función locomotora. En el extremo anterior hay una pequeña papila retráctil y a los lados de la misma hay glándulas que secretan sustancias utilizadas para perforar el tegumento del huésped intermediario. Existen placas fotosensibles llamadas placas oculares. En la parte posterior del miracidio hay células germinales indiferenciadas, que darán lugar a los elementos larvarios posteriores. El miracidio se forma dentro del huevo luego de la postura y cuando eclosiona en un medio hídrico en condiciones favorables va en busca del huésped intermediario, que es un caracol del género *Lymnaea*. El miracidio que se desarrolla en el medio exterior después de la eclosión penetra activamente a través del tegumento del pie del caracol para transformarse en esporoquiste. La penetración se realiza con contracciones musculares del miracidio, ayudado por movimientos de los cilios y por la lisis de las células del huésped por efecto enzimático.

El esporoquiste (figura 1.7) es el primer estado larvario que se forma dentro del caracol, en pie, tentáculos, cámara respiratoria, o pseudobranquias. Tienen aspecto de un saco con elementos germinativos, y su interior está ocupado por material parenquimatoso sin aparente organización orgánica. Los elementos fundamentales del esporoquiste son las células germinales que se multiplican y

quedan libres en la cavidad. Estas masas germinales pueden formar una segunda generación de esporoquistes hijos con estructura similar a sus progenitores.

Las redias (figura 1.7) son el segundo estado larvario formado en el caracol; generalmente proceden del esporoquiste y en casos excepcionales del miracidio. Se localizan en hepatopáncreas, pseudobranquias o masa pedicular. Tienen forma alargada, la estructura interna empieza a ser un poco más complicada; hay vestigios de aparato digestivo, presencia de anillo nervioso periesofágico y fibras nerviosas y un aparato excretor. También se encuentra una masa germinal que se origina de la pared y luego queda libre pudiendo dar lugar a redias hijas.

Las cercarias (figura 1.7) se forman a partir de redias hijas y rara vez de esporoquiste; se localizan en el hepatopáncreas y representan el último estado de desarrollo en el huésped intermediario. El cuerpo está formado por una parte anterior más o menos esferoide y una parte posterior alargada que constituye una cola. Algunas estructuras morfológicas del adulto como ventosas, ciego intestinal, vesícula y canales excretores ya están presentes. Está presente un sistema glandular de penetración formado por glándulas cefálicas, situadas al lado del esófago; las glándulas pre y postacetabulares situadas arriba y debajo de la ventosa ventral, las glándulas mucoides subcuticulares situadas debajo del tegumento de la región medio ventral y las glándulas cistógenas o elementos subtegumentarios. Hay un sistema nervioso y órganos de los sentidos compuestos por células sensoriales (Romero 1990).

Las cercarias salen del caracol, pierden la cola y se adhieren sobre plantas acuáticas en forma de metacercarias (figura 1.7). Si la metacercaria es ingerida por uno de los hospederos definitivos del parásito, al llegar al intestino se disuelve su cubierta y se convierte en un joven dístoma (adulto joven o adolescarias), que atraviesa la pared intestinal y llega a la cavidad abdominal aproximadamente 2 horas después de la ingestión. Luego atraviesa la glándula de Glisson y alcanza el parénquima hepático por donde migra durante 5 a 6 semanas, se alimenta preferentemente de hepatocitos, y finalmente llega a los conductos biliares donde se hace adulto e inicia la oviposición. Los huevos recién emitidos por el parásito

son evacuados con las heces y así se reinicia un nuevo ciclo de vida (Vignau, Romero et al. 2005).

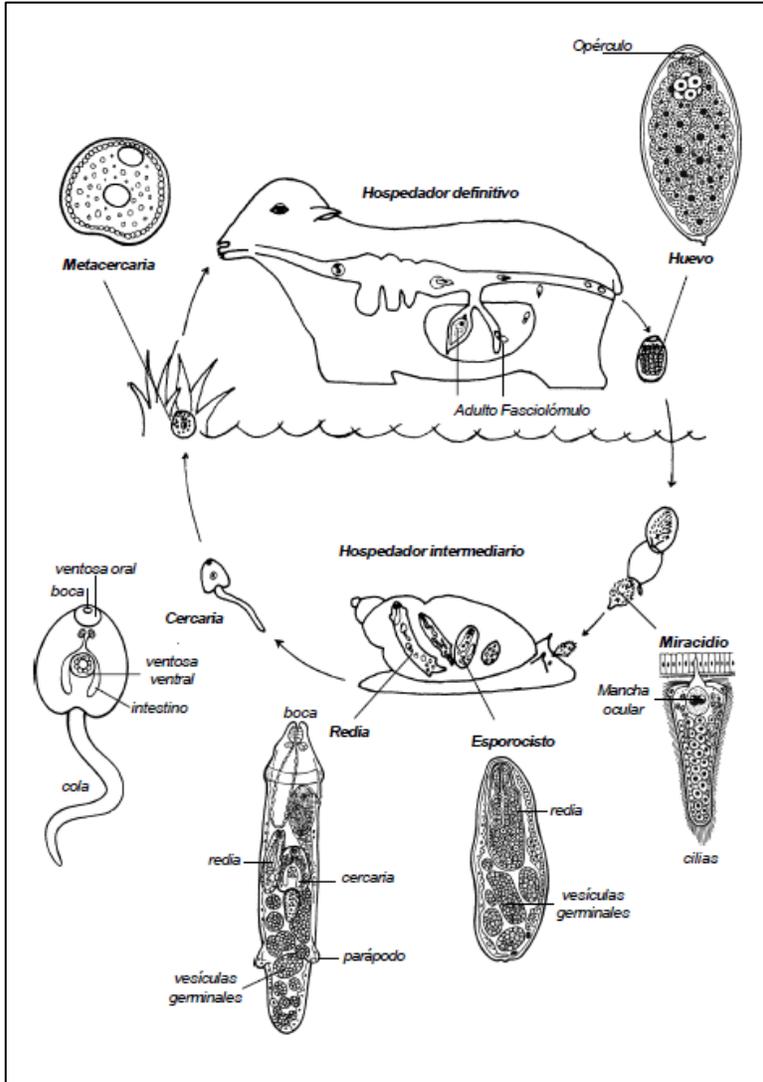


Figura 1.7. Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*. El parásito adulto vive en los conductos biliares de sus hospederos definitivos. Los huevos salen al exterior junto con las excretas. En el agua, los huevos generan el miracidio, y a través de su opérculo lo dejan salir. Éste nada libremente hasta encontrar su hospedero intermedio (*Lymnaea*), en donde se forman esporocistos, redias y cercarias. Las cercarias abandonan el caracol y se enquistan libremente en el agua o adheridas a plantas acuáticas donde se transforman en metacercarias, que es la forma que parasita al hospedero definitivo. Cuando éste ingiere una de ellas llega al intestino donde se disuelve su cubierta quística y deja en libertad un dístoma que atraviesa las paredes intestinales, y por vía peritoneal llega a la superficie del hígado. Allí produce una necrosis, al atravesar la cápsula fibrosa y el parénquima hepático, para establecerse en los conductos biliares, hacerse adulta, hermafrodita, y poner huevos que salen al exterior por las excretas, y comenzar de nuevo el ciclo (adaptado de (Vignau, Romero et al. 2005).

Marcadores moleculares de neoblastos en platelmintos

Para desarrollar estrategias de control y/o erradicación de las enfermedades causadas por platelmintos parásitos es de vital importancia conocer los aspectos moleculares del desarrollo de los mismos (Hewitson, Grainger et al. 2009).

Un aspecto de la biología de parásitos que es interesante profundizar es sobre sus células madre indiferenciadas, debido a su gran capacidad de regeneración (Salo 2006). En varios modelos de platelmintos de vida libre, se ha demostrado que las células somáticas no se dividen, y que un grupo de células madre indiferenciadas, denominadas neoblastos, son responsables de la proliferación celular durante el mantenimiento, el crecimiento y la regeneración de tejidos. Existen evidencias de que esto sería una característica de todos los miembros del phylum (Sanchez Alvarado 2003; Nimeth, Mahlknecht et al. 2004). Los neoblastos presentan características similares en cuanto a su morfología; como son el pequeño tamaño, alta relación núcleo/citoplasma, nucléolo prominente, intensa basofilia, mitocondrias pequeñas, escasez de retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi. En el caso particular de las planarias, los neoblastos presentan cuerpos cromatoides perinucleares y tienen un alto potencial proliferante en modelos de planaria estudiados. Además, son similares en otros aspectos y en sus marcadores moleculares a las células germinales de otros organismos.

Los avances en las técnicas de biología molecular han permitido ampliar el conocimiento acerca de la proliferación celular en neoblastos y los mecanismos de regeneración en estos organismos. Se han podido identificar algunos genes involucrados en los procesos regenerativos de planarias mediante la utilización de marcadores moleculares para los neoblastos y su progenie. El desarrollo de técnicas para el “knockdown” de los genes involucrados mediante ARN de interferencia ha permitido conocer la importancia de los mismos en estos procesos (Sanchez Alvarado, Newmark et al. 2002; Nimeth, Mahlknecht et al. 2004). Algunos de estos marcadores moleculares comprenden genes esenciales en los

procesos de replicación del ADN, como por ejemplo el gen tipo *vasa* en *Dugesia japonica* (*DjvlgA*) (Shibata, Umesono et al. 1999), *MCM2* (*minichromosome maintenance 2 gene*) (Salveti, Rossi et al. 2000), así como también la proteína PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) (Orii, Sakurai et al. 2005). La expresión de estos genes fue observada en la mayoría de los neoblastos morfológicos del mesénquima. Otros de estos marcadores moleculares, como por ejemplo el regulador post-transcripcional *Pumilio* (Salveti, Rossi et al. 2005) , así como también el receptor FGFR1 (*fibroblast growth factor receptor*) (Ogawa, Kobayashi et al. 2002), y el gen *piwi* (Rossi, Salvetti et al. 2006), comprenden genes reguladores de la expresión génica que se expresan de algún modo específico en neoblastos de planarias.

El estudio de diferentes marcadores moleculares específicos de estas células y la variación existente en la tolerancia de las mismas frente a diferentes dosis de rayos X, han sugerido la existencia de diferentes subpoblaciones celulares de neoblastos en planarias (Rossi, Salvetti et al. 2006). Además, se ha demostrado la existencia de una extrema plasticidad en el potencial regenerativo y de proliferación celular de algunos neoblastos de la zona ventral de estos animales, apoyando la idea de que los neoblastos comprenden una población celular heterogénea (Salveti, Rossi et al. 2009). Algunos investigadores han desarrollado esta idea, afirmando que en planarias, los neoblastos comprenden dos grandes grupos diferentes de células madre; uno integrado por las células madre somáticas necesarias para la regeneración y mantenimiento de tejidos, y el otro por las células madre de la línea germinal necesarias para la producción de células germinales durante los estados de reproducción sexual de estos organismos (Sato, Shibata et al. 2006; Shibata, Rouhana et al. 2010).

Se ha descubierto en *Dugesia japonica* y en *Schmidtea mediterranea* (Tricladida) que uno de los genes que se expresan en neoblastos durante la proliferación y diferenciación de las células germinales, es el gen ortólogo de *nanos*, llamados *Djnos* y *Smednos* respectivamente (Sato, Shibata et al. 2006; Wang, Zayas et al. 2007).

En el estado hermafrodita de *S. mediterranea*, el ARN mensajero de *Smednos* ha sido detectado en etapas de desarrollo y de regeneración, así como en el estado maduro, de ovarios y de testículos. Sin embargo, el mismo no se ha encontrado en la mayoría de las nuevas planarias escindidas por fisión, ni tampoco en fragmentos de tejido escindido, que en última instancia regeneraran células germinales. La introducción de ARN de interferencia de *Smednos* impide el desarrollo, regeneración, o mantenimiento de gónadas en planarias sexuales. Inesperadamente, ARN mensajero de *Smednos* fue detectado en presuntos primordios testiculares de individuos asexuales que se reprodujeron estrictamente por fisión. Estas presuntas células germinales son perdidas luego de la introducción de ARNi *Smednos*, sugiriendo que las planarias asexuales establecen células germinales, pero su diferenciación está bloqueada por la inhibición de la función de *Smednos* (Wang, Zayas et al. 2007).

En el estado asexual de *D. japonica*, el ARN mensajero de *Djnos* ha sido localizado en la región que da lugar a los futuros ovarios o testículos en las planarias sexuales. Durante la “sexualización”, las células expresando ARNm de *Djnos* produjeron células germinales, sugiriendo que en el estado asexual estas células fueron mantenidas como una línea de células madre para la oogonia y espermatogonia. Interesantemente, las células madre de la línea germinal fueron indistinguibles de los neoblastos por su morfología y no parecieron contribuir a la regeneración celular. Las células madre de la línea germinal aparecen inicialmente en las jóvenes planarias en desarrollo, sugiriendo que las células madre de la línea germinal están separadas de las células madre de la línea somática en las planarias. Sin embargo, células expresando *Djnos* han aparecido también en nuevas planarias generadas estrictamente por fisión, sugiriendo que las células madre somáticas pueden convertirse en células madre de la línea germinal (Sato, Shibata et al. 2006).

Estos resultados permiten suponer que la expresión de este gen está relacionada con la proliferación y diferenciación de líneas celulares germinales en planarias, y probablemente también lo esté en otros platelmintos (Sato, Shibata et al. 2006; Wang, Zayas et al. 2007).

Homología funcional y estructural de *Nanos*

En variados animales como insectos y vertebrados, las células de la línea germinal están separadas de las células de la línea somática tempranamente durante el desarrollo. Las células de la línea germinal, las cuales son llamadas células polares en *Drosophila* y células germinales primordiales (PGCs, del inglés “primordial germ cells”) en mamíferos, dan lugar a células madre de la línea germinal, las que se conservan en el cuerpo adulto hasta la producción de células germinales.

En *Drosophila*, la expresión de *nanos* es necesaria para la segmentación abdominal durante la embriogénesis y para la formación de oogonios durante la ovogénesis. El gradiente de concentración plasmático en el eje antero-posterior embrionario de este factor es determinado por la acción conjunta de otros factores que interactúan con el mismo (Lehmann and Nusslein-Volhard 1991; Wang and Lehmann 1991; Wang, Dickinson et al. 1994). Entre éstos se encuentran, *pumilio*, *oskar*, *valois*, *vasa*, *staufen* y *tudor*, que junto con *nanos* se han denominado los genes del grupo posterior, porque es en el polo posterior embrionario donde se encuentra la mayor actividad reguladora de sus productos. La expresión del gen *nanos* es clave para la diferenciación y mantenimiento de las células polares (Kobayashi, Yamada et al. 1996; Forbes and Lehmann 1998; Asaoka-Taguchi, Yamada et al. 1999; Deshpande, Calhoun et al. 1999; Hayashi, Hayashi et al. 2004). En el organismo adulto, *nanos* se expresa en las células germinales y es esencial para el mantenimiento de las células madre de la línea germinal (células polares) y su diferenciación a cistoblastos (Forbes and Lehmann 1998; Bhat 1999). Las funciones de los genes ortólogos de *nanos* en el mantenimiento de las células germinales se conservan en organismos de diferentes phyla, como lo son *Caenorhabditis elegans* (Subramaniam and Seydoux 1999), *Danio rerio* (Kopranner, Thisse et al. 2001), y ratón (Tsuda, Sasaoka et al. 2003; Suzuki, Tsuda et al. 2007). Genes tipo *nanos* se expresan en células germinales primordiales de metazoarios ampliamente divergentes, que van desde cnidarios hasta humanos (Extavour, Pang et al. 2005; Chang, Lee et al. 2006; Juliano,

INTRODUCCIÓN

Voronina et al. 2006). Aunque los mecanismos para la especificación de las células germinales difieran entre invertebrados y vertebrados, estos estudios sugieren la conservación del rol importante de la proteína Nanos en el desarrollo y en la diferenciación celular (Jaruzelska, Kotecki et al. 2003; Tsuda, Sasaoka et al. 2003) (tabla 1.1)

| Tabla 1.1. Genes tipo <i>nanos</i> de especies de diferentes phyla conservan ciertos patrones de expresión y funciones relacionadas con el desarrollo y mantenimiento de las células germinales. Aquí se exponen cuatro ejemplos de genes tipo <i>nanos</i> estudiados. | | | |
|--|---|---|----------------------------|
| Género / Especie | Patrón de expresión | Fenotipo de ARNi o mutantes deficientes | Referencia |
| <i>Schmidtea mediterranea</i> (<i>Smednos</i>) | En ovarios y testículos durante las etapas de desarrollo y de regeneración, así como en el estado maduro de los mismos. | Impide el desarrollo, regeneración, o mantenimiento de gónadas en planarias sexuales. Pérdida de presuntos primordios testiculares de individuos asexuales que se reprodujeron estrictamente por fisión, y bloqueo de la diferenciación de los mismos. | (Wang, Zayas et al. 2007). |

INTRODUCCIÓN

| | | | |
|--|--|--|---|
| <i>Dugesia japonica</i> (<i>Djnos</i>) | Durante el estado asexual de las planarias, expresión en la región que dará lugar a los ovarios o testículos en las futuras planarias sexuales. Durante el pasaje al estado sexual, expresión en las células madre de la línea germinal. | No se han comprobado efectos constatables aún. | (Sato, Shibata et al. 2006) |
| <i>Caenorhabditis elegans</i> (<i>nos-1</i> y <i>nos-2</i>) | Células germinales primordiales (PGCs) | Cese de la proliferación y muerte celular de las células germinales. | (Subramaniam and Seydoux 1999) |
| <i>Drosophila</i> (<i>nanos</i>) | Gradiente antero – posterior en cigotos y embriones tempranos con la mayor concentración en el polo posterior. Expresión en células germinales de adultos. | Fallo en la segmentación abdominal durante el desarrollo. Fallo en la diferenciación y mantenimiento de las células polares. | (Lehmann and Nusslein-Volhard 1991; Wang and Lehmann 1991; Wang, Dickinson et al. 1994); (Kobayashi, Yamada et al. 1996; Forbes and Lehmann 1998; Asaoka-Taguchi, Yamada et al. 1999; Deshpande, Calhoun et al. 1999; Hayashi, Hayashi et al. 2004) |
| <i>Danio rerio</i> (<i>nanos1</i>) | Células germinales primordiales (PGCs) | Falla la migración y supervivencia de las PGCs. | (Koprunner, Thisse et al. 2001) |
| Ratón (<i>nanos2</i> y <i>nanos3</i>) | Células germinales de macho (<i>nanos2</i>). PGCs durante su migración (<i>nanos3</i>). | Perdida de la espermatogonia (<i>nanos2</i>). Perdida de las células germinales en ambos sexos (<i>nanos3</i>). | (Tsuda, Sasaoka et al. 2003; Suzuki, Tsuda et al. 2007) |

El gen tipo *nanos* codifica para una proteína de unión al ARN altamente conservada en la evolución de los eucariotas. Actúa como un regulador post-transcripción clave utilizando la región 3' no traducida de algunos ARNm específicos, controlando de este modo la traducción de los mismos (Hashimoto, Kawaguchi et al. 2009). En *Drosophila*, la proteína Nanos contiene en su dominio C – terminal dos motivos de dedos de Zinc. Durante la embriogénesis, la función de Nanos es necesaria para el establecimiento del patrón corporal antero-posterior y para la migración de las células germinales primordiales. Durante la oogénesis, la proteína Nanos está vinculada al establecimiento y mantenimiento de las células madre de la línea germinal y en la diferenciación de las células precursoras del oocito. Para establecer el correcto patrón de desarrollo embrionario, Nanos actúa como un regulador de la traducción del ARNm de Hunchback. La región C – terminal contiene dos motivos CCHC necesarios para la formación del abdomen y la migración de las células germinales, pero no para la oogénesis (Curtis, Treiber et al. 1997; Arrizabalaga and Lehmann 1999). Se ha purificado y cristalizado (estudios iniciales de difracción de rayos X) esta región C – terminal en *Danio rerio* para comprender las bases estructurales de la función de Nanos. El dominio C – terminal de Nanos en este organismo tiene dos motivos conservados CCHC de tipo dedos de zinc que son fundamentales para efectuar sus funciones de regulación (Hashimoto, Kawaguchi et al. 2009) (figura 1.8).

La proteína Nanos interactúa con Pumilio para formar parte de un complejo regulador de la traducción de Hunchback en *Drosophila* (Forbes and Lehmann 1998; Wharton, Sonoda et al. 1998; Sonoda and Wharton 1999). La proteína Nanos humana NOS1 interactúa con la proteína Pumilio humana PUM2 vía dominios altamente conservados para formar un complejo estable. Además, estas proteínas son particularmente abundantes en las células madre de la línea germinal. Estas observaciones documentan la conservación de una interacción proteína-proteína en células germinales de especies tan distantes como los moscas y humanos, sugiriendo que ésta juega un rol conservado en el

INTRODUCCIÓN

mantenimiento y desarrollo de las células germinales (Jaruzelska, Kotecki et al. 2003).

En ratones, se ha demostrado que la expresión de *nanos* en células del sistema nervioso no es indispensable para un desarrollo normal de los mismos, ni tampoco se observaron defectos neurológicos significantes (Haraguchi, Tsuda et al. 2003). La interacción de Nanos con otras proteínas asociadas al cáncer es otra importancia significativa del estudio de la misma (Strumane, Bonnomet et al. 2006; Bonnomet, Polette et al. 2008).

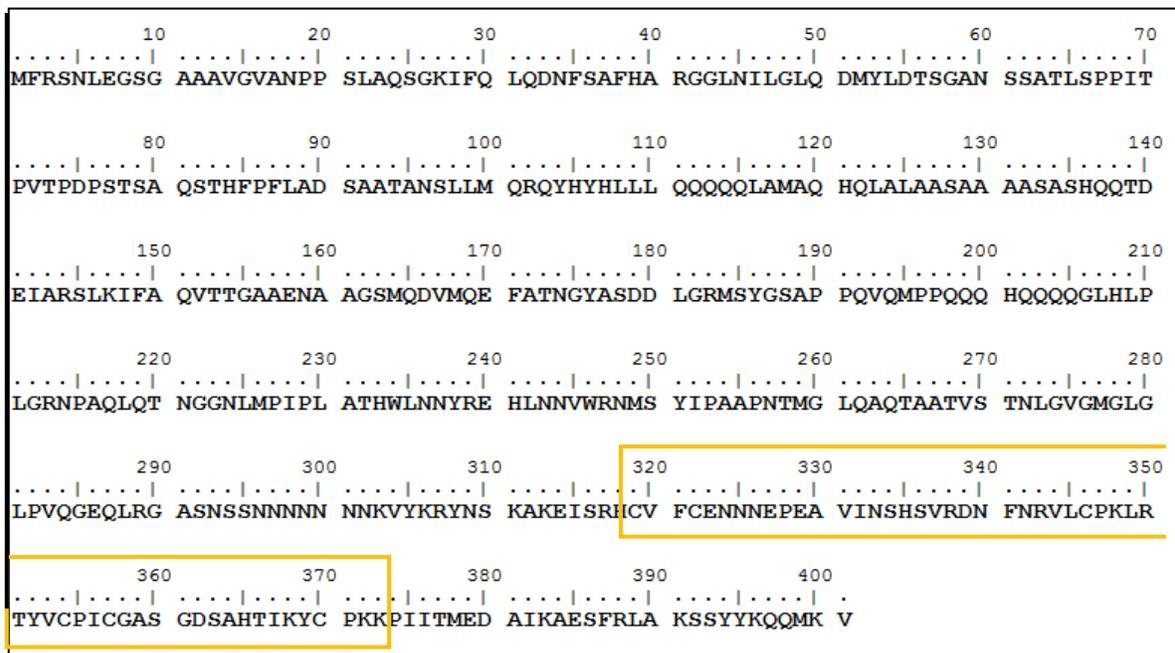


Figura 1.8. Secuencia de aminoácidos de la proteína Nanos de *Drosophila Melanogaster*. Se indica en el recuadro naranja el dominio altamente conservado en donde se encuentran los motivos de dedos de zinc, fundamentales para efectuar las funciones de regulación de la proteína.

De acuerdo a esta homología existente en tan diversos organismos; se piensa acerca de la probable existencia y expresión en células proliferantes, de un gen tipo *nanos*, en los platelmintos *Mesocostoides corti* y *Fasciola hepatica*. De este modo, se plantean objetivos de este trabajo detallados a continuación.

Objetivos de este trabajo

Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es contribuir a al estudio de los mecanismos moleculares del desarrollo en platelmintos parásitos. Dentro de esta línea de investigación, se busca profundizar en aspectos de la proliferación celular, como lo es, la expresión de determinados marcadores moleculares específicos.

Objetivo específico

El objetivo específico de este trabajo es, el aislamiento y caracterización de marcadores moleculares específicos tipo *nanos* de células germinales, en los platelmintos *Mesocestoides corti* y *Fasciola hepatica*. Además, se plantea el diseño de sondas para estudios de expresión mediante hibridación *in situ*.

Abordaje y estrategia experimental para esta investigación

Los antecedentes en planarias anteriormente mencionados y la información obtenida de las bases de datos disponibles, permiten suponer la existencia y expresión de algún gen ortólogo de *nanos* en los neoblastos de los platelmintos parásitos de interés para este equipo de trabajo.

Para la búsqueda de genes tipo *nanos* en *M. corti* y *F. hepatica*, se plantea la utilización de secuencias tipo *nanos* existentes en los genomas de platelmintos disponibles, para realizar un alineamiento de las mismas buscando regiones conservadas. En base a alguna de éstas, se pretende diseñar cebadores degenerados que permitan amplificarla. Logrado el paso anterior, se ligan estos fragmentos en vectores plasmídicos para luego transformar bacterias competentes y obtener colonias aisladas de clones conteniendo tales vectores. El rastreo (o “screening”) de los diferentes fragmentos de genes tipo *nanos* se realiza a partir de técnicas como la amplificación por PCR, digestión con enzimas de restricción seleccionadas, y finalmente por secuenciación automática. Una vez aislados y confirmados por secuenciación los fragmentos de genes tipo *nanos*, se diseñan cebadores específicos para completar los extremos 5' y 3' mediante la técnica de RACE (*Rapid Amplification cDNA Ends*). La obtención de fragmentos mayores de estos genes permite diseñar sondas para estudios de expresión mediante hibridación *in situ* con sondas frías (figura 1.9).

En el laboratorio donde se realizó este estudio se ha desarrollado una metodología adaptada al estudio de la expresión génica en material parasitario de cestodos y trematodos, por procedimientos inmunohistoquímicos y de hibridación *in situ*. También se dispuso de un sistema de cultivo *in vitro* para las etapas tempranas de desarrollo estrobilar de *M. corti* (Britos, Dominguez et al. 2000; Britos, Lalanne et al. 2007). Con respecto a marcadores moleculares de células proliferativas en platelmintos, se ha caracterizado la secuencia correspondiente al dominio Pumilio de *Echinococcus granulosus*, *Fasciola Hepatica*, y *Mesocestoides corti* (Koziol, Marin et al. 2008).

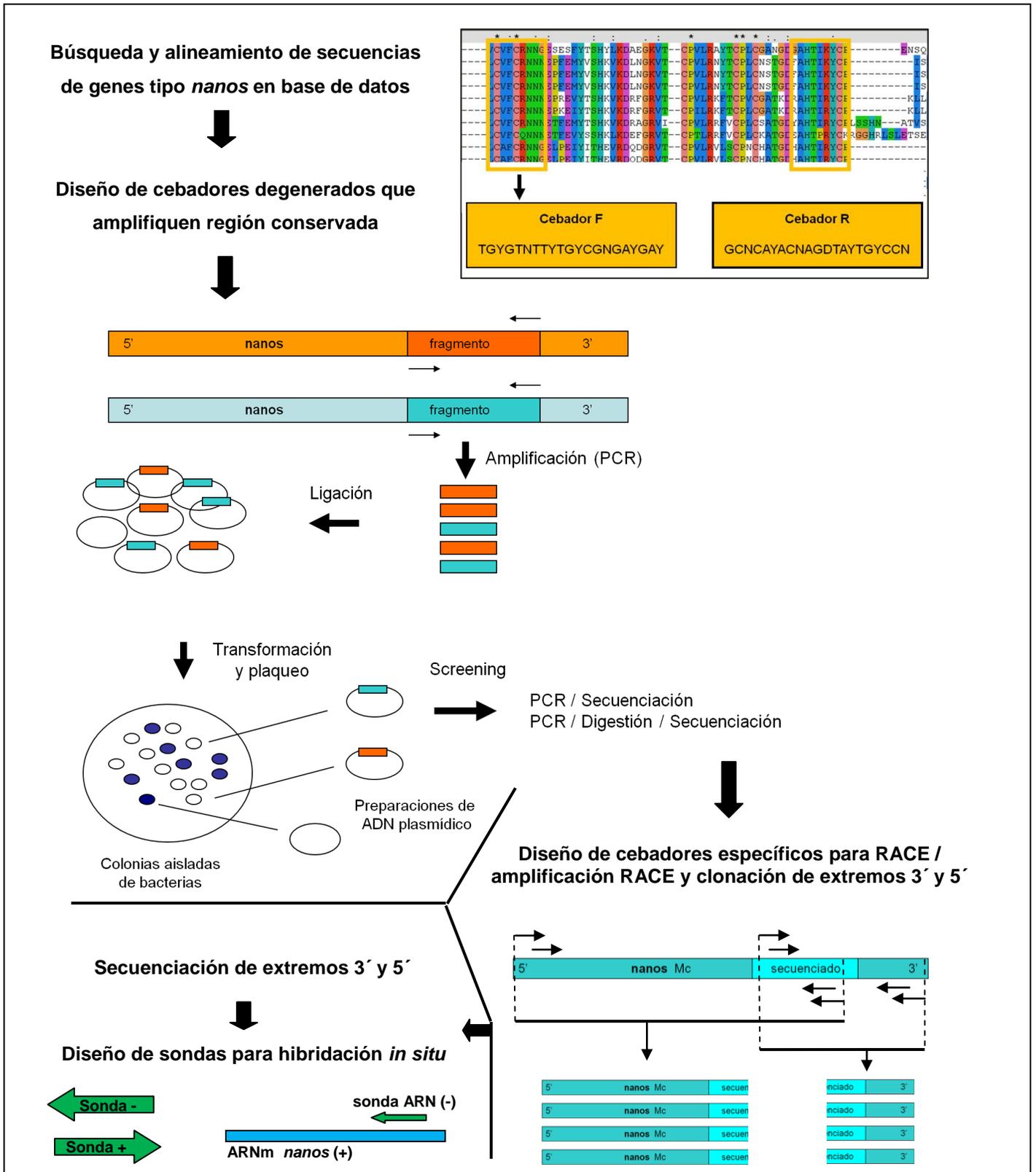


Figura 1.9. Estrategia experimental planteada a seguir en este trabajo, para lograr el aislamiento y caracterización de fragmentos de genes tipo *nanos*.

