



Lic. SERRANA ESTRADA SOBA

SECCIÓN BIOQUÍMICA – BIOLOGÍA MOLECULAR

FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

Contribución al conocimiento de la apoptosis en cestodos y su vínculo con la proliferación.

Orientadora: Dra. Estela Castillo

Co-orientadora: Dra. Cora Chalar

Setiembre, 2015

Agradecimientos

A mis padres, a Lu, y a Gon, por todo el apoyo y todas las palabras de ánimo y amor incondicional. Por ayudarme a alcanzar mis metas y por no dejarme rendir, por ayudarme y alentarme a ir por más, por acompañarme siempre en todo. Por hacerme ver lo positivo de todas las cosas, por los abrazos reconfortantes en los momentos de agotamiento, y por festejar conmigo mis logros. Por todo todo, mi más profundo amor y agradecimiento.

A todo el resto de mi familia, mis 4 abuelos, mis varios tíos, a la multitud de primos y a Sonis, a cada uno gracias por su amor, su apoyo, por su interés, y por siempre estar.

A mis amigas Vero y Noe que, sin estar en el mundo de la ciencia, siempre me dieron ánimo y fuerzas, siempre estuvieron para charlas de todo tipo, festejaron conmigo exámenes salvados, avances en los experimentos, avances en la escritura de la tesis, etc., etc.

A mis amigas científicas, Marti, Ro, Nikki y Lu, por las charlas y la comprensión, por entender y compartir las alegrías y tropiezos en los experimentos, por aportar ideas, por sus críticas constructivas. Por esas juntadas donde siempre terminamos hablando de la vida científica, por ser mis compañeras de estudio y salidas en la facultad, por ser mis amigas.

A mis amigos de Libra, por esos almuerzos impagables a pura carcajada, por la fuerza para seguir, por el interés, por las salidas, por estar ahí.

A Sole y a Gus, por el aguante y la complicidad, por las palabras de aliento en todo momento. Por darme ideas para el trabajo y discutir conmigo algún resultado.

A Ana, Manu, Marce, Uriel, Alicia y Fernanda, por las charlas entre experimento y experimento, por sus aportes y discusiones de resultados. Por la ayuda en mi trabajo.

A Estela y a Cora, por guiarme a lo largo de este trabajo. Por sus ideas, sugerencias, críticas, discusiones, oportunidades, ánimo, etc., etc., etc. Por ayudarme a formarme profesionalmente.

A María José Arezo, Verónica Fernández y Jenny Saldaña por estudiar mi trabajo y aceptar ser parte del tribunal.

Índice

Resumen	5
1) Introducción	7
1.1) Filo Platelmintos	7
1.1.a) Clasificación.....	9
1.2) Estudio de neoblastos en Platelmintos - Proliferación.....	10
1.3) Apoptosis en Platelmintos.....	16
1.4) Conversación entre proliferación celular y apoptosis	22
1.5) Introducción al modelo experimental - <i>Mesocestoides corti</i>	24
1.6) Antecedentes del grupo de trabajo	28
2) Objetivos	30
2.1) Objetivo general.....	30
2.2) Objetivos específicos	30
2.3) Hipótesis de trabajo	30
3) Estrategia experimental	31
3.1) Identificación de células apoptóticas en preparados histológicos y en organismos enteros de <i>M. corti</i> a lo largo de su desarrollo	31
3.2) Búsqueda, clonación y estudio de la expresión temporal de los genes Caspasa-3 como marcador de células apoptóticas, y Bcl-2 como marcador de supervivencia celular, a lo largo del desarrollo de <i>M. corti</i>	31
3.3) Identificación de las Caspasas codificadas en el genoma de <i>M. corti</i> , las cuales podrían participar en el proceso apoptótico de las células de dicho organismo	32
4) Materiales y métodos.....	33
4.1) Cultivos de <i>M. corti</i>	33
4.2) Marcación del ADN mediante la técnica TUNEL - Cuantificación.....	33
4.3) Identificación de células apoptóticas mediante Microscopía Electrónica de Transmisión	35
4.4) Clonación del gen Caspasa-3 y Bcl-2 de <i>M. corti</i>	36
4.5) Estructura de genes y análisis filogenético	38
4.6) PCR cuantitativa (qPCR)	39
4.7) Actividad de Caspasa-3 en <i>M. corti</i>	41
4.8) Búsqueda de las Caspasas participantes en la vía metabólica de la apoptosis en <i>M. corti</i>	42
5) Resultados y discusión	43
5.1) Identificación de células apoptóticas en preparados histológicos y en organismos enteros de <i>M. corti</i> a lo largo de su desarrollo	43
5.1.a) Identificación de células apoptóticas en preparados histológicos de <i>M. corti</i>	43
5.1.b) Identificación de células apoptóticas en organismos enteros de <i>M. corti</i> a lo largo de su desarrollo.....	47
5.2) Búsqueda, clonación y estudio de la expresión temporal de los genes Caspasa-3 como marcador de células apoptóticas, y Bcl-2 como marcador de supervivencia celular, a lo largo del desarrollo de <i>M. corti</i>	62

5.2.a) Búsqueda y clonación de los genes Caspasa-3 como marcador de células apoptóticas, y Bcl-2 como marcador de supervivencia celular, a lo largo del desarrollo de <i>M. corti</i>	63
5.2.b) Estudio de la expresión temporal de los genes Caspasa-3 como marcador de células apoptóticas, y Bcl-2 como marcador de supervivencia celular, a lo largo del desarrollo de <i>M. corti</i>	75
5.2.c) Estudio de la expresión temporal de los genes Caspasa-3 como marcador de células apoptóticas, y Bcl-2 como marcador de supervivencia celular, en ejemplares irradiados de <i>M. corti</i>	80
5.2.d) Estudio de la actividad de Caspasa-3 en diferentes estadios de desarrollo de <i>M. corti</i>	83
5.3) Identificación de las Caspasas codificadas en el genoma de <i>M. corti</i> que podrían participar en el proceso apoptótico de las células de dicho organismo	85
6) Conclusiones y perspectivas	93
Apéndice 1.....	95
Soluciones	95
Apéndice 2.....	97
Secuencia de cebadores degenerados para amplificar el gen de Caspasa-3 de <i>M. corti</i>	97
Secuencia de cebadores específicos para amplificar el gen de Caspasa-3 de <i>M. corti</i>	97
Secuencia de cebadores específicos para amplificar el gen de Bcl-2 de <i>M. corti</i>	97
Secuencia de cebadores específicos de <i>M. corti</i> para amplificar un fragmento del gen de Caspasa-3 mediante qPCR.....	98
Secuencia de cebadores específicos de <i>M. corti</i> para amplificar un fragmento del gen de Bcl-2 mediante qPCR.....	98
Apéndice 3.....	99
Figura 31 - Cálculo de eficiencia de cebadores para qPCR	99
Figura 32 – Expresión del gen de referencia (GAPDH)	99
Figura 33 – Variación de la expresión de Bcl-2 y Caspasa-3 respecto a GAPDH .	100
Figura 34 – Variación de la expresión de Bcl-2 y Caspasa-3 en <i>M. corti</i> irradiados respecto a <i>M. corti</i> no irradiados	102
Figura 35. Intensidad de fluorescencia de las muestras correspondientes a <i>M. corti</i> en diferentes estadios de desarrollo, con y sin inhibidor	103
Bibliografía.....	104

Resumen

El ciclo celular y la muerte celular son dos procesos que están muy relacionados entre sí y bajo un riguroso control recíproco, con el fin de mantener la homeostasis. Existe evidencia que muestra que algunas moléculas que regulan la apoptosis, participan en el control del ciclo celular, y viceversa, siendo un ejemplo de ello el gen anti-apoptótico Bcl-2 (marcador molecular de supervivencia). Se ha demostrado en planarias que este gen es requerido para la supervivencia celular en los organismos adultos ya que inhibe la acción de las Caspasas, un grupo de proteínas desencadenantes del proceso apoptótico.

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio han evidenciado que el proceso de proliferación celular en el cestodo *Mesocestoides corti* (*M. corti*) se basa en mecanismos moleculares conservados a lo largo de la evolución. Basándonos en los resultados obtenidos en los trabajos mencionados es que aquí se comienza a explorar la apoptosis y a indagar en la relación que se establece entre dicho proceso y la proliferación celular en *M. corti*.

En una primera instancia se realizó un análisis de micrografías de muestras histológicas de *M. corti* donde se logró identificar y caracterizar morfológicamente sus células apoptóticas. Asimismo, mediante el empleo de una técnica para la detección *in situ* de dichas células, se determinó el patrón témporo-espacial de las mismas, así como su cuantificación a lo largo de diferentes estadios de desarrollo de *M. corti*. Como resultado se pudo establecer que los niveles máximos de apoptosis coinciden con el inicio de la maduración sexual de los organismos.

En la búsqueda de marcadores moleculares para la apoptosis y la supervivencia celular, estudiamos y diseñamos cebadores específicos para amplificar y clonar los genes Caspasa-3 y Bcl-2 de *M. corti*. Mediante PCR cuantitativa, fue posible estudiar la expresión temporal de dichos genes a lo largo del desarrollo de *M. corti*, pudiendo establecer una relación entre ellos. Allí se pudo determinar que los mayores niveles de expresión de Bcl-2 se obtienen en los primeros días de desarrollo, mientras que los de Caspasa-3 se alcanzan en un estadio de desarrollo medio de *M. corti*. Estos resultados coinciden con diversos estudios realizados en planarias.

Finalmente, mediante un estudio bioinformático se pudo determinar que algunas de las Caspasas que participan en la vía apoptótica de diversos

organismos, están codificadas en el genoma de *M. corti*, pudiendo ser partícipes de su vía correspondiente.

Nuestros resultados son la primera contribución a la identificación de células apoptóticas durante el desarrollo estrobilar de un cestodo, y a la caracterización de posibles marcadores moleculares de apoptosis y supervivencia, indicando, como se mencionó previamente, la conservación evolutiva de estos procesos.

1) Introducción

1.1) Filo Platelminetos

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

El tejido conjuntivo, llamado parénquima en los platelmintos, tiene células mesenquimáticas así como cuerpos de células cuyos ápices forman parte de la pared corporal y del intestino, además de células glandulares. Las células mesenquimáticas y la matriz extracelular están especialmente bien desarrolladas en las especies grandes. A partir del mesodermo se originan capas musculares bien desarrolladas, incluyendo fibras longitudinales y circulares, y los órganos reproductivos. Los turbelarios de vida libre están cubiertos por una epidermis blanda y ciliada, mientras que las demás clases parasitarias presentan una cutícula con ventosas y/o ganchos externos para adherirse al huésped. La boca es típicamente la única apertura del tubo digestivo, cuando éste existe. El sistema excretor está compuesto por numerosas células flamígeras conectadas con los protonefridios que culminan en un poro en la región posterior. El sistema reproductor generalmente es hermafrodita pudiendo tener en muchos casos órganos reproductores complejos (Brusca & Brusca 2003, Ruppert *et al.*, 1996). Tienen una tendencia hacia la centralización del sistema nervioso ya que poseen un ganglio cerebral anterior que conecta (generalmente) cordones nerviosos longitudinales enlazados por comisuras transversales (Brusca & Brusca 2003).

Tradicionalmente, y a causa de algunas de las características mencionadas anteriormente, los platelmintos se ubicaban en una posición basal entre los animales bilaterales. Sin embargo, en las últimas décadas, luego de varios estudios moleculares y morfológicos (Ax, 1996; Bagnà y

Riutort, 2004; Littlewood, 2006), esta clasificación ha cambiado y actualmente se distinguen tres grupos dentro de este phylum: Catenulida, Acoelomorpha, y Rhabditophora; siendo cada uno de ellos aceptado como monofilético, pero las relaciones entre sí son dudosas debido a que existen pocas apomorfías morfológicas que unan a estos tres grupos entre sí (Figura 1). Una posible apomorfía es la ausencia de mitosis en células somáticas en todos los estadios post-embrionarios, rasgo basado en evidencia que sugiere que el crecimiento somático es provisto por células “madre” indiferenciadas y totipotenciales (neoblastos) más que por la proliferación de las células ya diferenciadas (Ax, 1996; Egger *et al.*, 2009; Steinke *et al.* 2009; Tyler y Hooge, 2004, Wilmer, 1990).

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

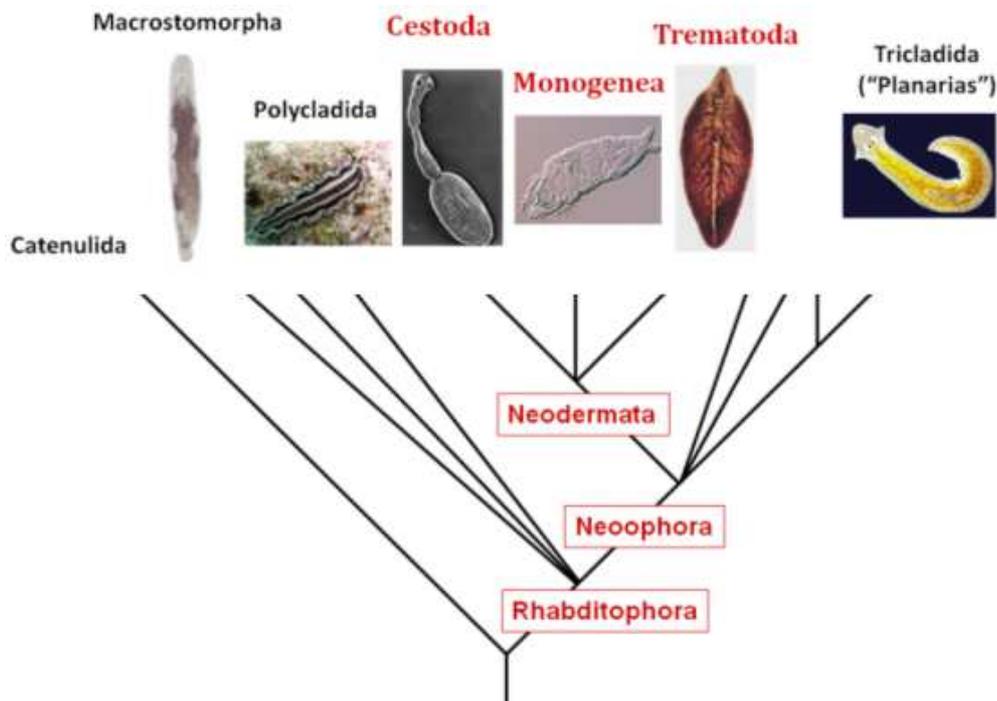


Figura 1. Esquema sobre las relaciones filogenéticas internas de los platelmintos. No se incluye el clado Acoelomorpha, que probablemente no pertenezca al phylum. (Figura tomada de Koziol, U. 2009).

1.1.a) Clasificación

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

- Clase Trematoda. Esta clase incluye dos subclases estrechamente relacionadas: los Digenea y los Aspidogastrea. Están compuestas por organismos parásitos que afectan tanto la salud humana como la animal, causando infecciones graves. La parasitosis más importante de este grupo es esquistosomiasis, producida por *Schistosoma mansoni*. El cuerpo está cubierto por un tegumento, con una o más ventosas como órganos de fijación oral y ventral, carecen de proaptor y opistaptor. La mayoría tiene 2 o 3 hospedadores durante su ciclo de vida, pudiendo actuar el hombre como huésped definitivo albergando a la forma adulta del parásito, localizada generalmente en las venas, hígado, pulmón o tubo digestivo (Berenguer, 2006; Brusca & Brusca 2003; Ruppert *et al.*, 1996). El aparato digestivo es bifurcado y ciego. La mayoría de los parásitos pertenecientes a esta clase son hermafroditas, siendo el aparato reproductor la parte más desarrollada de éstos. La reproducción puede realizarse por autofecundación o por fecundación cruzada entre dos ejemplares (Berenguer, 2006).

- Clase Monogenea. La mayoría son ectoparásitos de vertebrados acuáticos, especialmente de peces pero también de anfibios y reptiles. Como se fijan a la piel de hospedadores de movimientos rápidos, los monogeneos están aplanados dorsoventralmente y presentan un opistaptor que le permite al parásito fijarse fuertemente al hospedador. El ciclo biológico de los monogeneos es diferente al de los digeneos, no hay hospedadores intermediarios y un huevo (que produce una larva ciliada, el oncomiracidio) da lugar a un único adulto, de aquí el nombre de monogenea, que significa “una generación”. Aunque la cabeza carece de ventosa oral, presenta glándulas

adhesivas (órganos cefálicos). La fijación alternativa de órganos cefálicos y opistaptor permite reptar a los monogéneos; otros pueden fijarse permanentemente al hospedador. El cuerpo está cubierto por un tegumento sincitial. El sistema digestivo es similar al de los digéneos. Los monogéneos presentan protonefridios que se abren al exterior por dos poros dorsolaterales, y en algunas especies existe una vejiga urinaria asociada a cada poro. Al contrario de los digéneos que son endoparásitos, estos organismos por ser ectoparásitos tienen metabolismo aerobio (Ruppert *et al.*, 1996).

- Clase Cestoda. Los cestódeos, conocidos generalmente como tenias, constituyen la clase más diferenciada evolutivamente de los platelmintos. Las 3400 especies de cestódeos son endoparásitos. El cuerpo consiste en un órgano de fijación, escólex, y la estróbila, compuesta por una sucesión de segmentos denominados proglótides. El escólex aparece extendido hacia adelante con cuatro lados y dotada con ventosas o garfios para fijarse a la pared del intestino del hospedador. El cuerpo de estos organismos está cubierto por un tegumento sincitial como en los digéneos y monogéneos, pero los cestódeos presentan modificaciones específicas del tegumento asociadas con la absorción de nutrientes por éste, ya que carecen de aparato digestivo. Este tegumento tiene un rol importante en evitar la respuesta inmunitaria del hospedador. En los cestodos predomina el metabolismo anaeróbico, aunque no es el tipo exclusivo. Las capas musculares de los cestodos son las comunes de la musculatura circular y longitudinal, pero además, en el interior del parénquima aparecen fibras de musculatura longitudinal, transversal y dorsoventral. Los sistemas protonefridial y nervioso y la musculatura longitudinal se prolongan a lo largo de toda la cadena de proglótides. En cada proglótide hay un sistema reproductor completo que ocupa su mayor parte. La fecundación cruzada es probablemente la regla cuando hay más de una Tenia en el intestino del hospedador, pero frecuentemente se da la autofecundación, en el mismo estróbilo o incluso en el mismo proglótide (Brusca & Brusca 2003; Ruppert *et al.*, 1996).

1.2) Estudio de neoblastos en Platelmintos - Proliferación

Las Planarias son gusanos planos, de cuerpo blando, y sin segmentación visible. Muchas especies de este tipo son conocidas, entre las que se incluyen especies de agua dulce, agua salada, e incluso hay terrestres. "Planaria" es un término coloquial que hace referencia a los

miembros de vida libre del orden Tricladida, dentro de la Clase Turbellaria. Estos gusanos han atraído la atención de diversos biólogos debido a su gran abundancia de células madre y a su asombrosa capacidad regenerativa (un pequeño fragmento del cuerpo se puede regenerar en el lapso de 1 semana) (Rink, 2013; Sasidharan *et al.*, 2013).

La regeneración celular en Planarias está basada en un tipo celular pluripotente denominado neoblasto. Éstos se encuentran distribuidos en el parénquima de los organismos y conforman aproximadamente el 25 - 30 % del total de células (Baguña *et al.*, 1989). Los neoblastos en Planarias se caracterizan por su morfología, su gran capacidad proliferativa, y por la expresión de marcadores moleculares característicos de este tipo celular (Peter *et al.*, 2004; Reddien, 2013; Reuter y Kreshchenko, 2004).

La historia del descubrimiento de los neoblastos ha sido recientemente revisada (Baguña, 2012). El término "neoblasto" se usó en un primer momento para describir a las células pequeñas y redondas que se encontraban en el mesénquima de las Planarias, a excepción de la zona frente a los fotorreceptores y a la faringe (únicas áreas incapaces de regenerarse) (Reddien y Alvarado, 2004). Mediante el microscopio electrónico de transmisión (MET) fue posible caracterizarlas morfológicamente como células con un diámetro de 5 a 10 micras, con un citoplasma escaso, gran cantidad de ribosomas libres, cuerpos cromatoides prominentes, y un núcleo grande con poca heterocromatina (Baguña y Romero, 1981; Betchaku, 1967; Brøndsted, 1969; Coward, 1974; Heno y Coward, 1975; Hori, 1982; Pedersen, 1959).

Un indicio de que estas células juegan un rol preponderante en la regeneración surgió al observar mediante diversos experimentos que todas las divisiones celulares en planarias ocurrían exclusivamente en células que concordaban con la descripción morfológica detallada anteriormente, lo cual culminó con la afirmación de que "en planarias, los neoblastos son las únicas células que se dividen". En consecuencia, los marcadores de división celular genéricos tales como fosfo-histona H3, incorporación de BrdU, o la expresión de componentes de la maquinaria de la división celular, tales como PCNA son comúnmente utilizados como marcadores de neoblastos (Figura 2) (Morita y Best, 1984; Newmark y Sánchez Alvarado, 2000; Oii *et al.*, 2005; Salvetti *et al.*, 2000).

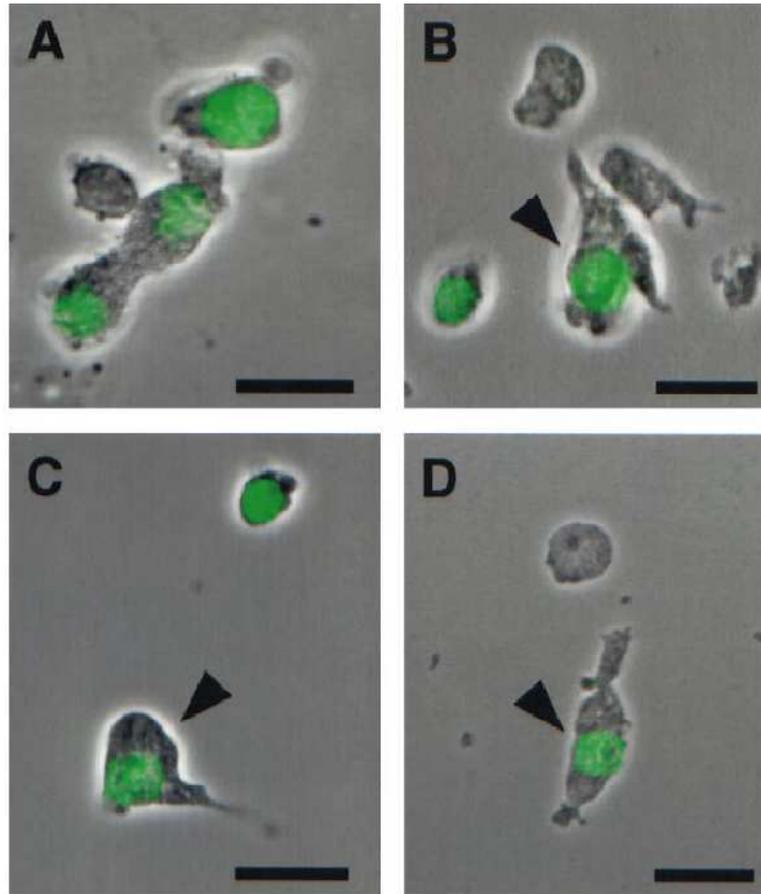


Figura 2. Células de *S. mediterranea* marcadas con BrdU (señal verde) y posteriormente disociadas luego de (A) 17 hrs. y (B a D) 48 hrs. observadas mediante microscopía confocal y contraste de fases. (A) Se puede observar que las únicas células marcadas corresponden a los neoblastos con su típica morfología previamente descrita. (B a D) Se observan células marcadas luego de 48 hrs. donde se puede apreciar el proceso de diferenciación. Las células ya perdieron la morfología típica de neoblastos y ahora aparecen como células con un mayor volumen citoplasmático y protuberancias (flechas). Barra 10 μm (Newmark y Sánchez Alvarado, 2000).

Los avances en técnicas moleculares y celulares han revelado los mecanismos que rigen la función de los neoblastos y la regeneración celular. Como respuesta a una amputación o a una lesión en el tejido del organismo, las Planarias son capaces de cicatrizar la herida mediante la migración de células epiteliales adyacentes, seguido por una rápida migración y proliferación de neoblastos (Baguña, 1976; Eisenhoffer *et al.*, 2008; Saló y Baguña, 1984; Sasidharan *et al.*, 2013; Wenemoser y Reddien, 2010;). El inicio de la regeneración implica una pérdida selectiva de células viejas cerca de la región herida mediante el proceso de apoptosis, seguida de una remodelación de tejidos viejos y nuevos. El resultado es la restauración completa de la morfología normal del animal (Figura 3) (Lobo *et al.*, 2012). Este proceso está controlado por una variedad de genes que codifican

proteínas implicadas en modificaciones de la cromatina, en diferentes vías de señalización, y procesos de regulación post-transcripcionales (Aboobaker *et al.*, 2011; King y Newmark, 2012; Reddien, 2011).

En un experimento realizado por Wagner y sus colegas, el cual consistió en transplantar un neoblasto a un gusano letalmente irradiado (depletado de células madre) se logró como resultado un gusano totalmente sano y del genotipo del gusano donante del neoblasto (Wagner *et al.*, 2011). Existen experimentos que ponen en evidencia este mecanismo a través de la técnica de marcaje con BrdU y posterior irradiación del organismo, por ejemplo en *Macrostomum lignano* (Figura 4). Allí se puede ver de manera clara que la proliferación celular se comienza a recuperar luego de una semana de transcurrida la irradiación del organismo previamente marcado con BrdU y que, luego de 3 semanas post-irradiación, el número de células proliferantes es incluso mayor que el número de células proliferantes de los organismos control (Pfister *et al.*, 2007).