Actividades específicas

- Diseño de cebadores degenerados a partir de la búsqueda y comparación de secuencias de genes tipo *nanos* en las bases de datos disponibles.
- PCR sobre ADN copia y ADN genómico de *Echinococcus granulosus*, *Fasciola Hepatica* y *Mesocestoides corti*, utilizando los cebadores anteriormente diseñados.
- Clonación de fragmentos obtenidos por PCR procedentes de *Fasciola Hepatica* y *Mesocestoides corti* en vectores procariotas.
- Secuenciación y análisis de los plásmidos recombinantes conteniendo fragmentos de genes tipo *nanos*.
- Amplificación por medio de RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) de los extremos 3' y 5' de la secuencia codificante de los genes tipo *nanos* en *M. corti* y *F. hepatica*.
- Clonación de los fragmentos obtenidos por medio de RACE procedentes de *Fasciola Hepatica* y *Mesocestoides corti* en vectores procariotas.
- Secuenciación y análisis de los plásmidos recombinantes conteniendo extremos 3' y 5' de genes tipo *nanos*.
- Diseño de sondas para la hibridación *in situ* en *M. corti*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Búsqueda de secuencias de genes tipo *nanos* en bases de datos

La búsqueda de secuencias de genes tipo *nanos* se realiza en las siguientes bases de datos: NCBI (*GenBank*), *Sanger Institute*, y *GeneDB Smansoni Genes*. Con el fin de encontrar alguna región conservada dentro de los genes propuestos a estudiar, se realizarán alineamientos en base a estas secuencias obtenidas en las bases de datos (anexo, referencia 1).

Análisis de secuencias de genes tipo *nanos* encontradas

Las secuencias de genes tipo *nanos* que se obtienen en las bases de datos pueden corresponder a secuencias de ADN codificante o a secuencias de ensamblado (*contigs*) del ADN genómico. Los *contigs* son grandes fragmentos del ADN genómico de un organismo, que abarcan por lo general múltiples genes, y por lo tanto, distintas secuencias codificantes (exones) que pueden estar intercaladas por secuencias no codificantes (intrones). Si un gen tipo *nanos* de algún organismo cuya secuencia ya es conocida (ADN codificante), encuentra su homología dentro del ADN genómico de algún otro organismo, significa que existe algún posible gen tipo *nanos* para este último. Para encontrar regiones de homología de genes tipo *nanos* dentro de los “contigs” de ADN genómico disponibles en la base de datos, se utiliza la herramienta informática *TBLASTN* (anexo, referencia 2). De este modo se resuelve también la posible existencia y ubicación de regiones intrónicas dentro de los genes tipo *nanos* encontrados en “contigs”, ya que el *TBLASTN* indica el lugar donde comienza y finaliza la homología entre las secuencias.

Alineamiento de las secuencias de genes tipo *nanos* encontradas

La herramienta informática *ClustalW* (integrada al *MEGA4*) se utiliza para realizar los alineamientos en base a las secuencias de genes tipo *nanos* encontradas. Se realizan 2 alineamientos similares, con la diferencia de que en el segundo se utiliza únicamente secuencias de genes tipo *nanos* de platelmintos.

El primer alineamiento se realiza en base a 10 secuencias codificantes de genes tipo *nanos* de 10 organismos diferentes y 2 secuencias genómicas de un

organismo. El segundo alineamiento se realiza en base a 7 secuencias codificantes de genes tipo *nanos* de 6 platelmintos diferentes y 2 secuencias genómicas de un platelminto. Para los alineamientos se utilizan solo las secuencias codificantes de genes tipo *nanos*. Las secuencias codificantes que se encuentran dentro de las secuencias genómicas son deducidas con la ayuda de herramientas informáticas y los detalles se muestran más adelante.

Análisis filogenéticos

Los análisis filogenéticos fueron realizados con el programa *MEGA4*, programa integral de análisis y alineamiento de secuencias, inferencia filogenética, y estimación de las distancias evolutivas. Los árboles filogenéticos se realizaron con este programa y los valores de *bootstrap* fueron estimados usando 500 replicas.

Diseño de cebadores degenerados para realizar PCR

Se diseñan los cebadores degenerados en base al segundo alineamiento, realizado con secuencias de genes tipo *nanos* de platelmintos. Los mismos permitirán amplificar por medio de PCR, la región conservada de un/os posible/s gen/es tipo *nanos*, en *M. corti* y *F. hepatica*.

Los cebadores son degenerados porque no se diseña un par específico de cebadores F (*Forward*, amplifican la cadena sentido) y R (*Reverse*, amplifican la cadena anti sentido) sino varios pares de cebadores F y R. Esto es porque el punto de partida para el diseño de los cebadores, son secuencias de aminoácidos deducidas a partir de secuencias de nucleótidos. Debido a la degeneración del código genético, es que existen varias posibles secuencias nucleotídicas capaces de amplificar la misma secuencia de aminoácidos.

Los aminoácidos correspondientes a los extremos 3' y 5' de la cadena codificante de la región conservada determinan una serie de oligonucleótidos posibles capaces de actuar como cebadores de la amplificación. Para el análisis de los oligonucleótidos cebadores diseñados se utilizan los programas *Gene Runner* y *Olygo Analyzer* (anexo, referencia 2). Se utiliza el código de letras

equivalentes a bases nucleotídicas especificado en la tabla M1 para resumir en una única secuencia al conjunto de cebadores oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR.

| Tabla M1 | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Código de letras equivalentes a determinados conjuntos de bases nucleotídicas utilizado para describir en una única secuencia a un conjunto de oligonucleótidos cebadores posibles. | | | | | | | | | | |
| | M | W | H | V | D | Y | S | K | B | N |
| A | A | A | A | A | A | | | | | A |
| C | C | | C | C | | C | C | | C | C |
| G | | | | G | G | | G | G | G | G |
| T | | T | T | | T | T | | T | T | T |

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para los siguientes dos tipos de reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores degenerados se utiliza la misma enzima *Taq DNA polymerase* recombinante provista por *Fermentas*. Las concentraciones de los diferentes reactivos se especifican a continuación para cada tipo de reacción.

- PCR con cebadores degenerados sobre ADN copia y ADN genómico

Las reacciones se llevan a cabo en un volumen final de 25 μ L conteniendo una mezcla de 0,064 μ M de cada juego de cebadores, 0,016 mM de $MgCl_2$, 0,016 mM de dNTPs, 1x buffer (10x) suministrado por la enzima, 0,01 U de enzima. Se utiliza de molde 3 μ L de ADNc o ADNg.

- PCR con cebadores degenerados sobre ADN plasmídico (Mp)

Las reacciones se llevan a cabo en un volumen final de 15 μ L conteniendo una mezcla de 0,016 μ M de cada juego de cebadores, 0,016 mM de $MgCl_2$, 0,0053 mM de dNTPs, 1x buffer (10x) suministrado por la enzima, 0,0083 U de enzima. Se utiliza de molde 1 μ L de ADN plasmídico.

- Condiciones de las etapas reacción

Las reacciones de amplificación con cebadores degenerados se realizan en condiciones específicas de temperatura (T), tiempo (t), y número de ciclos. Estos valores son determinados de acuerdo a los cebadores diseñados y a la enzima utilizada. Se utilizan las mismas condiciones de amplificación con cebadores degenerados para los diferentes moldes utilizados. Se utiliza un termociclador programable en el cual se configuran las condiciones de temperatura y tiempo de las etapas de la reacción, así como también el número de ciclos de las etapas de amplificación. En la tabla M2 se indican las condiciones de las diferentes etapas de reacción.

| Tabla M2 | | | |
|--|---|-------------|-------------------|
| Condiciones de temperatura y tiempo de las etapas de la reacción, así como también el número de ciclos de las etapas de amplificación. | | | |
| Etapas de la reacción | Condiciones de temperatura (T) y tiempo (t) | | |
| | T | t | |
| Inicialización | 94 °C | 3 minutos | |
| Desnaturalización | 95 °C | 30 segundos | x 35 ciclos |
| Unión del cebador | 50 °C | 30 segundos | |
| Extensión de la cadena | 72 °C | 45 segundos | |
| Extensión Final | 72 °C | 5 minutos | |
| Conservación | 15 °C | Indefinido | |

Electroforesis en gel de los fragmentos de ADN

El análisis primario de las moléculas de ADN se hizo mediante la migración de las mismas en geles de agarosa o poliacrilamida, según cual fuese su tamaño esperado. Para la amplificación con cebadores degenerados de los fragmentos nanos de 156 pares de bases se utilizan geles de agarosa al 2%. Para la purificación de ADN plasmídico (MPs > 1000 pb) se utilizan geles de agarosa al 1%. Para observar los patrones de digestión (fragmentos < 100 pb) se utilizan geles de poliacrilamida al 12% o 15%.

- Geles de agarosa

La separación de moléculas de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa se realiza en buffer TAE 1x (40 μ M Tris-Acetato, 10 mM EDTA pH8), a un voltaje de entre 80 y 100 Volts. Para cargar las muestras se utiliza buffer de carga 6X (0.25% Azul de bromofenol, 0.25% Azul de xilencianol, 30% Glicerol). La visualización se realiza mediante adición de bromuro de etidio a la solución de agarosa a una concentración de 0.5 μ g/mL, y luego de la corrida exposición a luz ultravioleta ($\lambda=254$ nm) en un transiluminador *MacroVue UV-20 Hoefer*. Para estimar el tamaño de las moléculas se utilizan los marcadores de peso molecular comerciales (anexo, referencia 3).

- Geles de poliacrilamida

La separación de moléculas de ADN mediante electroforesis en geles de poliacrilamida se realiza en buffer TBE (40 μ M Tris-Borato, 10 mM EDTA pH8) a un voltaje de 60 – 90 mV. Para cargar las muestras se utiliza buffer de carga 6X (0.25% Azul de bromofenol, 0.25% Azul de xilencianol, 30% Glicerol). La visualización se realiza mediante tinción con Nitrato de Plata utilizando tres soluciones diferentes y de forma ordenada. En primer lugar se introduce el gel de poliacrilamida durante 5 minutos en una cuba con la solución fijadora (10% etanol puro y 0.5% ácido acético glacial disueltos en agua). En segundo lugar, con previo lavado con agua, se introduce el gel de poliacrilamida durante 5 minutos en una

cuba con la solución de plata (nitrato de plata (2.0 g/L) disuelto en agua). En tercer lugar, con previo lavado con agua, se introduce el gel de poliacrilamida durante el tiempo que lleve ver las bandas, en una cuba con la solución reveladora (NaOH (30.0 g/L) y formaldeído 18.5%). Para estimar el tamaño de las moléculas se utilizan los marcadores de peso molecular comerciales (anexo, referencia 3).

Purificación de los fragmentos amplificados por medio de PCR

Se prepara un gel de agarosa para purificar el ADN utilizando un buffer de corrida nuevo sin haber sido utilizado previamente en otro ensayo de electroforesis. Se introduce el ADN a purificar en un carril y una alícuota del mismo en un carril contiguo que se utiliza como testigo.

La visualización se realiza de igual modo que el descrito anteriormente, con la excepción de que se irradiará con luz ultravioleta únicamente al carril de la alícuota. Es muy importante no irradiar con luz ultravioleta la muestra a purificar porque esto provocaría cambios irreversibles en las cadenas de nucleótidos. Se realiza una marca en el gel al lugar donde hayan migrado las moléculas de la alícuota, de modo que paralelamente a la misma, donde se encuentran las moléculas de la muestra (sin irradiar), se corta y extrae la agarosa conteniendo las moléculas de ADN.

El *kit* de extracción en gel de agarosa que se utiliza es el *QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN)*. Se sigue el protocolo del *kit* de extracción según las instrucciones sugeridas por el fabricante, excepto el último paso, donde la elución se realiza en un volumen de 20 μ L.

Concentración del ADN purificado

Se agrega a la solución de ADN, 1/10 volumen de Acetato de Sodio 3M, pH 5, y 2.5 volúmenes de Etanol absoluto. Se incuba durante una hora a -80°C . Se centrifuga a 4°C durante 20 minutos a 12000g y se descarta el sobrenadante. Se lava el sedimento con 500 μ L de Etanol 70% y se deja secar bajo lámpara. Se re suspende en H_2O pura (mQ) de acuerdo a la concentración deseada.

Clonado en vector plasmídico: Ligación y Transformación

- Ligación

Se utiliza el vector pGEM®-TEasy (*pGEM®-TEasy Vector System, Promega*) para ligar los fragmentos amplificados en la PCR con cebadores degenerados. El vector *pGEM®-TEasy* contiene un gen de resistencia a ampicilina que confiere resistencia a este antibiótico, de modo tal, que aquellas colonias que crezcan en un medio con ampicilina, serán aquellas que tengan a este vector plasmídico incorporado en su citoplasma. Este vector contiene también el gen *lacZ* que codifica para la β – galactosidasa, enzima que cataliza la reacción de hidrólisis de la lactosa en glucosa más galactosa. Si se agrega IPTG y X-Gal al medio, la selección blanco/azul de colonias aisladas, permitirá discernir entre aquellas que contengan inserto de las que no lo contengan. El IPTG (isopropil- β -D-tio-galactósido) se utiliza como inductor artificial del operón *lac*. El X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido) es un sustrato de la β -galactosidasa que, al ser hidrolizado, produce un compuesto (indoxil) que en contacto con el aire se transforma en índigo insoluble, el cual presenta un intenso color azul. Aquellas colonias que estén expresando la enzima se tornarán de un color azul. La interrupción del gen *lacZ* por insertos que son múltiplos de 3 no siempre produce la inactivación por inserción. El hecho de que el inserto sea un múltiplo de 3 hace que el marco de lectura no se vea afectado y la enzima producida sea activa, o al menos parcialmente, dado que pueden observarse colonias de color azul formadas por bacterias transformadas con vectores conteniendo inserto. En conclusión sobre este punto, la selección blanco / azul no es realizada de manera rigurosa en los ensayos de selección de colonias transformadas, ya que sabido lo anterior y que el inserto de interés es múltiplo de 3, se piensa que pueden existir colonias de color azul formadas por bacterias transformadas con vectores conteniendo insertos de interés para este estudio.

El mapa del vector y sus características se describen en figura M1. Se utiliza un *kit* de ligación provisto por *Promega* utilizando la enzima *T4 DNA Ligase*. Se sigue el protocolo del *kit* según las instrucciones sugeridas por el fabricante.

Se utilizan como insertos a ligar, los productos de amplificación de las reacciones de PCR con cebadores degenerados procedentes de ADN copia de *M. corti* y *F. hepatica*, purificados y concentrados de acuerdo al inciso anterior.

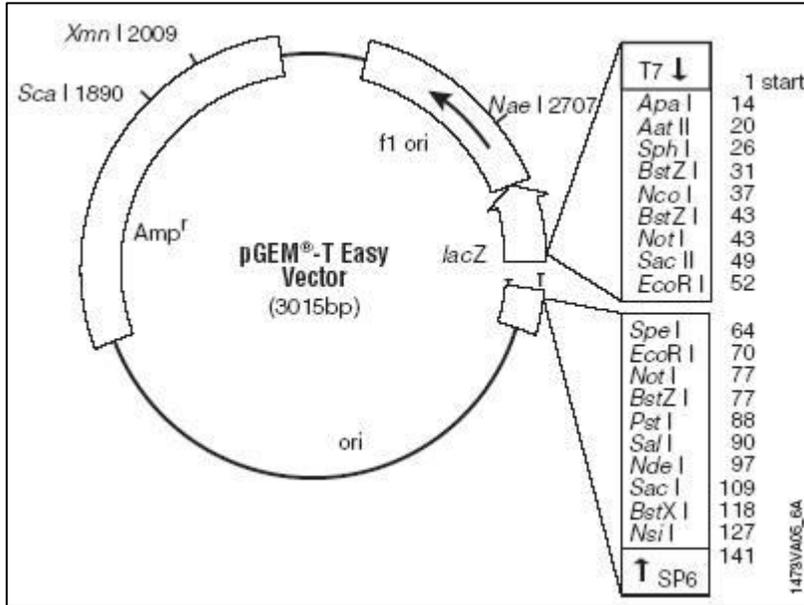


Figura M1

Mapa resumido del vector *pGEM®-T Easy*.

Se indican los puntos de referencia dentro del mismo. Cada número indica la distancia (en pares de bases) que hay desde el sitio de inicio de la transcripción de la T7 polimerasa hasta el sitio de restricción de cada enzima en la secuencia del vector.

- Transformación

Se utiliza la cepa *XL-1 Blue* de bacterias *E. coli* competentes tratadas con Cloruro de Calcio (CaCl) para transformar bacterias competentes con las mezcla de ligación producidas anteriormente. Se descongelan las células químicamente competentes en hielo durante 10 minutos. Se agrega como máximo el 10% del volumen de la mezcla de ligación al volumen total de células competentes, por ejemplo 5 µL de mezcla para 50 µL de células. Se incuba en hielo durante 20 minutos. Se realiza un shock térmico durante 90 segundos a 42 °C y a continuación se incuba en hielo por 90 segundos. Se agrega 600µL de medio LB líquido para 55 µL de mezcla de ligación con bacterias y se incuba con agitación a 37 °C durante 45 minutos. El cultivo de bacterias en medio sólido se realiza en placas con un medio de LB – Agar 16 g/L conteniendo ampicilina 100 µg/mL, IPTG 0,013 M, y X-Gal 2,67 mg/mL.

Obtención de ADN plasmídico

A continuación se detallan los pasos para obtener una preparación de ADN plasmídico a partir de una colonia de bacterias aislada de un cultivo en placa con medio sólido, como el descrito anteriormente para las bacterias transformadas de interés. Se realiza un cultivo en 3 mL de LB líquido con ampicilina 100 µg/mL a partir de una colonia aislada y se incuba 12 horas a 37 °C con agitación. Se centrifuga 30 segundos a 13600g para coleccionar las células y se descarta la totalidad del medio. La anterior centrifugación se realiza dos veces por separado, obteniendo la mayor cantidad de células posibles. Se re suspenden las células en 200 µL de solución 1 (Tris-HCl 50 mM pH8, EDTA 10 mM). Se agregan 200 µL de solución 2 (NaOH 200mM, SDS 1%) para lisar las células. Se mezcla por inversión suavemente. Se incuba 2 minutos a temperatura ambiente. Se agregan 200 µL de solución 3 (Acetato de potasio 3M pH 4,8) para la re naturalización del ADN. Se mezcla y se incuba 5 minutos en hielo. Se centrifuga 20 minutos a 12000 g a 4 °C y se recupera el sobrenadante con una pipeta. Se agregan 10 µL de ARN nucleasa 1 mg/mL y se incuba 15 minutos a 37 °C. Se agregan 600 µL de cloroformo - alcohol isoamílico (576 µL de cloroformo / 24µL de alcohol isoamílico). Se centrifuga durante 5 minutos para separar las fases. Se recupera la fase acuosa (superior) y se precipita el ADN plasmídico agregando 2 volúmenes de Etanol absoluto. Se centrifuga durante 15 minutos a 10000 g a 4°C. Se descarta el sobrenadante y se lava el sedimento con 300 µL de Etanol 70%. Se descarta todo el etanol posible con pipeta (se centrifuga una vez más si es necesario) y se deja secar bajo lámpara. Se re suspende en 40 µL de H₂O mQ.

Secuenciación - Análisis de secuencias

Se obtienen las secuencias del ADN de los insertos en los vectores plasmídicos en el servicio de secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo (*Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer*). Se utilizan los cebadores T7 o SP6 que hibridan con el vector en sitios adyacentes al sitio de clonado múltiple (anexo, referencia 4).

Las secuencias obtenidas se visualizan y corrigen con el programa *Chromas* y luego se analizan con el programa *Gene Runner* (anexo, referencia 2), comprobando por ejemplo, que los cebadores utilizados para la amplificación se encuentren flanqueando la región de interés. Luego se busca la homología entre las secuencias obtenidas en la secuenciación y la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), de modo de comprobar la identidad de las secuencias obtenidas. Para esto se utiliza la herramienta *BLASTX* del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) que permite introducir una secuencia de nucleótidos y buscar homología entre la misma traducida y las secuencias de aminoácidos (secuencias proteicas) dentro de la base de datos del *GenBank*.

Digestión con enzimas de restricción

- Digestión de vectores con enzimas de restricción HaeIII y AccI

De acuerdo a las dos secuencias caracterizadas de fragmentos clonados procedentes de *M. corti* y *F. hepatica*, se buscan dos posibles enzimas de restricción que produzcan un patrón de digestión característico para cada fragmento. De este modo se puede comprobar, de acuerdo a la migración en gel de los fragmentos de restricción, si éstos corresponden a las secuencias ya caracterizadas o pueden ser fragmentos de otro posible gen tipo *nanos* de alguno de los organismos de estudio. Esto se realiza (con el fin de ahorrar costos y tiempo) para no tener que secuenciar todos los fragmentos clonados, sino aquellos que presenten un patrón de digestión diferente al característico para los dos primeros fragmentos ya secuenciados.

Se eligen dos enzimas de restricción que determinen un patrón de digestión característico para cada fragmento de los dos genes tipo *nanos* ya secuenciados. Las enzimas son elegidas, de acuerdo a los mapas de restricción obtenidos para los fragmentos secuenciados, y también de acuerdo a la disponibilidad de las mismas en el laboratorio donde se realiza el trabajo. Los mapas de restricción para determinadas secuencias pueden obtenerse con numerosas aplicaciones informáticas tales como *Gene Runner* y *NEBcutter* (anexo, referencia 2).

En este caso, se elige cada enzima dentro del conjunto de enzimas obtenidas de cada mapa de restricción para cada fragmento secuenciado, de acuerdo a la disponibilidad de las mismas dentro del laboratorio de trabajo.

Para el fragmento procedente de *M. Corti*, se utiliza la nucleasa de restricción *HaeIII* (*Gibco*). Para cada reacción de digestión se utilizan 7 μL de los fragmentos procedentes de *M. Corti*, utilizando 5 U (10 U/ μL) de la enzima *HaeIII* (*Gibco*), con 1 μL de buffer de reacción 10x suministrado con la enzima, siendo el volumen final de la reacción de 10 μL .

Para el fragmento procedente de *F. Hepatica*, se utiliza la nucleasa de restricción *Accl* (*Fermentas*). Para cada reacción de digestión se utilizan 7 μL de los fragmentos procedentes de *F. hepatica*, utilizando 3,3 U (3 U/ μL) de la enzima *Accl* (*Fermentas*), con 1 μL de buffer de reacción 10x suministrado con la enzima, siendo el volumen final de la reacción de 10 μL .

Las secuencias específicas de reconocimiento de los sitios de clivaje de las enzimas de restricción *HaeIII* y *Accl* figuran en el anexo (anexo, referencia 5).

- Digestión de vectores con enzima de restricción *EcoRI*

Se realizan digestiones de ADN plasmídico para verificar la presencia de insertos en el vector *pGEM-TEasy*. Se utiliza la enzima de restricción *EcoRI*, que digiere el plásmido en regiones que flanquean al inserto (figura M1).

Para cada reacción de digestión se utilizan 3 μL de ADN plasmídico, utilizando 3,3 U (10 U/ μL) de la enzima *EcoRI* (*Fermentas*), con 1 μL de buffer de reacción 10x suministrado con la enzima, siendo el volumen final de la reacción de 10 μL .

Amplificación rápida de los extremos de ADN copia (RACE)

Se amplifican los extremos 5' y 3' mediante el sistema de amplificación rápida de los extremos de ADN copia, *RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)*. Se utiliza el *GeneRacer Kit (Invitrogen)* según las instrucciones sugeridas por el fabricante.

- Transcripción Inversa (RT)

Para la transcripción inversa del ARN mensajero se utiliza la enzima *SuperScript™ III* y el *Oligo dT Primer* del módulo de retrotranscripción del *kit (SuperScript™ III RT Module)*. El molde es ARN mensajero de platelmintos de 13 días para el caso de *M. corti* y de platelmintos adultos para el caso de *F. hepatica*.

- Diseño de cebadores específicos F y R

Las secuencias obtenidas de los fragmentos de ADN codificante se utilizan para diseñar cebadores específicos con el fin de amplificar los extremos 5' y 3' mediante el sistema de amplificación rápida de los extremos de ADN copia, *RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)*. Para obtener una elevada especificidad y sensibilidad en la amplificación de los extremos se realizan reacciones de PCR anidada (*PCR Nested*).

Para amplificar el extremo 3' del ADN copia se utilizan dos cebadores específicos *Forward (F)* y dos cebadores prediseñados del *kit GeneRacer*. De acuerdo a cada fragmento secuenciado en *M. corti* y en *F. hepatica*, se diseñan dos cebadores específicos *Forward (F)* que amplifican la cadena sentido y deben hibridar con la cadena anti sentido en la región 5' del fragmento secuenciado. Dos cebadores prediseñados del kit, el *GeneRacer™ 3' primer* y el *GeneRacer™ 3' Nested primer*, amplifican la cadena anti sentido e hibridan con la cadena sentido en la región 3' del ADN copia. En la primer reacción de PCR se utiliza el cebador específico F1 y el *GeneRacer™ 3' primer*. En la segunda reacción de PCR (PCR anidada) se utiliza el cebador específico (anidado) F2 y el *GeneRacer™ 3' Nested primer*.

Para amplificar el extremo 5' del ADN copia se utilizan dos cebadores específicos *Reverse* (R) y dos cebadores prediseñados del *kit GeneRacer*. De acuerdo a cada fragmento secuenciado en *M. corti* y en *F. hepatica*, se diseñan dos cebadores específicos *Reverse* (R) que amplifican la cadena anti sentido y deben hibridar con la cadena sentido en la región 3' del fragmento secuenciado. Dos cebadores prediseñados del kit, el *GeneRacer*TM *5' primer* y el *GeneRacer*TM *5' Nested primer*, amplifican la cadena sentido e hibridan con la cadena anti sentido en la región 5' del ADN copia modificado. El ADN copia utilizado es producto de la transcripción inversa a partir de ARN mensajero al cual se le ha ligado un oligonucleótido en su extremo 5'. Los cebadores *GeneRacer*TM *5'* y *GeneRacer*TM *5' Nested primers* hibridan con la secuencia de este oligonucleótido añadido al extremo 5'. En la primer reacción de PCR se utiliza el cebador específico R1 y el *GeneRacer*TM *5' primer*. En la segunda reacción de PCR (PCR anidada) se utiliza el cebador específico (anidado) R2 y el *GeneRacer*TM *5' Nested primer*.

Mcnos se refiere al fragmento secuenciado del gen tipo *nanos* en *M. corti* y *Fhnos* se refiere al fragmento secuenciado del gen tipo *nanos* en *F. hepatica*. Los cebadores *Mcnos* diseñados se utilizan sobre ADN copia de *M. corti* y los cebadores *Fhnos* diseñados se utilizan sobre ADN copia de *F. hepatica*.

Para el análisis de los oligonucleótidos cebadores diseñados se utilizan los programas *Gene Runner* y *Olygo Analyzer* (anexo). La temperatura de hibridación se calcula de acuerdo a la fórmula propuesta en el protocolo del kit, $4 \times (G+C) + 2 \times (A+T) = \text{Annealing temperature (approximate } T_m)$, donde G, C, A, o T representa el número de esas bases en la secuencia del cebador.

- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de los extremos 3' se utiliza la enzima *Taq DNA polymerase* recombinante y para la amplificación de los extremos 5' se utiliza la enzima *AccuPrime™ Pfx polymerase*, ambas enzimas provistas por *Invitrogen*.

Las condiciones de temperatura, tiempo, y número de ciclos se especifican en las tablas M3a y M3b. Para amplificar cada extremo 5' y 3' de cada fragmento en particular se realizan dos reacciones de PCR consecutivas utilizando un par de cebadores específicos para cada reacción. Se utilizan las siguientes concentraciones de reactivos para cada reacción:

La primera reacción de amplificación se lleva a cabo en un volumen final de 25 μ L; conteniendo una mezcla de 0,064 μ M de cada cebador específico, 0,16 mM de $MgCl_2$, 0,016 mM de dNTPs, 1x buffer (10x) suministrado por la enzima, 0,04 U de enzima, y 3 μ L de ADNc.

La segunda reacción amplificación (PCR anidada) se lleva a cabo en un volumen final de 25 μ L; conteniendo una mezcla de 0,064 μ M de cada cebador específico, 0,16 mM de $MgCl_2$, 0,016 mM de dNTPs, 1x buffer (10x) suministrado por la enzima, 0,04 U de enzima, y 0,5 μ L del producto de la primera reacción de PCR.

- Condiciones de las etapas reacción

Las reacciones de amplificación con el sistema *RACE* se realizan en condiciones específicas de temperatura (T), tiempo (t), y número de ciclos. Estos valores dependen de qué polimerasa se utilice para amplificar, de los cebadores específicos diseñados, y del largo estimado del fragmento de ADN a extender. Los valores de los largos de los extremos 3' y 5' son estimados de acuerdo a otros genes tipo *nanos* en otros platelmintos y se utiliza un tiempo de extensión de un minuto por cada mil bases (1 kb) de ADN a polimerizar. Se utiliza un termociclador programable en el cual se configuran las condiciones de temperatura y tiempo de las etapas de la reacción, así como también el número de ciclos de las etapas de amplificación. En las tablas M3a y M3b se indican las condiciones de las etapas de amplificación de la primera y segunda (PCR anidada) reacción respectivamente.

Tabla M3a. Condiciones de temperatura y tiempo de las etapas de la reacción, así como también el número de ciclos de las etapas de amplificación, de la primera PCR para la amplificación de los extremos 3' y 5' del ADN codificante.

| Etapas de la reacción | Condiciones de temperatura (T), tiempo (t), y número (Nº) de ciclos de la primera PCR | | | | |
|------------------------|---|-------------|--------|-------------|--------------|
| | PCR 3' | | PCR 5' | | PCR 3' y 5' |
| | T | t | T | t | Nº de ciclos |
| Inicialización | 94 °C | 2 minutos | 94 °C | 2 minutos | 1 |
| | 94 °C | 30 segundos | 94 °C | 30 segundos | 5 |
| | 72 °C | 1 minuto | 72 °C | 2 minutos | |
| | 94 °C | 30 segundos | 94 °C | 30 segundos | 5 |
| | 70 °C | 1 minuto | 70 °C | 2 minutos | |
| Desnaturalización | 94 °C | 30 segundos | 94 °C | 30 segundos | 25 |
| Unión del cebador | 62 °C | 30 segundos | 60 °C | 30 segundos | |
| Extensión de la cadena | 72 °C | 1 minuto | 68 °C | 2 minutos | |
| Extensión Final | 72 °C | 10 minutos | 68 °C | 10 minutos | 1 |
| Conservación | 15 °C | Indefinido | 15 °C | Indefinido | |

Tabla M3b. Condiciones de temperatura y tiempo de las etapas de la reacción, así como también el número de ciclos de las etapas de amplificación, de la segunda PCR (anidada) para la amplificación de los extremos 3' y 5' de ADN codificante.

| Etapas de la reacción | Condiciones de temperatura (T), tiempo (t), y número (Nº) de ciclos de la segunda PCR | | | | |
|------------------------|---|-------------|--------|-------------|--------------|
| | PCR 3' | | PCR 5' | | PCR 3' y 5' |
| | T | t | T | t | Nº de ciclos |
| Inicialización | 94 °C | 2 minutos | 94 °C | 2 minutos | 1 |
| Desnaturalización | 94 °C | 30 segundos | 94 °C | 30 segundos | 35 |
| Unión del cebador | 62 °C | 30 segundos | 60 °C | 30 segundos | |
| Extensión de la cadena | 72 °C | 1 minuto | 68 °C | 2 minutos | |
| Extensión Final | 72 °C | 10 minutos | 68 °C | 10 minutos | 1 |
| Conservación | 15 °C | Indefinido | 15 °C | Indefinido | |

Aislamiento y secuenciación de los extremos amplificados

Los productos de las reacciones de amplificación de los extremo 3' y 5' son ligados en el vector plasmídico *p-Gem T Easy*. El procedimiento de ligación es análogo a los anteriores ya realizados para los fragmentos de genes tipo nanos aislados. Se transforman bacterias *E. coli* competentes con las mezclas de ligación correspondientes. Las mismas se hacen crecer en placas, una y otra vez de manera de obtener colonias aisladas, o sean diferentes conjuntos de clones. El procedimiento de transformación es análogo a los anteriores ya realizados con diferentes mezclas de ligación. Las preparaciones de ADN plasmídico son digeridas con EcoRI para comprobar la presencia de los insertos respectivos. Los fragmentos seleccionados para secuenciarse son aquellos que luego de ser liberados como producto de la digestión, migran en el gel de agarosa de acuerdo a su tamaño esperado.

Diseño de sondas para hibridación *in situ*

Para la hibridación *in situ* se diseñan sondas específicas de ARN de cadena sencilla que hibriden con el extremo 3' del ARN mensajero del gen tipo *nanos* de *M. corti* (*Mcnos*). La secuencia específica de la sonda anti sentido (*antisense*) de ARN es determinada por la secuencia inversa y complementaria del ADN codificante del extremo 3' de *Mcnos*. La secuencia específica de la sonda sentido (*sense*) de ARN es determinada por la secuencia del ADN codificante del extremo 3' de *Mcnos*. Se utiliza como molde para la transcripción de la sonda a un vector plasmídico específico al que se le haya inserto un extremo 3' del gen *Mcnos*, y una enzima ARN polimerasa SP6 o T7, dependiendo del sentido en que se encuentre el ADN clonado en el vector, con respecto a los sitios de inicio (promotores SP6 o T7) de la transcripción. Para obtener un fragmento lineal que incluya al promotor de interés SP6 o T7 necesario para iniciar la transcripción y parte de la secuencia del extremo 3' (la mayor parte posible) del gen *Mcnos*, se elige una enzima de restricción específica de acuerdo al mapa de digestión generado con el vector y su inserto característico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Búsqueda de secuencias de genes tipo *nanos* en bases de datos

Se encontraron secuencias de genes tipo *nanos* de diferentes organismos en las bases de datos. Se seleccionaron algunas para descargar y utilizar posteriormente en los alineamientos. Se descargaron: 8 secuencias codificantes (ADN copia) de 7 organismos diferentes de la base de datos del NCBI (*GenBank*), 2 secuencias codificantes (ADN copia) de *S. Mansoni* del *GeneDB Smansoni Genes*, y 2 secuencias no codificantes (*contigs* de ADN genómico) de *E. Multilocularis* del Sanger Institute (anexo, referencia 1).

Análisis de las secuencias de ADN genómico en *E. multilocularis*

Para encontrar regiones de homología con genes tipo *nanos* en el ADN genómico de *E. multilocularis* disponible en la base de datos del Sanger Institute, se utilizó la herramienta informática TBLASTN (anexo, referencia 2). Se encontraron dos regiones dentro del ADN genómico de *E. multilocularis*, en el *Contig_0009653* y en el *Contig_0009811*, que tenían homologías con el gen tipo *nanos* de *S. mediterranea*. La homología existente entre las regiones del ADN genómico *E. multilocularis* y el gen tipo *nanos* de *S. mediterranea* fue la base para la hipótesis de que existía uno o dos posibles genes tipo *nanos* en *E. multilocularis*.

La homología encontrada es a nivel de secuencias de aminoácidos, ya que el TBLASTN traduce los tres posibles marcos de lectura de las secuencias nucleotídicas y “busca” las regiones homólogas entre las posibles secuencias aminoacídicas resultantes. Las secuencias aminoacídicas fueron deducidas a partir de las secuencias de nucleótidos del ADN copia del gen tipo *nanos* de *S. mediterranea*, y a partir de los dos *contigs* del ADN genómico de *E. multilocularis*. Existen diferentes secuencias aminoacídicas posibles correspondientes a los tres marcos de lectura abiertos, para cada uno de los *contigs* de *E. multilocularis*. La búsqueda de homologías se realiza automáticamente en los tres marcos de lectura, por lo cual, una vez encontrada alguna homología hay que observar a qué marco de lectura corresponde ésta para cada *contig* en particular. Cada una de las regiones encontradas en el ADN genómico de *E. multilocularis*, propuestas como

posibles genes tipo *nanos*, presentan una región interna donde no se encuentra similitud alguna con la secuencia codificante del gen tipo *nanos* de *S. mediterranea*. Esto fue así para cada *contig* de *E. multilocularis* donde se encontró homología, los cuales se ha dicho que fueron el *Contig_0009653* y el *Contig_0009811*. Debido a que las secuencias de *contigs* son parte del ADN genómico, lo más probable es que estas interrupciones en la homología correspondan a regiones intrónicas. Se pudo conocer la longitud aproximada de las regiones intrónicas de acuerdo a los lugares donde termina y vuelve a comenzar la similitud de secuencias aminoacídicas basadas en nucleótidos. Los resultados fueron de 253 pares de bases para el *Contig_0009653* y de 111 pares de bases para el *Contig_0009811* (Figura R1).

```

Score = 159 (61.0 bits), Expect = 6.4e-20, Sum P(2) = 6.4e-20
Identities = 27/43 (62%), Positives = 35/43 (81%), Frame = +1
[HSP Sequence]

Query:   161 KVKDLNGKVTCPVLRNYTCPLCNSTGDFAHITIKYCPISM-NTT 202
          +VKD  G+V  CPVLR  +  CPLC++TGD+AHTI+YCP+S  N  T
Sbjct: 13180 QVKDRAGRVICPVLRRFVCPLCSATGDYAHTIRYCPSSHNAT 13308

Score = 124 (48.7 bits), Expect = 6.4e-20, Sum P(2) = 6.4e-20
Identities = 32/75 (42%), Positives = 46/75 (61%), Frame = +1
[HSP Sequence]

Query:   91 RSDLKLSKELDRWVALLEAWPEKHITLDRSIWLRLLHKL-RTSNQIR--KESHIELCVFC 147
          RS  L  L  +  L  +  ++  +  E+  I  +D  +  RL  +  L  +  IR  E++++LCVFC
Sbjct: 12709 RSPLALMEVL--FSCRITYYEQGIPMDNPLLYRLTNFLGQLVPLIRHLSEANMDLCVFC 12882

Query:   148 RNNNEPFEMYVSHKV 162
          RNNNE  FEMY  SHKV
Sbjct: 12883 RNNNETFEMYTSHKV 12927
    
```

Figura R1. Región de homología entre el *contig_0009653* del ADN genómico de *E. multilocularis* (Sbjct) y el ADN copia del gen tipo *nanos* de *S. mediterranea* (Query), la cual se encuentra interrumpida por una región sin similitud alguna, propuesta como un posible intrón. En la secuencia genómica se indica con círculos rojos los sitios que corresponderían al lugar aproximado de corte y empalme del intrón en la secuencia de nucleótidos. Según estos sitios, la longitud estimada para esta región intrónica sería alrededor de los 253 pares de bases (13180 – 12927 = 253 pares de bases).

De acuerdo a la similitud de aminoácidos entre la secuencia traducida del ADN copia del gen tipo *nanos* de *S. mediterranea*, y alguna de las secuencias traducidas de cada uno de los *contigs* encontrados en el ADN genómico de *E. multilocularis*, se dedujeron los marcos de lectura correctos para cada uno de los dos supuestos genes tipo *nanos* de *E. multilocularis* encontrados. El marco de

lectura correcto para el posible gen tipo *nanos* del *contig_0009653* del ADN genómico de *E. multilocularis* es el +1 en éste *contig*, de acuerdo a la similitud de la secuencia de aminoácidos codificada por el mismo, con la secuencia de aminoácidos codificada por el ADN copia de *Smednos*.

Un análisis más detallado de las regiones intrónicas utilizando el *Gene Runner* (anexo, referencia 3) permitió conocer los sitios exactos de corte y empalme de los supuestos ARN mensajeros de los genes tipo *nanos* de *E. multilocularis*. La región intrónica exacta del posible gen tipo *nanos* del *contig_0009653* del ADN genómico de *E. multilocularis* va desde el sitio GT donador (12924) hasta el sitio AG aceptor (13183). De forma tal que el intrón es finalmente de un largo de 259 pares de bases (figura R2). Análogamente, se dedujo el largo exacto de la región intrónica del posible gen tipo *nanos* de *E. multilocularis* en el *Contig_0009811* de su ADN genómico, cuyo valor estimado era de 111 pares de bases. La extensión exacta del intrón según el sitio GT donador y el sitio AG aceptor es de 135 pares de bases.

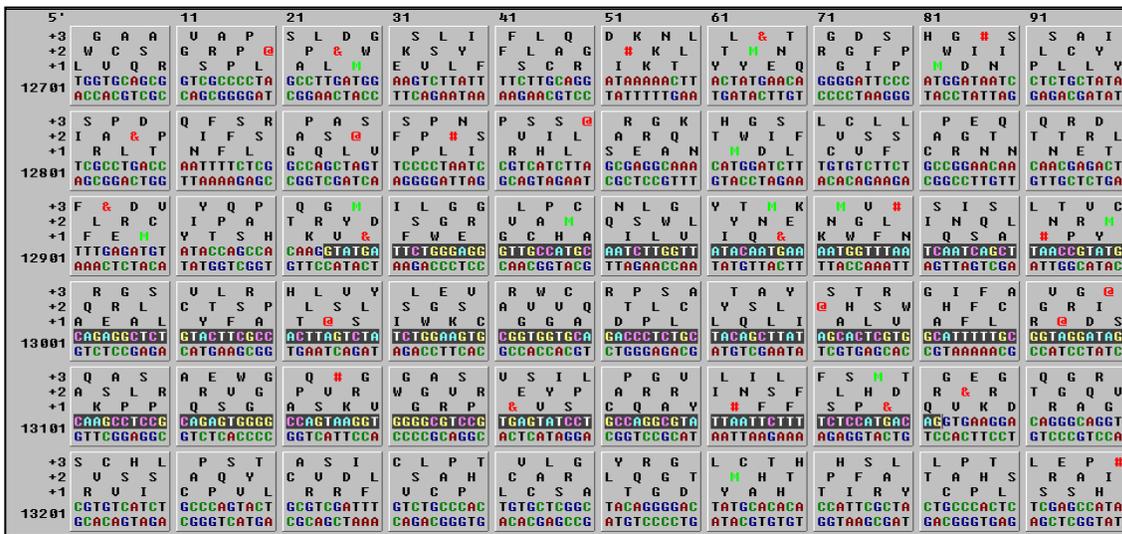


Figura R2. Marcos de lectura abiertos dentro del *contig_0009653* del ADN genómico de *E. multilocularis*. El marco de lectura correcto para el posible gen tipo *nanos* de este *contig* del ADN genómico de *E. multilocularis* es el +1, de acuerdo a la similitud de la secuencia de aminoácidos codificada por el mismo, con la secuencia de aminoácidos codificada por el ADN copia de *Smednos*. En sombreado se indica la región intrónica exacta, que va desde el sitio GT donador (12924) hasta el sitio AG aceptor (13183), siendo la misma de un largo de 259 pares de bases.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a las dos secuencias intrónicas encontradas en los dos posibles genes tipo *nanos* del ADN genómico de *E. multilocularis* se dedujeron las secuencias exónicas para tales genes, y por ende, los aminoácidos codificados por las mismas. Estas secuencias resultantes fueron las agregadas a los alineamientos realizados con las demás secuencias codificantes traducidas encontradas en las otras bases de datos (figura R3).

| | | |
|-------|--|-------|
| 12871 | TGT GTC TTC TGC CGG AAC AAC AAC GAG ACT TTT GAG ATG TAT ACC | 12915 |
| 4291 | Cys Val Phe Cys Arg Asn Asn Asn Glu Thr Phe Glu Met Tyr Thr | 4305 |
| 12916 | AGC CAC AAG GTA TGA TTC TGG GAG GGT TGC CAT GCA ATC TTG GTT | 12960 |
| 4306 | Ser His Lys Val End Phe Trp Glu Gly Cys His Ala Ile Leu Val | 4320 |
| 12961 | ATA CAA TGA AAA TGG TTT AAT CAA TCA GCT TAA CCG TAT GCA GAG | 13005 |
| 4321 | Ile Gln End Lys Trp Phe Asn Gln Ser Ala End Pro Tyr Ala Glu | 4335 |
| 13006 | GCT CTG TAC TTC GCC ACT TAG TCT ATC TGG AAG TGC GGT GGT GCA | 13050 |
| 4336 | Ala Leu Tyr Phe Ala Thr End Ser Ile Trp Lys Cys Gly Gly Ala | 4350 |
| 13051 | GAC CCT CTG CTA CAG CTT ATA GCA CTC GTG GCA TTT TTG CCG TAG | 13095 |
| 4351 | Asp Pro Leu Leu Gln Leu Ile Ala Leu Val Ala Phe Leu Arg End | 4365 |
| 13096 | GAT AGC AAG CCT CCG CAG AGT GGG GCC AGT AAG GTG GGG CGT CCG | 13140 |
| 4366 | Asp Ser Lys Pro Pro Gln Ser Gly Ala Ser Lys Val Gly Arg Pro | 4380 |
| 13141 | TGA GTA TCC TGC CAG GCG TAT TAA TTC TTT TCT CCA TGA CAG GTG | 13185 |
| 4381 | End Val Ser Cys Gln Ala Tyr End Phe Phe Ser Pro End Gln Val | 4395 |
| 13186 | AAG GAC AGG GCA GGT CGT GTC ATC TGC CCA GTA CTG CGT CGA TTT | 13230 |
| 4396 | Lys Asp Arg Ala Gly Arg Val Ile Cys Pro Val Leu Arg Arg Phe | 4410 |

Figura R3. Región intrónica (color turquesa) del posible gen tipo *nanos* en el *contig_0009653* del ADN genómico de *E. multilocularis*. Se indican todos los aminoácidos codificados por los nucleótidos de este fragmento, en el marco de lectura +1. Los nucleótidos que forman parte del intrón no serán traducidos y los aminoácidos que ellos codifican no se sintetizarán ni formarán parte de la proteína final (aunque igual se muestren). En azul resaltado se indica el sitio GT donador (12925-26) y el sitio AG aceptor (13181-82) que forman parte del intrón, siendo el mismo de un largo de 259 pares de bases.

La búsqueda de intrones en la secuencia de ADN genómico de *Echinococcus multilocularis* se realiza; por un lado, para estimar el tamaño de los posibles productos de amplificación obtenidos en PCR a partir de ADN genómico de las platemintos de estudio, y por otro lado, para verificar que los intrones contenidos en la región a amplificar no estén dentro de la zona de los cebadores, lo cual con alta probabilidad afectaría la reacción de amplificación.

Alineamiento de las secuencias de genes tipo *nanos* encontradas

En el primer alineamiento (figura R4a), se utilizaron 8 secuencias de 5 platelmintos diferentes, más 4 secuencias de 4 organismos diferentes que no fueran platelmintos, incluyendo géneros tales como *Pan* y *Drosophila*. El mismo reveló una región de 53 aminoácidos de alta homología, donde se conservan 23 aminoácidos idénticos. Esta región conservada correspondió al dominio de dedos de zinc de la proteína Nanos.

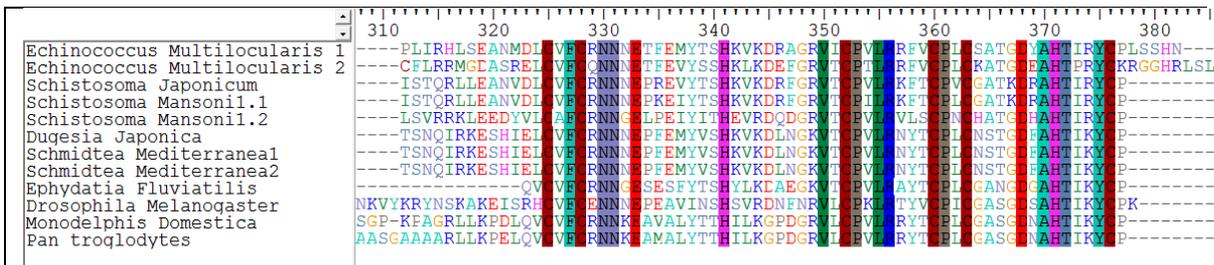


Figura R4a. Alineamiento 1. Se utilizan 12 secuencias de aminoácidos de 8 organismos diferentes, a partir de las secuencias de nucleótidos de los genes tipo *nanos* encontradas en las bases de datos. Se muestra la región conservada correspondiente al motivo de dedos de zinc de la proteína. Las columnas coloridas indican los 23 aminoácidos conservados entre las secuencias.

Intentando buscar mayor conservación entre los aminoácidos dentro de la región conservada, se realizó un segundo alineamiento incluyendo únicamente platelmintos (figura R4b). Para éste se utilizaron las 8 secuencias de los 5 platelmintos diferentes ya utilizadas para el primer alineamiento. El mismo reveló la misma región conservada de dedos de zinc, como era de esperar. Pero se encontró aún mayor similitud entre las secuencias de aminoácidos utilizadas, ya que esta vez fueron 27 los aminoácidos conservados idénticos.

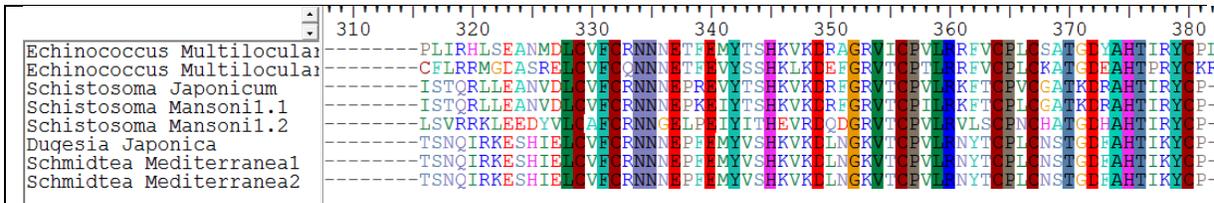


Figura R4b. Alineamiento 2. Se utilizan 8 secuencias de aminoácidos de 5 platelmintos diferentes, a partir de las secuencias de nucleótidos de los genes tipo *nanos*, encontradas en las bases de datos. Se muestra la región conservada correspondiente al motivo de dedos de zinc de la proteína. Las columnas coloridas indican los 27 aminoácidos conservados entre las secuencias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El segundo alineamiento reveló, que dentro de la región conservada, hay más aminoácidos en común para este conjunto de organismos que para el conjunto dónde se encuentran organismos más diversos, o sea, mayor homología dentro del phylum. Si alguno de estos aminoácidos extra en común se encuentra en la región cebadora, esto será de utilidad al amplificar la región conservada en los organismos de estudio, ya que probablemente, sean éstas más similares a las de los platelmintos que a las secuencias encontradas en organismos de otros phyla. De este modo, se logra el diseño de cebadores “menos degenerados”, lo que evita la amplificación de secuencias no específicas. En la figura R5 se observa la región del gen tipo *nanos* de *S. mediterranea* (*Smednos*), que se pretende amplificar en *M. corti* y *F. hepatica*.

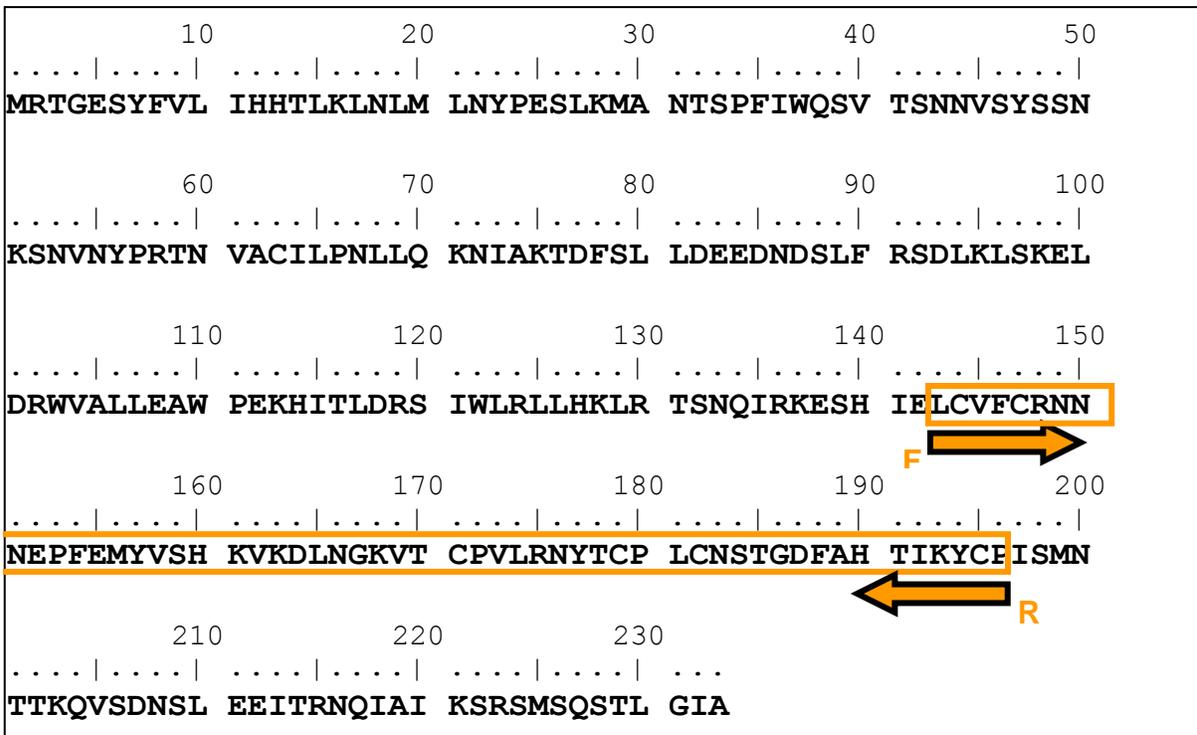


Figura R5

Secuencia de aminoácidos codificados por un gen tipo *nanos* de *S. mediterranea* (*Smednos*). El recuadro naranja corresponde a los 53 aminoácidos de la región altamente conservada que se pretende amplificar y aislar en *M. corti* y *F. hepatica*. Se muestran dos cebadores degenerados F y R hipotéticos que amplificarían esta región.

Diseño de cebadores degenerados para realizar PCR

En base al segundo alineamiento, realizado con secuencias de genes tipo *nanos* de platelmintos, se diseñaron los cebadores degenerados que permitieran amplificar por medio de PCR, la región conservada de algún/os posible/s gen/es tipo *nanos*, en *M. Corti* y *F. hepática* (figura R6).

Para el diseño del juego de cebadores Forward F (amplifican la cadena sentido) se utilizaron los aminoácidos conservados correspondientes al extremo 5' de la cadena codificante, los cuales fueron Leu Cys Val Phe Cys Arg Asn Asn. De forma tal que disminuya la degeneración del oligonucleótido cebador, el aminoácido Leu no se tuvo en cuenta para el diseño final del mismo. Leucina es codificado por 6 codones, por lo que suprimiéndolo se reduce considerablemente el número de secuencias de oligonucleótidos cebadores posibles. Por lo que la secuencia resultante para diseñar el cebador F fue Cys Val Phe Cys Arg Asn Asn. Se utilizó el código de equivalencias nucleotídicas presentado en materiales y métodos para integrar en una única secuencia al conjunto de posibles oligonucleótidos cebadores F: YTN^TGYGTNT^TTYTGYCGNAAYAA^Y

Para el diseño del juego de cebadores Reverse R (amplifican la cadena anti sentido) se utilizaron los aminoácidos conservados correspondientes al extremo 3' de la cadena codificante, los cuales fueron Ala His Thr Ile Lys Tyr Cys. Se utilizó el código de equivalencias nucleotídicas presentado en materiales y métodos para integrar en una única secuencia al conjunto de posibles oligonucleótidos cebadores R: CGNGTRTGNTADTTYATRACR

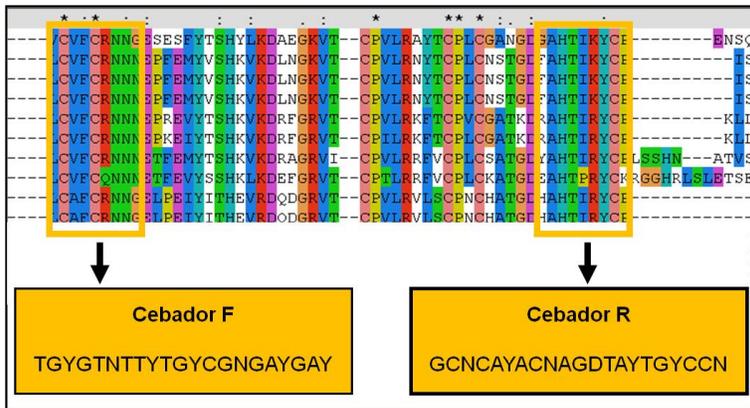


Figura R6. Alineamiento de secuencias de aa codificados por genes tipo *nanos* de platelmintos donde se observa la región altamente conservada de la proteína Nanos. En los recuadros naranjas se muestran los aa en base a los cuales se diseñaron los cebadores degenerados F y R.

De acuerdo al diseño de cebadores degenerados para la amplificación de la región conservada y el análisis de las regiones intrónicas del ADN genómico de *E. multilocularis*, se pudo deducir el largo esperado de los fragmentos de genes tipo *nanos* a amplificar en *M. corti* y *F. hepatica* (figura R7).

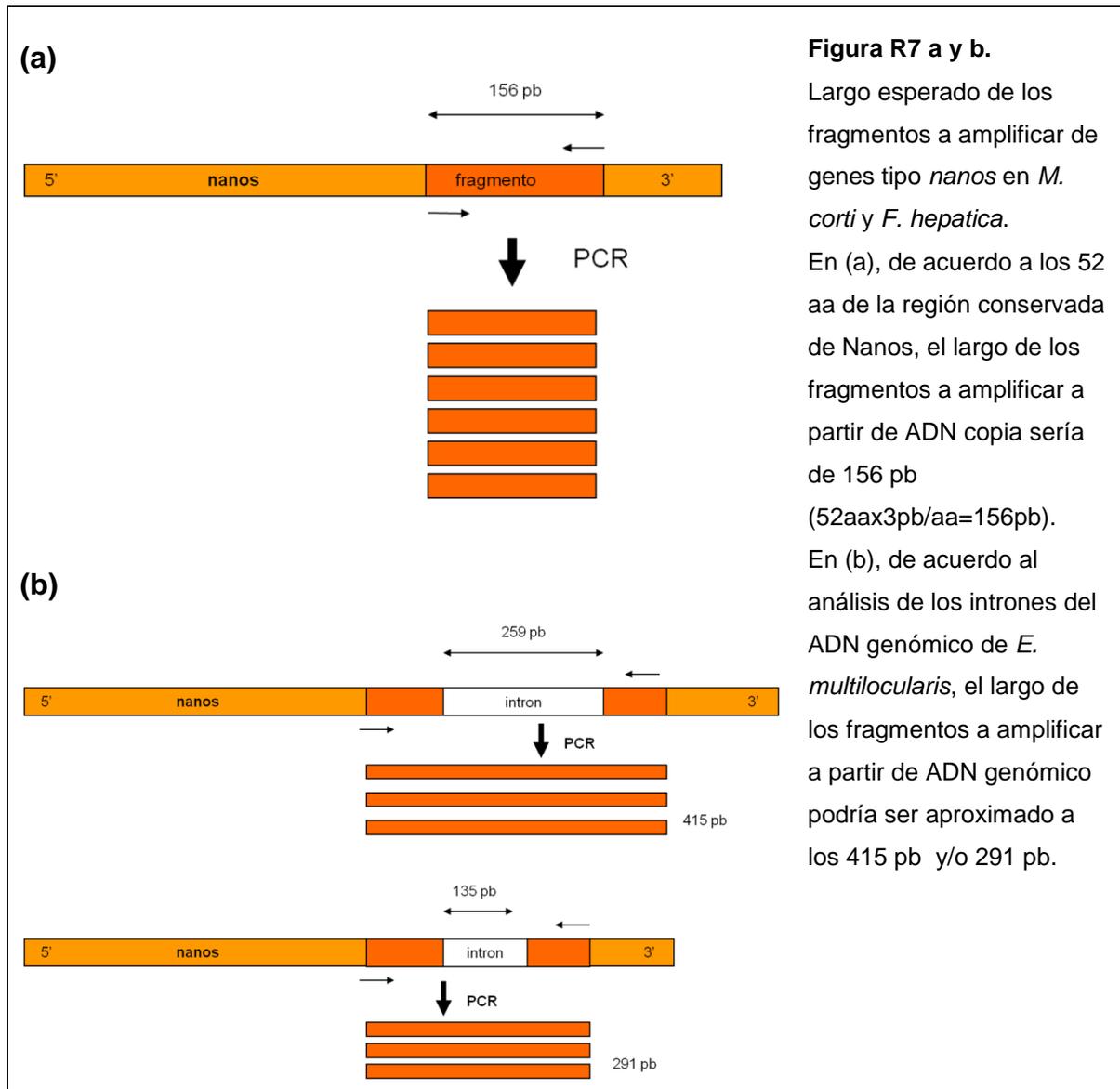


Figura R7 a y b.

Largo esperado de los fragmentos a amplificar de genes tipo *nanos* en *M. corti* y *F. hepatica*.