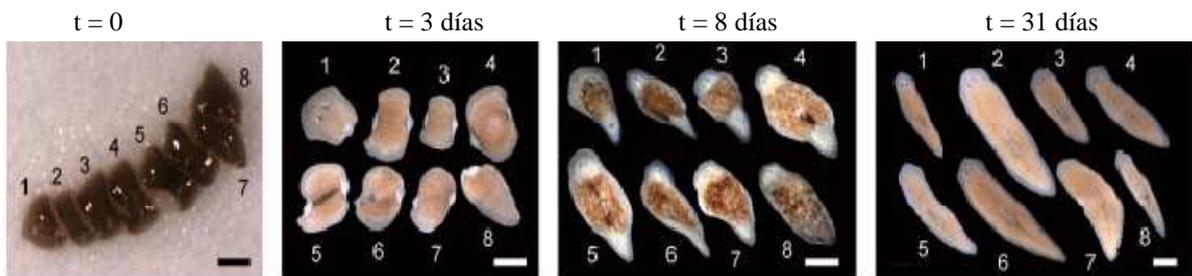


Figura 3. Capacidad regenerativa de *Dugesia ryukyuensis*. En $t = 0$ se puede observar un organismo maduro cortado en 8 fragmentos, mientras que en $t = 3$ y $t = 8$ se puede observar el proceso de remodelación y regeneración de los tejidos. En $t = 31$ se observan 8 organismos con una morfología completamente restaurada que se generaron a partir de los 8 fragmentos iniciales. Barra 1 mm (Nodono *et al.*, 2012).

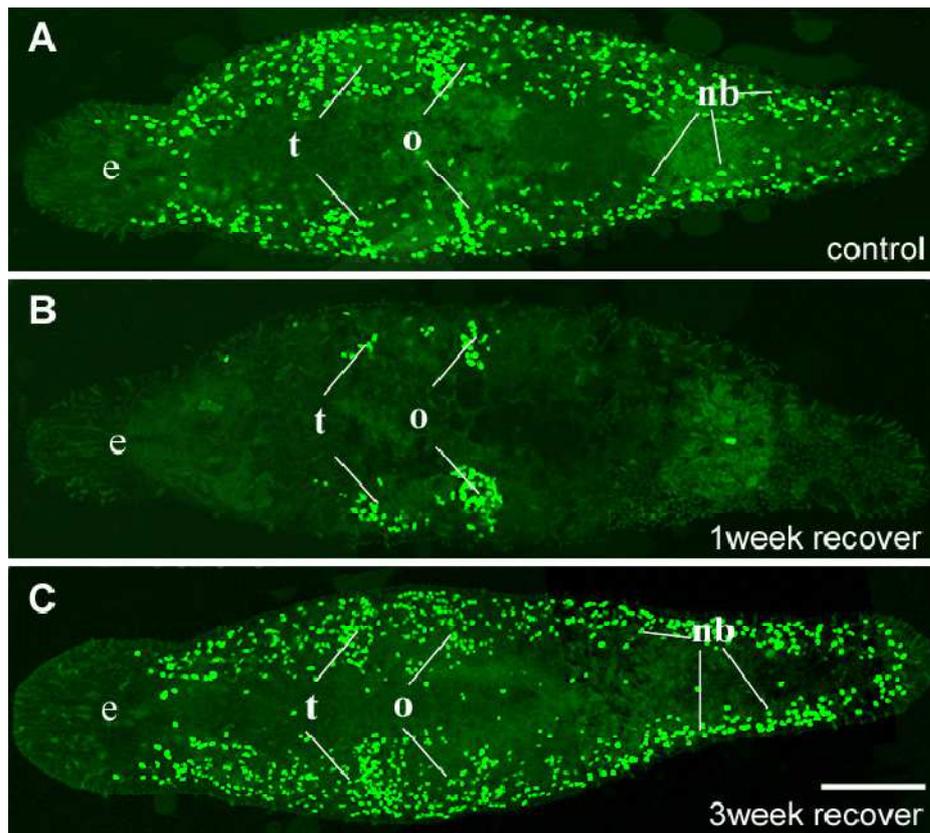


Figura 4. Influencia de la irradiación en la población de neoblastos de *Macrostomum lignano* previamente marcada con BrdU (señal verde). (A) Proyección confocal de un animal control luego de un pulso de 30 minutos de BrdU. Se puede observar la distribución bilateral de las células marcadas y unos clusters en los testes (t) y en los ovarios (o). (B) Proyección confocal del organismo irradiado con 80 Gray (Gy) luego de una semana de recuperación, donde, las células proliferantes se pueden encontrar únicamente en las gónadas. (C) Proyección confocal del organismo luego de 3 semanas de recuperación. La distribución de los neoblastos es similar al organismo control. (e) ojos, (nb) neoblastos. Barra 100 µm (Pfister *et al.*, 2007).

Otra característica inusual de los neoblastos de Planarias es su alta actividad mitótica basal, por la cual todos los tejidos del organismo se están renovando de manera continua y probablemente, carezcan de cualquier tipo de células de larga vida (Rink, 2013). Esta estrategia de renovación celular en Planarias contrasta con la existente en otros modelos animales conocidos, como por ejemplo en mamíferos, donde dependiendo del tejido, pueden coexistir entre las células proliferantes, células madre (con diversos niveles de compromiso para su diferenciación) y elementos celulares ya diferenciados.

Últimamente ha habido un gran desarrollo de técnicas para el estudio de la proliferación celular en neoblastos y los mecanismos de regeneración en platelmintos. Algunos de los avances más espectaculares se han logrado

mediante la utilización de marcadores moleculares para los neoblastos y su progenie mediante hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, el uso de citometría de flujo (Dominguez *et al.*, 2014; Higuchi *et al.*, 2007), la existencia de proyectos genoma y de expressed sequence tags (ESTs) que permiten el aislamiento sencillo de genes y la construcción de microarreglos (Robb *et al.*, 2008; Rossi *et al.*, 2007; Sanchez Alvarado *et al.*, 2002; Zayas *et al.*, 2005), y el desarrollo de técnicas para el silenciamiento mediante interferencia de ARN de los genes involucrados (Newmark *et al.*, 2003; Nimeth *et al.*, 2004; Reddien *et al.*, 2005; Sanchez Alvarado *et al.*, 2002; Sanchez Alvarado y Newmark, 1999).

Mediante el uso de las técnicas mencionadas, se han podido identificar algunos marcadores moleculares entre los cuales se encuentran genes efectores que participan directamente en los procesos de replicación del ADN como la proteína PCNA (Orii *et al.*, 2005), y el gen MCM2 (Salveti *et al.*, 2000), y factores que podrían participar en la regulación de estos procesos como ser el regulador post-transcripcional Pumilio (Rossi *et al.*, 2008; Salvetti *et al.*, 2005). Muchos de estos marcadores moleculares se encuentran compartidos con células madre de otros animales; por ejemplo, se ha postulado que las proteínas de tipo Pumilio tienen un rol original evolutivamente conservado en el mantenimiento del potencial proliferativo en células madre (Wickens *et al.*, 2002). Además se ha demostrado la heterogeneidad de los neoblastos al estudiar marcadores específicos de subpoblaciones, en particular en la línea germinal por el gen nanos (Handberg-Thorsager *et al.*, 2007; Rossi *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007).

Existen evidencias de que el mecanismo de renovación celular en los platelmintos parásitos neodermados es similar al de platelmintos de vida libre (Koziol *et al.*, 2014; Sanchez Alvarado *et al.*, 2003; Nimeth *et al.*, 2004), especialmente en el caso de cestodos, si bien existen algunos estudios en digeneos (Reuter y Kreshchenko, 2004). Los estudios se basan principalmente en el seguimiento mediante autoradiografía de células proliferativas tras su marcado en la fase S con un pulso de 3H-timidina (timidina tritiada). En la forma larvaria de *Diphyllobotrium dendriticum*, por ejemplo, se demostró que las llamadas células germinativas (al parecer equivalentes funcionalmente, y similares morfológicamente, a los neoblastos de turbelarios), distribuidas en el parénquima, proliferan para luego migrar y diferenciarse en células somáticas varias y en células germinales (Gustafsson, 1990). En la década pasada, Galindo *et al.*, (2003) han descrito la existencia de parches de células proliferativas en la capa germinal del quiste hidático (fase larvaria) de *Echinococcus granulosus*, a partir de los cuales se desarrollarían los protoescólex (fase infectiva para el perro); la

proliferación celular disminuiría una vez que comienza la diferenciación de los mismos. En cestodos adultos, por otra parte, se encuentra establecido para algunas especies que la proliferación celular existe principalmente en el parénquima de la región del cuello, donde se van generando los proglótidos (segmentos) de la estróbila (Koziol *et al.*, 2014; Merchant *et al.*, 1997).

1.3) Apoptosis en Platelminetos

Entre los diferentes tipos de muerte celular descritos al día de hoy (Debnath *et al.*, 2005; Formigli *et al.*, 2000; Sperandio *et al.*, 2000), se encuentra la “apoptosis”; un tipo de muerte celular programada cuyo nombre fue usado por primera vez en 1972 (Kerr *et al.*, 1972).

La apoptosis se produce naturalmente como un mecanismo homeostático para mantener la población celular durante el desarrollo y envejecimiento del organismo, aunque también puede ocurrir como mecanismo de defensa cuando las células son dañadas por agentes patógenos o nocivos (estímulos) (Fuchs y Steller, 2011; Jacobson *et al.*, 1997; Nijhawan *et al.*, 2000; Norbury y Hickson, 2001; Opferman y Korsmeyer, 2003; Osborne, 1996; Renehan *et al.*, 2001;). Este proceso también tiene un rol importante en la morfogénesis de muchos órganos o tejidos (Coucovanis y Martin, 1995; Malikova *et al.*, 2007; Mori *et al.*, 1995; Zuzarte-Luis y Hurle, 2005), siendo altamente regulado ya que de lo contrario puede conducir a problemas de desarrollo, enfermedades autoinmunes, neurodegeneración o cáncer (Rink, 2013). También, la apoptosis se produce como parte de la rotación constante de las células; por ejemplo las células de la piel e intestinales (Lippens *et al.*, 2009) tienen un alto índice de recambio y dependen en gran medida de la apoptosis.

La apoptosis está conducida por dos clases de proteasas especializadas, las caspasas iniciadoras y las caspasas efectoras. Estas moléculas son cisteína proteasas que se expresan como zimógenos inactivos y que se procesan a estado activo por proteólisis en un proceso irreversible. Son proteasas específicas de aspartato debido a que tienen cisteína como grupo nucleofílico para la rotura del sustrato y tienen un requerimiento específico por el residuo aspartato (D) de su sustrato al que rompen en los enlaces D-X. Éstas coexisten con sus inhibidores en células normales, lo cual previene una activación accidental que supondría una muerte innecesaria de

estas células, por lo que su activación está estrictamente regulada (Cascales Angosto, 2003; Ventura Gallegos *et al.*, 1999).

Las procaspasas contienen tres dominios: un prodominio N- terminal, una subunidad grande y una subunidad pequeña. En base a la similitud de la secuencia en los dominios de las subunidades, las caspasas se dividen en tres grupos: el grupo inflamatorio que comprende a las caspasas 1, 4, 5, 11, 12, 13 y 14; el grupo iniciador de la apoptosis que incluye las caspasas 2, 8, 9, y 10; y el grupo efector o ejecutor de la apoptosis que incluye a las caspasas 3, 6 y 7 (Cascales Angosto, 2003; Cohen, 1997; Hu *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 2002; Koenig *et al.*, 2001; Nakagawa *et al.*, 2000; Rai *et al.*, 2005, Ventura Gallegos *et al.*, 1999).

Las caspasas iniciadoras se activan luego de un estímulo apoptótico por autoproteólisis mientras que las caspasas efectoras se activan por las caspasas iniciadoras en una cascada amplificadora. La activación de las caspasas es una etapa crucial para desencadenar la apoptosis cualquiera que sea el estímulo ya que son las verdaderas ejecutoras de la apoptosis. La capacidad proteolítica de las caspasas activas conduce a la degradación de una serie de proteínas y tiene los siguientes objetivos (Cascales Angosto, 2003; Ventura Gallegos *et al.*, 1999):

- cortar contactos con células vecinas
- desorganizar el citoesqueleto
- activar las endonucleasas (fragmentación del ADN)
- dismantelar las láminas nucleares (condensación)
- expresar señales de fagocitosis (fosfatidilserina)
- activar proteínas específicas para preparar a la célula para el cese de las funciones metabólicas.

Se considera a la caspasa 3 como la caspasa ejecutora más importante, y se activa por cualquiera de las caspasas iniciadoras. Esta caspasa activa específicamente a la ADNasa llamada CAD que en las células proliferantes está formando un complejo con su inhibidor, ICAD, inhibiendo así su actividad y manteniéndose en el citoplasma. Cuando el estímulo apoptótico activa a las caspasas, la caspasa 3 rompe dicho complejo, de manera que CAD queda liberada pudiendo ingresar al núcleo y actuar como ADNasa con una elevada especificidad degradando rápidamente el ADN cromosómico (Cascales Angosto, 2003; Sakahira *et al.*, 1998). Además de degradar el ADN

de la célula, CAD tiene otros procesos asociados que aceleran la apoptosis, como por ejemplo la inactivación de enzimas implicadas en la reparación y replicación del ADN, y la rotura de proteínas nucleares estructurales (Cascales Angosto, 2003).

Otro de los principales sustratos de la caspasa 3 es la gelsolina, una proteína que colabora en la polimerización de la actina. La caspasa 3 actúa escindiéndola, y a su vez, los fragmentos generados cortan a los filamentos de actina. Como consecuencia de esto se produce la desorganización del citoesqueleto, y la interrupción del transporte intracelular, de la división celular, y de la transducción de señales (Kothakota *et al.*, 1997).

Mediante técnicas de microscopía, como la electrónica de transmisión, es posible revelar claramente los distintos cambios ultraestructurales característicos que se producen durante el proceso de la apoptosis en las células (Hacker, 2000). Durante la fase inicial de la misma se observa una reducción del volumen de la célula, el citoplasma más denso, condensación de la cromatina y su ubicación en la periferia nuclear (generalmente), y una modificación en la distribución de los organelos (Kerr *et al.*, 1972). Posteriormente, se observa la formación de vesículas conteniendo fragmentos de citoplasma, orgánulos y/o fragmentos nucleares, que darán lugar a los llamados cuerpos apoptóticos (Figura 5). Éstos, en una etapa final, serán fagocitados por células macrófagas, células del parénquima, o células neoplásicas, y degradados en los fagolisosomas (Bratton *et al.*, 1997; Fuchs y Steller, 2011; Gao, 1998; González-Estévez y Saló, 2010; Hengartner, 2000; Rink, 2013). Es debido a esta última etapa que este tipo de muerte celular no conlleva la generación de un proceso inflamatorio, ya que las células apoptóticas no liberan sus componentes al exterior y a que las células fagocíticas no producen citocinas antiinflamatorias (Casciola *et al.*, 1996; Kurosaka *et al.*, 2003; Savill y Fadok, 2000).

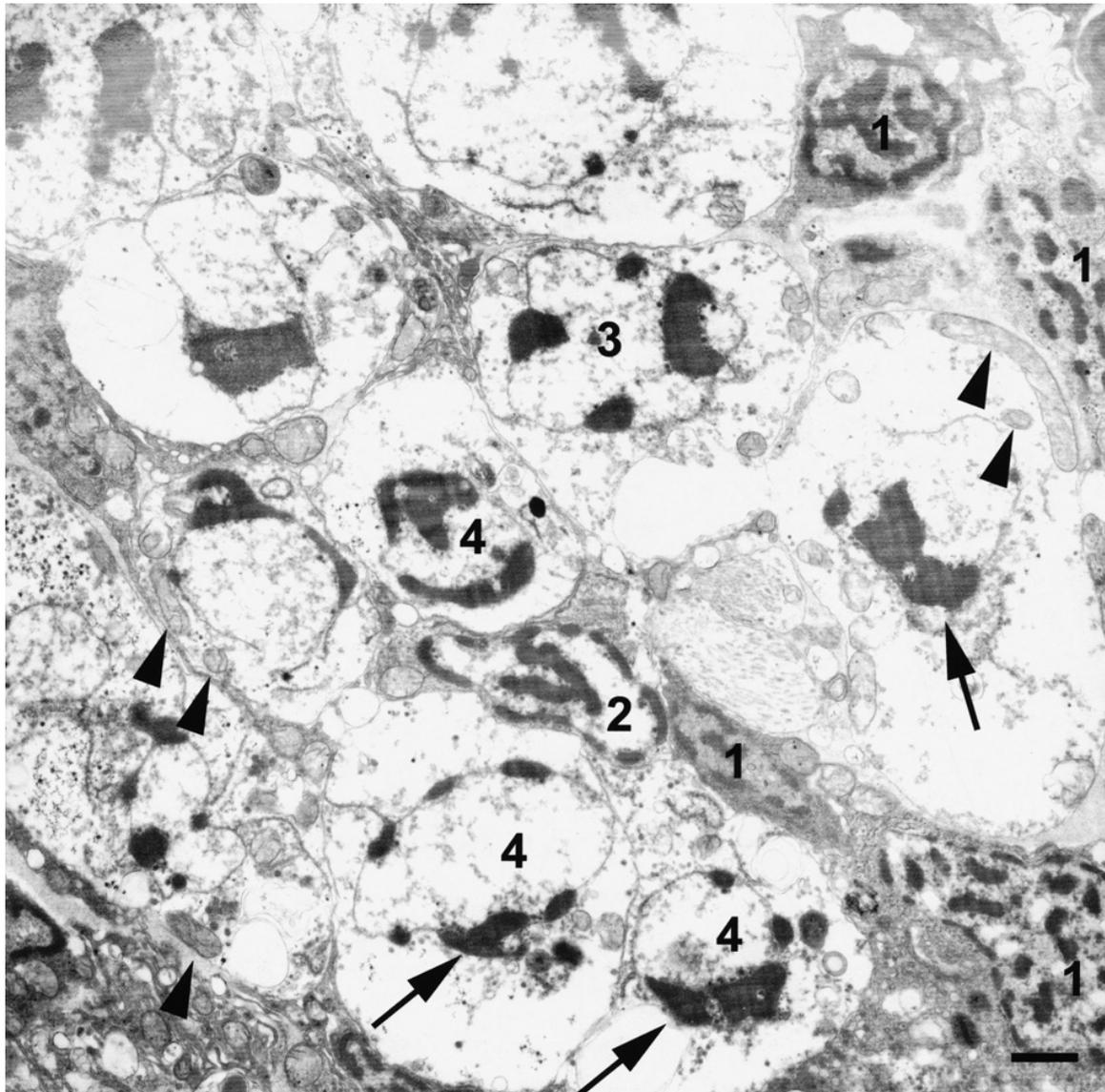


Figura 5. Grupo de células apoptóticas de *M. lignano* en la región del cerebro en diferentes etapas de la apoptosis inducida por tratamiento con colchicina, observadas mediante microscopía electrónica de transmisión. (1) Se observan células con los núcleos intactos, (2) Condensación de la cromatina en la etapa inicial de la apoptosis, (3) células apoptóticas características con acúmulos de cromatina (flechas) en el margen nuclear, y (4) inicios de la fragmentación de las células apoptóticas con material nuclear aislado en el citoplasma. Se puede observar que todas las células apoptóticas mantienen intactas sus mitocondrias (puntas de flecha). Barra 1 μm (Nimeth *et al.*, 2002).

Las dos vías principales por las que puede llevarse a cabo la apoptosis son la vía extrínseca, y la vía intrínseca o mitocondrial. La primera de ellas implica interacciones mediadas por receptores transmembrana, como por ejemplo los de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) que desempeñan un papel fundamental en la transmisión de la señal de la muerte de la superficie celular a las vías de señalización intracelular. Una vez que el

ligando se une al receptor, se activan las caspasas iniciadoras, que a su vez, activan por proteólisis a las caspasas ejecutoras. Esta vía puede ser regulada por diferentes factores, entre ellos el inhibidor de las proteínas apoptóticas (IAP) que afecta a las caspasas iniciadoras y a las ejecutoras (Ashkenazi y Dixit, 1998; Cascales Angosto, 2003; Locksley *et al.*, 2001; Ventura Gallegos *et al.*, 1999).

Por otro lado, la vía intrínseca, involucra una gran variedad de estímulos que no son mediados por receptores. Éstos producen señales intracelulares que actúan directamente sobre los objetivos dentro de la célula. Los estímulos que inician esta vía pueden dar señales negativas o positivas; las primeras implican la ausencia de ciertos factores de crecimiento, hormonas y citoquinas lo que puede conducir a un fallo de la supresión de los programas de muerte, iniciando así la apoptosis. Los estímulos que dan una señal positiva incluyen la radiación, toxinas, hipoxia, hipertermia, infecciones virales, y los radicales libres. Estos estímulos provocan una pérdida del potencial de membrana induciendo de esta forma un cambio en su permeabilidad. Como consecuencia de ello se produce la liberación de proteínas pro-apoptóticas que normalmente se encuentran secuestrados en la mitocondria. Entre estas proteínas mitocondriales se encuentra el citocromo c, que se une a Apaf-1 (factor activador de la proteasa apoptótica) para inducir la activación de la caspasa-9 y con ello la cascada de las caspasas, y smac/diablo que se une y antagoniza al inhibidor de las proteínas apoptóticas (IAP). Si bien son dos vías diferentes, existen pruebas relativamente recientes que indican que las moléculas que actúan en una de las vías, pueden influir en la otra (Cascales Angosto, 2003; Esposti, 2002; Igney y Krammer, 2002; Li *et al.*, 1998; Saelens *et al.*, 2004; Ventura Gallegos *et al.*, 1999; Zha *et al.*, 1996).

Además de las dos vías mencionadas, existe una tercera vía que ocurre mediante la interacción de las células T citotóxicas del sistema inmune con la célula blanco. Una vez que se liberan los gránulos citotóxicos de las primeras células y se produce la exocitosis de su contenido, se libera una batería de proteínas citotóxicas en el citosol de la célula diana que coopera para promover su apoptosis. Entre ellas está la perforina, cuya función es formar poros para facilitar la entrada a la célula de otros constituyentes del gránulo, y una batería de proteasas que en conjunto se denominan granzimas. No está claro cómo contribuyen todas las granzimas a la muerte de la célula diana tras su liberación en el interior del citoplasma celular, pero se sabe que las granzimas A y B desempeñan funciones particularmente importantes en este proceso. La granzima A puede estimular la activación de una nucleasa a través de la proteólisis de su inhibidor, y esto da lugar a la formación de numerosas interrupciones en el ADN monocatenario dentro de

la célula diana. Por otra parte, la granzima B puede procesar directamente y activar varios miembros de la familia caspasa, dejándolas en condiciones de empezar de forma inmediata el proceso apoptótico a través de la proteólisis restringida de centenares de proteínas dentro de la célula diana. Asimismo, puede promover indirectamente la activación de las caspasas, a través de la activación de Bid, una proteína que estimula la permeabilidad de las mitocondrias y la liberación de citocromo c mitocondrial en el citosol; esto último arma un complejo activador de caspasa que se ha denominado “apoptosoma” y que promueve la activación en cadena de varias caspasas. En conjunto, el ingreso del espectro completo de granzimas en las células diana produce la destrucción muy veloz de la célula y es probable que participen varias vías paralelas de apoptosis durante este proceso (Cascales Angosto, 2003; Delves, 2008; Rink, 2013; Ventura Gallegos *et al.*, 1999).

Todas las vías mencionadas convergen en la fase ejecutora del proceso, la cual se inicia por la activación de las caspasa 3 (Figura 6). (Elmore, 2007; Slee *et al.*, 2001).

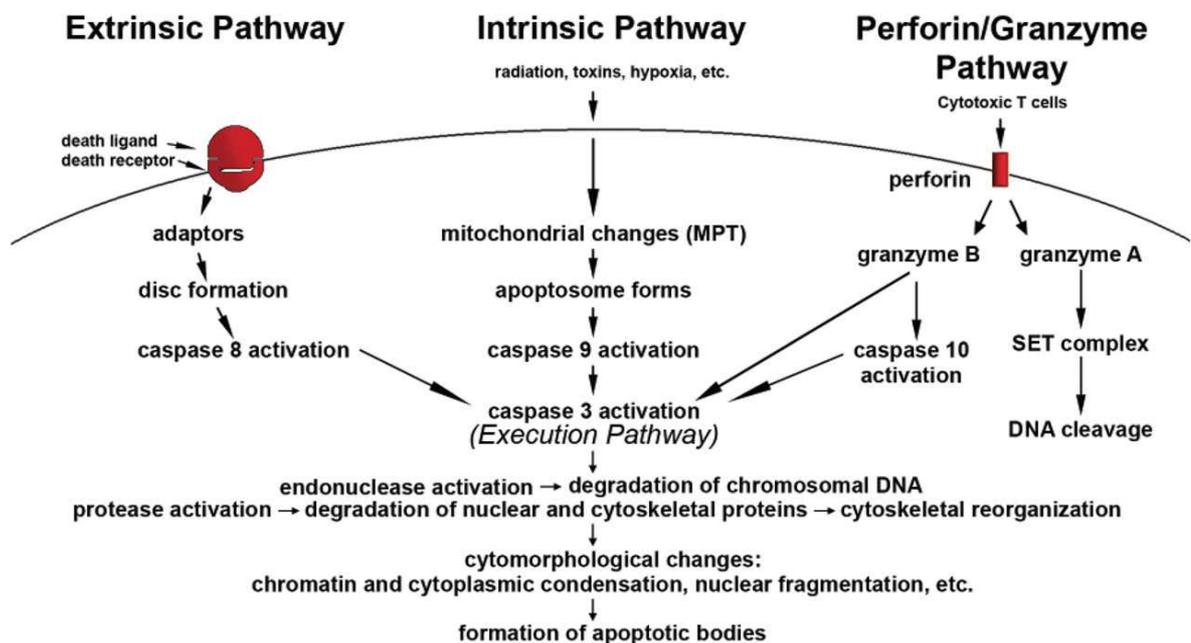


Figura 6. Representación esquemática de los eventos apoptóticos en las 3 vías mencionadas previamente. Cada una de ellas requiere señales de activación específicas para activar la cascada de eventos moleculares y cada vía, a excepción de la vía de la granzima A que funciona de manera independiente de caspasas, activa su propia caspasa iniciadora (8, 9, 10) para luego converger en la Caspasa 3. El resultado de esta reacción son los cambios morfológicos que ocurren en la célula y que se describieron previamente (Elmore, 2007).

En lo que respecta a Platelmintos; estudios genómicos han demostrado que existen similitudes entre las especies de *Schistosoma* y organismos de mayor complejidad en lo que respecta al número de procesos apoptóticos y a las moléculas actuantes en ellos (Peng *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2009)

Además, se han realizado estudios en Planarias que indican que existe una población de neoblastos en constante proliferación aún cuando el organismo ha alcanzado su máximo tamaño (Calow, 1981; Eisenhoffer *et al.*, 2008). Esto implica que la pérdida de células se produciría continuamente para mantener la homeostasis del organismo y que, por lo tanto, la muerte celular en los tejidos adultos sería esencial para contribuir a la renovación de los tejidos, para eliminar selectivamente determinadas células, y tal vez, para responder a posibles tensiones ambientales tales como cambios de temperatura, de pH, etc. (González-Estévez y Saló, 2010).

Existen trabajos que indican que, en condiciones de escasez de alimentos, las planarias sufren un proceso de reducción del tamaño corporal o decrecimiento, siendo este un evento completamente reversible e iniciándose el proceso inverso cuando se restablecen las condiciones. Ciertos resultados han determinado que la disminución de tamaño del organismo es el resultado de un cambio en el número de células y no del tamaño celular (Baguná y Romero, 1981; Oviedo *et al.*, 2003). Sin embargo, a medida que los organismos van madurando, algunas células comienzan a deteriorarse a un ritmo mayor que la proliferación celular, eliminándose a través de la apoptosis. Una teoría que explica este fenómeno es que el estrés oxidativo juega un papel principal en la fisio-patología de la apoptosis inducida por la edad a través de los radicales libres acumulados en el ADN mitocondrial (Harman, 1992; Ozawa, 1995).

1.4) Conversación entre proliferación celular y apoptosis

Como se mencionó previamente, con el fin de mantener la homeostasis del organismo, la progresión del ciclo celular está muy relacionada con la muerte celular programada, y ambos procesos están bajo un riguroso control recíproco (Fujise *et al.*, 2000).

Existen estudios que señalan que el control de la vía intrínseca de la apoptosis mediante la regulación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial se produce a través de una familia de proteínas llamada Bcl-2. Los miembros de esta familia incluyen proteínas pro-apoptóticas como Bcl-10,

Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, Blk, Puma y Noxa, y anti-apoptóticos como Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG, y todas ellas tienen un significado especial ya que pueden determinar si la célula muere por apoptosis o si aborta el proceso (Cascales Angosto, 2003; Cory y Adams, 2002; Ventura Gallegos *et al.*, 1999).

Se cree que el principal mecanismo de acción de la familia de proteínas Bcl-2 es mediante la regulación de la liberación del citocromo c de la mitocondria. Una forma de control es mediante la proteína pro-apoptótica Bad; cuando ésta es fosforilada, es secuestrada en el citosol por otra proteína reguladora llamada 14-3-3, sin embargo, cuando se desfosforila se puede traslocar a la mitocondria y liberar el citocromo c (Zha *et al.*, 1996). Los miembros anti-apoptóticos también participan en este control sobre el citocromo c, ya que Bcl-2 y Bcl-XL en su forma libre pueden inhibir su liberación de la mitocondria a través de un mecanismo que aún no está claro pero se estima que es mediante el control de la activación de las caspasas (Newmeyer *et al.*, 2000). Sin embargo, cuando forman un complejo con Bad, éste neutraliza su efecto protector y de esta manera se promueve la muerte celular (Yang *et al.*, 1995).

El miembro pro-apoptótico Puma también juega un papel importante en la apoptosis. Se ha demostrado *in vitro* que la sobreexpresión de esta proteína está acompañada por un aumento de la expresión y un cambio conformacional de Bax, por la traslocación a la mitocondria, la reducción en el potencial de membrana mitocondrial y la consiguiente liberación del citocromo c (Liu *et al.*, 2003). Por su parte, otros estudios han demostrado que Noxa se puede localizar en la mitocondria e interactuar con miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2, resultando en la activación de la caspasa 9 (Oda *et al.*, 2000).

Recientemente, han aparecido estudios reveladores sobre platelmintos en lo que refiere a este tipo de muerte celular. Pellettieri *et al.*, 2010 en estudios sobre el mecanismo de la apoptosis en estos organismos, han encontrado que el gen antiapoptótico Bcl2 es requerido para la supervivencia celular en los organismos adultos; mientras que, por su parte, Lee *et al.*, 2011 describen para *Schistosoma japonicum* y *S. mansoni* la identificación y caracterización mediante estudios bioinformáticos, bioquímicos y celulares de componentes de la vía de apoptosis regulada por Bcl-2 (Figura 7).

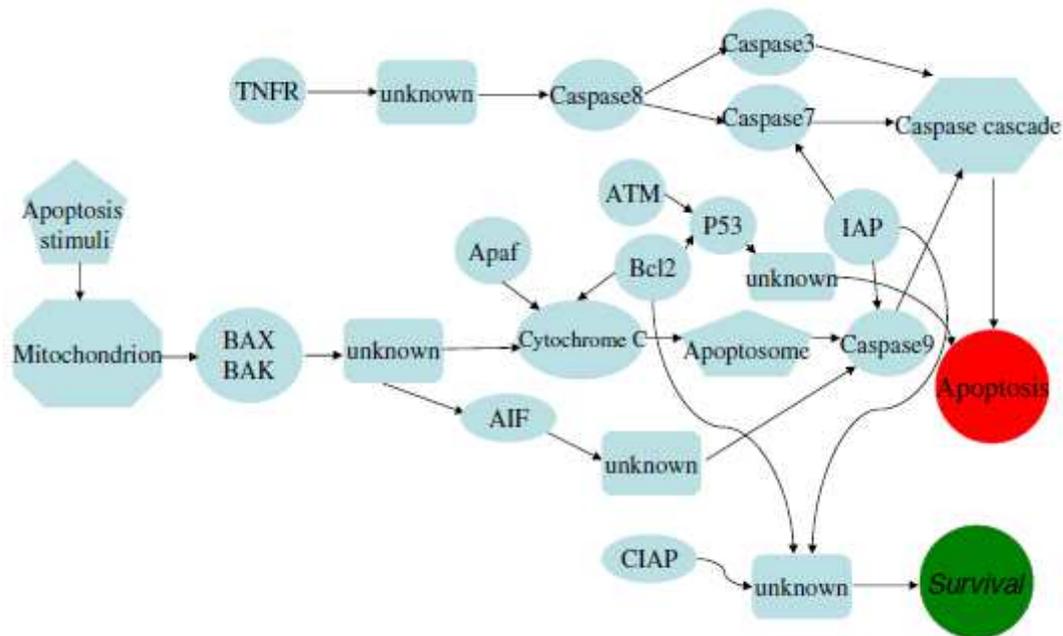


Figura 7. Esquema de la vía de señalización de la apoptosis por la vía extrínseca e intrínseca de *Schistosoma japonicum*. Se puede observar la interacción entre genes pro-apoptóticos y anti-apoptóticos y el resultado de dicha interacción, ya que la célula resolverá vivir o morir por el proceso de apoptosis (Han *et al.*, 2012).

1.5) Introducción al modelo experimental - *Mesocestoides corti*

Los parásitos cestodos representan un grupo de organismos responsable de infecciones principalmente en vertebrados, incluyendo al humano, causante de perjuicios sanitarios y económicos. Por este motivo es que han sido estudiados buscando dilucidar aspectos básicos de su biología, inmunología, y epidemiología. Sin embargo, a pesar del conocimiento acumulado, ninguna de las estrategias diseñadas para erradicarlos ha funcionado por lo que se sostiene que es imprescindible profundizar en el conocimiento de su biología (De Moraes Mourao *et al.*, 2009; Tran *et al.*, 2010; Young *et al.*, 2010).

Mesocestoides corti (*M. corti*) (orden Cyclophyllidea, familia Mesocestoididae) es un platelminto endoparásito perteneciente a la clase Cestoda (Figura 8).



Figura 8. Ejemplar de *M. corti* adulto teñido con TO-PRO-3, donde se puede observar el escólex, cuello, y la región anterior de la estróbila, con segmentos progresivamente más desarrollados. Imagen obtenida mediante microscopía confocal de fluorescencia. (Kozioł, 2009). Barra 1000 μm .

Este organismo tiene un ciclo de vida complejo, el cual no ha sido elucidado completamente (Figura 9), incluyendo dos hospedadores intermedios y uno definitivo (Loos-Frank, 1991; Webster, 1949), lo cual es atípico entre los ciclofilídeos. El adulto es un típico cestodo segmentado, vive en el intestino de varios animales carnívoros incluyendo, aunque raramente, al ser humano (Choi *et al.*, 1967; Fuentes *et al.*, 2003; Kawamoto *et al.*, 1986). Produce huevos con oncósferas (embriones) que infectan al primer hospedador intermediario, el cual es probablemente un artrópodo (Webster, 1949). Este último sería entonces ingerido por el segundo hospedador intermediario; en este caso, una amplia gama de animales son capaces de alojarlo, como por ejemplo pollos (Eom *et al.* 1992), reptiles (Choi *et al.*, 1967; Markoski *et al.*, 2003) y anfibios (Lalanne *et al.*, 2004; Markoski *et al.*, 2003). En la cavidad peritoneal del segundo hospedador se desarrollan como tetratiridios (estado larval), los cuales son similares al adulto en cuanto a que poseen un escólex con cuatro ventosas, pero no se encuentran aún segmentados ni poseen rudimentos del aparato reproductor (Crosbie *et al.*, 2000). En estos hospedadores, *M. corti* es capaz de proliferar asexualmente mediante fisión longitudinal (un proceso único en platelmintos), característica

inusual en las especies de este género (Padgett *et al.*, 2005). Finalmente, al ser ingeridos por el hospedador definitivo, que pueden ser zorros, gatos y perros, los tetratiridios se desarrollan como gusanos segmentados adultos en el intestino de los mismos (Lalanne *et al.*, 2004).

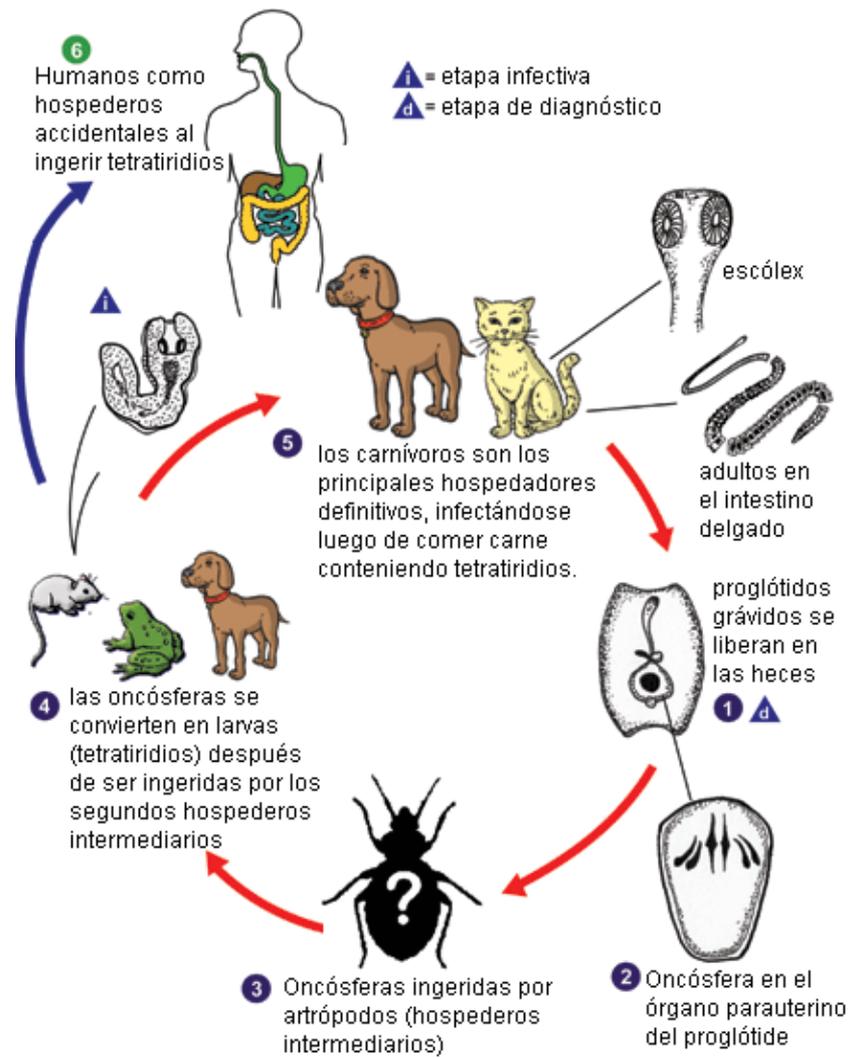


Figura 9. Ciclo de vida de *M. corti*. Figura modificada de http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Mesocestoidiasis_il.htm

En 1965, Specht y Vogue describieron el aislamiento de tetratiridios a partir de la cavidad peritoneal de lagartijas, y demostraron que estos eran capaces de proliferar asexualmente por fisión longitudinal (Figura 10) al ser inyectados en el peritoneo de ratones (de este aislamiento original provienen los linajes de organismos utilizados en laboratorios de todo el mundo). Esto

permite disponer de abundante material biológico en forma constante. Además, es posible llevar a la diferenciación sexual de los tetratiridios *in vivo* mediante infección de perros en condiciones experimentales controladas (y sin los peligros de bioseguridad asociados al desarrollo estrobilar de *Echinococcus spp.*). También es posible inducir *in vitro* tanto la reproducción asexual como la diferenciación al estado adulto sexuado (Figura 11).

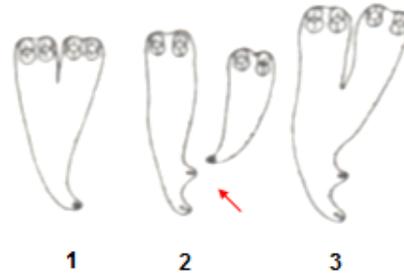


Figura 10. División asexual del tetratiridio por fisión longitudinal. 1) Comienzo de la división tras la duplicación de estructuras anteriores. 2) Separación de dos individuos, dejando un crecimiento lateral con un poro excretor en el progenitor (flecha). 3) Nuevo ciclo de división desde el mismo lado (proliferativo) del individuo progenitor. (Figura modificado de Novak, 1972 – Koziol, 2009).

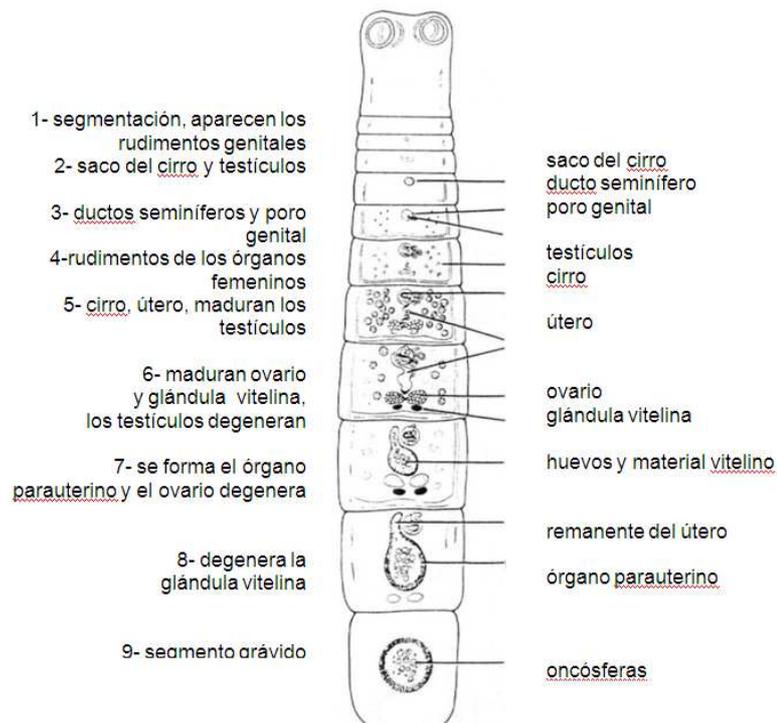


Figura 11. Esquema de la diferenciación sexual de un individuo de *M. corti*. Debido a que se van generando nuevos proglótidos en forma continua desde el cuello (región proliferante posterior al escólex), ocurre un gradiente de diferenciación sexual, siendo los proglótidos más

posteriores los más diferenciados (modificado por Lalanne (2003) de Smyth y McManus, 1989).

Las razones descritas anteriormente sustentan a *M. corti* como un modelo particularmente interesante para el estudio de la biología y desarrollo de cestodos (Barret *et al.*, 1982; Koziol y Castillo, 2011; Lalanne *et al.*, 2004).

1.6) Antecedentes del grupo de trabajo

En el laboratorio donde se llevó a cabo este trabajo de investigación, se logró caracterizar la localización, abundancia y morfología de las células proliferativas de *M. corti* desde su estadio larval hasta el adulto. Además, se esclareció el recorrido que realiza la progenie de las mismas luego de su división (Koziol, 2009).

Mediante la técnica de citometría de flujo y tinción con diversos colorantes, se observó que las células proliferantes tienen características similares a las células germinativas de otros cestodos; núcleo grande con cromatina poco compacta, nucléolo prominente, forma redondeada o con pequeñas extensiones, alta basofilia debido a la abundancia de ARN ribosomal, y no muestran indicios de diferenciación (Dominguez *et al.*, 2014).

A través de diversos estudios se pudo determinar que estas células se encuentran en el parénquima interior de *M. corti*, próximas a la capa muscular interna. En la larva se observa un gradiente antero-posterior, y luego de proliferar, la progenie celular migra al parénquima exterior y tejido subtegumentario donde se diferencian. Durante el desarrollo de *M. corti* se observaron acumulaciones periódicas de células proliferantes en el cuello (región posterior al escólex que genera los segmentos sucesivos) incluyendo una masa central en cada primordio que corresponde al primordio genital que generará los órganos reproductores masculinos y femeninos en cada segmento. Estas características en la formación y proliferación celular en el primordio genital muestran similitudes con otros cestodos estudiados (Douglas, 1961; Wikgren *et al.*, 1971), sugiriendo que estos eventos y mecanismos del desarrollo se encuentran conservados en esta clase.

Debido a que la distribución de células proliferantes que presenta *M. corti* parece ser una característica conservada en el desarrollo estrobilar de las especies de cestodos estudiadas (Bolla y Roberts, 1971; Douglas, 1961;

[Gustafsson, 1990](#)), el mismo representa un modelo ideal para estudiar este tipo de células en cestodos.

Además, logramos clonar y caracterizar espacialmente dos genes tipo pumilio y un homólogo de pcna como marcadores moleculares de células proliferantes. Los genes pumilio de *M. corti* se expresan en varios tejidos a lo largo de todo el desarrollo entre la forma larvaria y adulta, observándose una expresión preferencial de dichos genes en células proliferantes. En cuanto al gen pcna, se pudo clonar el homólogo de *M. corti* y demostrar mediante Western Blot la utilidad del anticuerpo monoclonal PC10 ([Waseem & Lane, 1990](#)) para reconocer la proteína PCNA de este organismo. Dicho anticuerpo se encuentra sumamente caracterizado, y es capaz de reconocer la proteína PCNA en extractos totales en organismos que incluyen algas, levaduras, insectos, otros invertebrados y vertebrados varios. Finalmente, hemos clonado un homólogo del gen nanos de *M. corti*, que en todos los animales estudiados se expresa exclusivamente en la línea germinal ([Extavour, 2007](#); [Handberg-Thorsager & Saló, 2007](#); [Sato, et al., 2006](#); [Wang et al, 2007](#)).

Por otra parte, en el marco del trabajo de tesis de Doctorado (PEDECIBA) “Biología del corpúsculo calcáreo en cestodos: una aproximación bioquímica, molecular y celular” ([Chalar, 2010](#)), con el objetivo de identificar en *E. granulosus* moléculas vinculadas a procesos de muerte celular caracterizadas en otros platelmintos, se realizó un análisis del transcriptoma basado en ESTs del estadio larval del parásito ([Fernández y col, 2002](#)) disponible en el sitio www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/Echinococcus. Esto permitió el reconocimiento del EST EGPSPsl-7f07.p1k cuya secuencia aminoacídica deducida fue comparada con el algoritmo BLAST ([Altschul y col, 1990](#)), con todas las secuencias depositadas en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Se encontró que dicha secuencia proteica es homóloga a la Caspasa-3 de diversos organismos, alcanzando una mayor homología con las de platelmintos.

2) Objetivos

2.1) Objetivo general

Comenzar a indagar en el mecanismo de apoptosis del cestodo *M. corti*, relacionándolo con el proceso molecular de proliferación celular en el mismo. Para lograr este objetivo nos planteamos la identificación de células apoptóticas y la búsqueda y caracterización de marcadores moleculares de dichos procesos.

2.2) Objetivos específicos

1) Identificación de células apoptóticas en preparados histológicos y en organismos enteros de *M. corti* a lo largo de su desarrollo.

2) Búsqueda, clonación y estudio de la expresión temporal de los genes Caspasa-3 como marcador de células apoptóticas, y Bcl-2 como marcador de supervivencia celular, a lo largo del desarrollo de *M. corti*.

3) Identificación de las Caspasas codificadas en el genoma de *M. corti*, las cuales podrían participar en el proceso apoptótico de las células de dicho organismo.

2.3) Hipótesis de trabajo

La hipótesis de trabajo que sustenta los objetivos planteados es que los mecanismos moleculares de apoptosis y proliferación son conservados, por lo que en *M. corti*, tal como se ha comprobado en planarias, el gen antiapoptótico Bcl-2 es requerido para la supervivencia celular inhibiendo la acción de las Caspasas (Cotter, 2009; Danial y Korsmeyer, 2004; Pellettieri *et al.*, 2010; Pellettieri y Sánchez Alvarado, 2007); de esta manera se establece la comunicación entre los procesos de proliferación y apoptosis.

3) Estrategia experimental

3.1) Identificación de células apoptóticas en preparados histológicos y en organismos enteros de *M. corti* a lo largo de su desarrollo

Para llevar a cabo la identificación de dichas células se realizó una búsqueda bibliográfica en diferentes bases de datos con el fin de conocer la morfología y ubicación de células apoptóticas en otros organismos parásitos. Una vez realizado esto, se procedió a analizar micrografías de preparaciones histológicas de *M. corti* obtenidas mediante el microscopio electrónico por la Lic. Fernanda Dominguez y así identificar las células apoptóticas propias de este cestodo.

Con el fin de ubicar dichas células espacialmente dentro del organismo en estudio, se propuso realizar la marcación del ADN mediante la técnica TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP Nick End Labeling) en *M. corti* enteros, y su posterior observación en el microscopio de epifluorescencia del Instituto Pasteur de Montevideo. Además, mediante la misma técnica de marcado y por medio del programa de análisis de imágenes ImageJ, se planteó la posibilidad de cuantificar las células apoptóticas a lo largo de diferentes estadios de desarrollo de *M. corti*.

3.2) Búsqueda, clonación y estudio de la expresión temporal de los genes Caspasa-3 como marcador de células apoptóticas, y Bcl-2 como marcador de supervivencia celular, a lo largo del desarrollo de *M. corti*

Para cumplir el objetivo mencionado, en primer lugar se estudiaron las secuencias disponibles de Caspasa-3 y Bcl-2 en diferentes bases de datos y se realizó un alineamiento con las mismas. En base a las regiones conservadas encontradas se diseñó un juego de cebadores para amplificar dichos genes y luego clonarlos en un vector plasmídico. En una segunda instancia, una vez finalizado esto, se transformaron células competentes con los productos de ligación y posteriormente se realizaron minipreparaciones.

Los plásmidos recombinantes fueron secuenciados y analizados mediante la herramienta Blast de la base de datos NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con el fin de encontrar secuencias homólogas en el GenBank. A partir de ello se pudo confirmar que los fragmentos amplificados y clonados se correspondían a los genes de Caspasa-3 y Bcl-2.

Una vez clonados los genes de interés, fue posible estudiar su expresión temporal en *M. corti* mediante la realización de PCR cuantitativo. Para ello se diseñó un nuevo juego de cebadores específicos para amplificar los genes Caspasa-3 y Bcl-2 de este organismo, posibilitando así el estudio de su expresión en los estadios larval, adulto y en etapas intermedias del desarrollo de *M. corti*.

Además, como parte de este objetivo se planteó la posibilidad de estudiar la actividad de la Caspasa-3 en diferentes estadios de desarrollo de *M. corti*, utilizando para ello el kit “EnzChek® Caspase-3 Assay Kit #1, Z-DEVD-AMC substrate” (Número de catálogo: E13183).

3.3) Identificación de las Caspasas codificadas en el genoma de *M. corti*, las cuales podrían participar en el proceso apoptótico de las células de dicho organismo

Para llevar a cabo este objetivo se realizó un análisis bioinformático en la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) con el fin de reconocer cuáles son las Caspasas que participan en el proceso apoptótico. Luego, en base a este análisis y en una segunda instancia, se buscaron las mismas en el genoma de *M. corti* mediante el uso de la herramienta Blast.

4) Materiales y métodos

4.1) Cultivos de *M. corti*

Los tetratiridios de *M. corti* fueron cedidos gentilmente por la Dra. Jenny Saldaña y colaboradores (Facultad de Química, Universidad de la República), quienes los mantienen a través de sucesivos pasajes intraperitoneales en ratones.

Para el cultivo *in vitro* de *M. corti*, se sacrificaron ratones por dislocación cervical y luego se extrajeron tetratiridios en condiciones estériles mediante lavado de la cavidad peritoneal con solución de Hanks (Apéndice 1). Los tetratiridios recogidos fueron lavados cinco veces con solución de Hanks estéril, y cultivados en placas con medio RPMI 1640 modificado (RPMI 1640-mod; Apéndice 1) con 10 % de suero fetal bovino (SFB provisto por Laboratorios Santa Elena, Uruguay, o GIBCO, Invitrogen, Estados Unidos) en una estufa incubadora a 37°C en una atmósfera con 5% CO₂. En ocasiones los tetratiridios fueron almacenados en solución de Hanks a 4°C por hasta 2 semanas antes de iniciar su cultivo.