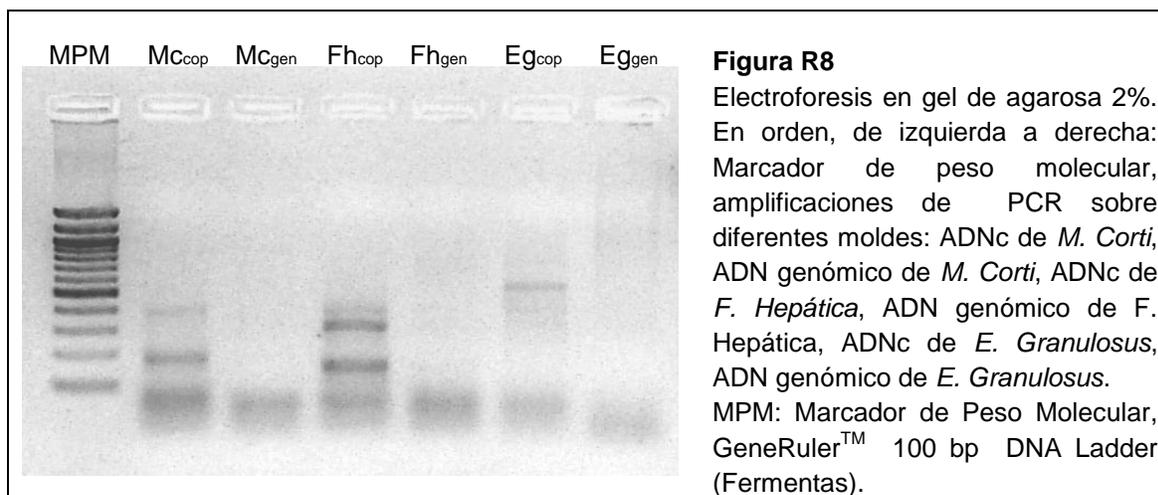
En (a), de acuerdo a los 52 aa de la región conservada de Nanos, el largo de los fragmentos a amplificar a partir de ADN copia sería de 156 pb

($52 \text{aa} \times 3 \text{pb/aa} = 156 \text{pb}$).

En (b), de acuerdo al análisis de los intrones del ADN genómico de *E. multilocularis*, el largo de los fragmentos a amplificar a partir de ADN genómico podría ser aproximado a los 415 pb y/o 291 pb.

PCR con cebadores degenerados sobre ADN copia y ADN genómico

El tamaño de los fragmentos amplificados a partir de ADN copia de *M. corti* y *F. hepatica*, fue aproximadamente el esperado de acuerdo a la migración de los productos en gel de agarosa (figura R8).



El tamaño esperado de los fragmentos de genes tipo *nanos* amplificados con los cebadores degenerados, a partir de ADN copia de *M. corti* y *F. hepatica*, era de 156 pares de bases. Los fragmentos más pequeños amplificados sobre ADN copia de *M. corti* y *F. hepatica* se encontraron entre 100 pb y 200 pb (aunque se encontraron más cerca de la banda de 200 pb del MPM existe cierto margen de error con esta apreciación), por lo cual se esperó que estos fragmentos correspondieran a la región conservada de genes tipo *nanos* que se ha propuesto aislar. Los fragmentos mayores amplificados sobre ADN copia de *M. corti* y *F. hepatica* se encontraron cerca de los 400 pb del MPM, correspondiendo probablemente a la amplificación de fragmentos de ADN genómico de los mismos, debido a posibles trazas de éste en el ADN copia.

La amplificación sobre ADN genómico de *M. Corti* y *F. Hepatica* no fue satisfactoria. La amplificación sobre ADN copia y ADN genómico de *E. granulosus* no fue obtenida, aunque pudo observarse un fragmento de alrededor de 500 pb en la amplificación sobre ADN copia, que corresponda probablemente a la amplificación de fragmentos de ADN genómico, por igual razón que anteriormente.

Búsqueda de genes tipo *nanos* en *M. corti* y *F. hepatica*

Con el fin de maximizar la eficiencia y organizar la búsqueda de fragmentos de genes tipo *nanos* en *M. corti* y *F. hepatica* se realizaron 4 series de rastreo denominadas A, B, C, y D. Los procedimientos de ligación, transformación, cultivo en placas de agar, obtención de ADN plasmídico (MPs), PCR a partir de MPs ó PCR a partir de colonias crecidas en medio sólido, que se realizaron en cada serie de rastreo fueron análogos.

En cada proceso de ligación los fragmentos amplificados por PCR con cebadores degenerados sobre ADN copia de *M. corti* y sobre ADN copia de *F. hepatica*, fueron ligados en los vectores plasmídicos p-Gem T Easy. Cada proceso incluyó dos mezclas de ligación, una a partir de fragmentos amplificados sobre ADN copia de *M. Corti* y otra a partir de fragmentos amplificados sobre ADN copia de *F. Hepatica*. Luego se transformaron bacterias *E. Coli* competentes con las mezclas de ligación correspondientes. Las mismas se hicieron crecer en placas, obteniendo así colonias aisladas, o sean éstas diferentes clones. La obtención de ADN plasmídico previa a la amplificación por PCR sobre las MPs se realizó únicamente en la serie A. En el resto de las series se realizaron reacciones de PCR directamente a partir de colonias crecidas en medio sólido.

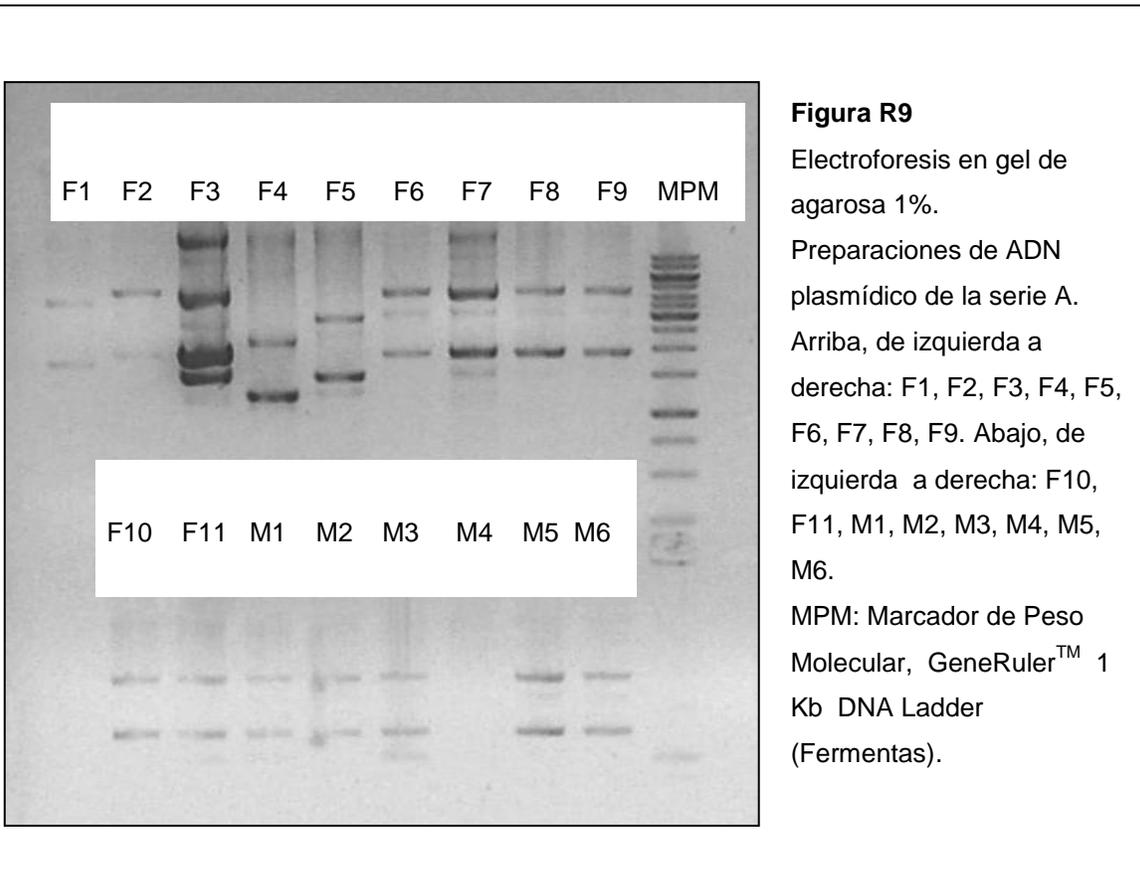
Las preparaciones de ADN plasmídico denominadas con una M delante de su número correspondiente contienen fragmentos amplificados a partir de ADN copia de *Mesoscestoides corti*. Las preparaciones de ADN plasmídico denominadas con una F delante de su número correspondiente contienen fragmentos amplificados a partir de ADN copia de *Fasciola hepatica*.

A continuación se detallan los resultados de dos series de rastreo, la primera (serie A) y la tercera (serie C). Por motivos de extensión de escritura, los resultados de la segunda (serie B) y cuarta (serie D) serie, serán resumidos con los demás resultados de rastreo en la tabla R4.

Búsqueda de genes tipo *nanos* en *M. corti* y *F. hepatica*

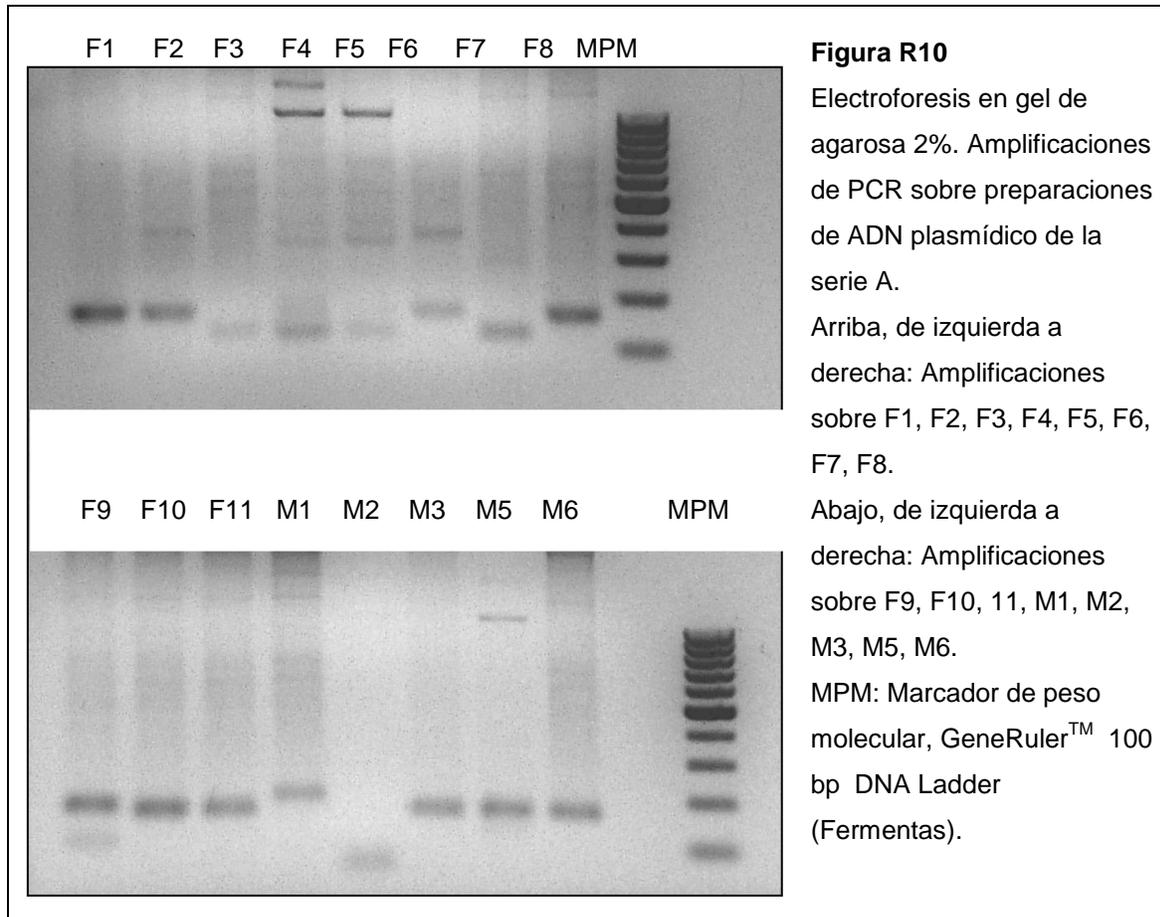
- [Serie A](#)
- [Clonación](#)

Se realizó el primer procedimiento de ligación, transformación, cultivo en placas, obtención de ADN plasmídico (MPs), PCR sobre MPs, correspondiente a la serie de rastreo A. Los procesos de ligación, transformación, cultivo en placas, obtención de ADN plasmídico (MPs), fueron en su mayor parte exitosos, de acuerdo a lo observado en la corrida en gel de agarosa de las preparaciones de ADN plasmídico. Las preparaciones de ADN plasmídico F1 a F11 contienen fragmentos clonados procedentes de *Fasciola hepatica*. Las preparaciones de ADN plasmídico M1 a M6, contienen fragmentos clonados procedentes de *Mesocestoides corti* (figura R9).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las preparaciones de ADN plasmídico se utilizaron como molde para realizar PCR con los cebadores degenerados, comprobando así la presencia de los fragmentos de genes tipo *nanos* contenidos en las mismas. La preparación M4 no fue utilizada como molde debido a la baja concentración de ADN obtenido. Un error de procedimiento fue no colocar marcador de peso molecular paralelo a los carriles inferiores en el gel de agarosa donde migraron las preparaciones de ADN plasmídico (figura R10).



La amplificación con cebadores degenerados utilizando como molde las preparaciones de ADN plasmídico de la serie A, fue satisfactoria para algunos casos. De acuerdo al tamaño esperado del inserto a amplificar (156 pb) se dedujo que las amplificaciones a partir de las MPs F1, F2, F6, F8, F9, F10, F11, M1, M3, M5, M6 fueron aquellas que probablemente contenían los fragmentos de genes tipo *nanos* conservados.

- Secuenciación

En una primera instancia, se caracterizaron las secuencias de dos fragmentos en particular. Uno de estos fragmentos procedió de *M. Corti*, correspondiente a la reacción de PCR y preparación de ADN plasmídico M6 de esta serie (serie A) y el otro fragmento procedió de *F. Hepatica*, correspondiente a la reacción de PCR y preparación de ADN plasmídico F11 de esta serie (serie A).

Se descartaron las secuencias de ambos extremos del inserto clonado en el vector, correspondientes a los cebadores diseñados, obteniendo así la secuencia de un posible fragmento de un gen tipo nanos. La secuencia codificante del fragmento de 114 pares de bases, procedente de *M. Corti*, clonado en la preparación de ADN plasmídico M6 de la serie A, y secuenciado con el cebador T7 en el vector plasmídico conteniendo al inserto se dispuso en la tabla R1.

La herramienta informática BLASTX (secuencia de nucleótidos traducidos vs. secuencias de proteínas de la base de datos), se utilizó para verificar que la secuencia del inserto clonado en el vector correspondiera a un fragmento de gen tipo nanos. Utilizando la base de datos del NCBI, se buscó homologías existentes con el fragmento procedente de *M. corti*, secuenciado en el clon de la preparación de ADN plasmídico M6a. El fragmento resultó ser parte de un gen tipo nanos, de acuerdo a su alta similitud con las regiones conservadas de genes tipo nanos de otros organismos. Esto confirma la presencia de al menos un gen tipo nanos presente en *M. corti*, del cual se conoce ahora, la secuencia de un fragmento dentro de la región conservada, correspondiente al dominio de dedos de Zinc de unión al ADN de la proteína Nanos. Este gen tipo *nanos* de *M. corti* se denominó *Mcnos* y de aquí en adelante se podrá hacer referencia al mismo de tal modo.

Se descartaron las secuencias de ambos extremos del inserto clonado en el vector, correspondientes a los cebadores diseñados, obteniendo así la secuencia de un posible fragmento de un gen tipo nanos. La secuencia codificante del fragmento de 114 pares de bases, procedente de *F. hepatica*, clonado en la preparación de ADN plasmídico F11 de la serie A, y secuenciado con el cebador T7 en el vector plasmídico se dispuso en la tabla R1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La herramienta informática BLASTX (secuencia de nucleótidos traducidos vs. secuencias de proteínas de la base de datos), se utilizó para verificar que la secuencia del inserto clonado en el vector correspondiera a un fragmento de gen tipo nanos. Utilizando a la base de datos del NCBI, se buscó homologías existentes con el fragmento procedente de *F. hepatica*, secuenciado en el clon de la preparación de ADN plasmídico F11a. El fragmento resultó ser parte de un gen tipo nanos, de acuerdo a su alta similitud con las regiones conservadas de genes tipo nanos de otros organismos. Esto confirma la presencia de al menos un gen tipo nanos presente en *F. hepatica*, del cual se conoce ahora, la secuencia de un fragmento dentro de la región conservada, correspondiente al dominio de dedos de Zinc de unión al ADN de la proteína Nanos. Este gen tipo *nanos* de *F. hepatica* se denominó *Fhnos* y de aquí en adelante se podrá hacer referencia al mismo de tal modo.

| Tabla R1 Secuencias de fragmentos conservados de genes tipo nanos. Se visualizan las secuencias codificantes de los dos fragmentos de genes tipo nanos caracterizados en <i>M. corti</i> y <i>F. hepatica</i> . El largo total de cada uno es de 114 pb. | |
|--|---|
| Fragmento conservado <i>Mcnos</i> (M6 serie A) | AACGAAACCTACGAAGTCTACTCAAGCCACAAGGTGAAGGACCAGGCCGGCAGG GTAACGTGTCCTGCCCTGCGCAAATACGTGTGTCCCCTCTGTATGGCTACAGGG GATTCA |
| Fragmento conservado <i>Fhnos</i> (F11 serie A) | GGTGAACCTTTTCGAAGTCTACATAACGCATAAGGTCAAGGACGCATCCGGAAGA GTAACGTGTCCTGTATTACGGCTGCTATCCTGTCCGCTATGTAAATCCACAGGAG ATGCG |

- Digestión con enzimas de restricción

De acuerdo a la comprobada existencia de más de un gen tipo *nanos* en platelmintos parásitos como lo son *E. multilocularis* (Cestoda) y *S. mansoni* (Trematoda), así como también en platelmintos de vida libre como lo es *S. mediterranea* (Turbellaria), se pensó acerca de la posible existencia de más de un gen tipo *nanos* en *M. corti* y *F. hepatica*. Con el fin de reducir número de secuenciaciones a realizar, se efectuó la digestión de los clones recombinantes con enzimas de restricción que pudieran reconocer algún sitio dentro de los fragmentos ya caracterizados, y así únicamente secuenciar aquellos que presentaran un patrón de digestión diferente al previsto para los mismos.

Cabe destacar por un lado, que un patrón de digestión característico para dos fragmentos aislados no indica necesariamente que éstos tengan idéntica secuencia en su totalidad, y por lo tanto, podrían ser diferentes y provenir de diferentes genes. Por otro lado, un patrón de digestión característico para dos fragmentos aislados que tienen idéntica secuencia en su totalidad, no indica necesariamente que éstos provengan de un mismo gen, ya que podrían existir diferencias fuera de la región aislada.

Por lo tanto, la digestión de los fragmentos amplificados puede no ser la estrategia más exacta a seguir con respecto a la búsqueda de otro/s posibles gen/es tipo *nanos* en *M. corti* y *F. hepatica*. Se podría por ejemplo, secuenciar a todos aquellos clones que contengan insertos del largo esperado del fragmento conservado del gen tipo *nanos*. Sin embargo, debido en parte al alcance de este trabajo, se eligió la digestión de los fragmentos amplificados de diferentes clones para la búsqueda de otro/s posibles genes tipo *nanos*.

Una vez comprobada por la secuenciación de dos plásmidos recombinantes (M6 serie A y F11 serie A) la existencia de al menos un gen tipo *nanos* en *M. corti* (*Mcnos*) y uno en *F. hepatica* (*Fhnos*); se procedió a utilizar enzimas de restricción sobre otros clones. Se eligieron dos enzimas de restricción de acuerdo al reconocimiento específico de al menos un sitio de clivaje existente en cada una de

las secuencias de los fragmentos de genes tipo *nanos* caracterizados en *M. corti* y *F. hepatica* en el punto anterior.

Para el fragmento del gen *Mcnos* de *M. Corti* se utilizó la nucleasa de restricción Hae III (*Gibco*) que reconoce la secuencia específica (anexo, referencia 5) de clivaje en el fragmento una única vez. La acción de la misma sobre el fragmento secuenciado de 114 pb dejaría dos productos de digestión de 46 y 68 pares de bases (tabla R2).

Para el fragmento procedente de *F. Hepatica*, se utilizó la nucleasa de restricción Acc I (*Fermentas*) que reconoce la secuencia específica (anexo, referencia 5) de clivaje en el fragmento una única vez. La acción de la misma sobre el fragmento secuenciado de 114 pb dejaría dos productos de digestión de 17 y 97 pares de bases (tabla R2).

| Tabla R2 Productos de digestión de los fragmentos <i>Mcnos</i> y <i>Fhnos</i> utilizando las enzimas de restricción HaeIII y AccI respectivamente. Se visualizan las secuencias codificantes de los dos productos de digestión para cada fragmento de gen tipo <i>nanos</i> . | | |
|---|-------|--|
| Fragmento del gen <i>Mcnos</i> | | AACGAAACCTACGAAGTCTACTCAAGCCACAAGGTGAAGGACCAGGCCGGC AGGGTAACGTGTCCTGCCCTGCGCAAATACGTGTGTCCCCTCTGTATGGCTA CAGGGGATTCA |
| Hae III reconoce al fragmento del gen <i>Mcnos</i> en un sitio de clivaje | 46 pb | AACGAAACCTACGAAGTCTACTCAAGCCACAAGGTGAAGGACCAGG |
| | 68 pb | CCGGCAGGGTAACGTGTCCTGCCCTGCGCAAATACGTGTGTCCCCT CTGTATGGCTACAGGGGATTCA |
| Fragmento Del gen <i>Fhnos</i> | | GGTGAACCTTTCGAAGTCTACATAACGCATAAAGGTCAAGGACGCATCCGGAA GAGTAACGTGTCCTGTATTACGGCTGCTATCCTGTCCGCTATGTAATCCAC AGGAGATGCG |
| Acc I reconoce al fragmento del gen <i>Fhnos</i> en un sitio de clivaje | 17 pb | GGTGAACCTTTCGAAGT |
| | 97 pb | CTACATAACGCATAAAGGTCAAGGACGCATCCGGAAAGAGTAA CGTGTCTGTATTACGGCTGCTATCCTGTCCGCTATGTAAT CCACAGGAGATGCG |

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hay que tener en cuenta que cada fragmento amplificado de 156 pb es 42 pb más largo que el fragmento secuenciado de 114 pb. Esta diferencia se debe a los cebadores degenerados de 21 pb que hibridan en cada extremo del fragmento. Por lo tanto al realizar el análisis de los productos de digestión en los geles de corrida, se deben de sumar 21 pb a cada fragmento de restricción que coincida con el extremo del fragmento.

De acuerdo al patrón de migración, resultante de la digestión de los fragmentos de los genes *Mcnos* y *Fhnos* que ya han sido secuenciados hasta ahora, se observó el patrón de digestión para otros fragmentos aislados, esperando encontrar alguno diferente que revele la presencia de un posible segundo gen tipo *nanos* en alguno de los platelmintos de estudio (figura R11a y R11b). Se utilizó a la enzima Hae III para los fragmentos procedentes de *M. Corti*, y a la enzima Acc I para los fragmentos procedentes de *F. Hepatica*. Como controles positivos de la identidad de los fragmentos de los genes *Mcnos* y *Fhnos* ya secuenciados se utilizaron los fragmentos amplificados a partir de las preparaciones M6 y F11 (de las cuales fueron éstos secuenciados), respectivamente.

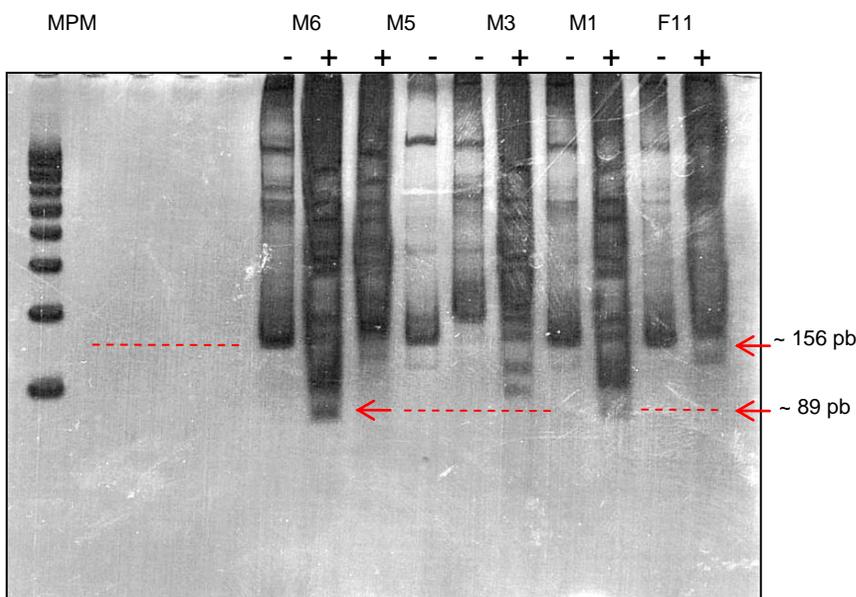


Figura R11a

Electroforesis en gel de acrilamida al 15%. Productos de digestión de fragmentos clonados. De derecha a izquierda: Amplificaciones sobre preparaciones de ADN plasmídico de la serie A con inserto esperado: F11 (C+), M1, M2, M3, M5, M6 (C+), digeridas (+) y sin digerir (-). MPM: Marcador de peso molecular.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las digestiones de los fragmentos amplificados a partir de las preparaciones M6 (control positivo de *Mcnos*) y M1, pudo observarse un fragmento menor a 100 pb, que podría corresponder al fragmento de restricción característico de 89 pb, resultante de la digestión del fragmento de *Mcnos* con la enzima Hae III. La secuencia característica del fragmento del gen tipo *nanos* procedente de M1 podría corresponder a la secuencia del fragmento del gen *Mcnos* ya conocido hasta ahora para *M. corti* (figura R11a). Si bien la digestión de los fragmentos amplificados a partir de la preparación M3 no presenta el mismo patrón de digestión que M6 (C+ de *Mcnos*), pudo observarse la presencia de lo que podrían ser los fragmentos de restricción característicos de la digestión del fragmento de *Mcnos* con la enzima Hae III, que por alguna razón, habrían migrado más lentamente de lo que deberían hacerlo según su tamaño esperado (figura R11a). En la digestión de los fragmentos amplificados a partir de la preparación M5 se pudo observar un fragmento de entre 100 pb y 200 pb, que podría corresponder a un fragmento amplificado sin digerir de 156 pb, proveniente de un gen tipo *nanos* de una identidad diferente a la ya conocida hasta ahora para *M. corti* (figura R11a).

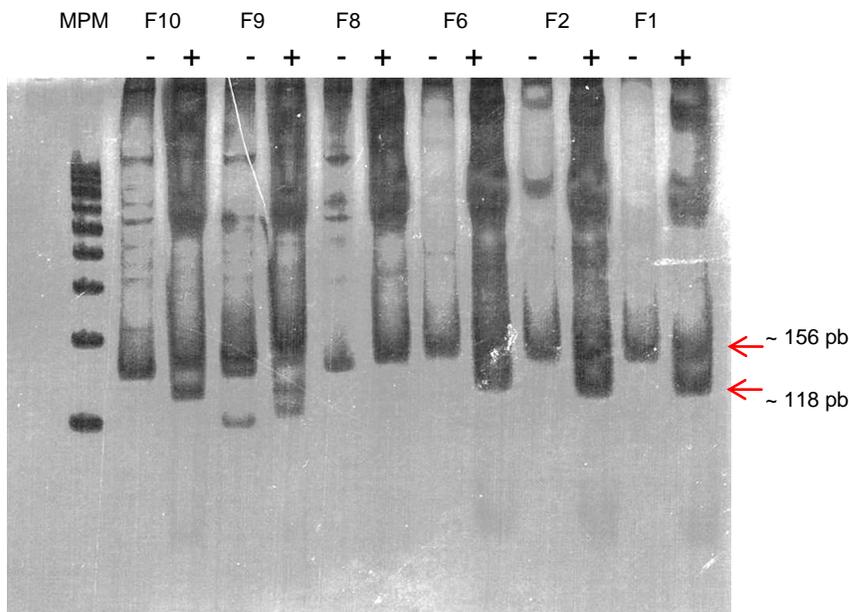


Figura R11b

Electroforesis en gel de acrilamida al 15%. Productos de digestión de fragmentos clonados. De derecha a izquierda: Amplificaciones sobre preparaciones de ADN plasmídico de la serie A con inserto esperado: F1, F2, F6, F8, F9, F10, digeridas (+) y sin digerir (-). MPM: Marcador de peso molecular.

En las digestiones de los fragmentos aislados a partir de las preparaciones F11 (control positivo de *Fhnos*), F1, F2, F6, F9, y F10, se pudo observar un fragmento algo mayor a los 100 pb, que podría corresponder al fragmento de restricción característico de 118 pb, resultante de la digestión del fragmento de *Fhnos* con la enzima Acc I. Las secuencias características de los fragmentos de los genes tipo *nanos* procedentes de F1, F2, F6, F9, y F10, podrían corresponder a la secuencia del fragmento del gen *Fhnos* ya conocido hasta ahora para *F. hepatica* (figura R11b).

Si bien la digestión de los fragmentos amplificados a partir de la preparación F9 no presenta el mismo patrón de digestión que F 11 (C+ de *Fhnos*), pudo observarse la presencia de lo que podrían ser los fragmentos de restricción característicos de la digestión del fragmento de *Fhnos* con la enzima Acc I, que por alguna razón, habrían migrado más lentamente de lo que deberían hacerlo según su tamaño esperado (figura R11b).

En la digestión de los fragmentos amplificados a partir de la preparación F8, se pudo observar un fragmento de entre 100 y 200 pb, que podría corresponder a un fragmento de 156 pb sin digerir. No se observó así un fragmento algo mayor a 100 pb, correspondiente al fragmento de restricción característico de 118 pb, resultante de la digestión del fragmento de *Fhnos* con la enzima Acc I. Esta amplificación podría corresponder a un fragmento proveniente de un gen tipo *nanos* de una identidad diferente a la ya conocida hasta ahora para *F. hepatica* (figura R11b).

Búsqueda de genes tipo *nanos* en *M. corti* y *F. hepatica*

- Serie C

Se realizó el tercer procedimiento de ligación, transformación, cultivo en placas, correspondiente a la serie de rastreo C. A diferencia de la primer serie de rastreo (serie A) no se obtuvo ADN plasmídico desde un principio, sino que se realizó la PCR directamente a partir de las colonias aisladas en placas de agar. El procedimiento fue en su mayor parte exitoso, de acuerdo a lo observado en la corrida en gel de agarosa de los productos de amplificación.

Los clones de bacterias extraídas de colonias aisladas en placa, M1 a M18, fueron transformados con vectores plasmídicos cuyos insertos fueron fragmentos procedentes de *M. corti*. Los clones de bacterias extraídas de colonias aisladas en placa, F1 a F15, fueron transformados con vectores plasmídicos cuyos insertos fueron fragmentos procedentes de *F. hepatica*. Estos clones (M1 – M18 y F1 – F15) se utilizaron directamente como moldes para realizar las reacciones de amplificación por PCR con los cebadores degenerados, comprobando así la presencia de los fragmentos de genes tipo *nanos* insertos en los vectores plasmídicos dentro de las bacterias. Se utilizó el clon M6 de la serie A como control positivo (C +) para esta amplificación porque el fragmento del gen *Mcnos* fue secuenciado a partir de éste.

La amplificación de fragmentos de genes tipo *nanos* con cebadores degenerados, utilizando como molde directamente a las bacterias extraídas de colonias aisladas en placa de la serie C, fue satisfactoria para algunos casos. De acuerdo al tamaño esperado del inserto a amplificar (156 pb) se dedujo que las amplificaciones a partir de las preparaciones de ADN plasmídico M1, M4, M5, M7, M8, M10, M11, M12, M13, M14, M16, M18, F1, F2, F3, F5, F7, F8, F9, F13, F14, fueron aquellas que probablemente contenían fragmentos conservados de genes tipo *nanos* (figura R12).

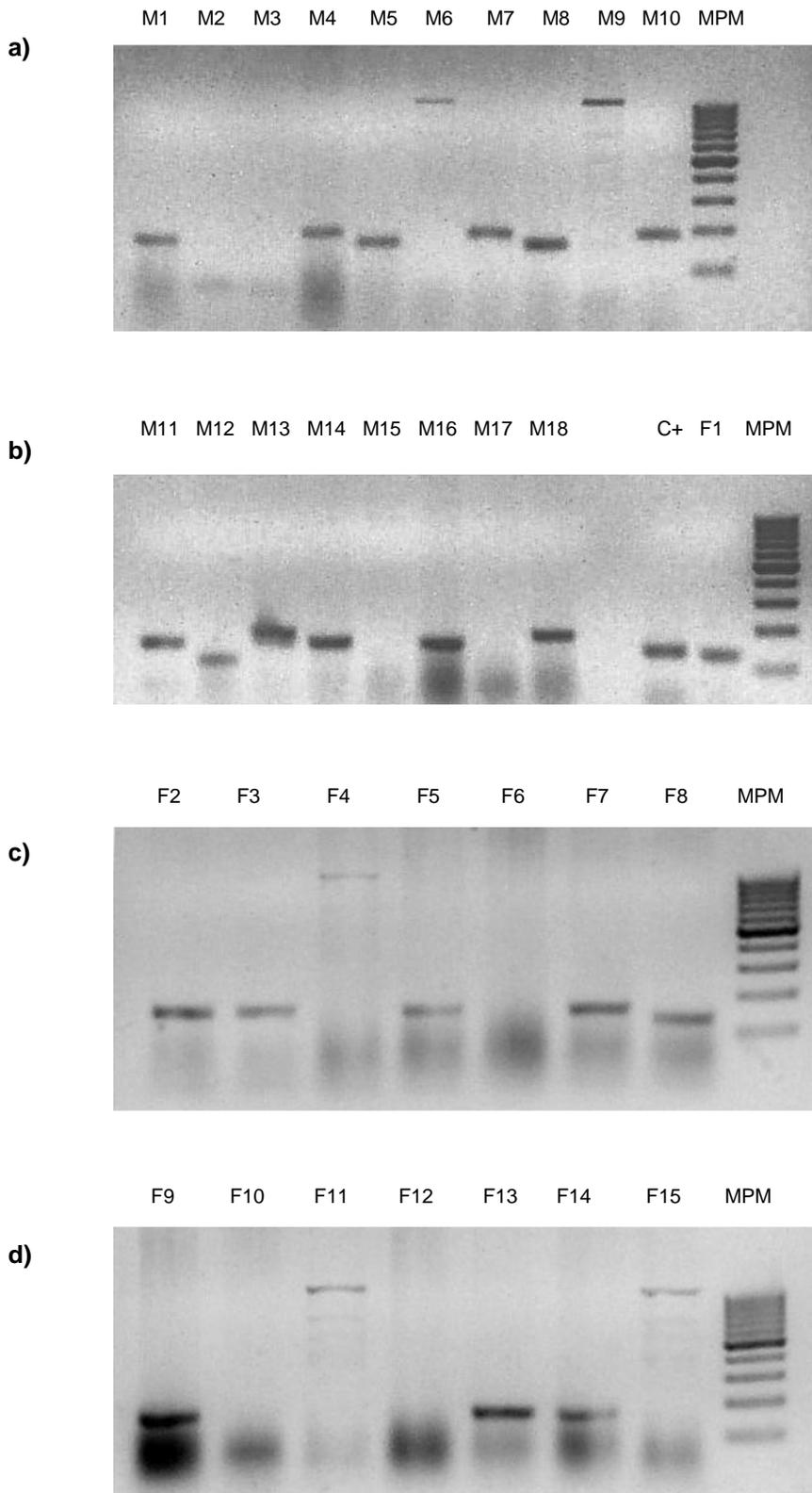


Figura R12

Electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Amplificaciones de PCR sobre ADN plasmídico. La reacción de PCR es directamente realizada utilizando los clones de de la serie C como material molde.

En a) de izquierda a derecha: Amplificaciones sobre M1 - M10.

En b) de izquierda a derecha: Amplificaciones sobre M13 – M18, C+, F1.

En c) de izquierda a derecha: Amplificaciones F1 - F7.

En d) de izquierda a derecha: Amplificaciones F8 – F14.

MPM: Marcador de peso molecular. GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estos fragmentos fueron luego sometidos a digestión, con las mismas enzimas de restricción (Hae III y Acc I) utilizadas anteriormente para digerir la primera serie (serie A) de fragmentos aislados, intentando distinguir algún posible patrón diferente de digestión dentro del conjunto de los nuevos fragmentos aislados en esta serie (figura R13a y R13b).

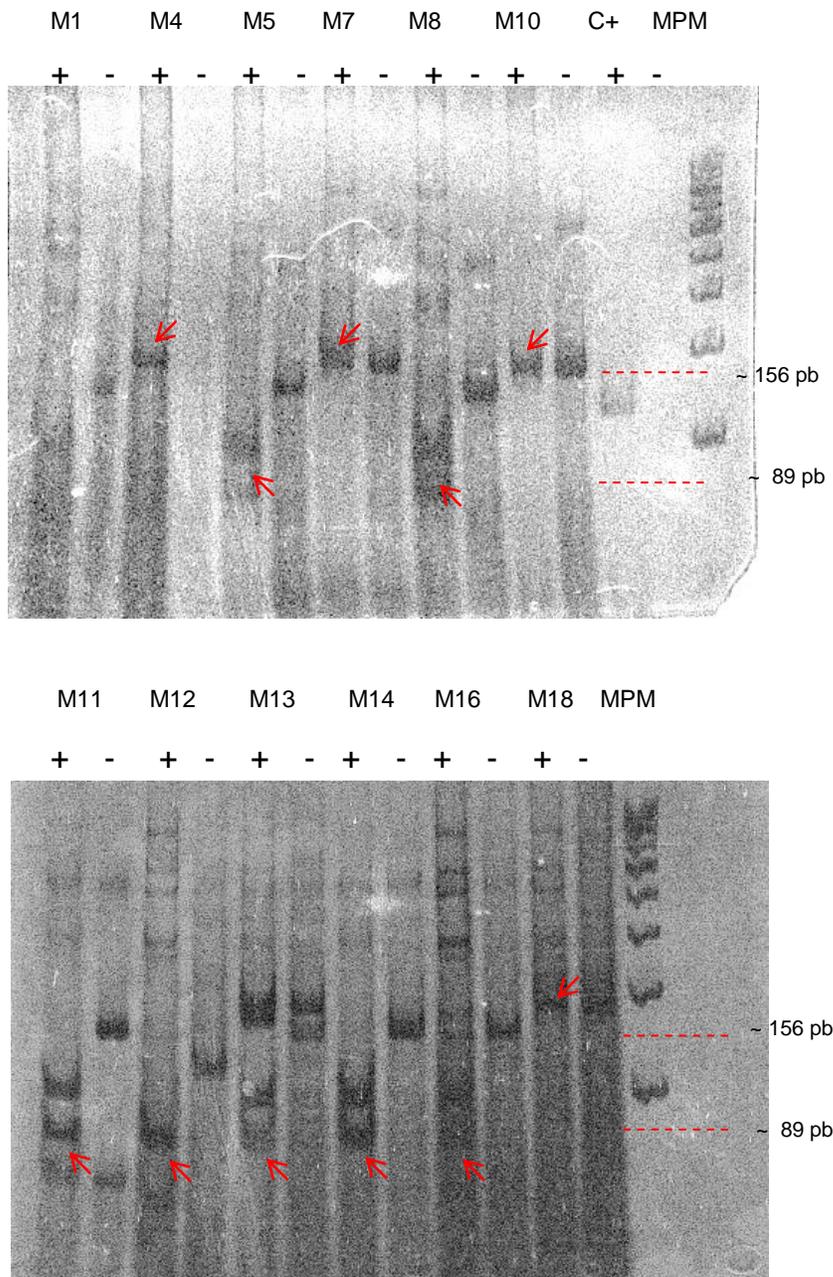


Figura R13a

Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%.

Productos de digestión de fragmentos clonados en la serie C.

Arriba de izquierda a derecha:

Amplificaciones sobre preparaciones de ADN plasmídico de la serie C con inserto esperado:

M1, M4, M5, M7, M8, M10, C+, digeridas (+) y sin digerir (-).

Abajo de izquierda a derecha:

Amplificaciones sobre preparaciones de ADN plasmídico de la serie C con inserto esperado:

M11, M12, M13, M14, M16, M18, digeridas (+) y sin digerir (-).

Las flechas indican los posibles fragmentos de 156 pb y de 89 pb.

MPM: Marcador de peso molecular.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

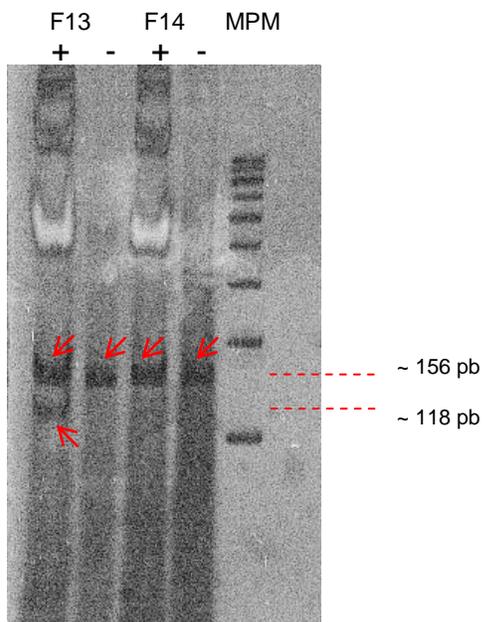
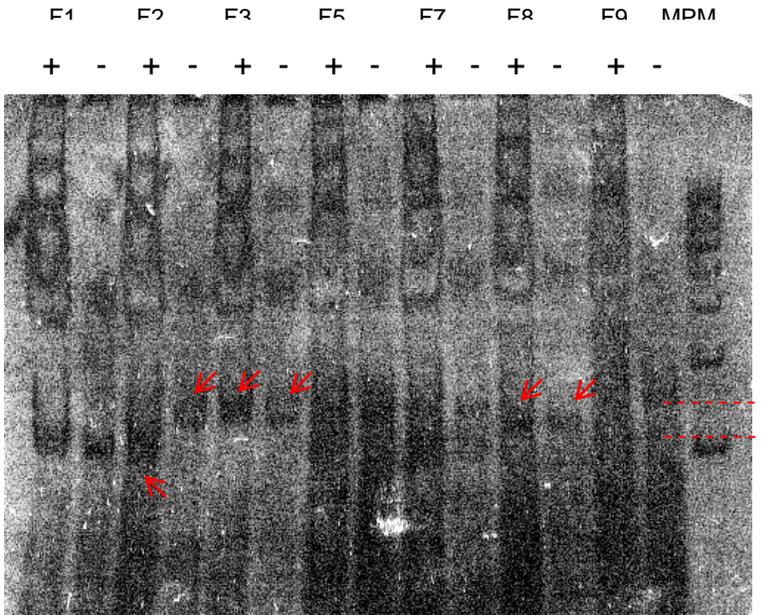


Figura R13b

Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%. Productos de digestión de fragmentos clonados en la serie C.

Arriba de izquierda a derecha: Amplificaciones sobre preparaciones de ADN plasmídico de la serie C con inserto esperado: F1, F2, F3, F4, F5, F7, F8, F9, digeridas (+) y sin digerir (-).

Abajo de izquierda a derecha: Amplificaciones sobre preparaciones de ADN plasmídico de la serie C con inserto esperado: F13 y F14 digeridas (+) y sin digerir (-).

Las flechas indican los posibles fragmentos de 156 pb y de 118 pb.

MPM: Marcador de peso molecular, GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

En las digestiones de los fragmentos amplificados a partir de los clones M5, M8, M11, M12, M13, M14, M16, se pudo observar lo que podría ser el fragmento de restricción característico de 89 pb, resultante de la digestión del fragmento del gen *Mcnos* con la enzima Hae III. La secuencia característica de estos

fragmentos amplificados podría corresponder probablemente a la secuencia del fragmento del gen *Mcnos* ya conocido hasta ahora para *M. corti* (figura R13a).

En las digestiones de los fragmentos amplificados a partir de los clones M4, M7, y M10, y M18 se pudo observar lo que podría ser el fragmento de 156 pb sin digerir. Estas amplificaciones podrían corresponder a fragmentos de genes tipo *nanos* de una identidad diferente a la ya conocida hasta ahora para *M. corti* (figura R13a).

En la digestión de los fragmentos amplificados a partir del clon M1, no se identifican claramente lo que podrían ser los fragmentos de restricción de 89 pb, característicos de la digestión del fragmento del gen *Mcnos* con la enzima Hae III. Tampoco pudo observarse lo que podría ser el fragmento de 156 pb sin digerir. Podría haber ocurrido algún error en el ensayo para esta digestión en particular.

En las digestiones de los fragmentos amplificados a partir de las preparaciones F2 y F13, se pudo observar lo que podría ser el fragmento de restricción característico de 118 pb, resultante de la digestión del fragmento del gen *Fhnos* con la enzima Acc I. La secuencia característica de estos fragmentos amplificados podría corresponder a la secuencia del fragmentos del gen *Fhnos* ya conocido hasta ahora para *F. hepatica* (figura R13b).

En las digestiones de los fragmentos amplificados a partir de las preparaciones F3, F8, y F14, se pudieron observar lo que podrían ser los fragmentos de 156 pb sin digerir, y no así los posibles fragmentos de restricción característicos de 118 pb, resultantes de la digestión del fragmento de *Fhnos* con la enzima Acc I. Estas amplificaciones podrían corresponder a fragmentos de genes tipo *nanos* de una identidad diferente a la ya conocida hasta ahora para *F. hepatica* (figura R13b).

En las digestiones de los fragmentos amplificados a partir de las preparaciones F1, F5, F7, y F9, no se identifican claramente los posibles fragmentos de restricción de 118 pb, característicos de la digestión del fragmento *Fhnos* con la enzima Acc I. Tampoco pudieron observarse lo que podrían ser fragmentos de 156 pb sin digerir. Esto significa que podría haber ocurrido algún error en el ensayo para estas reacciones de digestión en particular.

Búsqueda de genes tipo *nanos* en *M. corti* y *F. hepatica*

- [Selección final de clones recombinantes para secuenciación](#)
- [Preparaciones de ADN plasmídico con insertos de interés](#)

Se realizaron las preparaciones de ADN plasmídico conteniendo insertos de interés, sean aquellos que presentaron un patrón diferente de digestión al de los fragmentos de genes tipo *nanos* ya caracterizados hasta ahora. Es decir, patrones diferentes al de la digestión del fragmento de *Mcnos* con *HaeIII* para *M. corti* y al de la digestión del fragmento de *Fhnos* con *AccI* para *F. hepatica*. Para la purificación y extracción de ADN plasmídico conteniendo los insertos de interés, se tomaron los correspondientes clones de interés de bacterias de las colonias anteriormente aisladas en placas, para realizar nuevamente el cultivo de los mismos en una nueva placa.

Los insertos procedentes de *M. corti* anteriormente considerados de interés fueron aquellos presentes en los clones: M5 en la serie A (M5a); M13 en la serie B (M13b); M4, M7, M10, y M18 en la serie C (M4c, M7c, M10c, M18c); M2, M3, M4, M6, M7, M10 y M11 en la serie D (M2d, M3d, M4d, M6d, M7d, M10d y M11d).

Los insertos procedentes de *F. hepatica* anteriormente considerados de interés fueron aquellos presentes en los clones: F8 en la serie A (F8a); F3, F8, F9, F14 en la serie C (F3c, F8c, F9c, F14c); F3 y F5 en la serie D (F3d y F5d).

Se realizaron también las dos preparaciones de ADN plasmídico conteniendo los fragmentos de genes tipo *nanos* ya caracterizados hasta ahora en *M. corti* (M6a, C+ *Mcnos*) y en *F. hepatica* (F11a, C+ *Fhnos*), utilizados a modo de control (concentración, largo del inserto liberado) para las otras preparaciones de ADN plasmídico a realizar.

El procedimiento del nuevo cultivo (re cultivo) en placa y extracción de ADN plasmídico conteniendo insertos de interés, fue en su mayor parte exitoso, de acuerdo a lo observado en la corrida en gel de agarosa de las preparaciones de ADN plasmídico de los clones de interés (figura R14).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

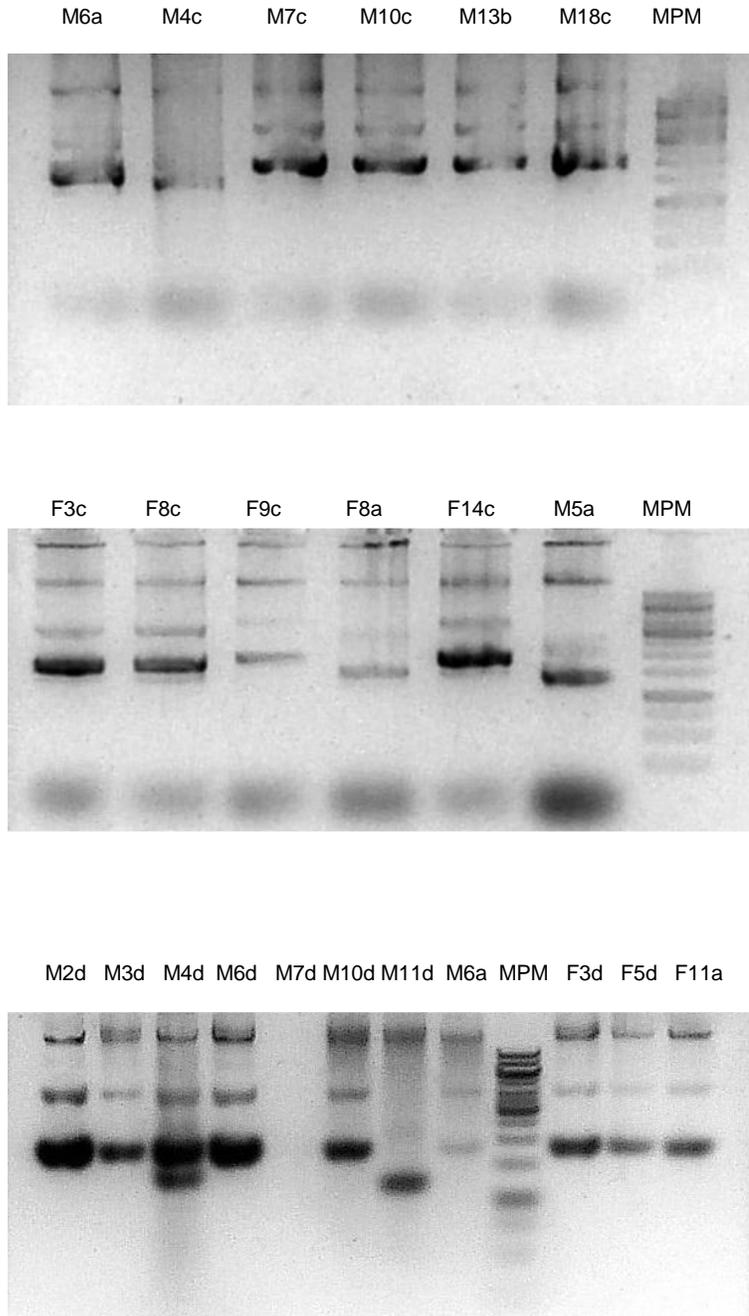


Figura R14

Electroforesis en gel de agarosa 1%.

Preparaciones de ADN plasmídico conteniendo insertos de interés.

Cada preparación tiene su número original y letra correspondiente a la serie de rastreo (a, b, c, d).

Arriba, de izquierda a derecha: M6a, M4c, M7c, M10c, M13b, M18c.

Medio, de izquierda a derecha: F3c, F8c, F9c, F8a, F14c, M5a.

Abajo, de izquierda a derecha: M2d, M3d, M4d, M6d, M7d, M10d, M11d, M6a, F3d, F5d, F11a.

MPM: Marcador de peso molecular, GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder (Fermentas).

- Digestión de vectores con enzima de restricción EcoRI

Para verificar la presencia de los fragmentos insertos en los vectores plasmídicos, se realizó la digestión de cada preparación de ADN plasmídico conteniendo insertos de interés con la enzima de restricción EcoRI. Esta enzima de restricción reconoce los sitios que flanquean al inserto en el vector plasmídico, por lo cual, el inserto es libre de migrar de forma independiente en una corrida electroforética. Las preparaciones de ADN plasmídico M7d y M11d no fueron utilizadas para ser digeridas con EcoRI y se descartaron como posibles candidatos para la secuenciación por obtener un bajo rendimiento en su purificación.

Se realizó también la digestión de la preparación de ADN plasmídico M6a, conteniendo al fragmento del gen *Mcnos*, procedente de *M. corti*, de un largo de 156 pb y ya caracterizado anteriormente en este trabajo. La digestión de M6a fue utilizada para comparar el largo del fragmento liberado de 156 pb, con el largo de los nuevos fragmentos aislados (Figuras R15a, R15b, R15c).

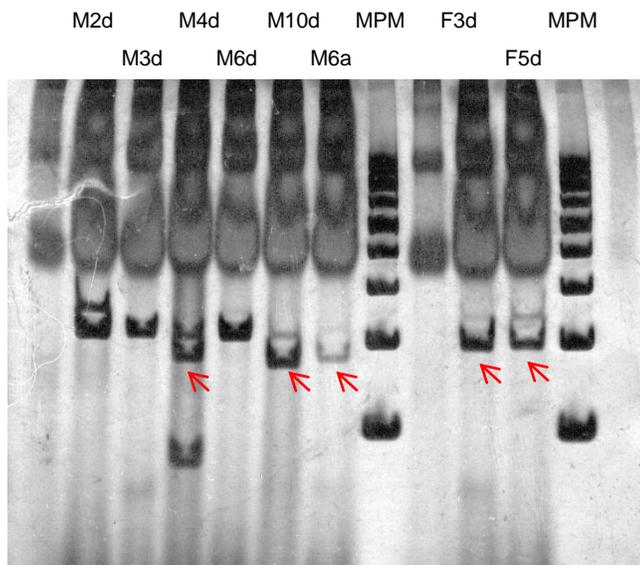


Figura R15a

Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%.

Preparaciones de ADN plasmídico digeridas con EcoRI:

M2d, M3d, M4d, M6d, M10d, M6a, F3d, F5d,

todas son digeridas.

Las flechas indican

fragmentos productos de digestión. MPM: Marcador de Peso Molecular.

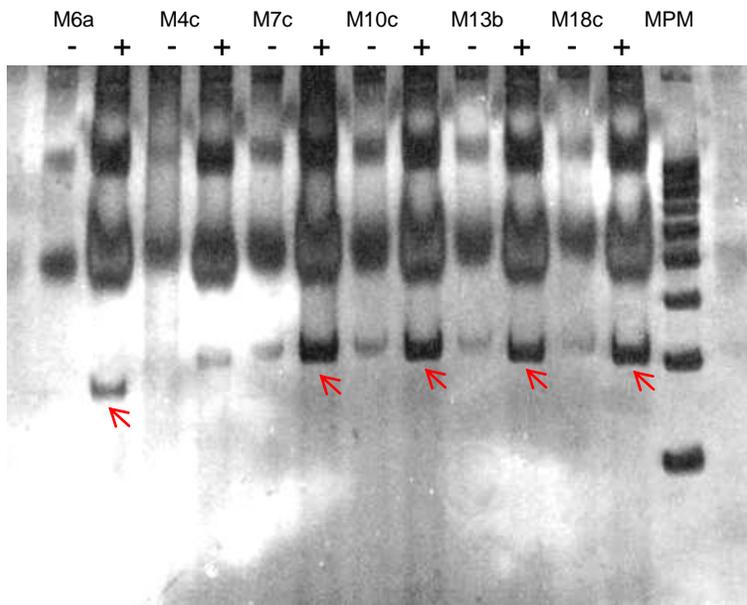


Figura R15b.

Electroforesis en gel de acrilamida al 15%.

Preparaciones de ADN plasmídico digeridas con EcoRI:

M6a, M4c, M7c, 10c, M13b, M18c, digeridas (+) y sin digerir (-).

Las flechas indican fragmentos productos de digestión. MPM: Marcador de Peso Molecular, GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

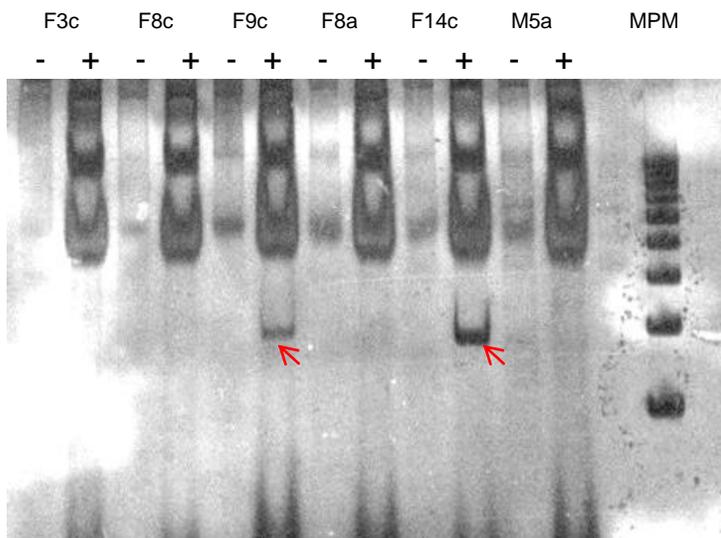


Figura R15c

Electroforesis en gel de acrilamida al 15%.

Preparaciones de ADN plasmídico digeridas con EcoRI:

F3c, F8c, F9c, F8a, F14c, M5a, digeridas (+) y sin digerir (-).

Las flechas indican fragmentos productos de digestión. MPM: Marcador de Peso Molecular, 100pb.

- Selección de clones a secuenciar

Posteriormente a la primer instancia de secuenciación de los dos fragmentos de genes tipo *nanos* de la serie A, se caracterizaron las secuencias de otros fragmentos de las siguientes tres series de búsqueda (series B, C, y D). Luego de realizar las preparaciones de ADN plasmídico de los clones de interés correspondientes, se seleccionaron para secuenciar aquellos fragmentos que, liberados de los plásmidos por la digestión con EcoRI, hayan presentado similitud de tamaño con los fragmentos ya secuenciados en *M. corti* y *F. hepatica* (156 pb).

- Fragmentos de genes tipo *nanos* provenientes de *M. corti* :

Dentro del conjunto de los clones de interés que contenían preparaciones de ADN plasmídico con fragmentos de genes tipo *nanos* provenientes de *M. corti*, cuyo patrón de digestión con la enzima HaeIII fue distinto al ya conocido para el fragmento de *Mcnos*, se eligieron algunos para ser secuenciados.

En las digestiones de las preparaciones M5a y M4c, no se pudo observar claramente un fragmento de restricción liberado de aproximadamente 156 pb, resultante de la digestión de los plásmidos recombinantes, con la enzima EcoRI. En las digestiones de las preparaciones M2d, M3d, y M6d no se pudo observar claramente un fragmento de restricción liberado de aproximadamente 156 pb, sino uno mayor a 200 pb.

En las digestiones de las preparaciones M13b, M7c, M10c, M18c, se pudo observar un fragmento de restricción liberado que parece ser algo mayor que el liberado por la digestión de la preparación M6a (C+ fragmento de *Mcnos* de 156 pb). Aunque estos fragmentos sean de casi 200 pb, podrían corresponder a fragmentos de genes tipo *nanos* de una identidad diferente a la ya conocida hasta ahora para *M. corti* (figura R15b). Observando la digestión con EcoRI de las preparaciones de ADN plasmídico M13b, M7c, M10c, M18c, parece ser que los fragmentos contenidos en las mismas tuvieran el mismo largo. Al menos en una primera instancia, se eligió a una sola de estas preparaciones para caracterizar la secuencia del fragmento inserto dentro de la misma.

Se descartaron las secuencias de ambos extremos del inserto clonado en el vector plasmídico de la preparación M7c, correspondientes a los cebadores diseñados, obteniendo así la secuencia de un posible fragmento de un gen tipo *nanos*. La secuencia codificante del fragmento procedente de *M. Corti*, clonado en la preparación de ADN plasmídico M7 de la serie C (M7c), y secuenciado por el cebador T7 en el vector plasmídico se dispuso en la tabla R3. La herramienta informática BLASTX (secuencia de nucleótidos traducidos vs. secuencias de proteínas de la base de datos) se utilizó para conocer la identidad de la secuencia del inserto clonado en el vector, o sea, que realmente correspondiera a un fragmento de gen tipo *nanos*. Utilizando la base de datos del NCBI, se buscó homologías existentes con el fragmento procedente de *M. corti*, secuenciado en el clon de la preparación de ADN plasmídico M7c. El fragmento resultó no ser parte de un gen tipo *nanos*, de acuerdo a su nula similitud con algún gen tipo *nanos* existente en la base de datos. Ya se pensaba acerca de este posible resultado al observar que el largo del nuevo fragmento aislado, de 140 pb sin los cebadores, era diferente al largo previsto para el mismo, de 114 pb sin los cebadores. Esto confirma que debe haber habido alguna hibridación inespecífica en la amplificación por PCR con los cebadores degenerados, obteniendo un fragmento que no corresponde a algún gen tipo *nanos*.