Se cultivaron aproximadamente 400 a 500 µl de tetratiridios cada 15 ml de medio, y cada 48 horas se cambió dos tercios del mismo. Para inducir el desarrollo estrobilar de los tetratiridios, tras dos días de cultivo, se añadió al medio Taurocolato de Sodio (TC; Sigma-Aldrich; 1 mg/ml concentración final), manteniendo su concentración durante los sucesivos cambios de medio. En estas condiciones, el desarrollo estrobilar es aparente a los 5 a 7 días de cultivo tras la inducción con TC.

4.2) Marcación del ADN mediante la técnica TUNEL - Cuantificación

Se trabajó con organismos enteros de *M. corti* cultivados durante 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 13 días bajo las condiciones ya descritas previamente.

Para la identificación y caracterización de las células apoptóticas de *M. corti* mediante la técnica TUNEL, se usó el kit "APO-BrdU™ TUNEL Assay Kit,

with Alexa Fluor® 488 Anti-BrdU” (número de catálogo: A23210) de *Life Technologies*, adaptando su protocolo según se indica a continuación:

- Cultivar los *M. corti* durante el tiempo establecido y realizar 3 lavados en PBS 1X (Apéndice 1).
- Destegumentar mediante lavado con leve agitación en H₂O_{dd} durante 3 horas y posteriormente realizar 2 lavados en PBS 1X durante 5 minutos.
- Fijar durante 1 hora en PFA 4% (Apéndice 1), realizar 3 lavados en PBS 1X durante 15 minutos cada uno y posteriormente almacenar a -20°C en etanol 70% hasta el momento de usar
- Retirar el etanol 70%
- Lavar dos veces en 1 ml de buffer de lavado durante 5 minutos con agitación suave. Retirar el buffer de lavado
- Agregar 250 µl de solución de marcado (al grupo control, en su lugar se le agregó PBS 1X)
- Incubar 2 horas a 37°C con agitación suave
- Agregar 1 ml de buffer de resuspensión y agitar suavemente durante 5 minutos. Repetir
- Retirar el buffer de resuspensión
- Agregar 250 µl de solución de anticuerpo e incubar 45 minutos a temperatura ambiente (RT). Proteger de la luz
- Retirar la solución de anticuerpo
- Lavar dos veces en 1 ml de PBS 1X durante 5 minutos. Retirar el PBS
- Agregar 500 µl de yoduro de propidio e incubar por 30 minutos a RT
- Lavar dos veces con 1 ml de PBS 1X por 10 minutos
- Montar en portaobjetos y proteger de la luz

Las muestras fueron analizadas por medio del microscopio de epifluorescencia invertido OLYMPUS IX81 del Instituto Pasteur de Montevideo y procesadas mediante el programa de acceso libre ImageJ.

Una vez procesadas las imágenes se procedió a cuantificar las células apoptóticas de *M. corti* mediante el ImageJ. Para ello se transformaron las imágenes al formato 8-bits, y una vez realizado esto se les aplicó un umbral (o threshold) con el fin de seleccionar únicamente aquellas células de la imagen cuyo nivel de gris cae dentro del intervalo deseado de valores de intensidad, en una escala de gris predeterminada. Para este trabajo, en una escala de grises del 0 al 255, el umbral se estableció a 69.

4.3) Identificación de células apoptóticas mediante Microscopía Electrónica de Transmisión

Se realizó una búsqueda bibliográfica en diferentes bases de datos con el fin de conocer la morfología y ubicación de células apoptóticas en otros organismos parásitos (ver introducción).

Una vez realizado esto, se procedió a analizar micrográficas de preparados histológicos de *M. corti* obtenidas mediante el microscopio electrónico de transmisión del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable por la Lic. Fernanda Domínguez con el fin de encontrar células apoptóticas. Las muestras estudiadas mediante microscopía electrónica se prepararon de acuerdo al siguiente protocolo:

- Fijación
 - Fijar los tetratridios de 4 días de cultivo en glutaraldehído 2,5% en PHEM ([Apéndice 1](#)), por 1 hora a 4°C con agitación
 - Realizar 6 lavados en PHEM por 10 minutos cada uno
- Pretratamiento
 - Descalcificar con PHEM suplementado con EDTA 0,5 M, *o.n.* a 4°C, con agitación (ajustar pH con hidróxido de potasio hasta 7,2 - 7,6)
 - Realizar 3 lavados en PHEM por 5 minutos cada uno
- Postfijación
 - Teñir con tetróxido de osmio al 1% en PHEM, 1 hora a T.A. con agitación
 - Realizar 6 lavados en PHEM de 5 minutos cada uno
- Deshidratación
 - Realizar pasajes sucesivos en solución de alcohol al 25%, 50%, 70% y 95% durante 15 minutos cada vez, con agitación
 - Realizar 2 lavados de 30 minutos cada uno en alcohol 100% (alcohol con arcilla)
- Infiltración
 - Sumergir la muestra en una mezcla de 1 volumen de resina: 3 volúmenes de alcohol (sin agua) durante 60 minutos
 - Sumergir la muestra en una mezcla de 2 volúmenes de resina: 2 volúmenes de alcohol (sin agua) durante 60 minutos
 - Sumergir la muestra en una mezcla de 3 volúmenes de resina: 1 volúmenes de alcohol (sin agua) durante 60min

- Dejar en Resina pura toda la noche a T.A., en campana de extracción
- Bloques y polimerización
 - Cambiar a resina fresca y dejar 1 hora con agitación a T.A.
 - Incluir en bloques
 - Dejar polimerizar un día a 40°C
 - Dejar polimerizar un día 60°C

4.4) Clonación del gen Caspasa-3 y Bcl-2 de *M. corti*

Se realizó una búsqueda de las secuencias aminoacídicas de las proteínas codificadas por los genes Caspasa-3 y Bcl-2 de diferentes organismos a través de las bases de datos GeneDB (<http://www.genedb.org/Homepage>) y GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Una vez realizado esto, se procedió a analizar sus correspondientes secuencias nucleotídicas y mediante el uso de la herramienta Blastn, se encontraron las regiones conservadas de ambos genes.

En base a esto y en una primera instancia, se diseñó un juego de cebadores degenerados (Apéndice 2) para amplificar la secuencia conservada de Caspasa-3 de *M. corti* mediante una reacción de PCR. Posteriormente, el Instituto Sanger (<http://www.sanger.ac.uk/>) publicó la secuencia nucleotídica del genoma de *M. corti*, por lo que en una segunda instancia, y a través del análisis de las secuencias conservadas de los genes Caspasa-3 y Bcl-2 de diferentes organismos, se pudo diseñar un juego de cebadores específicos (Apéndice 2) de *M. corti* para cada gen en estudio y así realizar los diferentes ensayos. Los siguientes análisis hacen referencia a los resultados obtenidos con dichos juegos de cebadores.

Todas las PCR de este trabajo fueron realizadas en un termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400. La mezcla básica para esta reacción fue la siguiente: 2,5 µl (conc. final 1x) de buffer 10x con MgCl₂, 0,5 µl (conc. final 0,2 mM) de dNTPs (10 mM), 2 µl (conc. final 0,4 mM) de c/u de los cebadores (10 µM) (en diferentes combinaciones), 0,2 µl de enzima Long Range PCR, 2 µl de ADN genómico, y por último c.s.p. 25 µl de H₂O doblemente desionizada (H₂O_{dd}).

Para la amplificación de Caspasa-3 empleando el juego de cebadores degenerados, las condiciones de ciclado fueron las siguientes:

desnaturalización inicial a 94°C de 3 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, apareamiento a 55,3°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 30 segundos, seguidos por una extensión final a 72°C por 5 minutos.

Por otra parte, las condiciones de ciclado para la amplificación de Caspasa-3 empleando los cebadores específicos consistieron en una desnaturalización inicial de 3 minutos a 94°C, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, apareamiento a 58°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 30 segundos, seguidos por una extensión final a 72°C por 5 minutos. Mientras que para Bcl-2 el programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 3 minutos a 94°C, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, apareamiento a 52°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 30 segundos, seguidos por una extensión final a 72°C por 5 minutos. El resultado de las reacciones de PCR se visualizaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% (Apéndice 1).

Luego de obtener el fragmento amplificado de cada gen, se procedió a su purificación y posterior ligación. La purificación se llevó a cabo mediante el kit "Isolate PCR and Gel Kit" de Bioline (n° de catálogo: Bio-52029) y la ligación de los productos de PCR en el vector pGEM-T-Easy se realizó bajo las siguientes condiciones: 1 µl de vector pGEM-T-Easy (50 ng) (Promega), 3 µl de ADN, 5 µl de buffer de ligación 10X y 1 µl de T4 DNA ligasa (5 U/µl) (Fermentas). Esta mezcla de ligación se incubó durante 1 hora a 22°C y luego se dejó toda la noche (o.n.) a 4°C.

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

Después del proceso de transformación, las células fueron plaqueadas e incubadas o.n. a 37°C en medio LB sólido conteniendo ampicilina (Sigma-Aldrich) (100 µg/ml). Los clones crecidos fueron inoculados en 3 ml de medio LB – ampicilina (100 µg/ml) y cultivados durante 12 horas a 37°C con agitación constante. A partir de estos cultivos se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico mediante el protocolo de lisis alcalina (según Sambrook *et*

al., 1989) o en algunos casos utilizando el kit Ron's Plasmid Mini Kit (Bioron), siguiendo las instrucciones del fabricante y el resultado se visualizó por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Las muestras de ADN plasmídico obtenidas de las minipreparaciones fueron enviadas al servicio secuenciador del Instituto Pasteur de Montevideo para corroborar si el inserto correspondía al fragmento de interés, tanto de Caspasa-3 como de Bcl-2. Las secuencias plasmídicas fueron analizadas y corregidas manualmente utilizando el programa Gene Runner 3,05 (Hastings Software, Inc.). Con el objetivo de encontrar secuencias homólogas a las estudiadas, éstas fueron utilizadas como secuencias problema en la búsqueda dentro de la base de datos del GenBank, utilizando el programa Blastn.

4.5) Estructura de genes y análisis filogenético

Mediante las secuencias del transcriptoma de tetratridios de *M. corti* brindadas por la Msc. Alicia Costábile, fue posible estudiar la estructura de los genes Caspasa-3 y Bcl-2 y ubicar los dominios conservados en los mismos. Este estudio se llevó a cabo mediante el software de acceso libre Artemis.

Por otra parte, el estudio filogenético de las proteínas Caspasa-3 y Bcl-2 de *M. corti* fue realizado mediante el método de máxima verosimilitud basado en el modelo Le Gascuel, por medio del software Mega 6 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, y Kumar 2013), con los parámetros predeterminados del mismo. El soporte de las ramas en el árbol se obtuvo mediante la prueba estadística "bootstrap" (Felsenstein, 1985) con 100 réplicas. Los valores superiores a 50% de soporte fueron considerados como válidos.

Para dicho estudio se emplearon las secuencias proteicas codificadas por los genes en cuestión, las cuales fueron obtenidas por la Msc. Alicia Costábile en el marco de sus estudios de doctorado (resultados no publicados).

4.6) PCR cuantitativa (qPCR)

Parte del material que se utilizó para realizar este experimento fue preparado por la MSc. Alicia Costábile. Se trabajó con organismos cultivados durante 0, 2, 4, 6, 8, 10, 13 y 16 días; a continuación se detalla la metodología que se siguió para preparar las muestras y realizar el ensayo de qPCR con los grupos mencionados.

Para obtener los organismos en distintos estadios del desarrollo se prepararon cultivos en paralelo para procesar todos los organismos en simultáneo y así minimizar la variabilidad que surgiría por procesarlos en distintos momentos. En algunos casos, el cultivo se realizó por triplicado a partir de organismos obtenidos del mismo ratón (réplicas técnicas del cultivo), los organismos cultivados de esta manera fueron analizados bajo lupa y separados manualmente para obtener una población con un nivel de desarrollo homogéneo en cada punto. Es necesaria esta etapa ya que los cultivos de *M. corti* no son sincrónicos, obteniéndose en el mismo punto de la curva de desarrollo organismos en diferentes estadios. A otro grupo de *M. corti* no se les realizó esta etapa y se procesó a todos los organismos presentes en el cultivo.

A un grupo de los *M. corti* cultivados se los irradió en el Instituto Nacional de Transplante del Hospital de Clínicas Dr. Manuel Quintela; a éstos se los dividió en 5 grupos con el fin de aplicarles diferentes dosis de radiación; 0 Gy, 100 Gy, 200 Gy, 300 Gy, 500 Gy, 1000 Gy. A su vez, a cada uno de estos grupos se los subdividió en 2; a un grupo se los cultivó durante 1 día luego del proceso de irradiación, y al segundo grupo durante 5 días.

Una vez finalizado el tiempo de cultivo, se procedió a hacer la extracción de ARN. Para ello, los organismos obtenidos se lavaron 3 veces en PBS 1X y se congelaron a -80°C en Trizol (Sigma – Aldrich). Se utilizó 1 ml de Trizol por cada 100 µl de parásitos. Se descongelaron en hielo y se disgregaron con un homogeneizador en tubos tipo eppendorf. Se incubaron 5 minutos a RT y luego se agregó 0,2 volúmenes de cloroformo mezclando con vórtex e incubando a RT 5 minutos. Se centrifugó 15 minutos a 12000g a 4°C y se recuperó la fase acuosa en un nuevo tubo. Luego se precipitó el ARN con 0,5 volúmenes de isopropanol incubando 5 minutos a RT y centrifugando durante 15 minutos a 12000g a 4°C. Se lavó el precipitado con 1 ml de etanol 70% y se secó brevemente al aire bajo lámpara. Se resuspendió en 30 µl de H₂O fresca y se incubó 10 minutos a 65°C para resuspender. Se almacenó a -80°C hasta el momento de su uso.

A continuación se eliminó el ADN remanente por digestión con DNAsa RQ1 (Promega). Se realizó en una reacción de 100 µl de volumen final conteniendo 15 µl de ARN (aproximadamente 5 µg), buffer 1X, 10 unidades de enzima y 100 unidades de inhibidor de RNAsas (Ribolock RNase inhibitor (Fermentas) o RNase Inhibitor (Applied Biosystems)). Se incubó 60 minutos a 37°C y a continuación a 65°C durante 10 minutos con Stop Solution. Se agregó un volumen de cloroformo y se recuperó la fase acuosa. Se precipitó el ARN durante toda la noche a -80°C con 0,1 volúmenes de LiCl 4M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Se centrifugó 20 minutos a 12000g a 4°C y se lavó con 1 ml de etanol 70%. Se resuspendió en 15 µl de H₂O fresca y se almacenó a -80°C hasta el momento de su uso. Se verificó la integridad del ARN mediante análisis en gel de agarosa y se cuantificó mediante espectrofotometría a 260 nm o por el uso de Qubit® Fluorometric Quantitation del Instituto Pasteur de Montevideo. Todo el material utilizado fue tratado con DEPC 0,1% y se utilizaron reactivos libres de RNAsas.

Una vez realizado esto, se retrotranscribió el ARN con la enzima SuperScript™ III (Invitrogen) utilizando 500 ng de ARN total, 250 ng de cebadores al azar (Invitrogen), 0,5 mM de cada dNTP, 40 unidades de inhibidor de RNAsas (Ribolock RNase Inhibitor – Fermentas), y 200 unidades de enzima en un volumen final de 20 µl. Se incubó la reacción durante 60 minutos a 50°C y a continuación 15 minutos a 70°C para inactivar la enzima.

Para las reacciones de PCR se diseñó un juego de cebadores específicos de *M. corti* para amplificar un fragmento de las secuencias de Caspasa-3 y Bcl-2 incluido en las secuencias previamente amplificadas.

Para las reacciones se utilizó el termociclador en tiempo real Rotor Gene™ 6000 (Corbett Life Science) de la Facultad de Química - UdelaR. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 10 µl utilizando el kit QuantiTect SYBR Green PCR (QIAGEN) con 0,9 µM de cada cebador y una dilución 1/4 de cada ADN copia (ADNc) generado.

Previo a la realización de las qPCR de cada gen, se llevó a cabo el estudio de la eficiencia de las muestras de ADNc de *M. corti* a usar en los ensayos; para ello se realizaron las siguientes diluciones: 1:20, 1:200, 1:2000, 1:20000 y 1:200000.

El programa de ciclado en todas las reacciones consistió en una desnaturalización inicial de 15 minutos a 95°C, 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 60°C por 1 minuto y una curva de melting desde 60°C a 95°C para determinar la especificidad de la reacción. El análisis de los datos se realizó utilizando el programa Rotor Gene™ 6000 Series Software (Corbett

Life Science) y el cálculo de los niveles de cambio en la expresión se realizó mediante el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

4.7) Actividad de Caspasa-3 en *M. corti*

Se trabajó con *M. corti* en diferentes estadios de desarrollo, cultivados durante 0, 2, 4, 6, 8, 10, 13, y 16 días. El estudio se realizó mediante el kit “EnzChek® Caspase-3 Assay Kit #1, Z-DEVD-AMC substrate” (Número de catálogo: E13183) de Life Technologies, con algunas modificaciones en el protocolo original.

A los organismos cultivados se los dividió en dos grupos para tratar a uno de ellos con un inhibidor de la apoptosis propio del kit. A continuación se detalla el procedimiento que se siguió para realizar el estudio:

- Cultivar los *M. corti* durante el tiempo establecido y luego realizar 3 lavados en PBS 1X
- Homogeneizar los organismos y cuantificar por medio del Qubit® Fluorometric Quantitation la concentración proteica de una alícuota del preparado para partir de muestras con similares características
- Agregar 250 μ l de solución de Buffer de Lisis, pipetear e incubar durante 30 en hielo
- Centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos
- Transferir 50 μ l del sobrenadante a una placa ELISA y 50 μ l de solución de Buffer de Lisis como control de fluorescencia del sustrato
- Agregar 1 μ l de la solución de inhibidor Ac-DEVD-CHO a la mitad de las muestras a estudiar. Proteger de la luz e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Mantener el resto de las muestras en hielo
- Añadir 50 μ l de la solución de sustrato a cada muestra, cubrir la placa e incubar a RT durante 30 minutos
- Medir la intensidad de fluorescencia en un fluorímetro

En paralelo con este ensayo, se realizó una curva estándar de 7-Amino-4-metilcoumarino (AMC) con el fin de determinar los moles producidos de producto en la reacción de la caspasa-3. Para ello se prepararon las siguientes diluciones en serie: 0, 1:4, 1:2 y 1:1.

La extracción de proteínas para su cuantificación se llevó a cabo mediante el agregado de Buffer de Lisis (Apéndice 1) y la posterior disgregación de los organismos con un homogeneizador en tubos tipo eppendorf. Luego se centrifugó las muestras durante 10 minutos a 15000xg a 4°C y se recuperó el sobrenadante.

4.8) Búsqueda de las Caspasas participantes en la vía metabólica de la apoptosis en *M. corti*

A través de los mapas de las vías metabólicas de apoptosis correspondientes a diversos organismos que se encuentran almacenados en la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; <http://www.genome.jp/kegg>), fue posible determinar cuáles eran las Caspasas que están involucradas en dicho proceso.

Una vez concluida la identificación de dichas Caspasas, se procedió a su búsqueda en el genoma de *M. corti* publicado en la página web del Instituto Sanger. Para ello se hizo una investigación previa de dichas proteínas en el genoma de varios platelmintos haciendo uso de las bases de datos GeneDB y GenBank. A partir de ellas se realizó un Blastn para cada una usando como secuencia molde el genoma de *M. corti*.

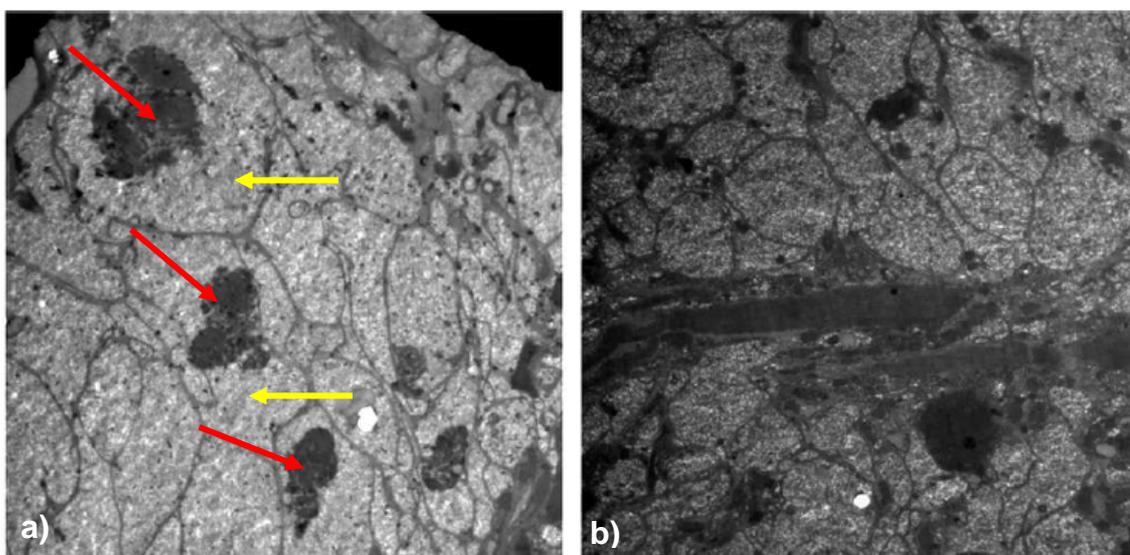
5) Resultados y discusión

5.1) Identificación de células apoptóticas en preparados histológicos y en organismos enteros de *M. corti* a lo largo de su desarrollo

A continuación se despliegan y analizan en 2 segmentos los resultados obtenidos con el fin de cumplir el objetivo mencionado.

5.1.a) Identificación de células apoptóticas en preparados histológicos de *M. corti*

A través de la búsqueda bibliográfica mencionada previamente, se pudo determinar los diferentes estadios por los que pasa una célula apoptótica y las características morfológicas que ese proceso conlleva (ver introducción). En base a eso y con el fin de identificar dichas células, se llevó a cabo un análisis de las micrografías de preparados histológicos de *M. corti* obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión. A continuación se muestra en dos instancias los resultados obtenidos de dicho estudio.



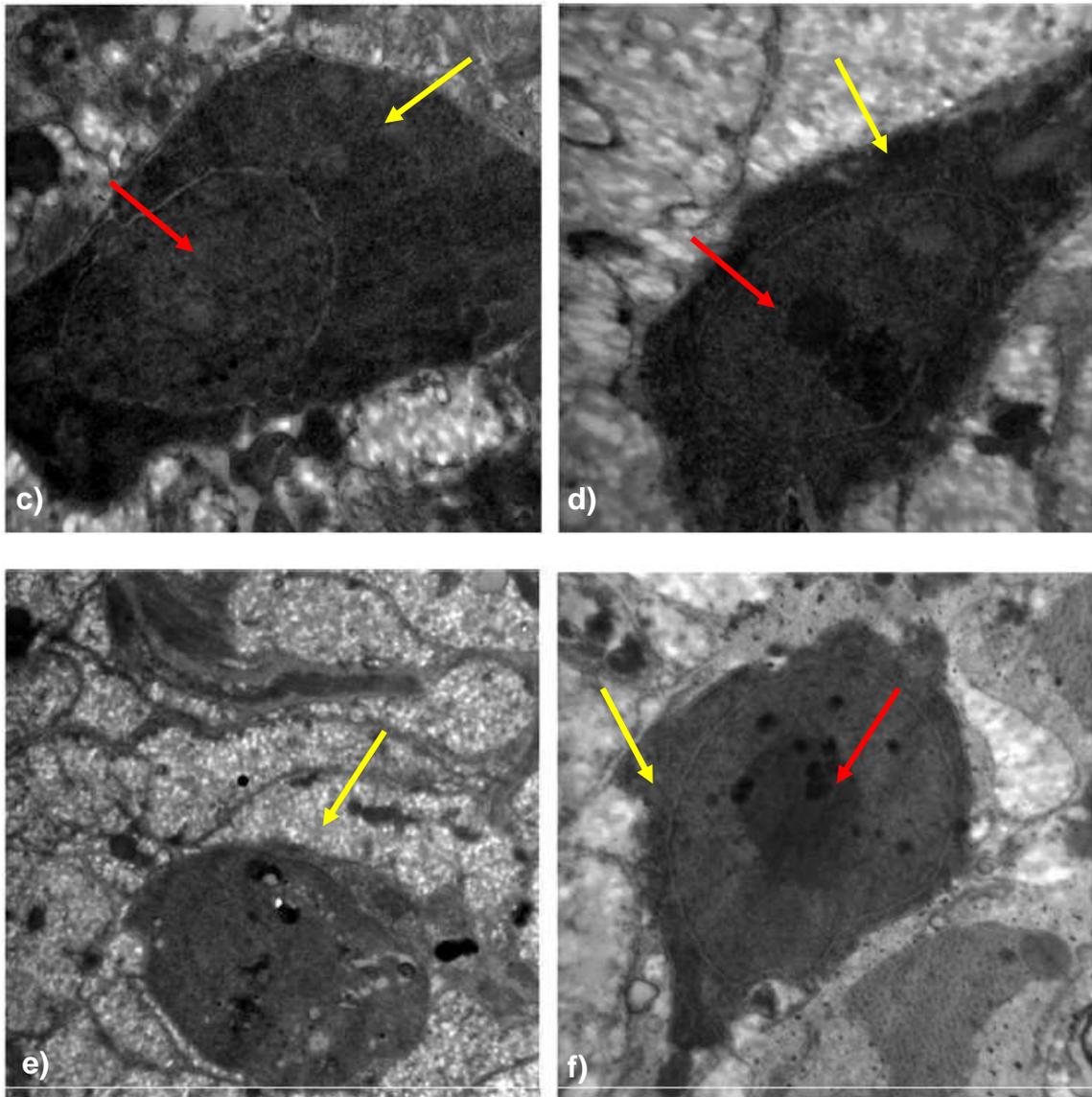
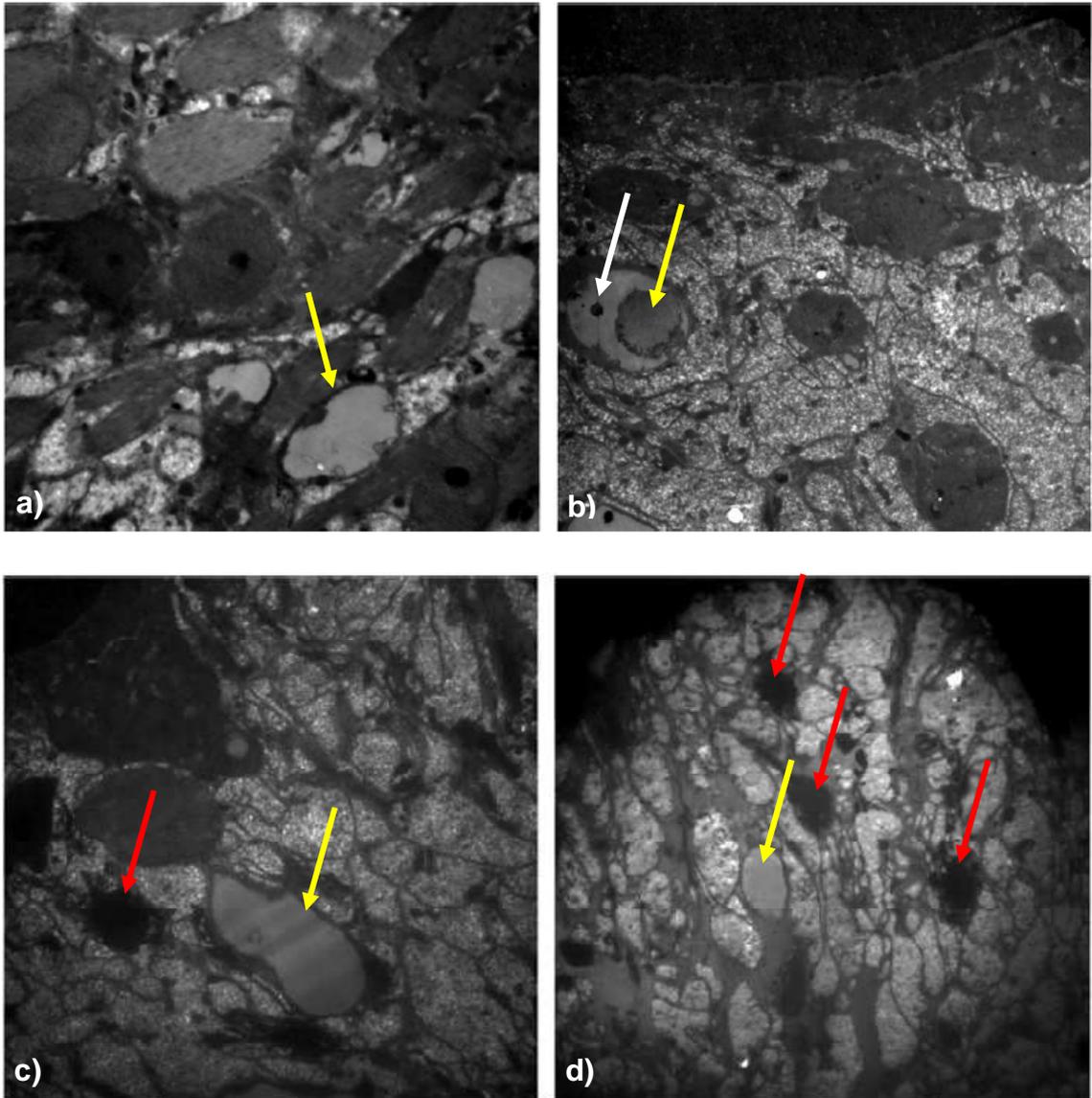


Figura 12. Micrografías de diferentes preparados histológicos de *M. corti* obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión. a) 4800x; b) 5800x; c) 29000x; d) 29000x; e) 14000x; f) 29000x. Con flechas amarillas se señala el citoplasma celular, mientras que las flechas rojas señalan el núcleo.