En las digestiones de las preparaciones M4d y M10d, se pudo observar un fragmento de restricción liberado de aproximadamente 156 pb, de igual largo aproximado al liberado por la digestión de la preparación M6a (C+ fragmento de *Mcnos* de 156 pb). Estos fragmentos podrían corresponder a fragmentos de genes tipo *nanos* de una identidad diferente a la ya conocida hasta ahora para *M. corti* (figura R15a). Observando la digestión con EcoRI de las preparaciones de ADN plasmídico M4d y M10d, parece ser que los fragmentos contenidos en las mismas tuvieran el mismo largo. Debido al anterior resultado para la secuenciación del fragmento procedente de *M. corti*, presente en la preparación de ADN plasmídico del clon M7c, se eligieron ambos fragmentos de la serie D, presentes en las

preparaciones de ADN plasmídico de los clones M4d y M10d, para ser secuenciados.

Se descartaron las secuencias de ambos extremos del inserto clonado en el vector plasmídico de la preparación M4d, correspondientes a los cebadores diseñados, obteniendo así la secuencia de un posible fragmento de un gen tipo *nanos*. La secuencia codificante del fragmento procedente de *M. Corti*, clonado en la preparación de ADN plasmídico M4 de la serie D (M4d), y secuenciado por el cebador T7 en el vector plasmídico se dispuso en la tabla R3. Este fragmento presentó un gran número de bases nucleotídicas indeterminadas en su secuenciación. Aún utilizando las bases conocidas no se pudo determinar efectivamente la identidad del mismo con herramientas informáticas. Esto se puede haber debido una purificación de ADN plasmídico no satisfactoria, o a alguna hibridación inespecífica en la amplificación por PCR, o directamente a algún error en las etapas de secuenciación.

Se descartaron las secuencias de ambos extremos del inserto clonado en el vector plasmídico de la preparación M10d, correspondientes a los cebadores diseñados, obteniendo así la secuencia de un posible fragmento de un gen tipo *nanos*. La secuencia codificante del fragmento procedente de *M. Corti*, clonado en la preparación de ADN plasmídico M10 de la serie D (M10d), y secuenciado por el cebador T7 en el vector plasmídico se dispuso en la tabla R3. La herramienta informática BLASTX (secuencia de nucleótidos traducidos vs. secuencias de proteínas de la base de datos), se utilizó para conocer la identidad de la secuencia del inserto clonado en el vector (si correspondía realmente a un fragmento de gen tipo *nanos*). Utilizando la base de datos del NCBI, se buscó homologías existentes con el fragmento procedente de *M. corti*, secuenciado en el clon de la preparación de ADN plasmídico M10d. El fragmento resultó no ser parte de un gen tipo *nanos*, de acuerdo a su nula similitud con algún gen tipo *nanos* existente en la base de datos (se encontró homología con otros genes, por ejemplo con el Pre-mRNA-splicing factor *cwc15* de *Schistosoma japonicum*). Ya se pensaba acerca de este posible resultado al observar que el largo del nuevo fragmento aislado, de 103 pb

sin los cebadores, era diferente al largo previsto para el mismo, de 114 pb sin los cebadores. Esto confirma que debe haber habido alguna hibridación inespecífica en la amplificación por PCR con los cebadores degenerados, obteniendo un fragmento que no corresponde a algún gen tipo *nanos*.

- Fragmentos de genes tipo *nanos* provenientes de *F. hepatica*:

Dentro del conjunto de los clones de interés que contenían preparaciones de ADN plasmídico con fragmentos de genes tipo *nanos* provenientes de *F. hepatica*, cuyo patrón de digestión con la enzima *AccI* fue distinto al ya conocido para el fragmento de *Fhnos*, se eligieron algunos para ser secuenciados.

En las digestiones de las preparaciones F8a, F5b, F8c, no se pudo observar claramente un fragmento de restricción liberado de aproximadamente 156 pb, resultante de la digestión de los plásmidos recombinantes, con la enzima *EcoRI*.

En las digestiones de las preparaciones F9c, F14c, F3d, F5d, se pudo observar un fragmento de restricción liberado de aproximadamente 156 pb, de igual largo aproximado al liberado por la digestión de la preparación M6a (C+ fragmento de *Fhnos* de 156 pb). Estos fragmentos podrían corresponder a fragmentos de genes tipo *nanos* de una identidad diferente a la ya conocida hasta ahora para *F. hepatica* (figura R15c). Observando la digestión con *EcoRI* de las preparaciones de ADN plasmídico F9c y F14c, parece ser que los fragmentos contenidos en las mismas tuvieron el mismo largo. Al menos en una primera instancia, se eligió a una sola de estas preparaciones para caracterizar la secuencia del fragmento inserto dentro de la misma.

Se descartaron las secuencias de ambos extremos del inserto clonado en el vector plasmídico de la preparación F14c, correspondientes a los cebadores diseñados, obteniendo así la secuencia de un posible fragmento de un gen tipo *nanos*. La secuencia codificante del fragmento procedente de *F. hepatica*, clonado en la preparación de ADN plasmídico F14 de la serie C (F14c), y secuenciado por el cebador T7 en el vector plasmídico conteniendo al inserto se dispuso en la tabla R3. Si bien existían 8 nucleótidos indeterminados por la secuenciación, se pudo

proceder de igual modo para comprobar la identidad del nuevo fragmento aislado. Para el uso de TBLASTX y BLASTN se utilizó la secuencia codificante de 97 pares de bases del fragmento, desde su comienzo en 5' hasta el comienzo de la región indeterminada de 8 nucleótidos. La herramienta informática BLASTX (secuencia de nucleótidos traducidos vs. secuencias de proteínas de la base de datos), se utilizó para verificar que la secuencia del inserto clonado en el vector correspondiera a un fragmento de gen tipo *nanos*. Utilizando la base de datos del NCBI, se buscó homologías existentes con el fragmento procedente de *F. hepatica*, secuenciado en el clon de la preparación de ADN plasmídico F14c. El fragmento resultó ser parte de un gen tipo *nanos*, de acuerdo a su alta similitud con las regiones conservadas de genes tipo *nanos* de otros organismos. Luego restaba por averiguar si la secuencia encontrada era parte de algún otro posible gen tipo *nanos*, o era parte del mismo gen tipo *nanos* encontrado en *F. hepatica*, para el cual ya se había secuenciado en el clon F11a, al fragmento de la región conservada. La herramienta informática TBLASTX (secuencia de nucleótidos traducidos vs. secuencias de nucleótidos traducidos), se utilizó para saber si la secuencia del nuevo fragmento aislado correspondía al fragmento del gen tipo *nanos* de *F. hepatica* ya secuenciado en el clon F11a. Utilizando a la secuencia del fragmento inserto en el clon de la preparación de ADN plasmídico F11a, se buscó homologías existentes con el fragmento procedente de *F. hepatica*, secuenciado en el clon de la preparación de ADN plasmídico F14c. El fragmento resultó ser parte del mismo gen tipo *nanos*, de acuerdo a su coincidencia en la secuencia de nucleótidos traducidos, con el fragmento secuenciado anteriormente en el clon F11a. Si bien hay 8 nucleótidos indeterminados en la secuencia del clon F14c, se piensa que no deben existir diferencias en ellos que puedan revelar la identidad de otro gen tipo *nanos*. La herramienta informática BLASTN (secuencia de nucleótidos vs. secuencias de nucleótidos), se utilizó para encontrar diferencias entre las secuencias de nucleótidos de los fragmentos de los clones F14c y F11a, que aún siendo no redundantes (ya que las secuencias traducidas fueron iguales), pudieran ser numerosas. De 97 nucleótidos existieron 95 coincidencias, siendo las 2 diferencias, no redundantes en cuanto a la traducción de los mismos como ya se

había comprobado de acuerdo al resultado con TBLASTX. Se piensa que estas diferencias no dan lugar para pensar en que el fragmento aislado del clon F14c represente a otro gen tipo *nanos* existente en *F. hepatica*. Las mismas pueden surgir por la causa de errores en la amplificación de la PCR, o por errores en la replicación del ADN plasmídico, o directamente por errores en las etapas de secuenciación.

Observando la digestión con EcoRI de las preparaciones de ADN plasmídico F3d y F5d, parece ser que los fragmentos contenidos en las mismas tuvieran el mismo largo. Debido al anterior resultado para la secuenciación del fragmento procedente de *F. hepatica*, presente en la preparación de ADN plasmídico del clon F14c, se eligieron ambos fragmentos de la serie D, presentes en las preparaciones de ADN plasmídico de los clones F3d y F5d, para ser secuenciados.

Se descartaron las secuencias de ambos extremos del inserto clonado en el vector plasmídico de la preparación F3d, correspondientes a los cebadores diseñados, obteniendo así la secuencia de un posible fragmento de un gen tipo *nanos*. La secuencia codificante del fragmento procedente de *F. hepatica*, clonado en la preparación de ADN plasmídico F3 de la serie D (F3d), y secuenciado por el cebador T7 en el vector plasmídico conteniendo al inserto se dispuso en la tabla R3. La herramienta informática BLASTX (secuencia de nucleótidos traducidos vs. secuencias de proteínas de la base de datos), se utilizó para conocer la identidad de la secuencia del inserto clonado en el vector (si correspondía realmente a un fragmento de gen tipo *nanos*). Utilizando la base de datos del NCBI, se buscó homologías existentes con el fragmento procedente de *F. hepatica*, secuenciado en el clon de la preparación de ADN plasmídico F3d. El fragmento resultó no ser parte de un gen tipo *nanos*, de acuerdo a su nula similitud con algún gen tipo *nanos* existente en la base de datos. Ya se pensaba acerca de este posible resultado al observar que el largo del nuevo fragmento aislado, de 130 pb sin los cebadores, era diferente al largo previsto para el mismo, de 114 pb sin los cebadores. Esto confirma que debe haber habido alguna hibridación inespecífica

en la amplificación por PCR con los cebadores degenerados, obteniendo un fragmento que no corresponde a algún gen tipo *nanos*.

Se descartaron las secuencias de ambos extremos del inserto clonado en el vector plasmídico de la preparación F5d, correspondientes a los cebadores diseñados, obteniendo así la secuencia de un posible fragmento de un gen tipo *nanos*. La secuencia codificante del fragmento procedente de *F. hepatica*, clonado en la preparación de ADN plasmídico F5 de la serie D (F5d), y secuenciado por el cebador T7 en el vector plasmídico conteniendo al inserto se dispuso en la tabla R3. La herramienta informática BLASTX (secuencia de nucleótidos traducidos vs. secuencias de proteínas de la base de datos), se utilizó para conocer la identidad de la secuencia del inserto clonado en el vector (si correspondía realmente a un fragmento de gen tipo *nanos*). Utilizando la base de datos del NCBI, se buscó homologías existentes con el fragmento procedente de *F. hepatica*, secuenciado en el clon de la preparación de ADN plasmídico F5d. El fragmento resultó no ser parte de un gen tipo *nanos*, de acuerdo a su nula similitud con algún gen tipo *nanos* existente en la base de datos. Ya se pensaba acerca de este posible resultado al observar que el largo del nuevo fragmento aislado, de 130 pb sin los cebadores, era diferente al largo previsto para el mismo, de 114 pb sin los cebadores. Esto confirma que debe haber habido alguna hibridación inespecífica en la amplificación por PCR con los cebadores degenerados, obteniendo un fragmento que no corresponde a algún gen tipo *nanos*.

Tabla R3

Secuencias de fragmentos provenientes de *M. corti* (M) y *F. hepatica* (F), caracterizados a partir de clones seleccionados. Se visualizan las secuencias codificantes de los fragmentos.

| | |
|--|---|
| <p>Fragmento del clon M7c (140 pb)</p> | <p>GTTATAAAACCAAATTCAGAGGGTACTTGTGTTAGTGTGTAGACCACGGT AAACCGAAGAAAGACTCAGAGACGGATAAATGACTCAGACGGTGGTTTGT TCGGGCGAGCACACTTNTNTNGNNGTNNNTCTGATGAG</p> |
| <p>Fragmento del clon M4d (114b)</p> | <p>AGNANACTNAAGANNTGNANNCAANNCGNNNGGNGNNNNNCCANNTGGT TGNCNTNCAGGCTGCCGCNAAGNCNANANNGATNTGTGTTNCTNGGNNT GATGACNNNNNATTCA</p> |
| <p>Fragmento del clon M10d (103 pb)</p> | <p>AACCGCTGGTCGACCTACTTGAATACTGCGAAAGGTGGAAAGGGGAAA TGGGAGGGTGACTTGAGTGCTCTTTCGAAGCAGTATTCTGTCCGCGATCT CCCT</p> |
| <p>Fragmento del clon F14c (114 pb)</p> | <p>GGTGAACCTTTTCGAAGTCTACATAACGCATAAGGTCAAGGACGCATCGG GAAGAGTAACGTGTCCTGTATTACGGCTGCTGTCCTGTCCGCTATGTANN NNNNNNAGATGCGGC</p> |
| <p>Fragmento del clon F3d (130 pb)</p> | <p>GCCACCTGGTCCGGGCGACTGATNCACTTTCAGTTTCTTCGGTTCCTTGG CGATCTTAGCTGAATGAAAGTGCCGGAGCACGAGAATAACATTCGTATAA GGCGGTGACGGCGATAAGGTTGANTCTGTC</p> |
| <p>Fragmento del clon F5d (130 pb)</p> | <p>GCCACCTGGTCCGGGCGACTGATACACTTTCAGTTTCTTCGGTTCCTTGG CGATCTTAGCTGAATGAAAGTGCCGGAGCACGAGAATAACATTCGTATAA GGCGGTGACGGCGATAANNNGNNTCTGTC</p> |

Tabla R4

Resumen de resultados de las 4 series de rastreo de fragmentos de genes tipo nanos en *M. corti* y *F. hepatica*. *Anteriormente los fragmentos de *Mcnos* y *Fhnos* se caracterizaron en una serie que no fue mostrada en el trabajo porque no se hizo el análisis de rastreo incluyendo enzimas de restricción.

| | Número de reacciones de PCR | | PCR + fragmento nanos (~156 pb) | | Digestión igual a fragmento secuenciado | | Digestión diferente a fragmento secuenciado | | Patrón de digestión sin determinar | | Patrón de digestión con EcoRI | | Plásmidos recombinantes secuenciados | | | |
|---------|-----------------------------|-------------|---------------------------------|--------------|---|---------------|---|---------------|------------------------------------|---------------|-------------------------------|-----------------|--------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | <i>M. c.</i> | <i>F.h.</i> | <i>M. c.</i> | <i>F. h.</i> | <i>Mc nos</i> | <i>Fh nos</i> | <i>Mc nos</i> | <i>Fh nos</i> | <i>Mc nos</i> | <i>Fh nos</i> | ≠ <i>Mc nos</i> | ≠ <i>Fh nos</i> | = <i>Mc nos</i> | ≠ <i>Mc nos</i> | = <i>Fh nos</i> | ≠ <i>Fh nos</i> |
| Serie A | 5 | 11 | 3 | 6 | 1 | 5 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | M6* | | F11* | |
| Serie B | 20 | 0 | 7 | 0 | 3 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | | 1 | M9 M10 | | | |
| Serie C | 18 | 14 | 12 | 9 | 7 | 2 | 4 | 3 | 1 | 4 | 1 | 1 | | M7 | F9 F14 | |
| Serie D | 12 | 12 | 11 | 9 | 4 | 6 | 6 | 2 | 1 | 1 | 3 | | | M4 M10 | | F3 F5 |

Diseño de cebadores específicos para RACE

Se diseñaron los cebadores específicos que permitieran amplificar junto con los cebadores prediseñados del kit *Generacer*, los extremos 3' y 5' de la secuencia codificante de los genes tipo nanos. Se utilizaron las secuencias específicas de cada fragmento caracterizado en *M. corti* y *F. hepatica* para diseñar los dos pares de cebadores específicos en cada platelminto. La región 5' de cada fragmento secuenciado se utilizó para diseñar los cebadores F (Forward) F1 y F2. La región 3' de cada fragmento secuenciado se utilizó para diseñar los cebadores R (Reverse) R1 y R2. Los cebadores F1 y R1 se utilizan en la primera reacción de amplificación de los extremos 3' y 5' respectivamente. Los cebadores F2 y R2 se utilizan en la segunda reacción de amplificación (PCR anidada) de los extremos 3' y 5' respectivamente.

Dentro de las múltiples secuencias posibles de cebadores coincidentes con las regiones 3' y 5' de cada uno de los fragmentos secuenciados, se eligió una en particular para diseñar cada cebador específico. El número de nucleótidos, así como el porcentaje GC, la termodinámica del apareamiento (temperatura de fusión), y la formación de heterodímeros con los cebadores *Generacer* fueron factores determinantes para la elección de la secuencia de cada cebador específico. Se utilizan algoritmos informáticos (ver anexo, referencia 2) para calcular dichos factores conjuntamente y deducir la secuencia que probablemente apareará más eficientemente con el ADN molde.

La secuencia del cebador específico F1, utilizado junto con el *GeneRacer*TM 3' primer en la primera reacción de amplificación del extremo 3' del ADN copia del gen tipo nanos en *M. corti* fue: GAAACCTACGAAGTCTACTCAAGCCACA. La longitud del cebador específico fue de 28 nucleótidos y los valores de temperatura de fusión, o *melting temperature* (Tm) en inglés, y contenido en GC obtenidos para este cebador específico fueron los siguientes: % GC = 46.4%; Tm (%GC) = 76.4 °C; Tm (2(A+T) + 4(G+C)) = 82 °C; Tm (IDT)=59.7. Se estimó la Tm como una media entre la Tm (IDT) por ser un algoritmo integral y la Tm (2(A+T) + 4(G+C)) por ser la recomendada por el kit *Generacer*. La Tm de 68 °C es menor a 72 °C, por lo cual según las indicaciones del kit se debió utilizar una temperatura de unión

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

del cebador (*annealing*) en el termociclador de entre 60 y 65 °C, que finalmente fue de 62 °C (tabla M3a y M3b). En la tabla R5 se describen las secuencias características, así como la longitud, el contenido GC, y los valores de T_m para cada cebador específico utilizados en las reacciones de amplificación de RACE. El cálculo de cada T_m para cada cebador se realizó de igual modo que para el cebador F1 Mcnos, utilizado para amplificar el extremo 3' del ADN copia del gen tipo nanos en *M. corti*, como se detalló anteriormente.

Tabla R5. Secuencias características, así como la longitud, el contenido GC, y los valores de T_m para cada cebador específico utilizados en las reacciones de amplificación de RACE.

| Cebador específico | Secuencia | Nº de nucleótidos | % GC | T _m (°C) (GC+AT) | T _m (°C) (IDT) | T _m (°C) media |
|--------------------|----------------------------------|-------------------|------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| F1 Mcnos | GAAACCTACGAAGTCTA CTCAAGCCACA | 28 | 46.4 | 82.0 | 59.7 | 70.85 |
| F2 Mcnos | ACTCAAGCCACAAGGTG AAGGACCAG | 26 | 53.8 | 80 | 62.5 | 71.25 |
| R1 Mcnos | CCTGTAGCCATACAGAG GGGACACA | 25 | 56.0 | 78.0 | 61.0 | 69.50 |
| R2 Mcnos | CAGAGGGGACACACGTA TTTGCG | 23 | 56.5 | 72.0 | 60.1 | 66.05 |
| F1 Fhnos | GGTGAACCTTTTGAAGT CTACATAACGC | 28 | 46.4 | 82.0 | 59.2 | 70.6 |
| F2 Fhnos | CATAACGCATAAGGTCA AGGACGCAT | 26 | 46.2 | 76.0 | 59.2 | 67.2 |
| R1 Fhnos | CGCATCTCCTGTGGATTT ACATAGCG | 26 | 50.0 | 78.0 | 59.4 | 68.7 |
| R2 Fhnos | TACATAGCGGACAGGAC AGCAGC | 23 | 56.5 | 72.0 | 60.9 | 66.45 |

PCR de extremos 3' de *Mcnos* y *Fhnos*

La amplificación del extremo 3' del ADN copia del gen tipo *nanos* en *F. hepatica* (3'Fhnos) y en *M. corti* (3'Mcnos) podría ser satisfactoria de acuerdo a la migración de los productos de reacción en gel de agarosa (figura R16).

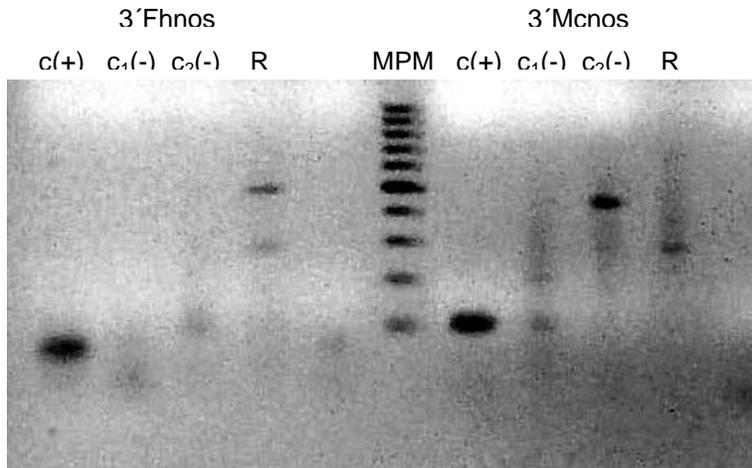


Figura R16

Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Amplificación del extremo 3' del ADN copia del gen tipo *nanos* en *F. hepatica* (3'Fhnos) y en *M. corti* (3'Mcnos). Control positivo es c(+), controles negativos son c₁(-) y c₂(-), y reacción de extensión es R, para 3'Fhnos y 3'Mcnos. Marcador de peso molecular es MPM, GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

La amplificación de los fragmentos utilizados como control positivo para la extensión de 3'Mcnos y 3'Fhnos se realizó utilizando cada par específico de cebadores F1 y R1, sobre ADN copia de *M. corti* y *F. hepatica* respectivamente. El fragmento amplificado por los cebadores F1 y R1 específicos para *M. corti* sobre el respectivo ADN copia tiene una extensión de 104 pb (amplifican la mayor parte del fragmento de *Mcnos*). Éste es el control positivo para la amplificación de 3'Mcnos. El fragmento amplificado por los cebadores F1 y R1 específicos para *F. hepatica* sobre el respectivo ADN copia tiene una extensión de 114 pb (amplifican todo el fragmento de *Fhnos*). Éste es el control positivo para 3'Fhnos. La reacción utilizada como primer control negativo c₁(-) para la extensión de 3'Mcnos y 3'Fhnos se realizó utilizando únicamente al cebador *GeneRacer*™ 3' primer, sobre ADN copia de *M. corti* y *F. hepatica* respectivamente. La reacción utilizada como segundo control negativo c₂(-) para la extensión de 3'Mcnos y 3'Fhnos se realizó sin utilizar los moldes de ADN copia de *M. corti* y *F. hepatica*

respectivamente. El control positivo es importante para comprobar la eficacia experimental (funcionalidad de la enzima polimerasa, funcionalidad de cebadores específicos, concentración de reactivos). Los controles negativos son importantes para comprobar la posible existencia de hibridaciones inespecíficas entre reactivos que puedan provocar la extensión de productos de amplificación no deseados. Los controles positivos fueron satisfactorios. Los controles positivos amplificados se encontraron muy próximos a la banda de 100 pb del MPM, correspondiendo muy probablemente a la amplificación de los fragmentos esperados. Los controles negativos amplificados fueron en su mayoría satisfactorios. No se observaron productos de amplificación en los controles negativos para la extensión de 3´Fhnos. No se observaron productos de amplificación en el control negativo c_1 (-), pero sí se observó un producto de amplificación en el control negativo c_2 (-) para la extensión de 3´Fhnos. La reacción de extensión R de 3´Fhnos podría ser satisfactoria. Se observaron dos productos de amplificación de aproximadamente 300 pb y 500 pb correspondientes a posibles extremos 3´ del ADN copia del gen *Fhnos* de *F. hepatica*. La reacción de extensión R de 3´Mcnos podría ser satisfactoria. Se observó un producto de amplificación de aproximadamente 300 pb correspondiente a un posible extremo 3´ del ADN copia del gen *Mcnos* de *M. corti*.

Aislamiento del extremo 3´*Mcnos*

El producto de la reacción de amplificación del extremo 3´ del ADN copia del gen tipo *nanos* en *M. corti*, 3´Mcnos, fue ligado en el vector plasmídico *p-Gem T Easy*. Se transformaron bacterias *E. coli* competentes con las mezclas de ligación correspondientes. Las mismas se hicieron crecer en placas, una y otra vez de manera de obtener colonias aisladas, o sean diferentes conjuntos de clones. El procedimiento ligación - transformación - cultivo en placas - extracción de ADN plasmídico, fue en su mayor parte exitoso, de acuerdo a lo observado en la corrida en gel de agarosa de las preparaciones de ADN plasmídico (figura R17a y R17b).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las preparaciones de ADN plasmídico fueron realizadas en 2 series diferentes E y F, provenientes de colonias de bacterias aisladas de diferentes placas de cultivo. A modo de control negativo se utilizaron dos preparaciones de ADN plasmídico, $C_E(-)$ y $C_F(-)$, realizadas a partir de clones extraídos de colonias azules aisladas, ya que éstos no deberían contener vectores con insertos en los sitios de clonado (recordar el método de selección de colonias en el medio de cultivo con IPTG, ver materiales y métodos para detalles). Las demás preparaciones de ADN plasmídico E1,..., E7 y F1,..., F7 fueron realizadas a partir de clones extraídos de colonias blancas aisladas, por lo cual se espera que éstos contengan insertos extremos 3' Mcnos en el sitio de clonado de sus vectores.

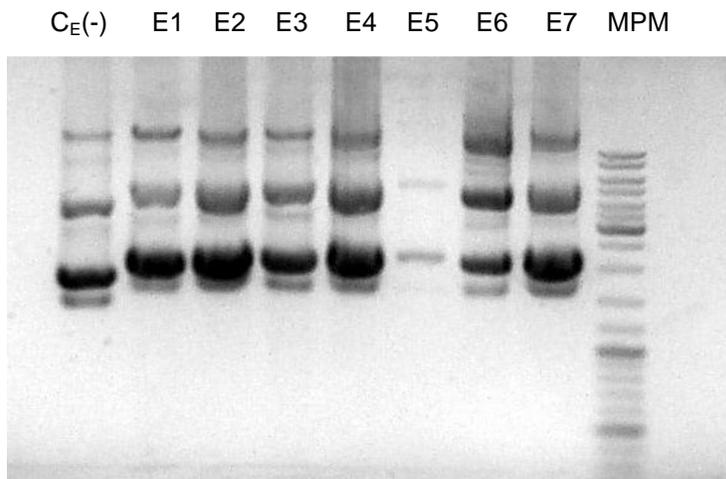


Figura R17a

Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Preparaciones de ADN plasmídico cuyos insertos son posibles extremos 3' del gen tipo *nanos* de *M. corti* (3' Mcnos): E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7. Control negativo es $C_E(-)$, marcador de peso molecular es MPM, GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder (Fermentas).

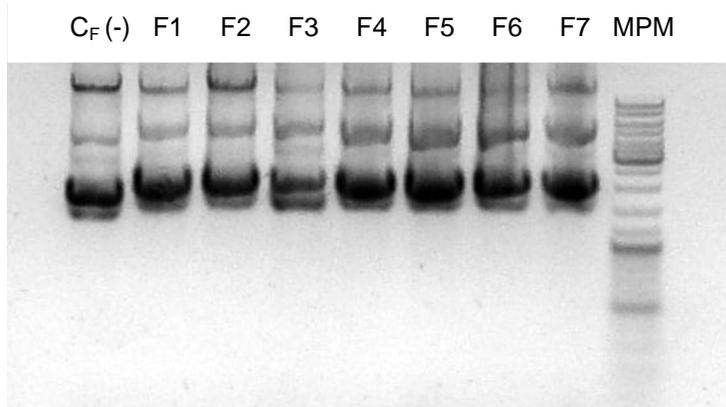


Figura R17b

Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Preparaciones de ADN plasmídico cuyos insertos son posibles extremos 3' del gen tipo *nanos* de *M. corti* (3' Mcnos): F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7. Control negativo es $C_F(-)$, marcador de peso molecular es MPM, GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder (Fermentas).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pudo constatar que las preparaciones de ADN plasmídico C_E (-) y C_F (-) fueron algo más pequeñas que el resto de las preparaciones, como era de esperar según su selección particular en las placas de cultivo como fue explicado anteriormente. Las demás preparaciones podrían contener un inserto ligado, correspondiente probablemente al extremo 3' del gen *Mcnos* de *M. corti* (3'Mcnos). Para verificar la presencia de dichos fragmentos, se realizó la digestión de cada preparación de ADN plasmídico conteniendo insertos de interés con la enzima de restricción *EcoRI* (figura R18). Esta enzima ya fue utilizada anteriormente en este trabajo y reconoce los sitios que flanquean al inserto en el vector plasmídico, por lo cual, el inserto es libre de migrar de forma independiente en una corrida electroforética. La preparación de ADN plasmídico E5 no fue utilizada para ser digerida y se descartó como posible candidato para la secuenciación por obtener un bajo rendimiento en su purificación.