En la figura 12 podemos observar distintos tipos celulares presentes en cortes histológicos de *M. corti*. A pesar de tener diferente morfología, las células no exhiben las características típicas del proceso apoptótico previamente mencionadas ya que en ellas no se observa una condensación clara de la cromatina ni una reducción del volumen celular, así como tampoco se ven vesículas conteniendo fragmentos celulares, tal como se puede apreciar en la Figura 5 del presente trabajo.

En cambio, en la Figura 13 se puede ver otro grupo de micrografías donde sí se observan ciertos cambios morfológicos típicos del proceso en estudio.



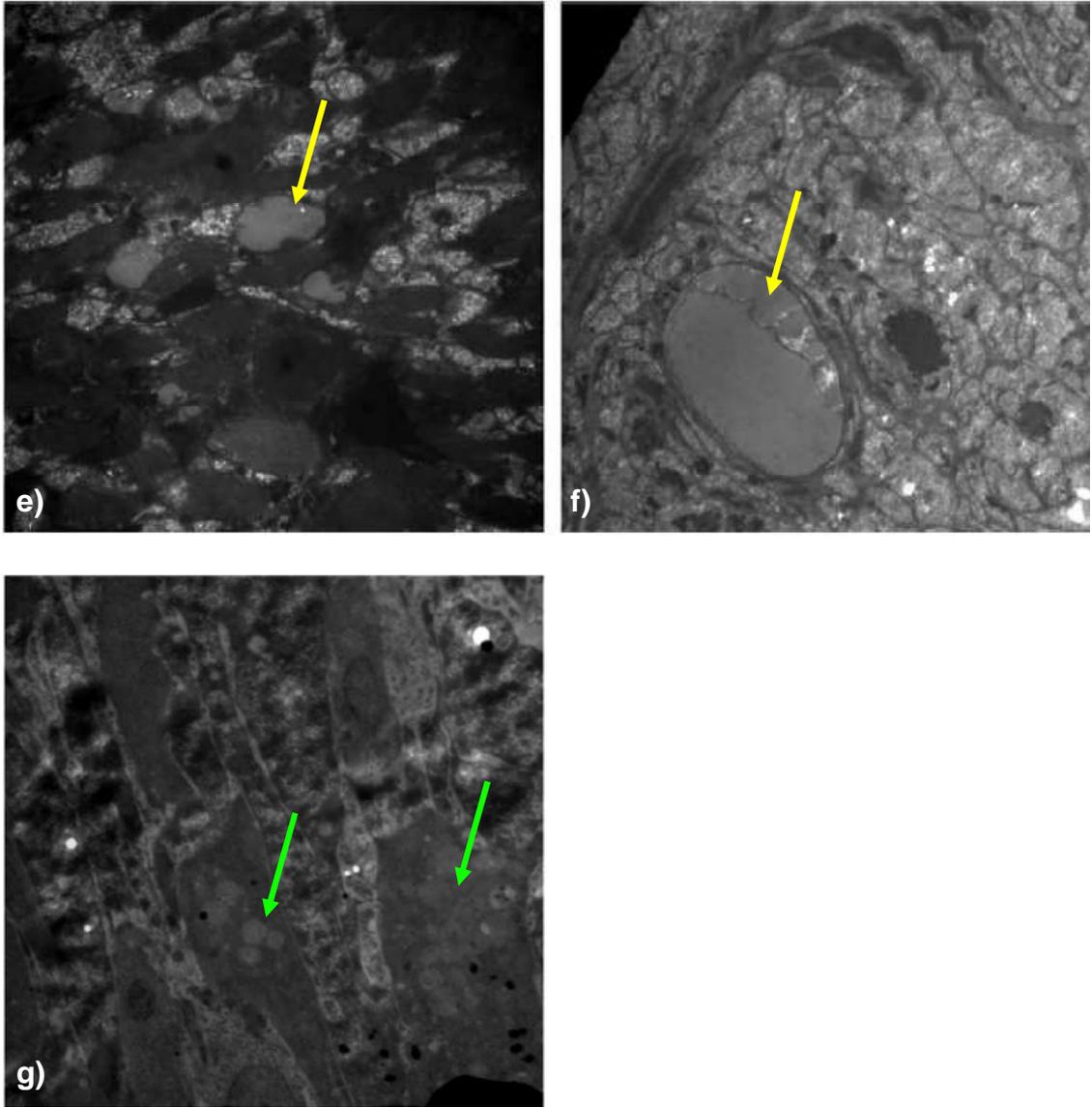


Figura 13. Micrografías de preparados histológicos de *M. corti* obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión. a) 7200x; b) 5800x; c) 4800x; d) 2900x; e) 4800x; f) 4800x; g) 10000x. Las flechas rojas indican células que en la fase inicial de la apoptosis, la flecha blanca señala un fragmento nuclear presente en el citoplasma celular, las flechas amarillas señalan la cromatina ubicada en la periferia nuclear, y por último, las flechas verdes indican células con corpúsculos calcáreos en formación

En la Figura 13, al igual que en la Figura 12, también se puede observar un grupo de células muy variado pertenecientes a diferentes preparados histológicos de *M. corti*. Allí se pueden apreciar algunas células con características correspondientes a distintas fases del proceso apoptótico.

Las flechas rojas indican células que se encontrarían en la fase inicial de la apoptosis ya que se observa la cromatina de manera condensada, electrodensa, mientras que las flechas amarillas indican una fase mas

avanzada, señalando la cromatina en la periferia nuclear. La flecha blanca señala un fragmento nuclear presente en el citoplasma celular, indicando el inicio del desmantelamiento nuclear, y por último, las flechas de color verde estarían señalando células con corpúsculos calcáreos en formación. Estas estructuras de carbonato de calcio son comunes en platelmintos y se ha visto que son acompañadas por la presencia de signos apoptóticos en la célula asociada al mismo, desencadenando la desaparición de la misma (Chalar, 2010).

El análisis de estos preparados nos permite concluir que *M. corti* presenta células con morfologías similares a las células apoptóticas de otros organismos (ver Introducción).

5.1.b) Identificación de células apoptóticas en organismos enteros de *M. corti* a lo largo de su desarrollo

Si bien mediante el análisis de las Figuras 12 y 13 no podemos determinar la región del organismo donde se encuentran las células apoptóticas, a través de la técnica TUNEL podemos observar la presencia de estas células en *M. corti* a lo largo de su desarrollo.

En una primera instancia y con el fin de corroborar el funcionamiento del kit empleado, se llevó a cabo el control propio del mismo que consiste en aplicar el tratamiento sobre una línea celular de linfoma humano positiva para la apoptosis y otra negativa. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 14.

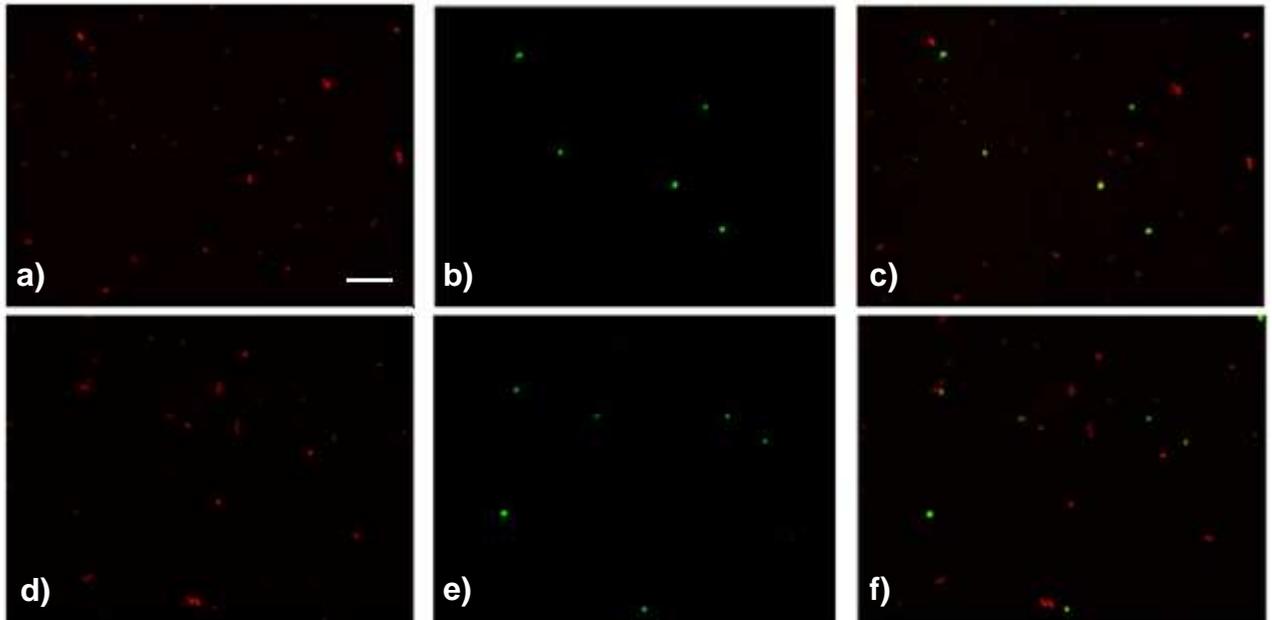


Figura 14. Células control del kit APO-BrdUTM TUNEL Assay. a, d) células teñidas con yoduro de propidio. b, e) células teñidas con solución de marcado del kit. c, f) superposición de células teñidas con yoduro de propidio y solución de marcado del kit. Las imágenes fueron tomadas a 40x. Barra 100 μm .

En base a los resultados mostrados en la Figura 14 podemos asegurar que el kit empleado para realizar este experimento funciona de manera adecuada en suspensiones celulares, ya que se puede ver claramente que la señal indicativa de un proceso apoptótico (color verde) coincide perfectamente con la señal positiva para yoduro de propidio (color rojo), la cual indica presencia celular.

En una segunda instancia, y una vez corroborado el buen funcionamiento del kit, se procedió a realizar el experimento con ejemplares de *M. corti* según lo explicado en la sección Materiales y Métodos. Los resultados fueron visualizados mediante diferentes objetivos del microscopio de epifluorescencia de manera de poder observar por un lado las células del organismo más en detalle, y por otro lado el organismo completo o semicompleto.

En primer lugar y con el fin de observar una posible autofluorescencia por parte de los organismos estudiados, se realizó un control para el experimento con un grupo de ejemplares de *M. corti* en diferentes estadios de desarrollo, a los cuales se los trató de igual forma que al resto de los organismos con la excepción de que no se les aplicó la solución de marcado. El resultado se observa en la Figura 15.

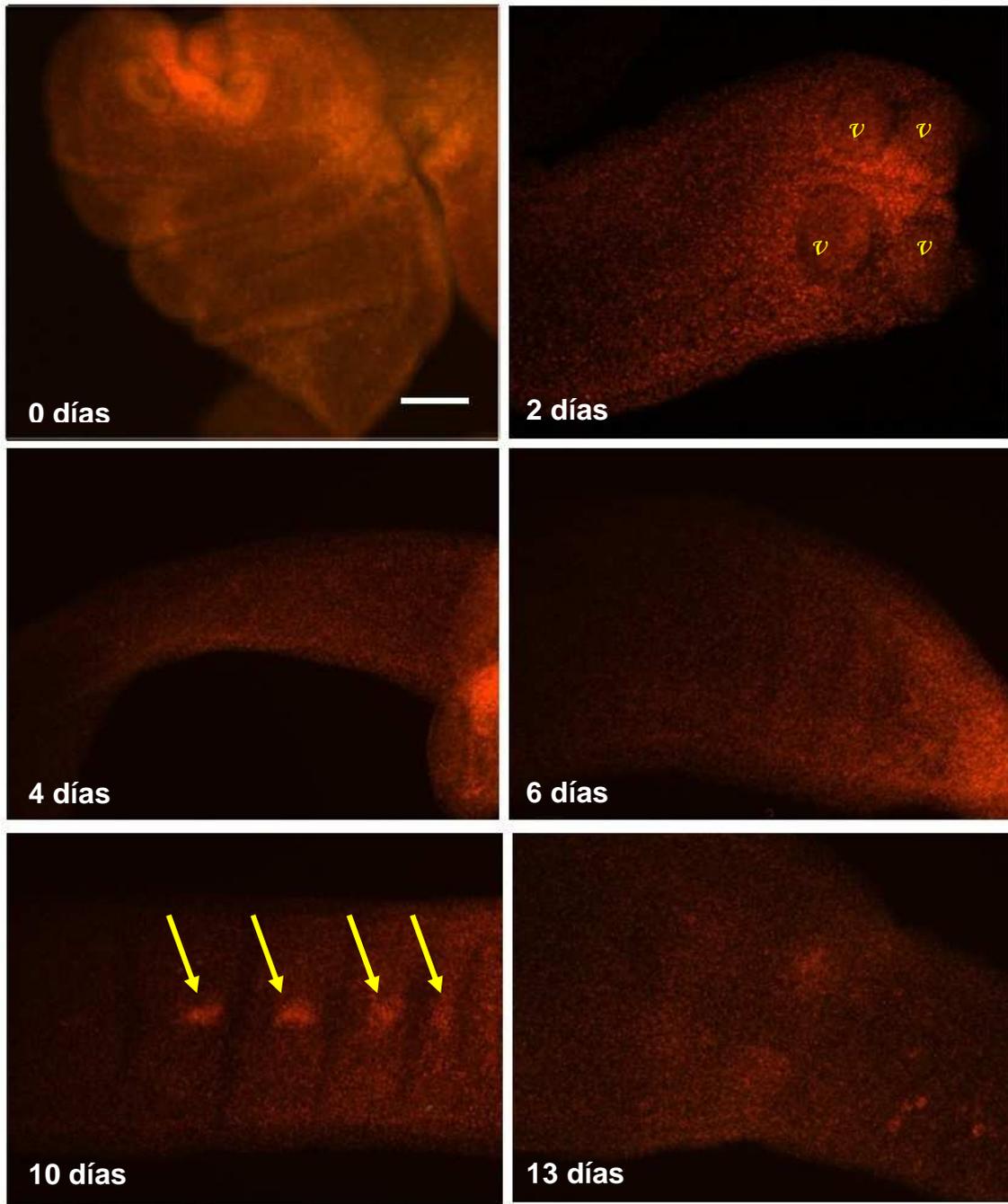


Figura 15. Superposición de imágenes obtenidas mediante *M. corti* pertenecientes al grupo “control autofluorescencia”, teñidos con ioduro de propidio. 0 día, tetratiridio; 2 días, escólex; v: ventosas.; 4 días, cuello sin segmentación; 6 días, extremo posterior; 10 días; segmentos tempranos; las flechas indican los primordios genitales tempranos; 13 días, fragmento final de la segmentación. Todas las imágenes fueron tomadas a 10x. Barra 100 μ m.

En la Figura 15 se pueden apreciar segmentos de ejemplares de *M. corti* teñidos con ioduro de propidio en diferentes estadíos de desarrollo,

desde tetratiridios hasta el estadio adulto. En ellos se puede ver claramente que no presentan autofluorescencia verde en ninguna de las etapas estudiadas a la longitud de onda utilizada en el microscopio.

Determinado el buen funcionamiento del kit y la no autofluorescencia de los *M. corti*, se procedió a analizar al resto de los ejemplares estudiados que sí fueron tratados con la solución de marcado, por lo que conformarían el “grupo experimento”. El estudio de dicho grupo se dividió en dos en base al objetivo del microscopio con el que fueron tomadas las fotos. En primer lugar se analizará un grupo de imágenes que permiten visualizar a las células de los *M. corti* con mayor detalle que las imágenes restantes, ya que fueron tomadas a mayor aumento, mientras que las imágenes pertenecientes al otro grupo fueron obtenidas con el objetivo de menor aumento por lo que permite visualizar a los ejemplares analizados en su totalidad o en grandes regiones del organismo.

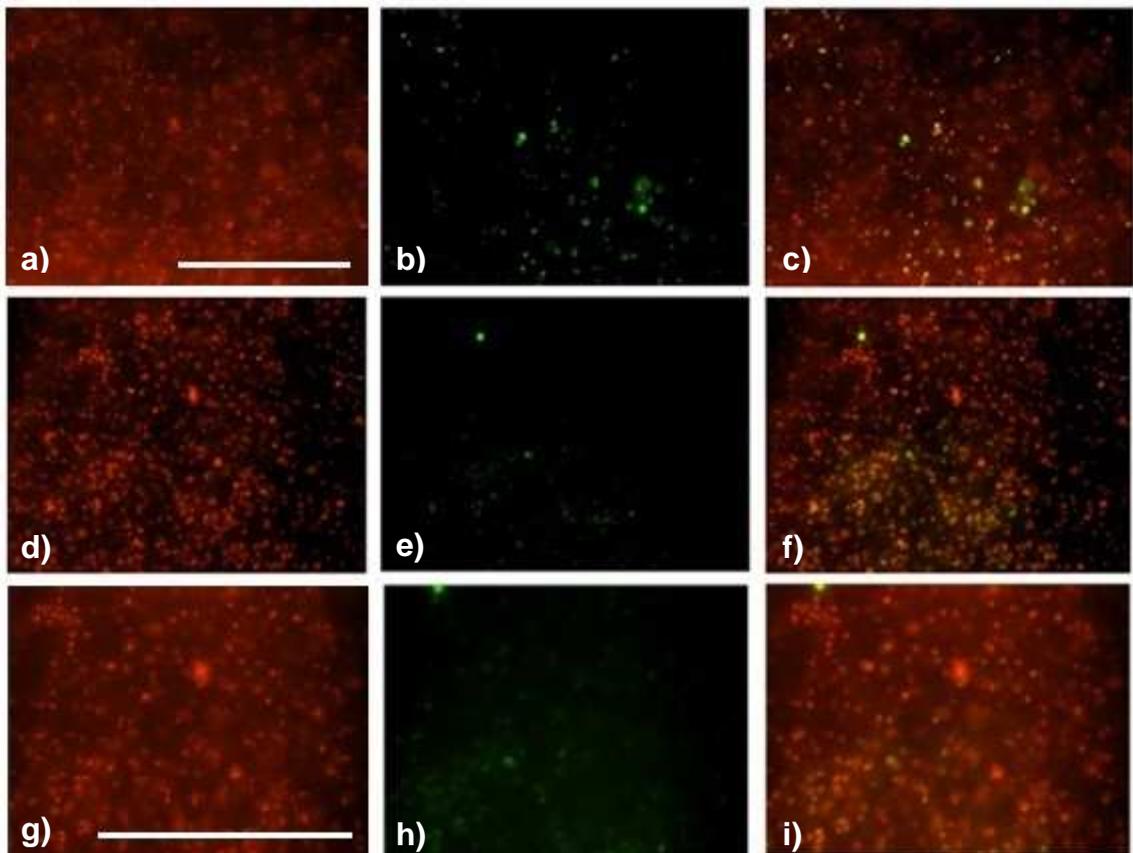


Figura 16. Fotografías de ejemplares de *M. corti* tratados por la técnica de TUNEL. a, d, g) tinción con yoduro de propidio. b, e, h) tinción con solución de marcado del kit. c, f, i) superposición de yoduro de propidio y solución de marcado del kit. a – f) 40x. Barra 100 μm . g – i) 60x. Barra 100 μm .

A través de los resultados obtenidos que se muestran en la Figura 16 podemos observar que, al igual que ocurre con las células del linfoma humano analizadas previamente, la señal positiva para el proceso de apoptosis coincide claramente con la señal positiva para el yoduro de propidio. De esta forma podemos decir que lo que se observan son células marcadas. Además, en estas imágenes podemos ver que el modelo en estudio se constituye de una población celular variada, con células de diferente tamaño y morfología.

Habiendo comprobado mediante los resultados anteriores que el kit funciona de manera correcta para *M. corti*, procedemos a estudiar la apoptosis a nivel global en el organismo a lo largo del desarrollo del mismo. En las Figuras 17 a 21 se muestran los resultados obtenidos a través de una serie de fotografías tomadas de diferentes regiones de los ejemplares analizados; tanto del escólex, como del cuello en los organismos ya segmentados y de la parte posterior de los mismos. Para una mejor orientación sobre las regiones de *M. corti* mostradas, se puede recurrir a la Figura 11 donde se publica el esquema de un ejemplar de este organismo ya diferenciado con las diferentes regiones bien definidas.

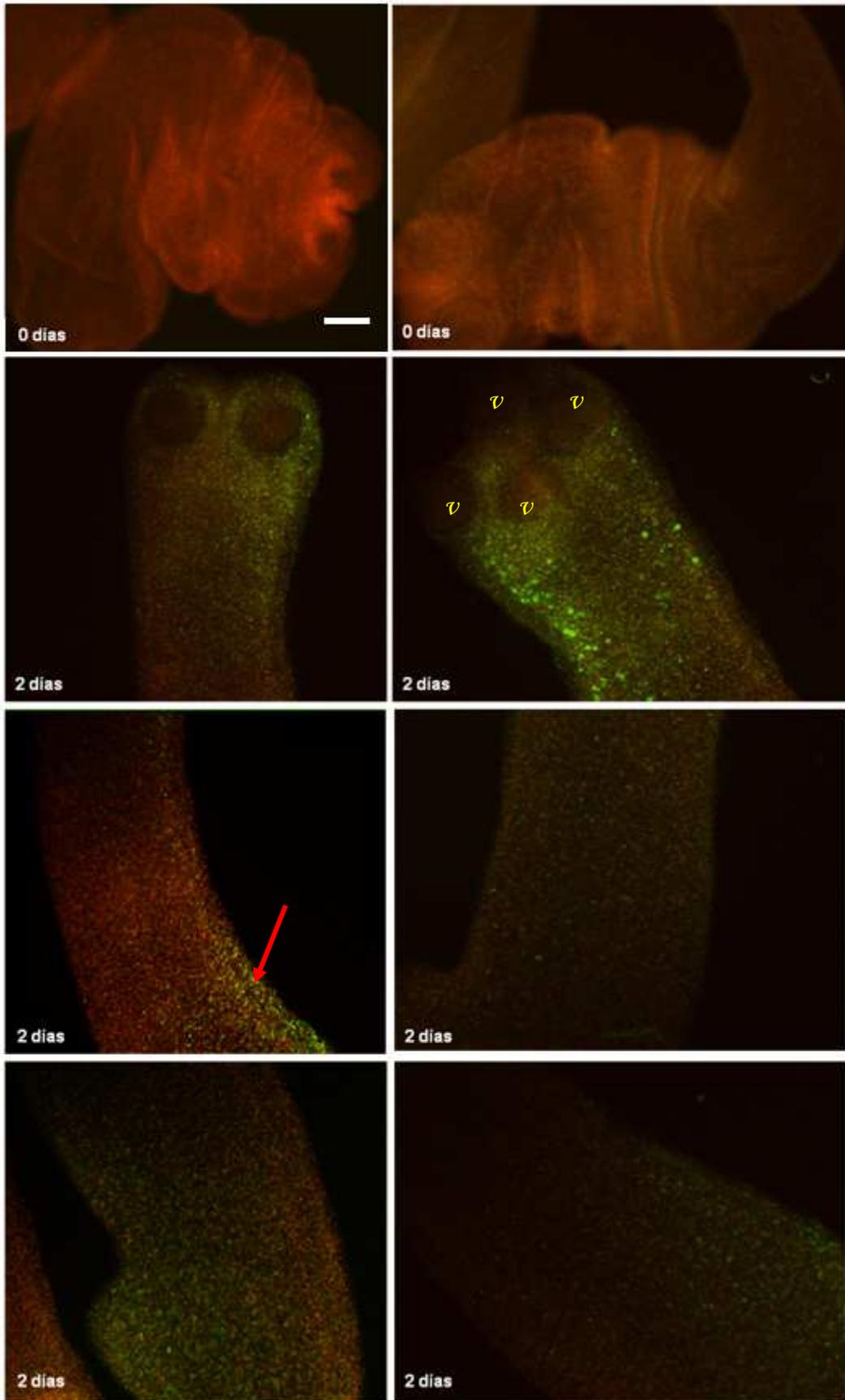


Figura 17. *M. corti* en diferentes estadios de desarrollo tratados mediante la técnica TUNEL. En el día 0 de cultivo se puede observar a los tetratiridios enteros, mientras que a los 2 días

de cultivo se muestran fotos del escólex, el cuello y la parte posterior del organismo. *v.* ventosas. Con una flecha roja se muestra un cordón lateral de *M. corti*. Todas las imágenes fueron tomadas con el objetivo 10x. Barra 100 μ m.

Analizando la Figura 17 podemos ver que los ejemplares de *M. corti* recién extraídos del ratón (día 0 de cultivo) no presentan señal positiva para la apoptosis, sin embargo sí lo hacen los cultivados durante 2 días. En estos últimos podemos ver la aparición de señal a lo largo de todo su cuerpo, habiendo mayor prevalencia de la misma alrededor de las ventosas y en la parte posterior del organismo donde ésta es abundante. También se hace clara la aparición de señal en los dos cordones laterales que descienden desde el escólex.

En base a estos resultados podemos sostener que la apoptosis en *M. corti* se desataría una vez que el organismo comienza su maduración en un medio de cultivo y no dentro del ratón. Además, mirando los ejemplares cultivados en todos los estadios analizados, podemos pensar que tal vez, parte de la señal positiva para la apoptosis se deba a roturas del ADN como consecuencia de la manipulación de los ejemplares, por ejemplo en el proceso de destegumentación de los mismos.

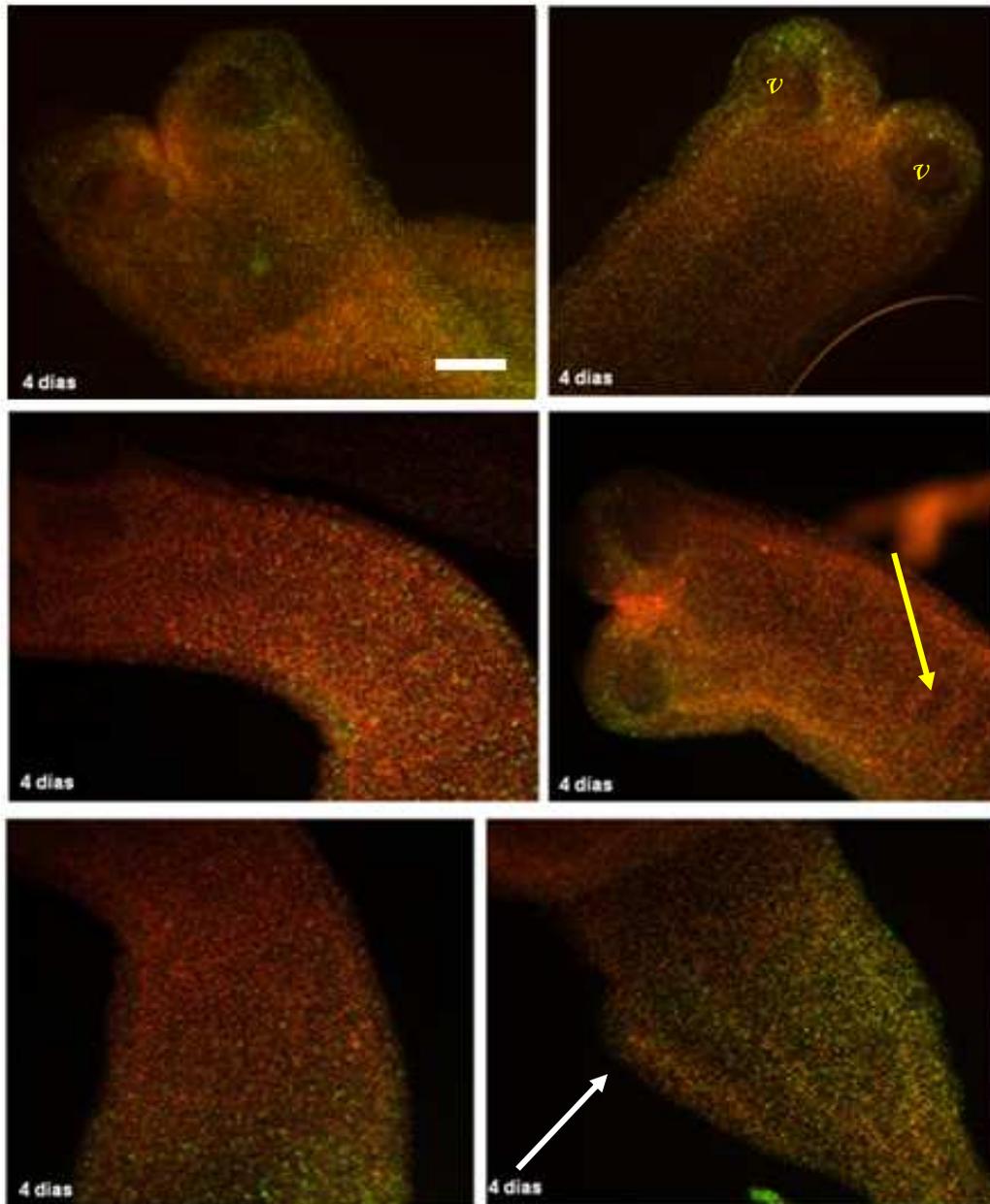


Figura 18. *M. corti* cultivados durante 4 días tratados mediante la técnica TUNEL. Se muestran fotos del escólex, el cuello y la parte posterior del organismo. *v.* ventosas. Con una flecha amarilla se muestra el inicio de la segmentación mientras que con una flecha blanca se muestra un crecimiento lateral como consecuencia de una división asexual por fisión longitudinal. Todas las imágenes fueron tomadas con el objetivo 10x. Barra 100 μ m.

En la Figura 18 vemos que, si bien sigue habiendo señal alrededor de las ventosas, la abundancia de ésta disminuye de manera notoria. Por el contrario, en la región del cuello inmediatamente luego del escólex, donde ya es visible el comienzo de segmentación, la señal se multiplica respecto a lo observado en los ejemplares de 2 días de cultivo. En la región posterior se continúa observando gran abundancia de señal.

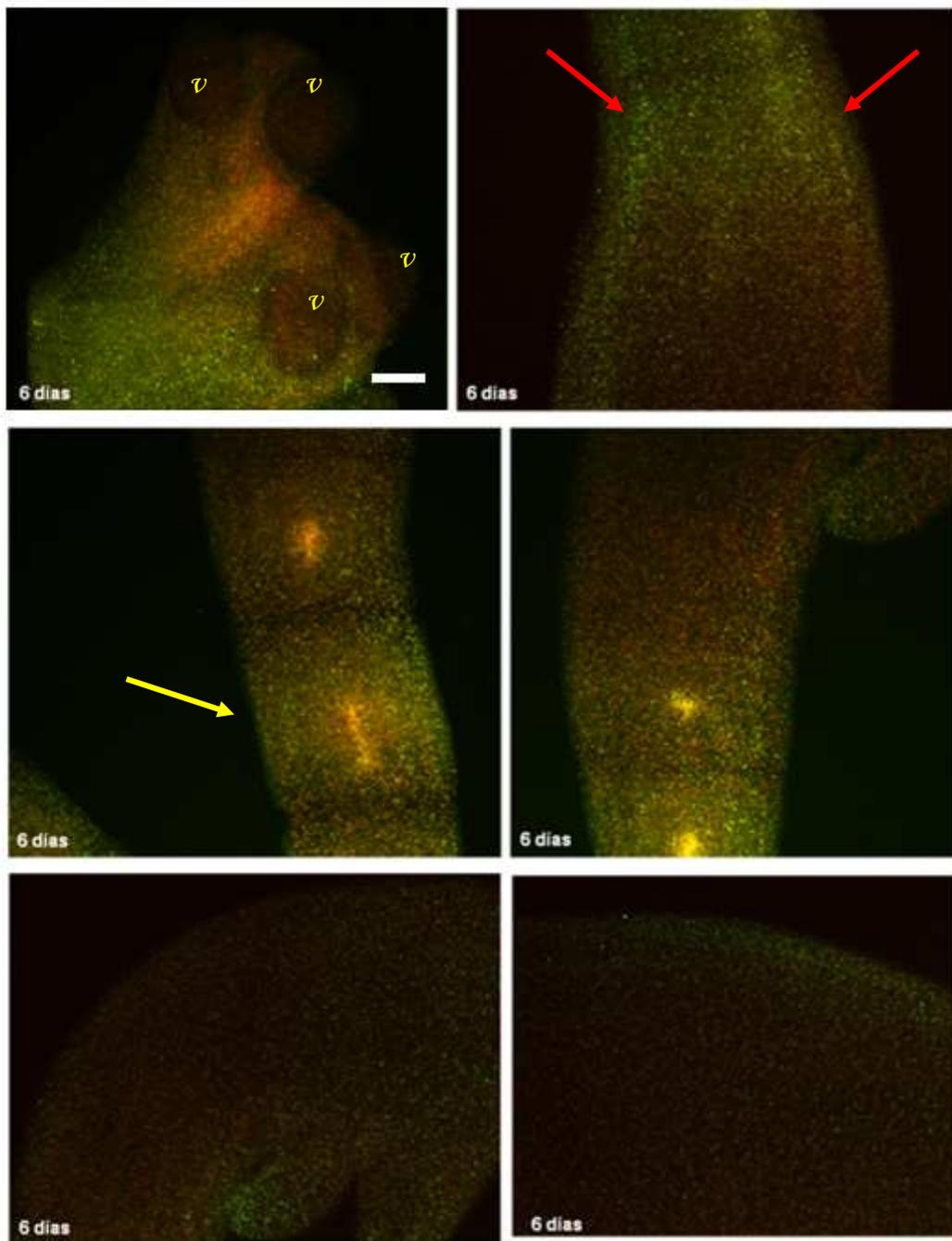


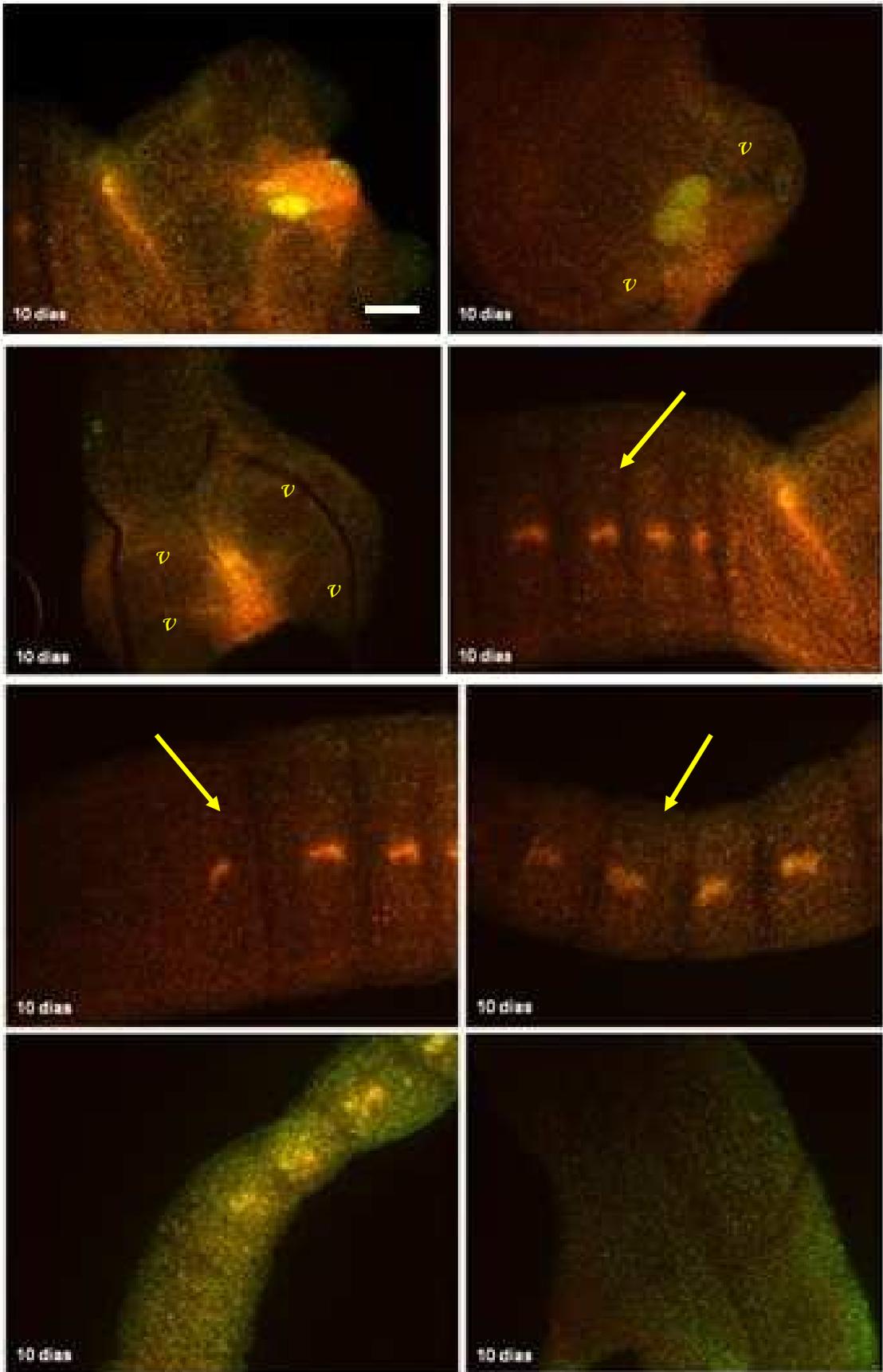
Figura 19. *M. corti* cultivados durante 6 días tratados mediante la técnica TUNEL. Se muestran fotos del escólex, el cuello y la parte posterior del organismo. *v*: ventosas. Con flechas rojas se indican los cordones laterales mientras que con una flecha amarilla se indica la segmentación de *M. corti* con los primordios genitales. Todas las imágenes fueron tomadas con el objetivo 10x. Barra 100 μ m.

A pesar de que sigue siendo visible la presencia de señal alrededor de las ventosas, en los organismos cultivados durante 6 días (Figura 19) se

puede observar una pequeña tendencia a su disminución respecto a los *M. corti* cultivados durante 4 días.

A los 6 días de cultivo ya es clara la formación de segmentos en el parásito, donde se van generando nuevos proglótides en forma continua desde el cuello por lo que ocurre un gradiente de diferenciación sexual. Se podría esperar un aumento de señal en las regiones entre segmentos continuos debido a que la misma sufre un pequeño invaginamiento, sin embargo los resultados obtenidos no reflejan esa situación. Allí se puede ver la aparición de señal sobre los cordones laterales, inmediatamente después del escólex de *M. corti*, así como también se observa de manera generalizada en los segmentos.

Sobre la región posterior del cuerpo se puede ver el mantenimiento de señal generalizada, igual que en el resto de los casos. La gran abundancia de señal en esta región podría explicarse debido al crecimiento antero-posterior de los organismos, donde los segmentos mas antiguos son los posteriores.



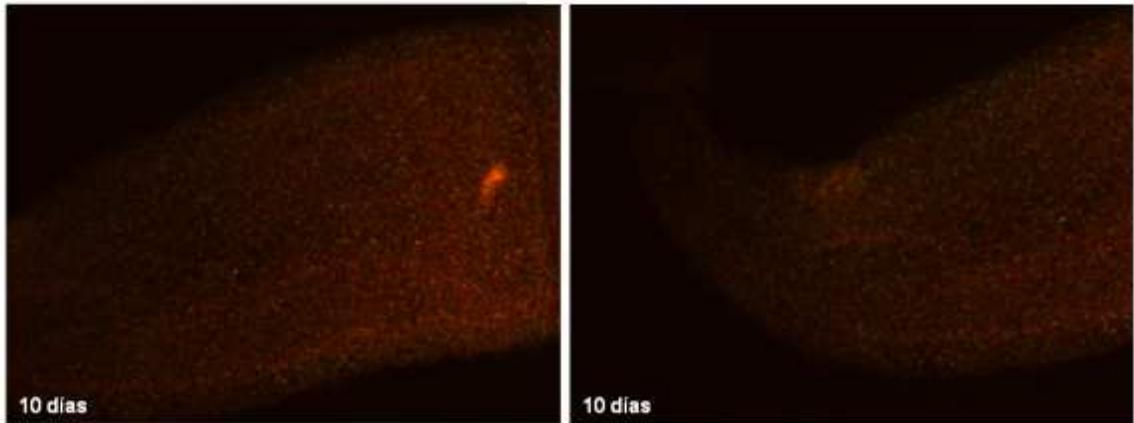
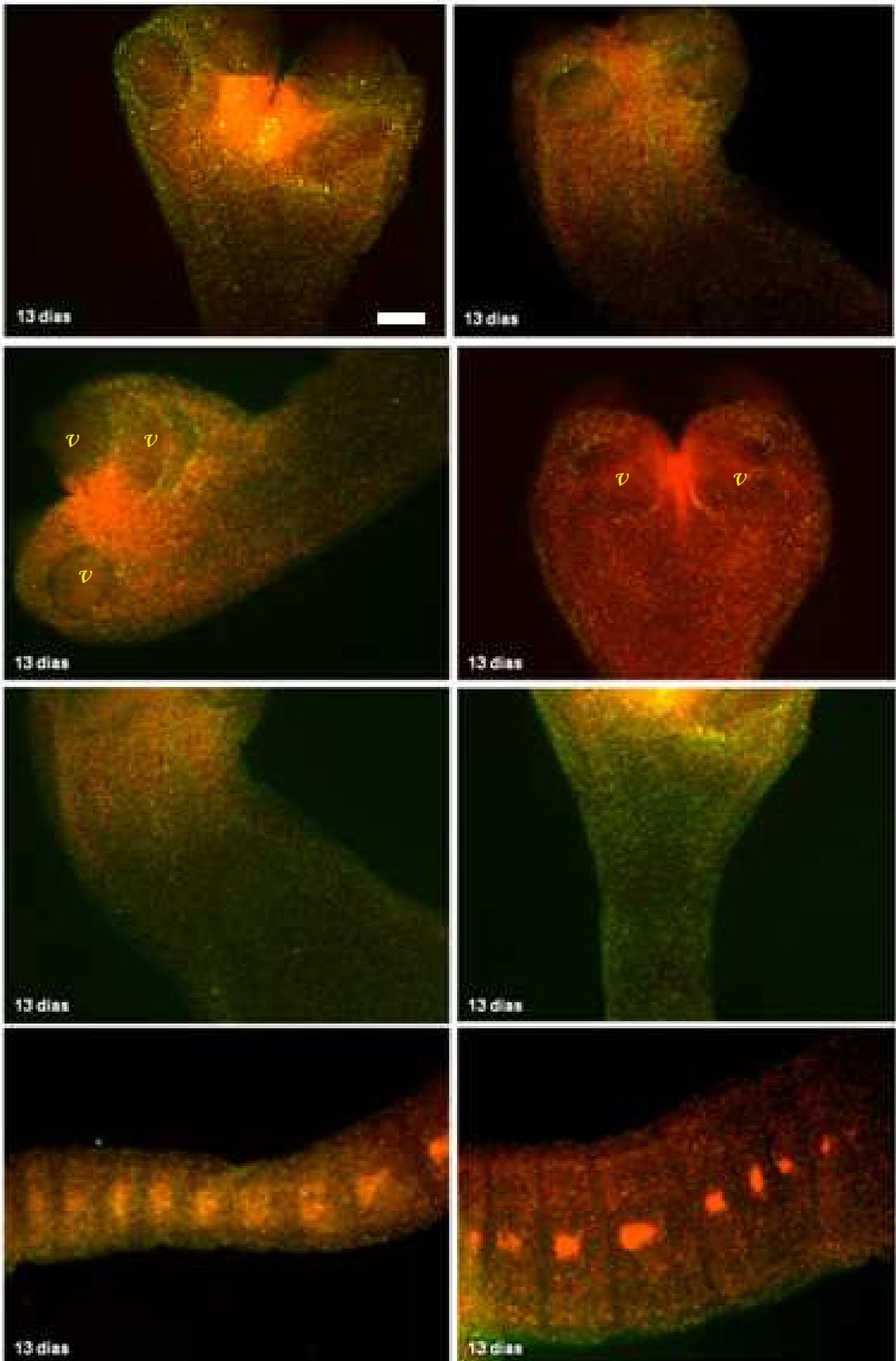


Figura 20. *M. corti* cultivados durante 10 días tratados mediante la técnica TUNEL. Se muestran fotos del escólex, el cuello y la parte posterior del organismo. *v.* ventosas. Con flechas amarillas se indican los segmentos del organismo con sus primordios genitales. Todas las imágenes fueron tomadas con el objetivo 10x. Barra 100 μ m.

A los 10 días de cultivo, en los ejemplares de *M. corti* estudiados (Figura 20) se observa un pequeño aumento de la señal en la región de las ventosas, respecto a los organismos cultivados durante 6 días. Por otra parte, respecto al proceso apoptótico en la región del cuello no se pudo obtener un resultado concluyente debido a que en algunos de los ejemplares tratados se puede apreciar un incremento importante de la señal, y en otros una disminución notoria de la misma. Esto puede deberse a que el proceso de lavado no fue homogéneo para todos los *M. corti* estudiados o tal vez a una simple diferencia en el tiempo de desarrollo de los mismos. Por otro lado, en la región posterior, a pesar de que la señal visible es abundante y se encuentra distribuída de manera generalizada, se aprecia una leve disminución respecto a los organismos cultivados durante 6 días.



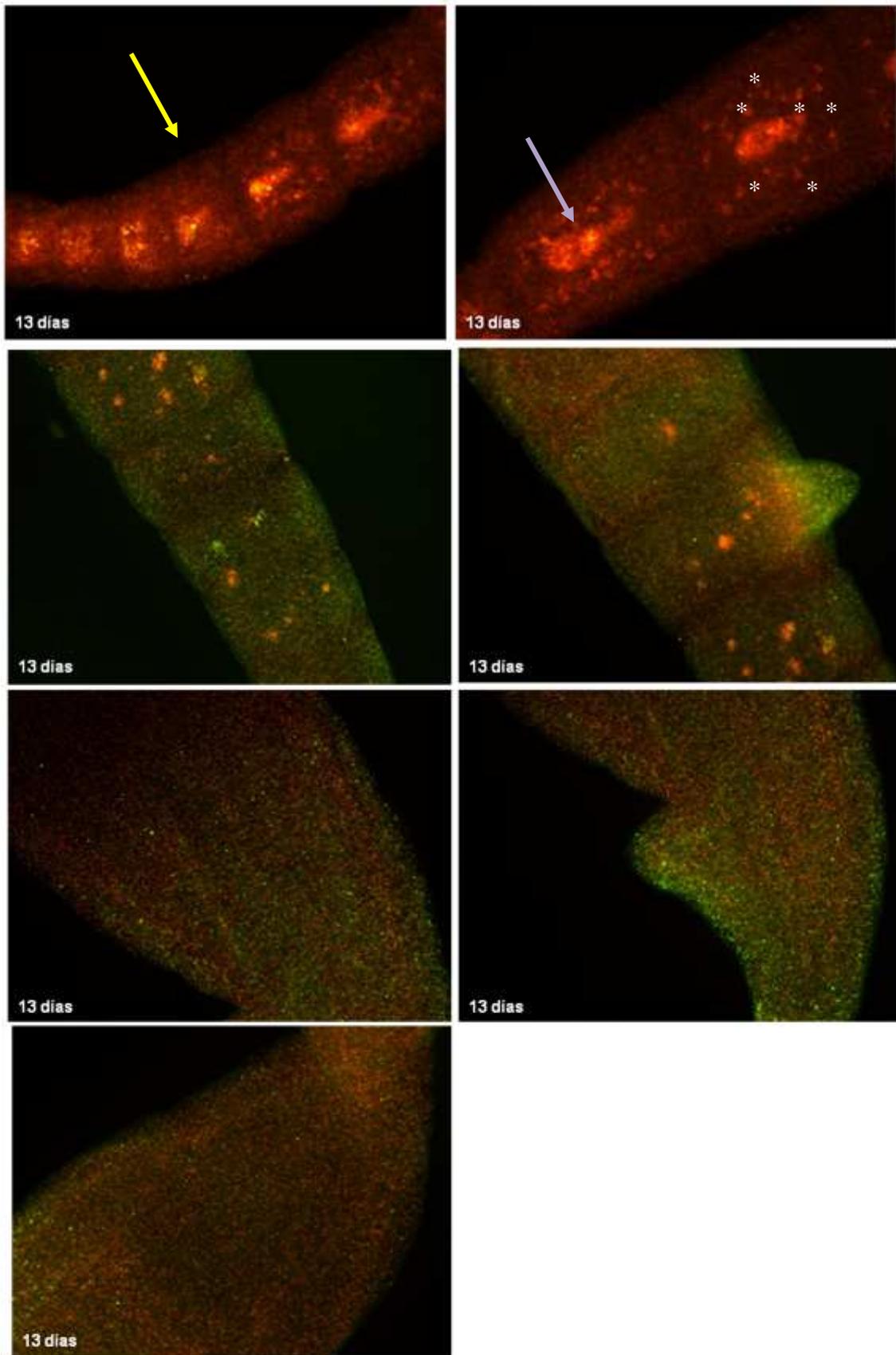


Figura 21. *M. corti* cultivados durante 13 días tratados mediante la técnica TUNEL. Se muestran fotos del escólex, el cuello y la parte posterior del organismo. *v.* ventosas. Con flecha amarilla se señala la segmentación de *M. corti*, con flecha color lila se indica un

primordio genital más avanzado, el cual adquiere un tamaño mayor que los de los estadios anteriores, con forma alargada y distribución compacta de sus células. Con asteriscos se indican algunos de los primordios de los testis del segmento. Todas las imágenes fueron tomadas con el objetivo 10x. Barra 100 μm .