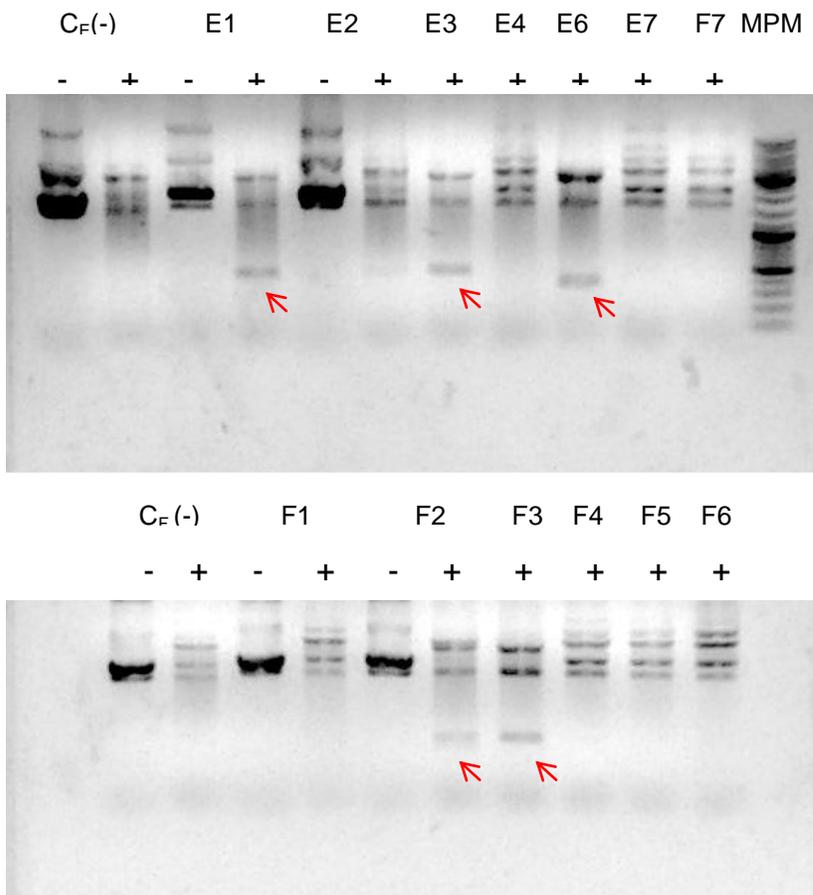


Figura R18

Electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Preparaciones de ADN plasmídico conteniendo posibles insertos 3'Mcnos, digeridas con *EcoRI*:

E1, E2, E3, E4, E6, E7, F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7.

Marcador de peso molecular es MPM.

MP digerida es (+) y MP sin digerir es (-). Controles negativos sin insertos son C_E (-) y C_F (-).

Las MPs desde E3 hasta E7 y desde F3 hasta F7 no se muestran sin digerir en este gel. Las flechas indican los probables extremos 3'Mcnos productos de la digestión.

Luego de realizar las digestiones con *EcoRI* de las preparaciones de ADN plasmídico conteniendo probables extremos 3´Mcnos, se seleccionaron aquellas que tuvieran insertos de entre 300 y 500 pares de bases como candidatos para la secuenciación. Pudo comprobarse como era esperado según su selección como controles negativos, que las preparaciones de ADN plasmídico C_E (-) y C_F (-) fueron digeridas sin observar algún producto resultante. Se seleccionaron las preparaciones E1, E3, E6, F2, y F3 como posibles candidatos para la secuenciación de sus insertos, de acuerdo a sus respectivos productos de digestión generados con la enzima *EcoRI*. En las demás preparaciones digeridas con esta enzima, no se pudo observar claramente un fragmento de restricción liberado de aproximadamente 300 o 500 pares de bases, por lo que no se tuvieron en cuenta para la secuenciación.

Caracterización del extremo 3´Mcnos

En una primera instancia, se caracterizaron las secuencias de dos fragmentos en particular, correspondientes a extremos 3´ del ADN copia del gen tipo *nanos* en *M. corti* (3´Mcnos), procedentes de las preparaciones E1 y E3 de ADN plasmídico.

La secuencia del fragmento de 450 pares de bases, procedente de *M. Corti*, clonado en la preparación de ADN plasmídico E1, y secuenciado por el cebador T7 en el vector plasmídico conteniendo al inserto, se dispuso en la tabla R6. La herramienta informática BLASTX (secuencia de nucleótidos traducidos vs. secuencias de proteínas de la base de datos), se utilizó para verificar que la secuencia del inserto clonado en el vector correspondiera a un extremo 3´de algún gen tipo *nanos*. Utilizando la base de datos del NCBI, se buscó homologías existentes con este fragmento procedente de *M. corti*. El mismo resultó ser perteneciente al extremo 3´ de un gen tipo *nanos*, de acuerdo a su alta similitud con las regiones 3´ de genes tipo *nanos* de otros organismos. Esto confirma que este fragmento corresponde al extremo 3´ de un gen tipo *nanos* presente en *M. corti*. El fragmento clonado en el vector representa la secuencia de la cadena

sentido del extremo 3' del gen tipo *nanos* y se encuentra en dirección 5' → 3'. Esto se reconoció rápidamente al observar el conjunto de 24 adeninas ubicadas al final de la secuencia obtenida, que corresponden a la secuencia de poliadenilado en el ARN mensajero correspondiente.

En un primer análisis detallado de la secuencia de ADN obtenida, se encontró el sitio de clivaje del correspondiente ARN mensajero transcrito. Esta información fue importante para conocer la secuencia exacta de aminoácidos codificados por esta región del gen, es decir, dónde termina exactamente la traducción del ARN mensajero correspondiente. El sitio de clivaje se encuentra aproximadamente a quince pares de bases en dirección 5' de donde comienza el sitio de poliadenilado. El sitio exacto de clivaje fue determinado por la secuencia característica AUAA del ARN mensajero, correspondiente a la secuencia ATAA en la cadena sentido del ADN codificante.

En un segundo análisis detallado de la secuencia de ADN obtenida, se encontró el sitio exacto de dónde finaliza la homología con el fragmento conservado del gen *Mcnos* caracterizado anteriormente. Esta información fue importante para evitar la información redundante y unir correctamente las secuencias obtenidas. Para comprender lo anterior recordar que los cebadores específicos F fueron diseñados en base al fragmento del gen *Mcnos* secuenciado en un principio, por lo cual la secuencia 3' *Mcnos* E1 comienza en su extremo 5' con la secuencia del fragmento de *Mcnos* ya obtenida anteriormente en este trabajo. Esta región del extremo 3' *Mcnos* E1 coincidente con el fragmento conservado de *Mcnos* anteriormente secuenciado es de una longitud de 99 pares de bases. Luego de ésta comienza la región del 3' del gen *Mcnos* que aún no era conocida hasta aquí.

Luego de estos dos análisis se dedujo la secuencia del ADN codificante correspondiente al extremo 3' de *Mcnos* sin la región solapante de la secuencia caracterizada anteriormente y sin la región que comprende más allá del sitio de clivaje en dirección 3'. La secuencia deducida comprende 287 pares de bases de los 450 pb originales secuenciados en la preparación de ADN plasmídico E1. En la tabla R7 se dispone dicha secuencia codificante del extremo 3' del gen *Mcnos*. Esta secuencia de ADN de 287 pares de bases codifica 94 aminoácidos en el

marco abierto de lectura +1, siendo TAA el último codón de fin de la traducción, y quedando las últimas dos bases AA fuera de la misma.

De modo análogo se procedió con la secuencia del extremo 3' clonado en la preparación de ADN plasmídico E3 que fue en este caso de 433 pares de bases. Más adelante se verá como esta diferencia de 17(450 – 433) pares de bases no es significativa en la secuencia codificante final, que es idéntica a la del extremo 3' del gen *Mcnos* secuenciada en el clon E1. Esto se debe a que estos 17 nucleótidos se encuentran luego del sitio de clivaje del ARN mensajero correspondiente en dirección 3'. La secuencia del fragmento de 433 pares de bases, procedente de *M. Corti*, clonado en la preparación de ADN plasmídico E3, y secuenciado por el cebador T7 en el vector plasmídico conteniendo al inserto, se dispuso en la tabla R6. La herramienta informática BLASTX (secuencia de nucleótidos traducidos vs. secuencias de proteínas de la base de datos), se utilizó para verificar que la secuencia del inserto clonado en el vector correspondiera a un extremo 3' de algún gen tipo *nanos*. Utilizando la base de datos del NCBI, se buscó homologías existentes con este fragmento procedente de *M. corti*. El mismo resultó ser perteneciente al extremo 3' de un gen tipo *nanos*, de acuerdo a su alta similitud con las regiones 3' de genes tipo *nanos* de otros organismos. Esto confirma que este fragmento corresponde al extremo 3' de un gen tipo *nanos* presente en *M. corti*.

El fragmento clonado en el vector representa la secuencia de la cadena anti sentido del extremo 3' de un gen tipo *nanos* y se encuentra en dirección 3' → 5'. Esto se reconoció rápidamente al observar el conjunto de 27 timinas ubicadas al principio de la secuencia obtenida, que en un entorno de transcripción celular dan lugar a la secuencia de poliadenilado en el ARN mensajero transcrito correspondiente.

En un primer análisis detallado de la secuencia de ADN obtenida, se encontró el sitio de clivaje del correspondiente ARN mensajero transcrito. Esta información fue importante para conocer la secuencia exacta de aminoácidos codificados por esta región del gen, es decir, dónde termina exactamente la traducción del ARN mensajero correspondiente. El sitio de clivaje se encuentra aproximadamente a

quince pares de bases en dirección 5' de donde comienza el sitio de poliadenilado. El sitio exacto de clivaje fue determinado por la secuencia característica AUAA del ARN mensajero, correspondiente a la secuencia ATAA en la cadena sentido del ADN codificante.

En un segundo análisis detallado de la secuencia de ADN obtenida, se encontró el sitio exacto de dónde finaliza la homología con el fragmento conservado del gen *Mcnos* caracterizado anteriormente. Esta información fue importante para evitar la información redundante y unir correctamente las secuencias obtenidas. Para comprender lo anterior recordar que los cebadores específicos F fueron diseñados en base al fragmento del gen *Mcnos* secuenciado en un principio, por lo cual la secuencia 3'*Mcnos* E3 comienza en su extremo 5' con la secuencia del gen *Mcnos* ya obtenida anteriormente en este trabajo. Esta región del extremo 3'*Mcnos* E3 coincidente con el fragmento conservado de *Mcnos* anteriormente secuenciado es de una longitud de 80 pares de bases. Luego de ésta comienza la región del 3' del gen *Mcnos* que aún no era conocida hasta aquí.

Luego de estos dos análisis se dedujo la secuencia del ADN codificante correspondiente al extremo 3' de *Mcnos* sin la región solapante de la secuencia caracterizada anteriormente y sin la región que comprende más allá del sitio de clivaje en dirección 3'. La secuencia deducida comprende 287 pares de bases de los 433 pb originales secuenciados en la preparación de ADN plasmídico E3. En la tabla R7 se dispone dicha secuencia codificante del extremo 3' del gen *Mcnos*. Esta secuencia de ADN de 287 pares de bases codifica 94 aminoácidos en el marco abierto de lectura +1, siendo TAA el último codón de fin de la traducción, y quedando las últimas dos bases AA fuera de la misma.

De modo análogo se procedió con la secuencia del extremo 3' clonado en la preparación de ADN plasmídico E6 que fue en este caso de 260 pares de bases. El fragmento resultó no ser parte de un gen tipo *nanos*, de acuerdo a su nula similitud con algún gen tipo *nanos* existente en la base de datos. Ya se pensaba acerca de este posible resultado al constatar que este fragmento era casi de la mitad del largo que los otros fragmentos obtenidos correspondientes a extremos 3'. Esto confirma que debe haber habido alguna hibridación inespecífica

en la amplificación por PCR, obteniendo un fragmento que no corresponde a un extremo 3' de un gen tipo *nanos*.

Las dos secuencias correspondientes a extremos 3' de algún gen tipo *nanos* en *M. corti* obtenidas hasta aquí fueron desde preparaciones de dos clones diferentes (E1 y E3). Éstas resultaron, de acuerdo a su misma identidad, ser características del mismo gen *Mcnos* de *M. corti*, del cual ya se había caracterizado al fragmento conservado de 114 pb. Por lo que en este punto se pudo sólo afirmar la existencia de un gen tipo *nanos* en *M. corti*, del cual se conoce ahora la secuencia codificante de la región 3', desde su extremo 3' hasta el fragmento ya anteriormente secuenciado de la región conservada.

| <p>Tabla R6. Secuencias de fragmentos correspondientes a extremos 3' del gen tipo <i>nanos</i> <i>Mcnos</i> de <i>M. corti</i>, obtenidas a partir de clones seleccionados. Se visualizan las secuencias de los insertos originales de los clones E1 y E3, y la deducción a partir de las mismas, de la idéntica secuencia codificante del extremo 3' del gen <i>Mcnos</i>. La secuencia del inserto del clon E6 no figura porque no correspondía a algún gen tipo <i>nanos</i>.</p> | |
|---|--|
| <p>Inserto del clon E1 (450 pb)</p> | <p>CGATTACTCAGCCACAAGGTGAAGGACCAGGCCGGCAGGGTAAACGCGTCCTGCCCTGCGCA AATACGTGTGTCCCCTCTGTATGGCTACAGGGGATTCAGCTCATATGGTCAGATACTGCAAAC AAAATATCCTTGAGCGAACACCAAGGGATGATGGCTCTCGAAGTGCTGTTGATTGCATCTGGT CACCTCAATTGGGCACTGTTGGAGACAAAAGTGGCATCAACGACAACAGGCTCTGGGAGTTCCG GCTCTTCTGCAACCTCTCTTCATGGGGCTTCCAACACGCTCACTCCTGCACCTTTTTCTAATT AAAACCTGCGTTTTTGTGTATCAATTTTGTCTACTACCTTTTCAGCGGTTTATTGAACTTTCCG AAATAAACTATTTGCGTCGTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTCTGCGTTGTTAC CACTGCTT</p> |
| <p>Extremo 3' (E1) del gen <i>Mcnos</i> (287b), deducido desde el inserto del clon E1</p> | <p>GCTCATACGGTCAGATACTGCAAACAAAATATCCTTGAGCGAACACCAAGGGATGATGGCTC TCGAAGTGCTGTTGATTTCGATCTGGTCACTCAATTGGGCACTGTTGGAGACAAAAGTGGCAT CAACGACAACAGGCTCTGGGAGTTCCGGCTCTTCTGCAACCTCTCTTCATGGGGCTTCCAACA CGTCTCACTCCTGCACCTTTTTCTAATTAACCTGCGTTTTTGTGTATCAATTTTGTCTACTAC CTTTTCAGCGGTTTATTGAACTTTCCGAAATAAAA</p> |
| <p>Inserto del clon E3 (433 pb)</p> | <p>AGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAACGACGCAAATA GTTTTATTTTCGGAAAGTTCAAATAAACCGCTGAAAAGGTAGTAGACAAAATTGATACACAAAAA CGCAGGTTTTAATTAGAAAAAGGTGCAGGAGTGAGACGTGTTGGAAGCCCCATGAAGAGAGG TTGCAGAAGAGCCGAACCTCCAGAGCCTGTTGTCGTTGATGCCACTTTGTCTCCAACAGTGC CCAATTGAGGTGACCAGATCGAATCAACAGCACTTCGAGAGCCATCATCCCTTGGTGTTCGC TCAAGGATATTTGTTGTCAGTATCTGACCGTATGAGCTGAATCCCTGTAGCCATACAGAGG GGACNACGTATTTGCGCANGGNANGNNGTTACCCTGCCGGCCTGGTCCTTCNN</p> |
| <p>Extremo 3' (E3) del gen <i>Mcnos</i> (287b), deducido desde el inserto del clon E3</p> | <p>GCTCATACGGTCAGATACTGCAAACAAAATATCCTTGAGCGAACACCAAGGGATGATGGCTC TCGAAGTGCTGTTGATTTCGATCTGGTCACTCAATTGGGCACTGTTGGAGACAAAAGTGGCAT CAACGACAACAGGCTCTGGGAGTTCCGGCTCTTCTGCAACCTCTCTTCATGGGGCTTCCAACA CGTCTCACTCCTGCACCTTTTTCTAATTAACCTGCGTTTTTGTGTATCAATTTTGTCTACTAC CTTTTCAGCGGTTTATTGAACTTTCCGAAATAAAA</p> |

Diseño de las sondas para hibridación *in situ* en *M. corti*

El diseño de las sondas específicas para el ARN mensajero del gen *Mcnos* es necesario para realizar futuros ensayos de hibridación *in situ* con este gen en *M. corti*. Se planteó el diseño de las sondas para utilizar en tales ensayos, aunque éstos no serán tomados en cuenta ya que su realización excede la extensión de esta tesis. Los moldes posibles a utilizar fueron las preparaciones de ADN plasmídico E1 y E3, purificadas a partir de los respectivos clones, correspondientes a extremos 3' del gen *Mcnos*. A partir de cada una de estas dos preparaciones fue secuenciado el ADN codificante del extremo 3' del gen *Mcnos* de *M. corti*, obteniendo de modo independiente la misma secuencia característica. El sentido en que se encuentra cada una de estas secuencias clonadas en el vector plasmídico (ver secuencias originales de insertos E1 y E3) es diferente, y esto es importante para saber que promotor se utiliza para la transcripción de cada sonda.

Para la síntesis de la sonda *antisentido* (*antisense*) de ARN transcripta a partir del ADN del plásmido E1, se podría utilizar el promotor SP6 de modo de obtener una secuencia que fuera complementaria al extremo 3' del ARN mensajero transcrito del gen *Mcnos*. Recordar que la secuenciación de este inserto a partir del promotor T7 dio como resultado la cadena sentido del extremo 3' del gen *Mcnos*, por lo que la transcripción a partir del promotor SP6 daría como resultado la cadena anti sentido del extremo 3' de este gen. De modo análogo, se podría utilizar el promotor T7 de modo de obtener una secuencia que fuera idéntica al extremo 3' del ARN mensajero transcrito del gen *Mcnos*.

Para la síntesis de la sonda *antisentido* (*antisense*) de ARN transcripta a partir del ADN del plásmido E3, se podría utilizar el promotor T7 de modo de obtener una secuencia que fuera complementaria al extremo 3' del ARN mensajero transcrito del gen *Mcnos*. Recordar que la secuenciación de este inserto a partir del promotor T7 dio como resultado la cadena anti sentido del extremo 3' del gen *Mcnos*, por lo que la transcripción a partir del promotor T7 daría como resultado la cadena anti sentido del extremo 3' de este gen. De modo

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

análogo, se podría utilizar el promotor SP6 de modo de obtener una secuencia que fuera idéntica al extremo 3' del ARN mensajero transcrito del gen *Mcnos*.

Se generaron los mapas de digestión de las secuencias de ambas preparaciones de ADN plasmídico, E1 y E3, y así en un futuro, elegir enzimas de restricción que permitan obtener fragmentos lineales que incluyan a algún promotor de interés SP6 o T7, necesarios para iniciar la transcripción de la sonda, y parte de la secuencia del extremo 3' (la mayor parte posible) del gen *Mcnos*. En la figura R19a se visualiza el mapa total de restricción del plásmido E1 conteniendo el extremo 3' del gen *Mcnos*. En las figuras R19b y R19c se visualizan las regiones ampliadas del mismo utilizadas para transcribir las sondas. Por motivos de extensión, se muestra únicamente al plásmido del clon E1. El razonamiento es análogo para el plásmido E3.

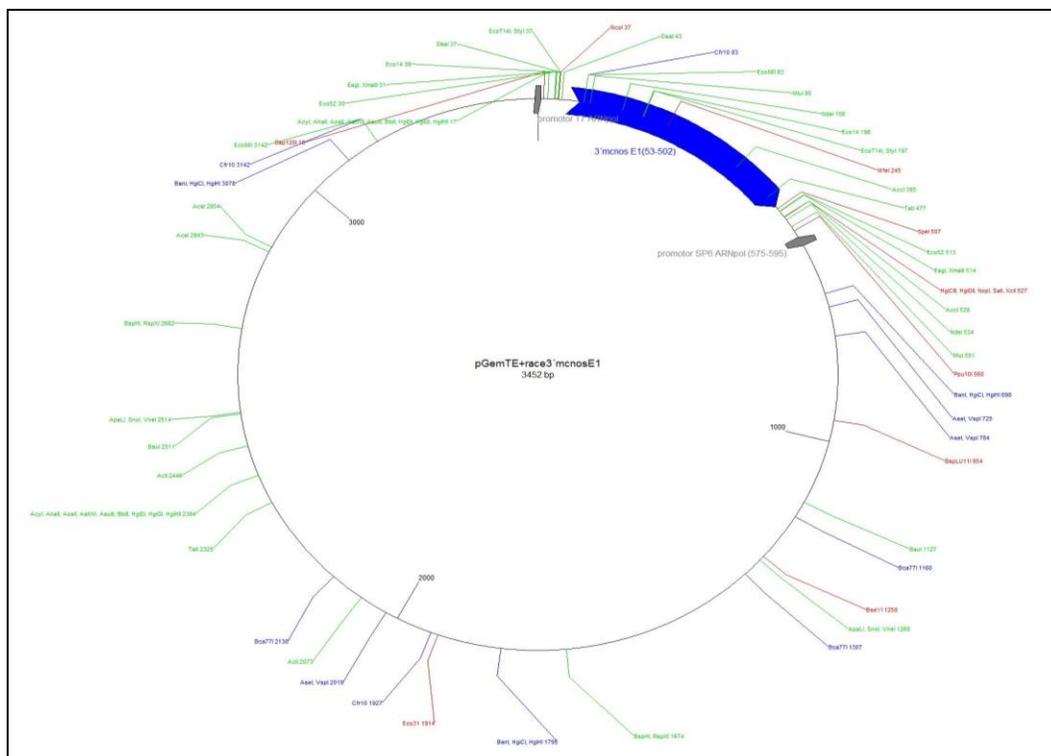


Figura R19a. Mapa de restricción del plásmido E1 conteniendo al extremo 3' del gen *Mcnos*. El inserto se orienta de modo que la sonda *antisense* sería transcrita a partir del promotor SP6, y la *sense* lo sería a partir del promotor T7.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

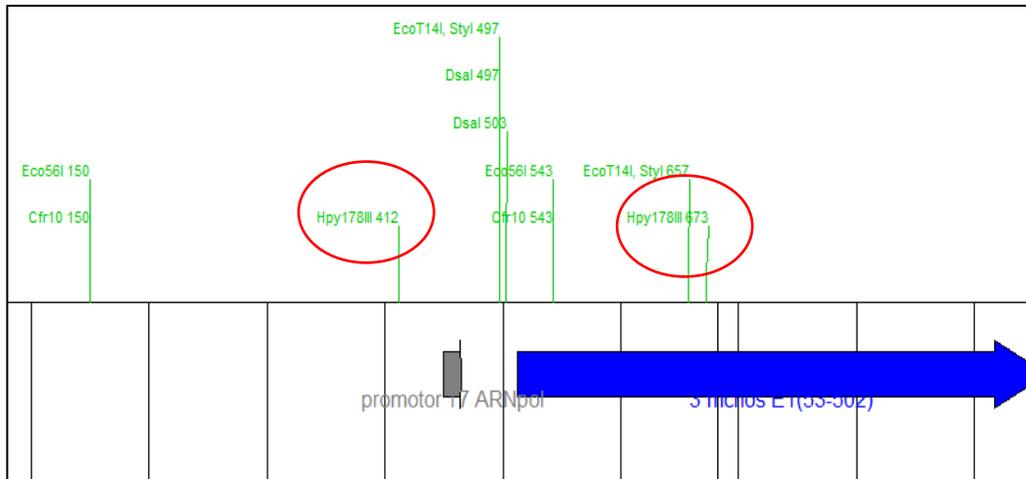


Figura R19b. Región ampliada del mapa de restricción del plásmido E1 conteniendo al extremo 3' del gen *Mcnos*. La región corresponde al sitio donde se ubican el promotor T7 de inicio de la transcripción y al sitio de clonado del inserto. El fragmento lineal con cual se transcribiría la sonda sentido (*sense*) utilizando la ARN polimerasa T7, podría ser generado con la enzima de restricción marcada con un círculo rojo en la figura. Para simplificar el esquema se han quitado algunas enzimas que cortan esta región.

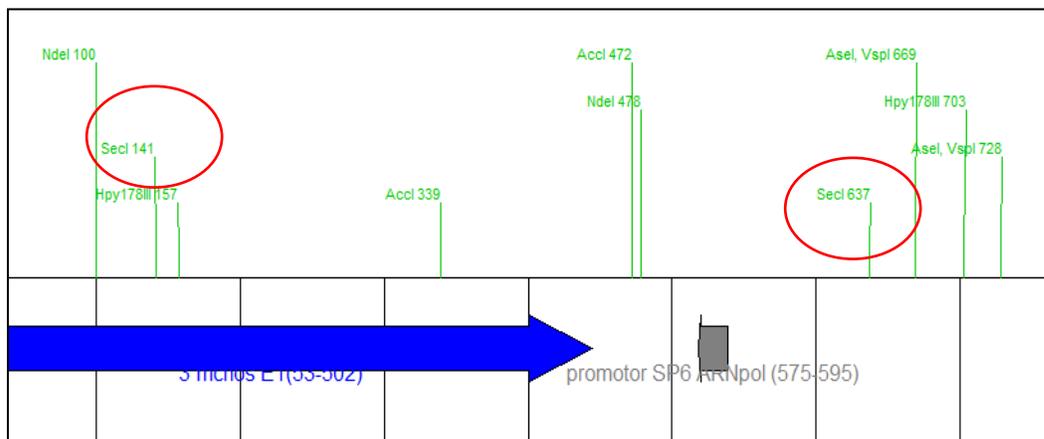


Figura R19b. Región ampliada del mapa de restricción del plásmido E1 conteniendo al extremo 3' del gen *Mcnos*. La región corresponde al sitio donde se ubican el promotor SP6 de inicio de la transcripción y al sitio de clonado del inserto. El fragmento lineal con cual se transcribiría la sonda antisense (*antisense*) utilizando la ARN polimerasa SP6, podría ser generado con la enzima de restricción marcada con una círculo rojo en la figura. Para simplificar el esquema se han quitado algunas enzimas que cortan esta región.

Análisis filogenético

Para el análisis filogenético se realizó un alineamiento de secuencias de la región conservada de *Nanos*, correspondiente al dominio de dedos de zinc de la proteína. Se utilizaron las 8 secuencias de genes tipo *nanos* de los 5 platelmintos ya alineadas al comienzo de este trabajo cuando se buscaba alguna región conservada de genes tipo *nanos*. De las mismas se dedujeron los fragmentos de 114 pb de la región conservada, homólogos a los fragmentos de 114 pb de los genes *Mcnos* y *Fhnos*, caracterizados anteriormente en *M. corti* y *F. hepatica* respectivamente. Luego se procedió a realizar el alineamiento incluyendo las secuencias deducidas de las bases de datos, y las de los fragmentos de los genes *Mcnos* de *M. corti* y *Fhnos* de *F. hepatica* (figura R20a).

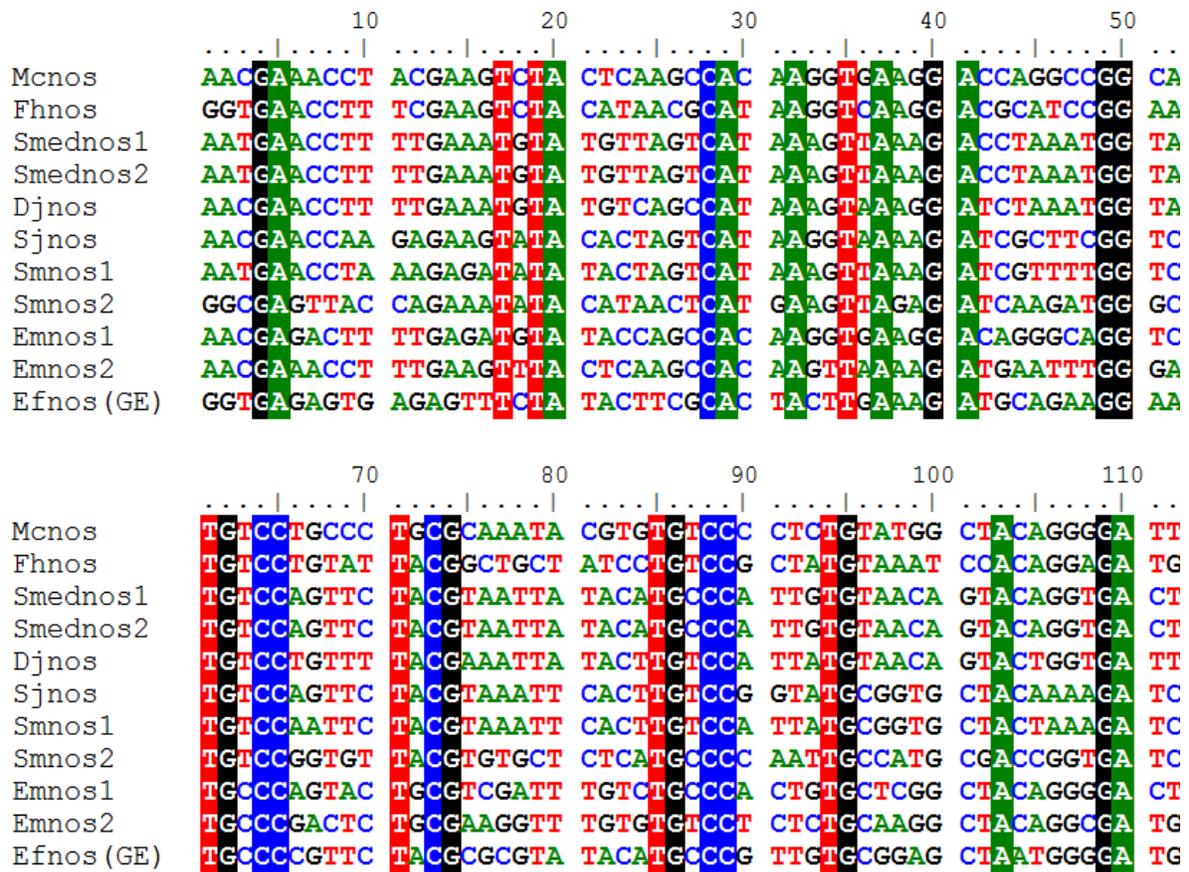


Figura R20a. Alineamiento de secuencias homólogas a los fragmentos de 114 pb de los genes *Mcnos* y *Fhnos*. Se incluyen los fragmentos caracterizados y 8 secuencias deducidas de genes tipo *nanos* de las bases de datos. El grupo externo (GE) utilizado es *Ephydatia fluviatilis* (*Efnos*).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se nombran los genes tipo *nanos* de cada platelminto con las letras de su género y su especie, seguidas por *nos*, excepto aquellos genes tipo *nanos* que ya se han denominado de algún modo específico. Así, *Emnos* corresponde al gen tipo *nanos* de *E. multilocularis*, *Sjnos* corresponde al gen tipo *nanos* de *S. japonicum*, etc. Se realizó la reconstrucción filogenética en base a este alineamiento mediante el método de máxima parsimonia y utilizando el test estadístico de *bootstrap* con 1000 réplicas.