En la Figura 21 donde se muestra a los *M. corti* cultivados durante 13 días, se observa un aumento de la señal alrededor de las ventosas respecto a los organismos cultivados durante 10 días, así como también en la región inmediata al escólex. En el área segmentada desaparece casi totalmente la presencia del proceso apoptótico, volviendo a surgir hacia la región posterior del organismo.

Nuestros resultados muestran que *M. corti* presenta un importante número de células identificadas como apoptóticas mediante la técnica de TUNEL. Los mismos siguen la misma línea que los obtenidos por [Nimeth et al., 2002](#) donde se vio que la apoptosis juega un papel decisivo en la renovación de las células en *M. lignano*. Allí se demostró que este organismo presenta una alta frecuencia de renovación celular ([Ladurner et al., 2000](#)) y se confirma el gran nivel de conservación de la apoptosis así como también la temprana aparición de la misma en la evolución de organismos bilaterales ([Vaux y Korsmeyer, 1999](#); [Meier et al., 2000](#)).

Otros estudios han documentado el proceso apoptótico en organismos tales como la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* ([Bergmann et al., 1998](#); [Vernooy et al., 2000](#); [Meier et al., 2000](#); [Bangs y White, 2000](#)) o el nematodo *Caenorhabditis elegans* ([Metzstein et al., 1998](#); [Fraser, 1999](#); [Liu y Hengartner, 1999](#); [Meier et al., 2000](#); [Bangs y White, 2000](#)). Este último se ha establecido como un organismo modelo para estudiar la apoptosis y se ha determinado que durante el desarrollo embrionario del mismo se generan 1090 células somáticas de las cuales 131 son eliminadas a través de la apoptosis ([Hale et al., 1996](#); [Metzstein et al., 1998](#); [Meier and Evan, 1998](#); [Meier et al., 2000](#)).

Como se mencionó previamente, con el fin de determinar la abundancia de células marcadas mediante el kit de TUNEL en las diferentes etapas de desarrollo de *M. corti*, se procedió a la cuantificación de las mismas por medio del programa ImageJ.

En la Figura 22 se presentan los resultados obtenidos de la cuantificación celular realizada en base a las Figuras 17 a 21, diferenciando parte anterior, parte intermedia y parte posterior de los organismos en estudio. Allí podemos ver que, en concordancia con los resultados obtenidos mediante

el análisis visual de las imágenes, la mayor cantidad de células apoptóticas en *M. corti* se obtiene a los 2 y a los 6 días de cultivo. Esto se podría explicar como parte del proceso de remodelación de tejidos en lo que refiere al comienzo de la maduración de los ejemplares de *M. corti* estudiados, al crecimiento antero-posterior de los organismos, y a su maduración sexual (Jacobson *et al.*, 1997; Fuchs *et al.*, 2011)

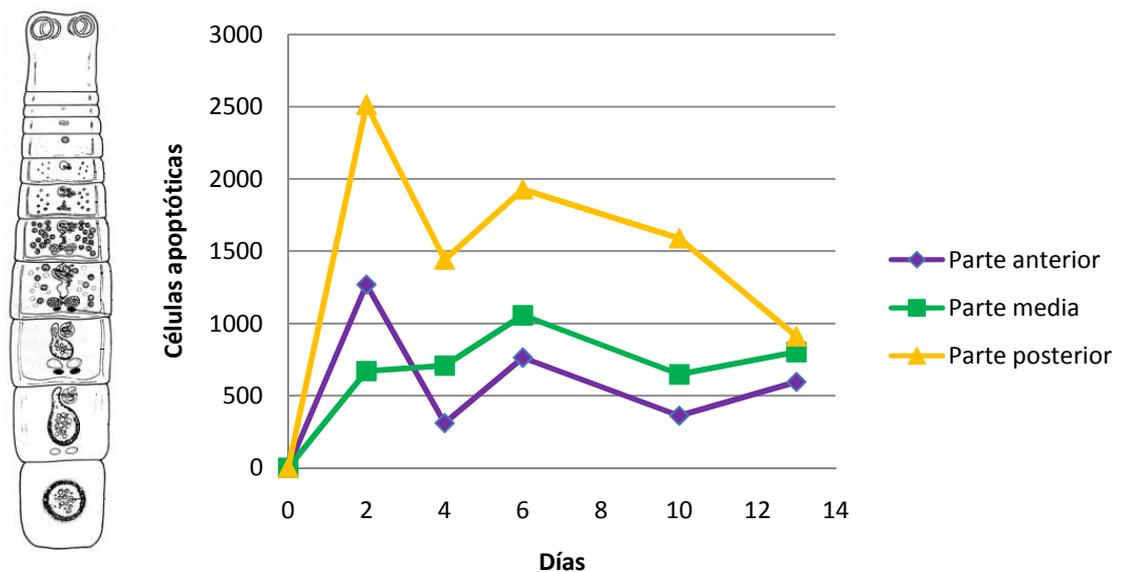


Figura 22. Resultado de la cuantificación de células apoptóticas en los diferentes estadios de desarrollo de *M. corti*, estudiando de manera independiente la parte anterior, la media y la parte posterior de dichos organismos.

5.2) Búsqueda, clonación y estudio de la expresión temporal de los genes Caspasa-3 como marcador de células apoptóticas, y Bcl-2 como marcador de supervivencia celular, a lo largo del desarrollo de *M. corti*.

A continuación se despliegan y analizan en 4 segmentos los resultados obtenidos con el fin de cumplir el objetivo mencionado.

5.2.a) Búsqueda y clonación de los genes Caspasa-3 como marcador de células apoptóticas, y Bcl-2 como marcador de supervivencia celular, a lo largo del desarrollo de *M. corti*

Como se mencionó previamente, se realizó en una primera instancia una búsqueda de las secuencias proteicas disponibles de Caspasa-3 y Bcl-2 en las bases de datos GeneDB y GenBank y con algunas de ellas se realizó un alineamiento en T-coffee para encontrar las regiones conservadas. El resultado de ello se muestra en las Figuras 23 y 24.



Figura 23. Resultado del alineamiento llevado a cabo en el programa T-coffee a partir de las siguientes secuencias proteicas de Caspasa-3: *E. granulosus* – GeneDB: EgrG_000462900; *E. multilocularis* - GenBank: CDJ00103.1; *H. microstoma* - GeneDB: HmN_000393000; *C. sinensis* - GenBank: GAA49976.1; *S. mansoni* - GenBank: ACU88129.1; *S. japonicum* - GenBank: CAX71159.1. Mediante rectángulos se indica la región de las secuencias alineadas usada para el diseño de los cebadores específicos para amplificar el gen de Caspasa-3 de *M. corti* (explicado posteriormente).

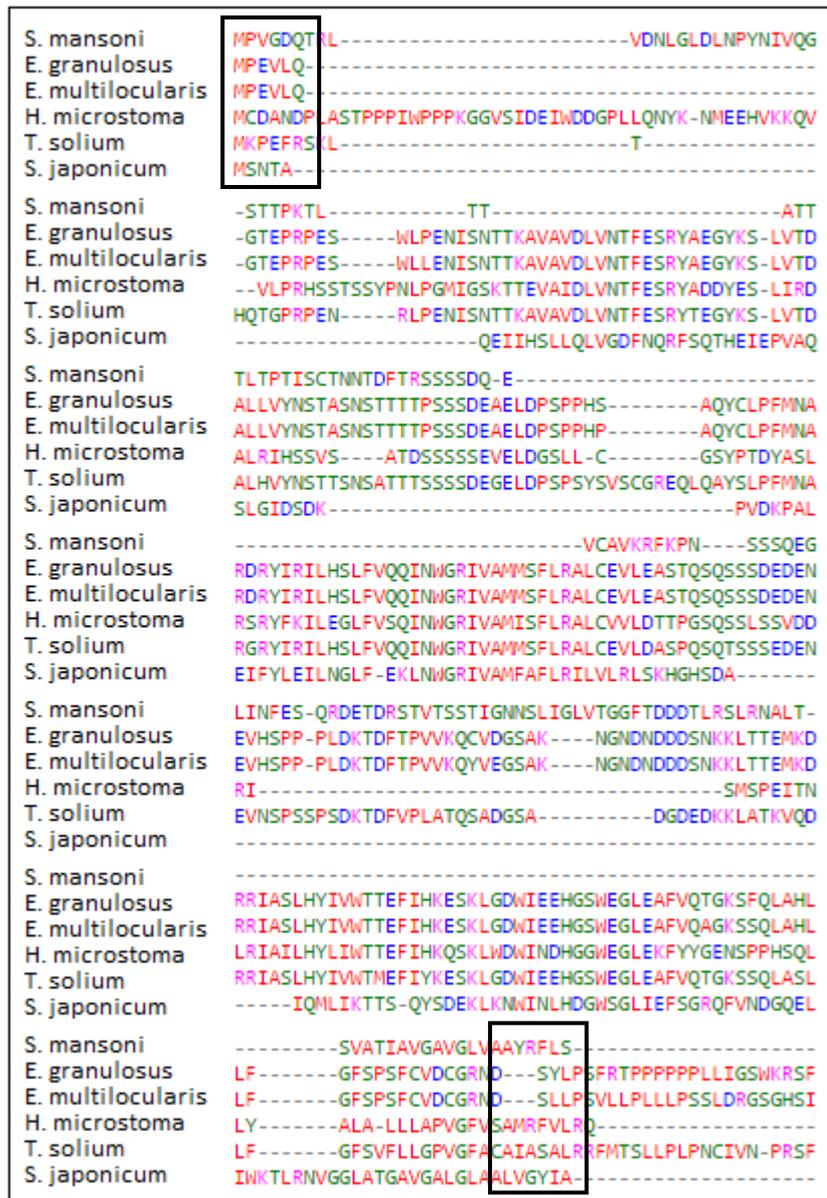


Figura 24. Resultado del alineamiento llevado a cabo en el programa T-coffee a partir de las siguientes secuencias proteicas de Bcl-2: *S. mansoni* - GeneDB: Smp_041630; *E. granulosus* - GeneDB: EgrG_000365100; *E. multilocularis* - GenBank: CDS36546.1; *H. microstoma* - GeneDB: HmN_000575800; *T. solium* - GeneDB: TsM_000181900; *S. japonicum* - GenBank: CAX69465.1. Se muestra únicamente un fragmento del alineamiento debido a su extensión. Mediante rectángulos se indica la región de las secuencias alineadas usada para el diseño de los cebadores específicos para amplificar el gen de Bcl-2 de *M. corti* (explicado posteriormente).

Una vez obtenidos los alineamientos de las secuencias proteicas analizadas, se procedió a buscar en ellos una región conservada para diseñar juegos de cebadores que amplifiquen los genes Caspasa-3 y Bcl-2 de *M. corti*.

Al momento de diseñar el juego de cebadores para Caspasa-3 no se contaba con la publicación de la secuencia genómica de *M. corti*, por lo que se diseñó un juego de cebadores degenerado (Apéndice 2) para amplificar dicho gen.

Luego de llevar a cabo la reacción de amplificación por PCR de Caspasa-3 tal como se explica en la Sección Materiales y Métodos, las muestras obtenidas fueron sometidas a electroforesis en un gel de agarosa 1% en buffer TAE 1x, y posteriormente visualizadas mediante tinte con bromuro de etidio (0,5 g/ml) y exposición a la luz ultravioleta (UV: = 240 nm) en un transiluminador MacroVue UV-20 (Hoefer). Mediante la comparación de los tamaños entre las bandas de las muestras analizadas y las del marcador de pares de bases de concentración conocida, fue posible inferir que se trataba del fragmento de interés. Una vez establecido eso, se procedió a purificarlo tal como se detalló en la sección Materiales y Métodos (Resultado no mostrado).

Finalizado el proceso de purificación del producto de amplificación de Caspasa-3 de *M. corti*, se procedió a su ligación en el vector pGEM-T-Easy y a su clonado mediante la transformación de células competentes DH5- α . Posteriormente se llevaron a cabo minipreparaciones y se enviaron a secuenciar al Institut Pasteur de Montevideo algunos de los plásmidos extraídos. Una vez obtenidas las secuencias, se realizó un Blastx para determinar si el fragmento amplificado se trataba realmente de Caspasa-3. A continuación, en la Figura 25 se muestra el resultado del mismo donde se obtuvo un 78% de conservación con *E. multilocularis* y *E. granulosus* y un 58% con *S. mansoni*.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
caspase 3 apoptosis cysteine peptidase [Echinococcus granulosus]	299	299	99%	3e-98	78%	CDS19333.1
Caspase-3 [Echinococcus granulosus]	298	298	99%	4e-98	78%	EUB60363.1
caspase 3, apoptosis cysteine peptidase [Echinococcus multilocularis]	298	298	99%	5e-98	78%	CDJ00103.1
caspase 3, apoptosis cysteine peptidase [Hymenolapis microstoma]	296	296	99%	2e-97	77%	CDS31953.1
caspase-3 [Clonorchis sinensis]	213	213	99%	5e-65	60%	GAA49976.1
hypothetical protein T265_01459 [Opisthorchis viverrini]	212	212	99%	9e-65	60%	XP_009163764.1
caspase-3 [Clonorchis sinensis]	210	210	99%	3e-64	60%	GAA53495.1
hypothetical protein T265_08003 [Opisthorchis viverrini]	207	207	99%	4e-62	59%	XP_009171948.1
caspase-3 [Schistosoma mansoni]	203	203	99%	2e-61	58%	ACU88129.1
Caspase-3 [Schistosoma haematobium]	202	202	99%	5e-61	58%	KGB39207.1

Figura 25. Resultado del Blastx realizado a partir de la secuencia de uno de los clones obtenidos usando un juego de cebadores degenerado diseñado para amplificar la Caspasa-3 de *M. corti*.

Mientras se realizaban los estudios ya detallados, en la página web del Instituto Sanger se publicó la secuencia genómica de *M. corti*. Basándonos en ella y en el estudio de las secuencias aminoacídicas mostradas en los alineamientos correspondientes a las Figuras 23 y 24, fue posible diseñar un juego de cebadores específico para Caspasa-3 de *M. corti* y otro específico para Bcl-2 del mismo organismo (Apéndice 2). En dichos alineamientos se puede visualizar, señalados mediante rectángulos, las regiones de las secuencias empleadas para diseñar los cebadores específicos para cada gen.

Con los nuevos juegos de cebadores específicos diseñados para amplificar los genes de Caspasa-3 y Bcl-2 de *M. corti* se llevó a cabo una reacción de PCR tal como se describe en la sección Materiales y Métodos y el resultado que se obtuvo se visualizó mediante geles de agarosa, los cuales se muestran en la Figura 26.

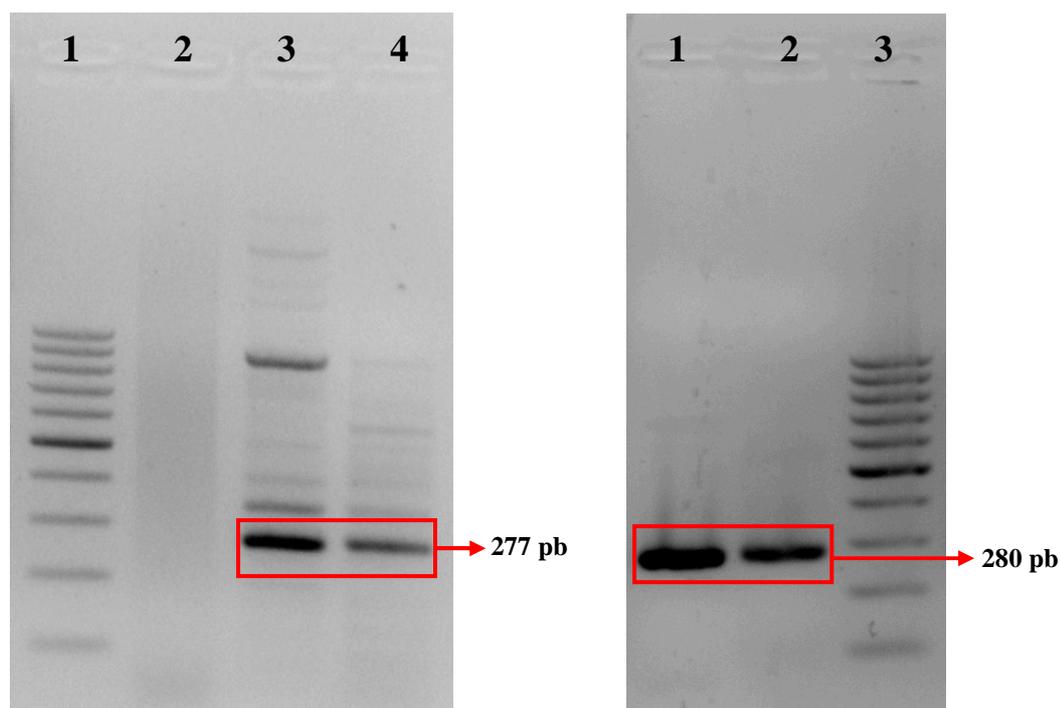


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa 1%, buffer TAE 1x. Señalados con rectángulos rojos se indican los tamaños esperados de las bandas obtenidas.

- Izquierda: fragmento de Caspasa-3 de *M. corti* amplificado por PCR. Carril 1: marcador de peso molecular GeneRuler 100pb DNA Ladder. Carril 2: control negativo de la reacción de amplificación. Carril 3: fragmento obtenido mediante la amplificación a partir de ADNg de *M. corti*. Carril 4: fragmento obtenido mediante la amplificación a partir de ADNc de *M. corti*.

- Derecha: fragmento de Bcl-2 de *M. corti* amplificado por PCR. Carril 1: fragmento obtenido mediante la amplificación a partir de ADNg de *M. corti*. Carril 2: fragmento obtenido mediante la amplificación a partir de ADNc de *M. corti*. Carril 3: marcador de pares de bases GeneRuler 100pb DNA Ladder.

Comparando los tamaños de banda de las muestras obtenidas y las del marcador de pares de bases, es posible pensar que las reacciones de amplificación fueron exitosas, obteniendo los fragmentos del tamaño deseado de los genes en cuestión. Una vez establecido esto, se procedió a ligar los fragmentos obtenidos al vector pGEM-T-Easy y se hizo una transformación en células DH5- α . Luego, mediante la realización de minipreparaciones, se pudo estudiar la presencia de los insertos en el vector; el resultado fue confirmado mediante secuenciación.

Con las secuencias de Caspasa-3 y Bcl-2 obtenidas se realizó un Blastx contra todas las secuencias proteicas almacenadas en la página web de NCBI, así como también se realizó un Blastn contra la secuencia nucleotídica de *M. corti* almacenada en la página web del Instituto Sanger. A través de los resultados logrados se puede ver que hay homología con proteínas Caspasa-3 y Bcl-2 de otros platelmintos, así como también un 99%

de homología respecto a la secuencia nucleotídica de Caspasa-3 de *M. corti* y un 96% respecto Bcl-2. Dichos resultados se muestran en las Figuras 27 y 28.

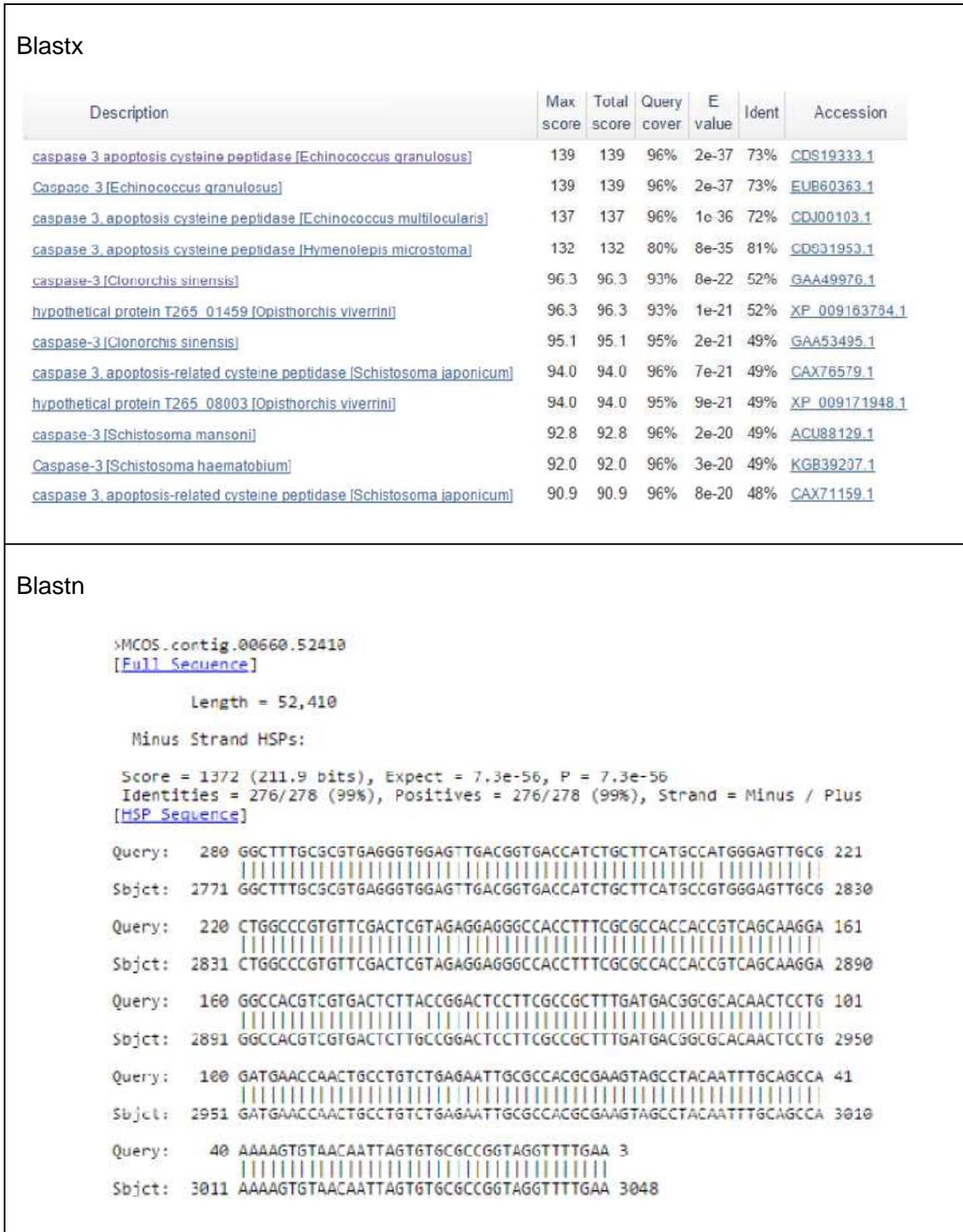


Figura 27. Resultado de los Blast realizados a partir de la secuencia del producto de amplificación obtenido con los cebadores específicos de Caspasa-3 de *M. corti*.