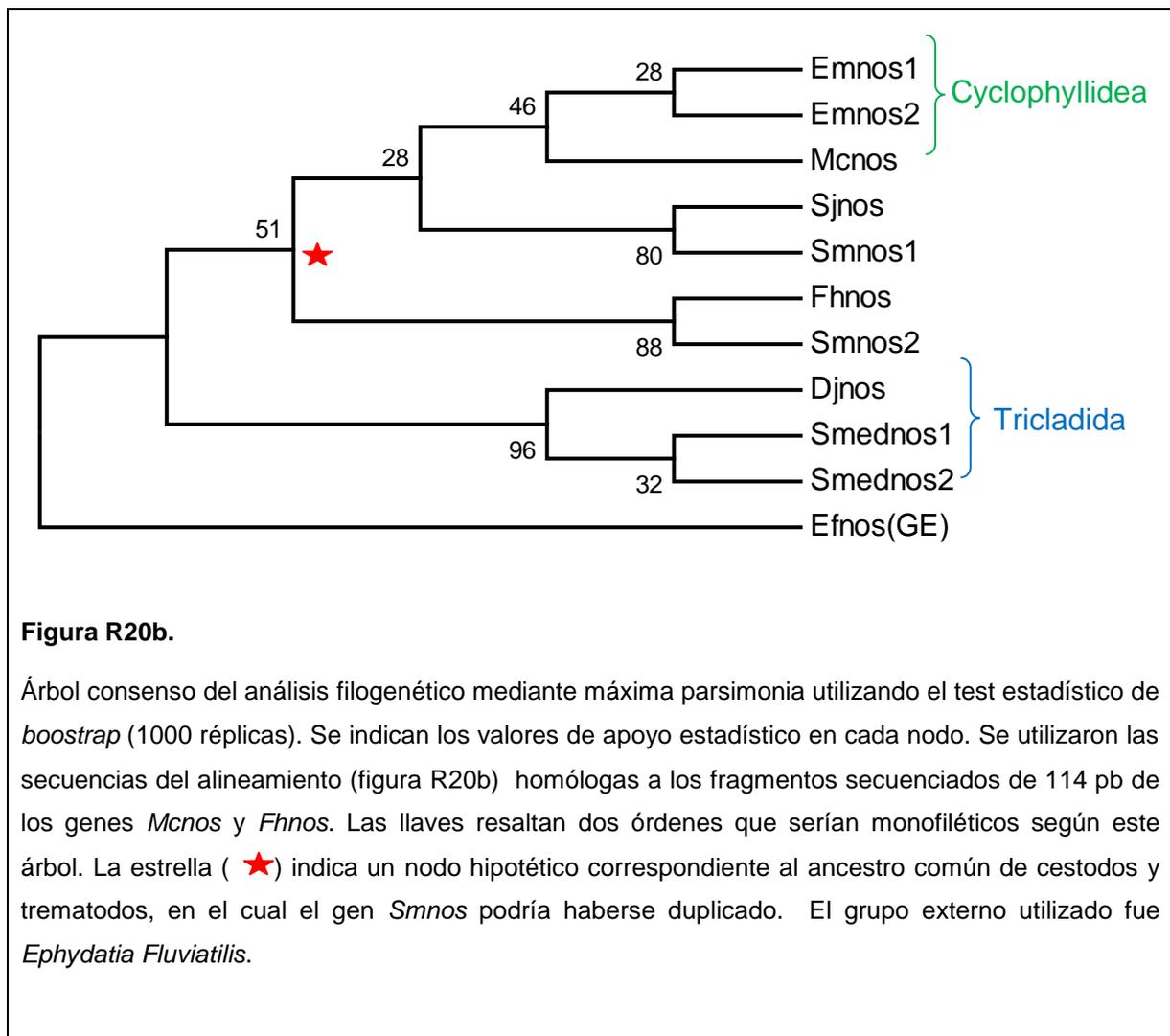


Figura R20b.

Árbol consenso del análisis filogenético mediante máxima parsimonia utilizando el test estadístico de *bootstrap* (1000 réplicas). Se indican los valores de apoyo estadístico en cada nodo. Se utilizaron las secuencias del alineamiento (figura R20b) homólogas a los fragmentos secuenciados de 114 pb de los genes *Mcnos* y *Fhnos*. Las llaves resaltan dos órdenes que serían monofiléticos según este árbol. La estrella (★) indica un nodo hipotético correspondiente al ancestro común de cestodos y trematodos, en el cual el gen *Smnos* podría haberse duplicado. El grupo externo utilizado fue *Ephydatia Fluviatilis*.

La inferencia filogenética confirma a los ciclofilideos como un grupo monofilético con respecto a los otros platelmintos. Aunque el número de especies utilizadas no sea representativo para este fin, lo importante es el aporte que otorga la secuencia del fragmento de *Mcnos* a este respecto. El orden Tricladida también se confirma monofilético y se indicó en la figura como tal, pero esto es de menor importancia para este trabajo, ya que ninguna de las dos nuevas secuencias corresponde a este orden (figura R20b).

Por otro lado, la situación no es tan clara con respecto al origen de los digeneos. Si bien *F. hepatica* se encuentra junto con *S. mansoni* de acuerdo a la posición de éste relativa a uno sus dos genes tipo *nanos*, el gen tipo *nanos* de *S. mansoni* (*Smnos*) podría haberse duplicado antes en el tiempo que el propio origen de esta especie. Si esto fuera así, sería muy tempranamente en la evolución, en el ancestro común a todos cestodos y trematodos. De cualquier modo, el número de especies utilizadas no es suficiente para afirmar tal cuestión, y además, el nodo en donde se ubicaría esta divergencia en este árbol tiene bajo apoyo estadístico (figura R20b).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo de investigación, se ha logrado aislar y caracterizar fragmentos conservados de genes tipo *nanos* en *M. corti* y *F. hepatica*. Además, se ha logrado aislar y caracterizar el extremo 3' de uno de ellos. El cumplimiento de este objetivo ha permitido, por un lado, conocer la existencia de estos genes en estos platelmintos parásitos cuyos genomas no están disponibles. Por otro lado, ha abierto un camino dentro del campo de la investigación de la biología molecular de platelmintos parásitos, ya que este gen se ha mostrado como un marcador molecular de células germinales en otros organismos.

Se ha aislado un solo fragmento característico para cada gen en los estadios analizados en ambos parásitos. Los experimentos de *RACE* 5' y 3' fueron infructuosos excepto para el extremo 3' del gen *Mcnos*, quizás debido a la baja expresión de estos genes. La alta conservación de los fragmentos aislados hace que el uso de éstos como sondas pueda no discriminar la expresión ante la eventualidad de dos genes tipo *nanos*.

El extremo 3' obtenido permitirá construir las sondas adecuadas que hibriden con el extremo 3' del ARN mensajero de *Mcnos*. De esta manera, se podrán realizar ensayos de hibridación *in situ* en diferentes etapas del desarrollo de *M. corti*. De acuerdo a los resultados obtenidos, podrían establecerse posibles patrones de expresión que indiquen la expresión localizada o temporal de este gen. Comparando estos hipotéticos resultados obtenidos en *M. corti*, con los resultados obtenidos en otros organismos podrían sugerirse algunas conclusiones con respecto a las funciones que ejerce la expresión del gen *Mcnos* en el desarrollo y mantenimiento de las células germinales.

Paralelamente, sería posible concluir la caracterización de *Mcnos* y *Fhnos* en *M. corti* y *F. hepatica*, a modo de completar la información restante de tales genes. Además, es posible que exista algún otro gen tipo *nanos* en *M. corti* y/o *F. hepatica*, de acuerdo a la existencia de los mismos en otros platelmintos, y éstos aún no han sido encontrados. Por un lado, la estrategia empleada en este trabajo para la búsqueda de algún otro gen tipo *nanos* podría no ser la adecuada para

este fin, ya que las diferencias existentes entre estos supuestos genes y los ya encontrados, probablemente no se encuentren en el fragmento conservado que ha sido aislado. Por otro lado, estos supuestos genes podrían expresarse en alguna etapa de desarrollo diferente a la cual se encontraba el parásito en el momento de realizar la extracción de ARN. Con lo cual éstos no se encontrarían dentro de la mezcla de los ADN copia, y por lo tanto, no podrían ser amplificados por reacciones de PCR.

Pensamos que se debe continuar en la búsqueda de nuevos blancos moleculares con el fin de desarrollar, en el hospedero, estrategias antiparasitarias eficientes; lo cual es esencial para el control de las enfermedades provocadas por helmintos parásitos y su transmisión a seres humanos o animales. Los marcadores de proliferación son excelentes blancos debido al rol fundamental de éstos en las diferentes etapas y transiciones de los ciclos de vida de los parásitos

ANEXO

(1) Secuencias descargadas de las bases de datos

Las secuencias descargadas del GenBank del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) fueron:

- *Schmidtea mediterranea*, (1) *Schmidtea mediterranea* nanos-like protein mRNA, complete cds 753 bp linear mRNA EF153633.1 GI:139539182
- *Schmidtea mediterranea*, (2) *Schmidtea mediterranea* nanos-like protein mRNA, complete cds 839 bp linear mRNA EF035555.1 GI:134048654
- *Dugesia japonica*, Djnns mRNA for nanos-related protein, complete cds.
- *Ephydatia fluviatilis*, *Ephydatia fluviatilis* mRNA for Nanos-related protein PoNOS, complete cds.
- *Monodelphis domestica*, *Monodelphis domestica* similar to Nanos homolog 2 (LOC100010596), mRNA.
- *Drosophila melanogaster*, *Drosophila melanogaster* nanos (nos)
- *Pan troglodytes*, *Pan troglodytes* nanos homolog 2 (NANOS2), mRNA
- *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma japonicum* SJCHGC03345 protein mRNA, complete cds

Las secuencias extraídas del GeneDB (<http://www.genedb.org/>) fueron:

- *Schistosoma mansoni* , (1) Sm17364, putative Nanos-related protein PoNOS
- *Schistosoma mansoni* , (2) Sm00750 putative CNNOS2

Las secuencias extraídas del Sanger Institute (<http://www.sanger.ac.uk/>) fueron:

- *Echinococcus multilocularis*, Contig_0009653*
- *Echinococcus multilocularis*, Contig_0009811*

*Los contigs de *E. multilocularis* fueron actualizados luego de realizado este trabajo y en abril del 2010 al realizar nuevamente el Blast de la secuencia del gen tipo nanos de *S. Mediterranea* se encontró que a las dos secuencias homólogas en dos contigs con diferente referencia: [pathogen_EMU_contig_4611](#) y [pathogen_EMU_contig_2838](#).

(2) Herramientas informáticas utilizadas

Alineamiento de secuencias utilizando bases de datos:

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>):

- TBLASTN 2.0. Copyright (C) 1996-2004 Washington University, Saint Louis, Missouri USA.
- BLASTX 2.2.23

Visualización de cromatogramas:

- Chromas 2.32 (Technelysium) (<http://www.technelysium.com.au/>).
Copyright © 2009 Technelysium Pty Ltd.

Análisis y alineamiento de secuencias:

- Gene Runner 3.05 (Hastings Software, Inc). Copyright (C) 1994
- CLUSTAL 2.0.12 Multiple Sequence Alignments (<http://www.clustal.org/>)
- BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.9.0
(<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)
Copyright (C) 1997-2007 Tom Hall.

Análisis de oligonucleótidos (cebadores para PCR):

- IDT Sci Tools Olygo Analyzer 3.1
(<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>)
© Copyright 2010 Integrated DNA Technologies, Inc

Mapas de restricción:

- NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>)

Análisis filogenéticos:

- MEGA 4.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)

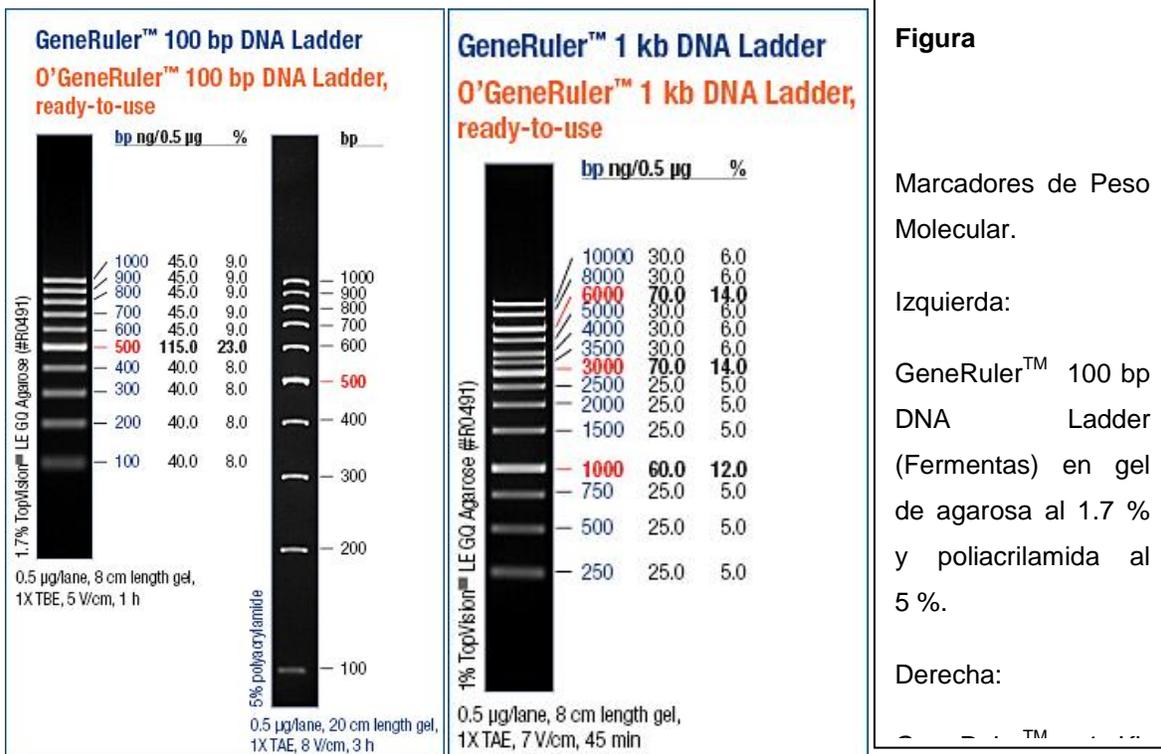
(<http://www.megasoftware.net/>)

Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S

Copyright©1993-2009

(3) Marcadores de Peso Molecular (MPM)

Se utilizan dos tipos de Marcadores de Peso Moleculares (MPMs). Para las moléculas menores de 1000 pares de bases se utiliza el GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (de Fermentas). Para las moléculas mayores de 1000 pares de bases se utiliza el GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder (de Fermentas) (Figura).



(4) Cebadores utilizados para secuenciación

Se utilizan los cebadores T7 o SP6, que hibridan con el vector en sitios adyacentes al sitio de clonado múltiple. Las secuencias de los cebadores utilizados para la secuenciación fueron las siguientes:

SP6 Prom: 5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA 3'

T7 Prom: 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'

(5) Secuencias específicas de reconocimiento de HaeIII y Accl

Para el fragmento del gen *Mcnos* procedente de *M. Corti*, se utilizó la nucleasa de restricción HaeIII (Gibco) que reconoce la secuencia:

5'...GG ▾ CC... 3'

3'...CC ▲ GG... 5'

Para el fragmento del gen *Fhnos* de *F. Hepatica*, se utilizó la nucleasa de restricción Accl (Fermentas) que reconoce la secuencia:

5'...G T ▲ M K A C... 3'

Siendo M = A o C y K = G o T

3'...C A K M ▲ T G... 5'

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arrizabalaga, G. and R. Lehmann (1999). "A selective screen reveals discrete functional domains in *Drosophila* Nanos." Genetics 153(4): 1825-38.
- Asaoka-Taguchi, M., M. Yamada, et al. (1999). "Maternal Pumilio acts together with Nanos in germline development in *Drosophila* embryos." Nat Cell Biol 1(7): 431-7.
- Ax, P. (1996). Multicellular Animals - A New Approach to the Phylogenetic Order in Nature - Vol I
 Berlin, Springer Verlag.
- Baguna, J. and M. Riutort (2004). "The dawn of bilaterian animals: the case of acoelomorph flatworms." Bioessays 26(10): 1046-57.
- Barrett, N. J., J. D. Smyth, et al. (1982). "Spontaneous sexual differentiation of *Mesocostoides corti* tetrathyridia in vitro." Int J Parasitol 12(4): 315-22.
- Bhat, K. M. (1999). "The posterior determinant gene nanos is required for the maintenance of the adult germline stem cells during *Drosophila* oogenesis." Genetics 151(4): 1479-92.
- Bonnomet, A., M. Polette, et al. (2008). "The E-cadherin-repressed hNanos1 gene induces tumor cell invasion by upregulating MT1-MMP expression." Oncogene 27(26): 3692-9.
- Britos, L. (2000). Estudios celulares y moleculares del desarrollo estrobilar de *Mesocostoides corti*. Sección Bioquímica - Biología Molecular. Montevideo, Uruguay, Facultad de Ciencias - UdelaR. Msc.
- Britos, L., L. Dominguez, et al. (2000). "Effect of praziquantel on the strobilar development of *Mesocostoides corti* in vitro." J Helminthol 74(4): 295-9.
- Britos, L., A. I. Lalanne, et al. (2007). "*Mesocostoides corti* (syn. *vogae*, cestoda): characterization of genes encoding cysteine-rich secreted proteins (CRISP)." Exp Parasitol 116(2): 95-102.
- Brusca, R. C. and G. J. Brusca (2003). Invertebrates. Sunderland, Mass., Sinauer Associates.
- Campos, A., M. P. Cummings, et al. (1998). "Phylogenetic relationships of platyhelminthes based on 18S ribosomal gene sequences." Mol Phylogenet Evol 10(1): 1-10.
- Crosbie, P. R., S. A. Nadler, et al. (2000). "Molecular systematics of *Mesocostoides spp* (cestoda: mesocostoididae) from domestic dogs (*Canis familiaris*) and coyotes (*Canis latrans*)." J Parasitol 86(2): 350-7.
- Curtis, D., D. K. Treiber, et al. (1997). "A CCHC metal-binding domain in Nanos is essential for translational regulation." EMBO J 16(4): 834-43.

- Chang, C. C., W. C. Lee, et al. (2006). "Germ-plasm specification and germline development in the parthenogenetic pea aphid *Acyrtosiphon pisum*: Vasa and Nanos as markers." Int J Dev Biol 50(4): 413-21.
- Deshpande, G., G. Calhoun, et al. (1999). "Novel functions of nanos in downregulating mitosis and transcription during the development of the *Drosophila* germline." Cell 99(3): 271-81.
- Eckert, J., T. Von Brand, et al. (1969). "Asexual multiplication of *Mesocestoides corti* (Cestoda) in the intestine of dogs and skunks." J Parasitol 55(2): 241-9.
- Egger, B., D. Steinke, et al. (2009). "To be or not to be a flatworm: the acoel controversy." PLoS One 4(5): e5502.
- Ehlers, U. (1986). "Comments on a phylogenetic system of the Platyhelminthes." Hydrobiologia 132(1): 1-12.
- Espinoza, I., M. Galindo, et al. (2005). "Early post-larval development of the endoparasitic platyhelminth *Mesocestoides corti*: trypsin provokes reversible tegumental damage leading to serum-induced cell proliferation and growth." J Cell Physiol 205(2): 211-7.
- Extavour, C. G., K. Pang, et al. (2005). "vasa and nanos expression patterns in a sea anemone and the evolution of bilaterian germ cell specification mechanisms." Evol Dev 7(3): 201-15.
- Forbes, A. and R. Lehmann (1998). "Nanos and Pumilio have critical roles in the development and function of *Drosophila* germline stem cells." Development 125(4): 679-90.
- Haraguchi, S., M. Tsuda, et al. (2003). "nanos1: a mouse nanos gene expressed in the central nervous system is dispensable for normal development." Mech Dev 120(6): 721-31.
- Hart, J. L. (1968). "Regeneration of tetrathyridia of *Mesocestoides* (Cestoda: Cyclophyllidae) in vivo and in vitro." J Parasitol 54(5): 950-6.
- Hashimoto, H., S. Kawaguchi, et al. (2009). "Purification, crystallization and initial X-ray diffraction study of the zinc-finger domain of zebrafish Nanos." Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 65(Pt 9): 959-61.
- Hayashi, Y., M. Hayashi, et al. (2004). "Nanos suppresses somatic cell fate in *Drosophila* germ line." Proc Natl Acad Sci U S A 101(28): 10338-42.
- Henry, A. (1927). "Tetrathyridium et *Mesocestoides*." Rec Méd Vét 103: 147-52.
- Hess, E. (1980). "Ultrastructural study of the tetrathyridium of *Mesocestoides corti* Hoespli, 1925: tegument and parenchyma." Z Parasitenkd 61(2): 135-59.

- Hewitson, J. P., J. R. Grainger, et al. (2009). "Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity." Mol Biochem Parasitol 167(1): 1-11.
- Jaruzelska, J., M. Kotecki, et al. (2003). "Conservation of a Pumilio-Nanos complex from Drosophila germ plasm to human germ cells." Dev Genes Evol 213(3): 120-6.
- Juliano, C. E., E. Voronina, et al. (2006). "Germ line determinants are not localized early in sea urchin development, but do accumulate in the small micromere lineage." Dev Biol 300(1): 406-15.
- Kawamoto, F., H. Fujioka, et al. (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): 323-31.
- Kobayashi, S., M. Yamada, et al. (1996). "Essential role of the posterior morphogen nanos for germline development in Drosophila." Nature 380(6576): 708-11.
- Koprunner, M., C. Thisse, et al. (2001). "A zebrafish nanos-related gene is essential for the development of primordial germ cells." Genes Dev 15(21): 2877-85.
- Koziol, U. (2006). Estudio sobre genes HD en platelmintos. Sección Bioquímica - Biología Molecular. Montevideo, Uruguay, Facultad de Ciencias, UdelaR. Lic.
- Koziol, U. (2009). Caracterización de células proliferantes en *Mesocestoides corti* (Cestoda), y de genes *pumilio* como posibles marcadores moleculares de las mismas. Facultad de Ciencias. Montevideo, Universidad de la República (UDELAR), Uruguay.
- Koziol, U., M. Marin, et al. (2008). "Pumilio genes from the Platyhelminthes." Dev Genes Evol 218(1): 47-53.
- Lalanne, A. I., L. Britos, et al. (2004). "*Mesocestoides corti*: a LIM-homeobox gene upregulated during strobilar development." Exp Parasitol 108(3-4): 169-75.
- Lehmann, R. and C. Nusslein-Volhard (1991). "The maternal gene nanos has a central role in posterior pattern formation of the Drosophila embryo." Development 112(3): 679-91.
- Littlewood, D. T., A. E. Lockyer, et al. (2006). "The complete mitochondrial genomes of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma spindale* and the evolutionary history of mitochondrial genome changes among parasitic flatworms." Mol Phylogenet Evol 39(2): 452-67.

- Loos-Frank, B. (1991). "One or two intermediate hosts in the life cycle of *Mesocestoides* (Cyclophyllidea, Mesocestoididae)?" Parasitol Res 77(8): 726-8.
- Mas-Coma, M. S., J. G. Esteban, et al. (1999). "Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification." Bull World Health Organ 77(4): 340-6.
- Mas-Coma, S. (2005). "Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas." J Helminthol 79(3): 207-16.
- Minot, C. S. (1883). "Life-History of the Liver-Fluke." Science 1(12): 330-1.
- Nielsen, C. (1995). Animal Evolution: Interrelationships of the Living Phyla. Oxford, Oxford Univ. Press
- Nimeth, K. T., M. Mahlknecht, et al. (2004). "Stem cell dynamics during growth, feeding, and starvation in the basal flatworm *Macrostomum* sp. (Platyhelminthes)." Dev Dyn 230(1): 91-9.
- 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): 1189-96.
- Ogawa, K., C. Kobayashi, et al. (2002). "Planarian fibroblast growth factor receptor homologs expressed in stem cells and cephalic ganglions." Dev Growth Differ 44(3): 191-204.
- Ong, S. J. and J. D. Smyth (1986). "Effects of some culture factors on sexual differentiation of *Mesocestoides corti* grown from tetrathyridia in vitro." Int J Parasitol 16(4): 361-8.
- Orii, H., T. Sakurai, et al. (2005). "Distribution of the stem cells (neoblasts) in the planarian *Dugesia japonica*." Dev Genes Evol 215(3): 143-57.
- Padgett, K. A. and W. M. Boyce (2005). "Ants as first intermediate hosts of *Mesocestoides* on San Miguel Island, USA." J Helminthol 79(1): 67-73.
- Rausch, R. L. (1994). Family Mesocestoididae Fuhrmann, 1907. Keys to the cestode parasites of vertebrates. L. F. Khalil, A. Jones and R. A. Bray. Wallingford, U.K., CAB International: 309-14.
- Reinhard, E. G. (1957). "Landmarks of parasitology. I. The discovery of the life cycle of the liver fluke." Exp Parasitol 6(2): 208-32.
- Rohde, K., C. Hefford, et al. (1993). "Contributions to the phylogeny of Platyhelminthes based on partial sequencing of 18S ribosomal DNA." Int J Parasitol 23(6): 705-24.
- Romero, H. Q. (1990). Parasitología. México, D.F.
- Rossi, L., A. Salvetti, et al. (2006). "DjPiwi-1, a member of the PAZ-Piwi gene family, defines a subpopulation of planarian stem cells." Dev Genes Evol 216(6): 335-46.

- Ruiz-Trillo, I., M. Riutort, et al. (2004). "Mitochondrial genome data support the basal position of Acoelomorpha and the polyphyly of the Platyhelminthes." Mol Phylogenet Evol 33(2): 321-32.
- Ruiz-Trillo, I., M. Riutort, et al. (1999). "Acoel flatworms: earliest extant bilaterian Metazoans, not members of Platyhelminthes." Science 283(5409): 1919-23.
- Salo, E. (2006). "The power of regeneration and the stem-cell kingdom: freshwater planarians (Platyhelminthes)." Bioessays 28(5): 546-59.
- Salveti, A., L. Rossi, et al. (2009). "Adult stem cell plasticity: neoblast repopulation in non-lethally irradiated planarians." Dev Biol 328(2): 305-14.
- Salveti, A., L. Rossi, et al. (2000). "An MCM2-related gene is expressed in proliferating cells of intact and regenerating planarians." Dev Dyn 218(4): 603-14.
- Salveti, A., L. Rossi, et al. (2005). "DjPum, a homologue of Drosophila Pumilio, is essential to planarian stem cell maintenance." Development 132(8): 1863-74.
- Sanchez Alvarado, A. (2003). "The freshwater planarian Schmidtea mediterranea: embryogenesis, stem cells and regeneration." Curr Opin Genet Dev 13(4): 438-44.
- Sanchez Alvarado, A., P. A. Newmark, et al. (2002). "The Schmidtea mediterranea database as a molecular resource for studying platyhelminthes, stem cells and regeneration." Development 129(24): 5659-65.
- Sato, K., N. Shibata, et al. (2006). "Identification and origin of the germline stem cells as revealed by the expression of nanos-related gene in planarians." Dev Growth Differ 48(9): 615-28.
- Shibata, N., L. Rouhana, et al. (2010). "Cellular and molecular dissection of pluripotent adult somatic stem cells in planarians." Dev Growth Differ 52(1): 27-41.
- Shibata, N., Y. Umesono, et al. (1999). "Expression of vasa(vas)-related genes in germline cells and totipotent somatic stem cells of planarians." Dev Biol 206(1): 73-87.
- Soldatova, A. P. (1944). "A contribution to the study of the development cycle in the cestode *Mesocoeloides lineatus* (Goeze, 1782), parasite of carnivorous mammals." Compte Rendu (Doklady) de l'Académie des Sciences de l'URSS 45: 310-12.
- Sonoda, J. and R. P. Wharton (1999). "Recruitment of Nanos to hunchback mRNA by Pumilio." Genes Dev 13(20): 2704-12.

- Specht, D. and M. Voge (1965). "Asexual Multiplication of *Mesocestoides* Tetrathyridia in Laboratory Animals." J Parasitol 51: 268-72.
- Srivastava, H. D. (1939). "A study of the life-history of a common tapeworm, *Mesocestoides lineatus*, of Indian dogs and cats." Indian J Vet Sci Anim Husb 9: 83-90.
- Storer, T. I., R. L. Usinger, et al. (1986). Zoología General. Barcelona, España, Omega S.A.
- Strumane, K., A. Bonnomet, et al. (2006). "E-cadherin regulates human Nanos1, which interacts with p120ctn and induces tumor cell migration and invasion." Cancer Res 66(20): 10007-15.
- Subramaniam, K. and G. Seydoux (1999). "nos-1 and nos-2, two genes related to *Drosophila* nanos, regulate primordial germ cell development and survival in *Caenorhabditis elegans*." Development 126(21): 4861-71.
- Suzuki, A., M. Tsuda, et al. (2007). "Functional redundancy among Nanos proteins and a distinct role of Nanos2 during male germ cell development." Development 134(1): 77-83.
- Thompson, R. C., L. P. Jue Sue, et al. (1982). "In vitro development of the strobilar stage of *Mesocestoides corti*." Int J Parasitol 12(4): 303-14.
- Tsuda, M., Y. Sasaoka, et al. (2003). "Conserved role of nanos proteins in germ cell development." Science 301(5637): 1239-41.
- Tyler, S. and M. Hooge (2004). "Comparative morphology of the body wall of flatworms (Platyhelminthes)." Canadian Journal of Zoology 82: 194-210
- Vignau, M. L. V., Lucila María; J. R. E. Romero, Diego Fernando; , et al. (2005). Parasitología Práctica y

Modelos de Enfermedades

Parasitarias en los

animales domésticos.

- Voge, M. (1967). "Development in vitro of *Mesocestoides* (Cestoda) from oncosphere to young tetrathyridium." J Parasitol 53(1): 78-82.
- Voge, M. and L. S. Coulombe (1966). "Growth and asexual multiplication in vitro of *Mesocestoides* tetrathyridia." Am J Trop Med Hyg 15(6): 902-7.
- Voge, M. and J. S. Seidel (1968). "Continuous growth in vitro of *Mesocestoides* (Cestoda) from oncosphere to fully developed tetrathyridium." J Parasitol 54(2): 269-71.
- Wang, C., L. K. Dickinson, et al. (1994). "Genetics of nanos localization in *Drosophila*." Dev Dyn 199(2): 103-15.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Wang, C. and R. Lehmann (1991). "Nanos is the localized posterior determinant in *Drosophila*." Cell 66(4): 637-47.
- Wang, Y., R. M. Zayas, et al. (2007). "nanos function is essential for development and regeneration of planarian germ cells." Proc Natl Acad Sci U S A 104(14): 5901-6.
- Webster, J. D. (1949). "Fragmentary studies in the life history of the cestode *Mesocestoides latus*." J Parasitol 35(1): 83-90.
- Wharton, R. P., J. Sonoda, et al. (1998). "The Pumilio RNA-binding domain is also a translational regulator." Mol Cell 1(6): 863-72.
- Wilmer, P. G. (1990). Invertebrate relationships. Patterns in animal evolution. Cambridge, Cambridge University Press.
- Witenberg, G. (1934). "Studies on the cestode genus *Mesocestoides*." Arch Zool Ital 20: 487-508.