Blastx

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected 0

Alignments [Download](#) - [GenPept](#) [Graphics](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein Smp_072180 [Schistosoma mansoni]	38.1	38.1	26%	0.38	64%	CCD76289.1
<input type="checkbox"/>	Apoptosis regulator R11 [Schistosoma haematobium]	37.7	37.7	26%	0.54	60%	KGB35703.1
<input type="checkbox"/>	Chain A, Bakh3 in Complex With Sja [Schistosoma japonicum]	37.0	37.0	26%	1.1	60%	JQBR_A
<input type="checkbox"/>	BCL2-like apoptosis inhibitor domain-containing protein [Schistosoma japonicum]	37.0	37.0	26%	1.2	60%	CAX69465.1
<input type="checkbox"/>	SjCHGC06286 protein [Schistosoma japonicum]	37.0	37.0	26%	1.2	60%	AAX28099.2
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein BRAFLDRAFT_206502 [Branchiostoma floridae]	32.0	57.8	53%	1.4	44%	XP_002593407.1
<input type="checkbox"/>	uracil phosphoribosyltransferase [Aspergillus oryzae Rib40]	35.4	35.4	79%	3.5	36%	XP_001822461.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein Smp_168470.2 [Schistosoma mansoni]	35.0	35.0	73%	5.3	31%	CCD81036.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein Smp_168470.1 [Schistosoma mansoni]	35.0	35.0	73%	5.4	31%	CCD81035.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein CAPTEDRAFT_187496 [Capitella teleta]	34.3	34.3	37%	5.7	41%	ELT95167.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein MS3_02309 [Schistosoma haematobium]	35.0	35.0	45%	7.1	36%	KGB34109.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein T265_07148 [Opisthorchis viverrini]	34.7	34.7	32%	7.8	45%	XP_009170956.1
<input type="checkbox"/>	BCL2 apoptosis inhibitor domain containing protein [Hymenolepis microstoma]	34.7	34.7	44%	8.1	37%	GDS34235.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: bcl-2-like protein 1 [Crassostrea gigas]	28.5	55.1	59%	8.6	42%	XP_011449013.1
<input type="checkbox"/>	Apoptosis regulator R1 [Crassostrea gigas]	28.5	55.1	59%	9.4	42%	EKC20905.1
<input type="checkbox"/>	BCL2-like apoptosis inhibitor domain-containing protein [Schistosoma japonicum]	34.7	34.7	46%	9.6	38%	CAX83013.1
<input type="checkbox"/>	apoptosis regulator BAX [Clonorchis sinensis]	34.3	34.3	32%	9.7	45%	GAA29319.2

Blastn

>MCOS.scaffold.00475.66954
[\[Full Sequence\]](#)

Length = 66,954

Minus Strand HSPs:

Score = 1316 (203.5 bits), Expect = 2.5e-53, P = 2.5e-53
 Identities = 270/281 (96%), Positives = 270/281 (96%), Strand = Minus / Plus
[\[HSP Sequence\]](#)

```

Query:   281 CCCAGCCACCCTGTTCAACTATGAAGGTCTTAAGGCAACGATCTATGAAAGAGGCGGTAA 222
          |||
Sbjct: 30942 CCCAGCCACCCTGTTCAACTATGAAGGTCTTAAGGCGACGATCTATGAAAGAGGCGGTAA 31001

Query:   221 GATCGACTAGTTTATTCAAGGACTGTAATCGTGATTAGCTTTGANNNNNNNGGCAGCA 162
          |||
Sbjct: 31002 GATCGACTAGTTTATTCAAGGACTGTAATCGTGATTAGCTTTGATTTTTTT-GGCAGCA 31060

Query:   161 CTTTGAAGTATGGCAAACATGGAACGATCCGACCCCAATTGACATGCTCGAACAGATTC 102
          |||
Sbjct: 31061 CTTTGAAGTATGGCAAACATGGAACGATCCGACCCCAATTGACATGCTCGAACAGATTC 31120

Query:   101 TCGAGGACATTGGAGTAGCTAGTCAGCACATGTTCAATATCCTTATCAAAAACNCCATCG 42
          |||
Sbjct: 31121 TCGAGGATATTGGAGTAGCTAGTCAGCACATGTTCAATATCCTTATCAAAAACACCATCG 31180

Query:    41 ACAAGCTGAAAAGTAGGTGCGTAGTTGGGAAGACTTCGGAA 1
          |||
Sbjct: 31181 ACAAGCTGAAAAGTAGGTGCGTAGTTGGGAAGACTTCGGAA 31221
  
```

Figura 28. Resultado de los Blast realizados a partir de la secuencia del producto de amplificación obtenido con los cebadores específicos de Bcl-2 de *M. corti*.

En vista de los resultados obtenidos podemos concluir que la estrategia empleada para la amplificación de los genes Caspasa-3 y Bcl-2 fue satisfactoria. Los clones obtenidos presentaron una buena homología respecto a las proteínas de otros platelmintos así como también, respecto a la secuencia nucleotídica de *M. corti*.

Mediante las secuencias del transcriptoma de tetratiridios de *M. corti* facilitados por la Msc. Alicia Costáble, fue posible estudiar la estructura de los genes Caspasa-3 y Bcl-2. Además, tal como se mencionó en la Sección Materiales y Métodos, también se pudo realizar un análisis filogenético mediante la secuencia proteica de los mismos. Los resultados se pueden observar en las Figuras 29 y 30.

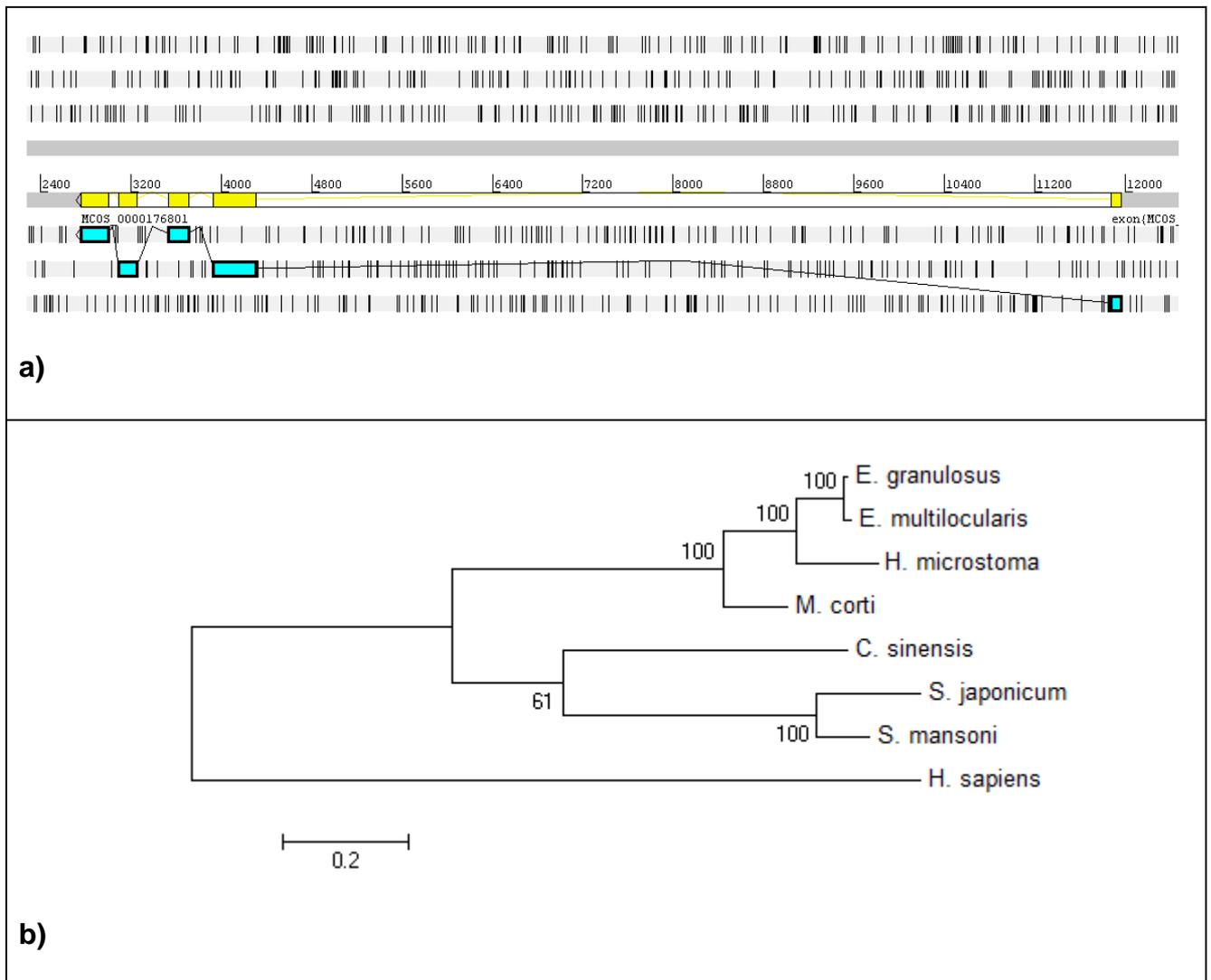


Figura 29. a) Estudio de la estructura del gen Caspasa-3 de *M. corti* a través de Artemis, donde en amarillo se muestran los exones en una de las hebras de ADN, y en celeste se muestran dichos exones en los diferentes marcos de lectura. b) Árbol filogenético resultante

utilizando el método de máxima verosimilitud donde se detallan las relaciones evolutivas entre la Caspasa-3 de *M. corti* y dicha proteína correspondiente a los siguientes organismos: *E. granulosus* – GeneDB: EgrG_000462900; *E. multilocularis* - GenBank: CDJ00103.1; *H. microstoma* - GeneDB: HmN_000393000; *C. sinensis* - GenBank: GAA49976.1; *S. mansoni* - GenBank: ACU88129.1; *S. japonicum* - GenBank: CAX71159.1. Como grupo externo se utilizó la secuencia proteica de Caspasa-3 de *Homo sapiens* – GenBank: CAC88866.1. Se muestran valores de bootstrap basados en 100 réplicas.

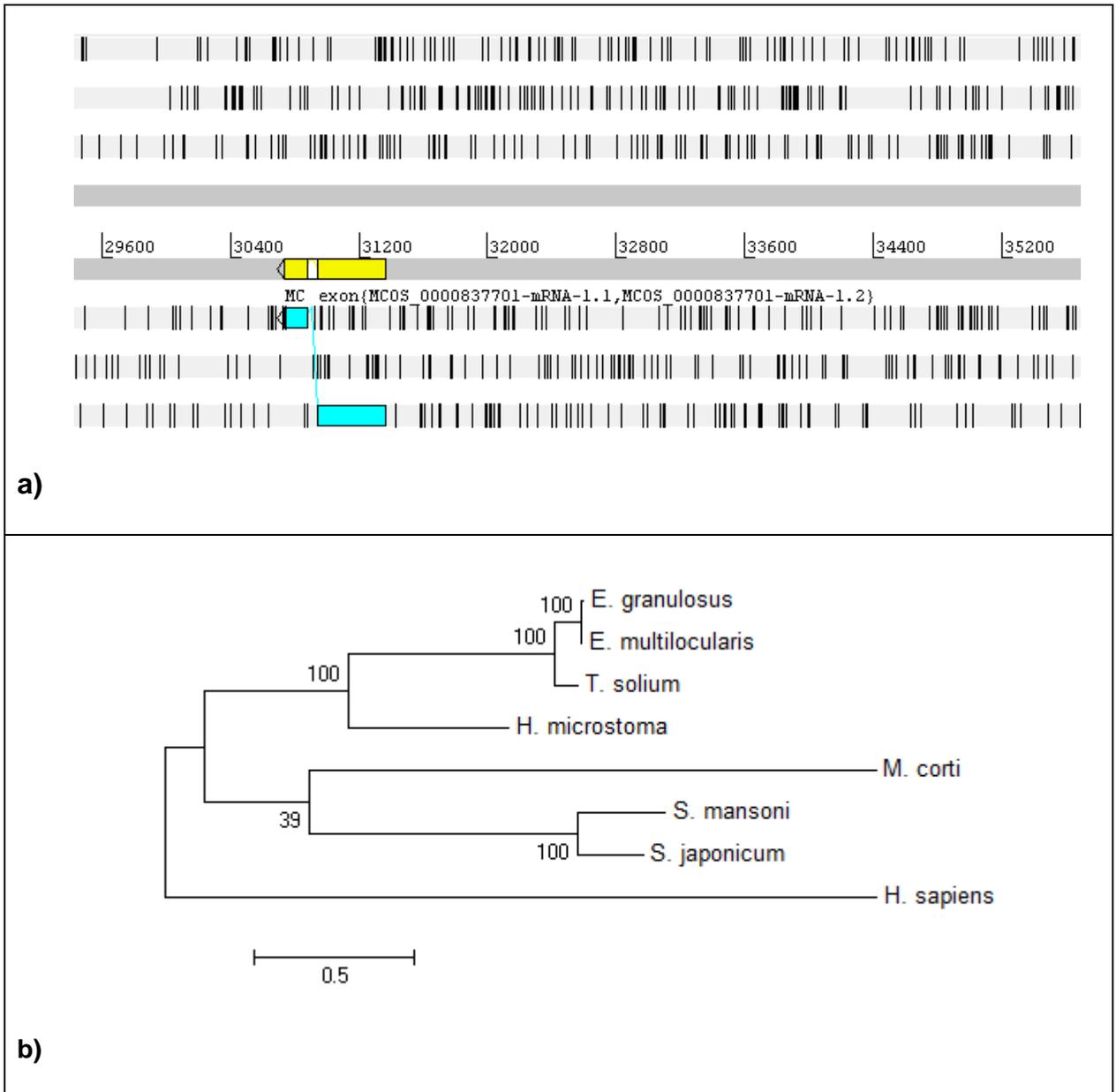


Figura 30. a) Estudio de la estructura del gen Bcl-2 de *M. corti* a través de Artemis, donde en amarillo se muestran los exones en una de las hebras de ADN, y en celeste se muestran dichos exones en los diferentes marcos de lectura. b) Árbol filogenético resultante utilizando el método de máxima verosimilitud donde se detallan las relaciones evolutivas entre Bcl-2 de *M. corti* y dicha proteína correspondiente a los siguientes organismos: *S. mansoni* - GeneDB: Smp_041630; *S. japonicum* – GenBank: CAX83013.1; *T. solium* – GeneDB: TsM_000181900;

E. granulosus – GeneDB: EgrG_000365100; *E. multilocularis* – GenBank: CDS36546.1 y *H. microstoma* – GeneDB: HmN_000575800. Como grupo externo se utilizó la secuencia proteica de Bcl-2 de *Homo sapiens* – GenBank: NP_000624.2. Se muestran valores de bootstrap basados en 100 réplicas.

En la Figura 29 se puede observar que el gen Caspasa-3 está formado por 5 exones de diferentes tamaños, coincidiendo con lo observando en otros platelmintos. Respecto a la proteína Caspasa-3 de *M. corti* podemos decir que, como era de esperar, tiene una relación cercana con las de otros cestodos, por ejemplo *H. microstoma*, *E. granulosus* y *E. multilocularis*, presentando un ancestro en común.

En la Figura 30, a pesar de que el transcrito no está completo, podemos observar exones en diferentes marcos de lectura. Por otra parte, analizando el árbol filogenético correspondiente a la proteína Bcl-2 de *M. corti* podemos ver que la misma se agrupa junto a la de trematodos, como son *S. mansoni* y *S. japonicum*, sin embargo el valor de bootstrap obtenido es bajo.

Teniendo este resultado en cuenta se decidió repetir el análisis filogenético mediante diferentes métodos (Jones et al. w/freq., y Le Gascuel). Al igual que en los análisis anteriores, el soporte de las ramas en el árbol se obtuvo mediante la prueba estadística “bootstrap” con 100 réplicas y los valores superiores a 50% de soporte fueron considerados como válidos. Los resultados se muestran en la Figura 31 y 32.

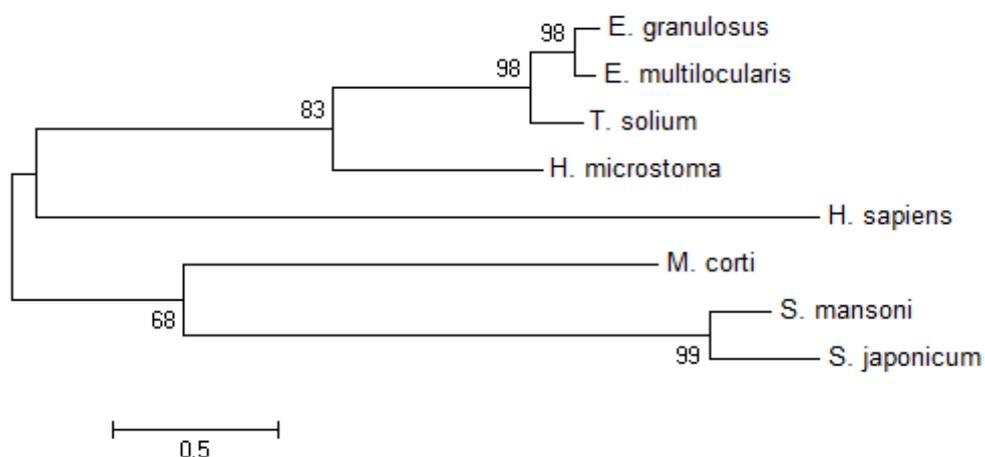


Figura 31. Árbol filogenético resultante utilizando el método de máxima verosimilitud y el método evolutivo Jones et al. w/freq., donde se detallan las relaciones evolutivas entre Bcl-2 de *M. corti* y dicha proteína correspondiente a los siguientes organismos: *S. mansoni* - GeneDB: Smp_041630; *S. japonicum* – GenBank: CAX83013.1; *T. solium* – GeneDB:

TsM_000181900; *E. granulosus* – GeneDB: EgrG_000365100; *E. multilocularis* – GenBank: CDS36546.1 y *H. microstoma* – GeneDB: HmN_000575800. Como grupo externo se utilizó la secuencia proteica de Bcl-2 de *Homo sapiens* – GenBank: NP_000624.2. Se muestran valores de bootstrap basados en 100 réplicas.

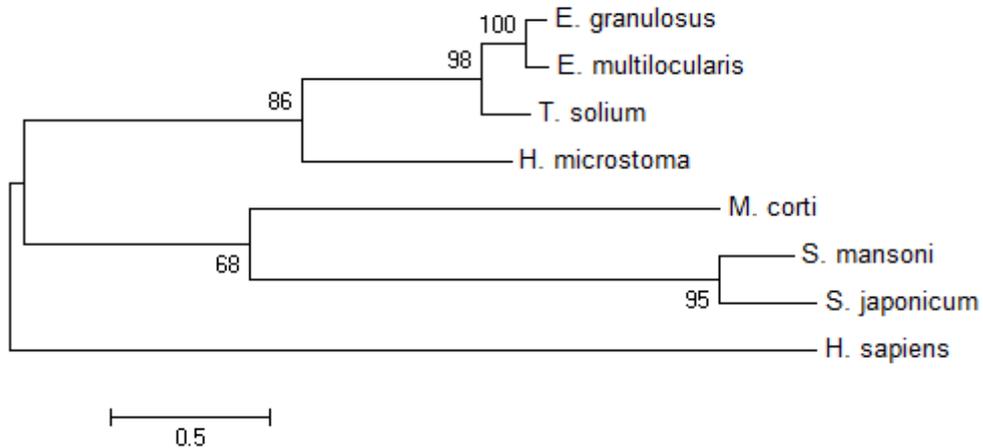


Figura 32. Árbol filogenético resultante utilizando el método de máxima verosimilitud y el método evolutivo Le Gascuel, donde se detallan las relaciones evolutivas entre Bcl-2 de *M. corti* y dicha proteína correspondiente a los siguientes organismos: *S. mansoni* - GeneDB: Smp_041630; *S. japonicum* – GenBank: CAX83013.1; *T. solium* – GeneDB: TsM_000181900; *E. granulosus* – GeneDB: EgrG_000365100; *E. multilocularis* – GenBank: CDS36546.1 y *H. microstoma* – GeneDB: HmN_000575800. Como grupo externo se utilizó la secuencia proteica de Bcl-2 de *Homo sapiens* – GenBank: NP_000624.2. Se muestran valores de bootstrap basados en 100 réplicas.

Si bien en los resultados mostrados en las Figuras 31 y 32 se obtuvo mayor valor de bootstrap, la proteína Bcl-2 de *M. corti* continúa agrupando de manera más cercana a trematodos que a otros cestodos. Es así como se decidió investigar en mayor profundidad y se realizó un árbol filogenético con todos los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 de todos los organismos almacenados en las bases de datos GenBank y GeneDB (resultado no mostrado). Allí se pudo observar que la proteína en estudio se ubica en el mismo grupo que otras proteínas de la familia Bcl-2, agrupando junto a una en particular de *S. japonicum* llamada SjA que se ha visto que forma parte de los miembros de supervivencia de esta familia (Rosenberg, 2011). Con esto podemos concluir que el gen de Bcl-2 de *M. corti* clonado en este trabajo corresponde a un miembro de supervivencia de la Familia Bcl-2.

5.2.b) Estudio de la expresión temporal de los genes Caspasa-3 como marcador de células apoptóticas, y Bcl-2 como marcador de supervivencia celular, a lo largo del desarrollo de *M. corti*.

Una vez clonados los genes de Caspasa-3 y Bcl-2 tal como se mencionó previamente, se procedió a analizar el nivel de transcripción de los mismos a lo largo del desarrollo de *M. corti* mediante retrotranscripción seguida de PCR cuantitativo. Para ello se extrajo ARN de organismos que presentaban distintos niveles de desarrollo, entre tetratiridio (0 y 2 días de cultivo) y gusano adulto segmentado (10 y 16 días de cultivo), incluyendo gusanos alargados (4 días de cultivo), gusanos con principio de segmentación (6 días de cultivo) y gusanos segmentados no adultos (8 días de cultivo).

El objetivo de este ensayo es estudiar la variación de la expresión de dichos genes a lo largo del desarrollo estrobilar mediante la cuantificación de su ARN mensajero (ARNm), y de esta forma ver si es posible establecer una hipótesis sobre el rol de cada gen en la biología del parásito estudiado. Para ello se diseñaron juegos de cebadores específicos ([Apéndice 2](#)) para amplificar los transcritos de Bcl-2 y Caspasa-3.

Para realizar la cuantificación relativa de un ARNm, es necesario contar con un gen de referencia, cuyo nivel de expresión no cambie a lo largo del desarrollo. Experimentos anteriores han determinado que los genes de Gliceraldehído-3-Fosfato deshidrogenasa (GAPDH), Tropomiosina 1 de alto peso molecular (TPM) y el gen para el ARN ribosomal 18S (18S) de *M. corti* tendrían una expresión constitutiva durante el desarrollo estrobilar, por lo que cumplirían con los requisitos para ser utilizados como genes de referencia ([Costábile, 2013](#); [Koziol et al., 2011](#)). Para este trabajo el gen elegido fue GAPDH.

Una vez diseñados los cebadores para Caspasa-3 y Bcl-2, se llevaron a cabo las reacciones de qPCR tal como se detalla en la Sección Materiales y Métodos, obteniéndose así las curvas de amplificación. Éstas últimas se corrigieron por el ruido de fondo y se estableció un valor de fluorescencia arbitrario en la región exponencial de la curva para determinar el valor de ciclo umbral (Ct: ciclo fraccional donde se alcanza un cierto valor arbitrario de fluorescencia). Para analizar si estos genes presentaban variación en su nivel de expresión en las condiciones ensayadas se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct'}$ ([Livak y Schmittgen, 2001](#)), siendo $\Delta Ct' = Ct_{\text{gen A, tiempo x}} - Ct_{\text{gen A, tiempo 0}}$.

Por el método de cálculo de la razón de cambio del nivel de ARNm, es necesario que no haya inhibidores en la reacción, ya que se asume que la eficiencia de amplificación de la reacción es cercana a 1.

La eficiencia es la tasa a la cual el producto de PCR es generado; si la muestra es duplicada durante la fase exponencial de la reacción, entonces la eficiencia es del 100%. Para el cálculo de la misma se deben realizar diluciones seriadas del ADNc a utilizar como molde y verificar que la pendiente del gráfico (Ct) vs Logaritmo de la concentración de ADN (Log [ADNc]) sea cercana a -3,32, lo cual estaría indicando una eficiencia del 100%. Valores más negativos representan reacciones menos eficientes y pendientes más positivas, pueden indicar baja calidad de la muestra.

$$E=10^{(-1/\text{pendiente})}-1.$$

La eficiencia puede verse influenciada por el tamaño del fragmento a amplificar, por su contenido GC, por estructuras secundarias, por la concentración de los componentes de la reacción, por posibles inhibidores de la PCR, así como también por variaciones en el patrón de extracción del ARN.

En la Figura 33 se muestra el gráfico donde se puede visualizar dicho análisis para ambos genes en estudio (Apéndice 3); la eficiencia para GAPDH fue valorada previamente por la MSc. Alicia Costáble.

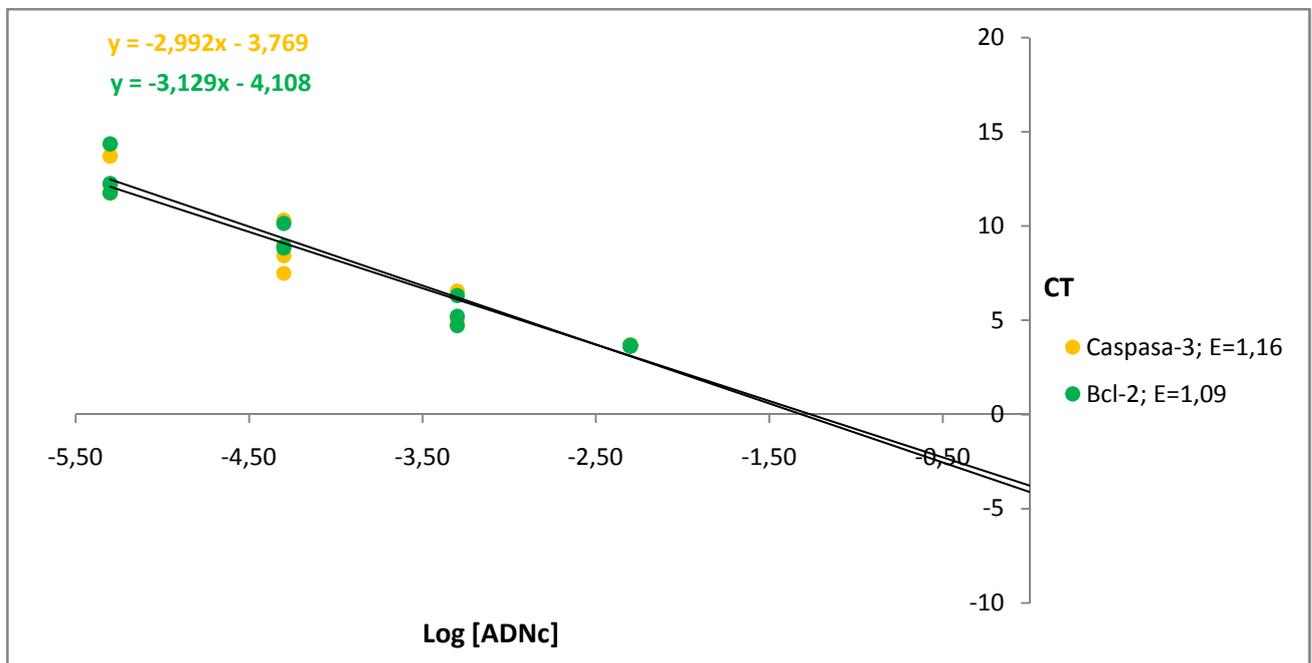


Figura 33. Eficiencia de la reacción de amplificación de los genes Bcl-2 y Caspasa-3 de *M. corti* llevada a cabo por qPCR.

Observando la Figura 33 podemos ver que las condiciones de las cuales se partió no fueron las ideales, sin embargo, aún así se procedió a estudiar los datos obtenidos de las diferentes reacciones realizadas. En una primera instancia se analizó cuantitativamente como variaban los valores cuando se calcula $2^{-\Delta Ct}$ en referencia al día 0 (sin cultivo) o en referencia al día 2 (2 días de cultivo); en la Figura 34 se puede ver el resultado obtenido para las condiciones ensayadas de GAPDH:

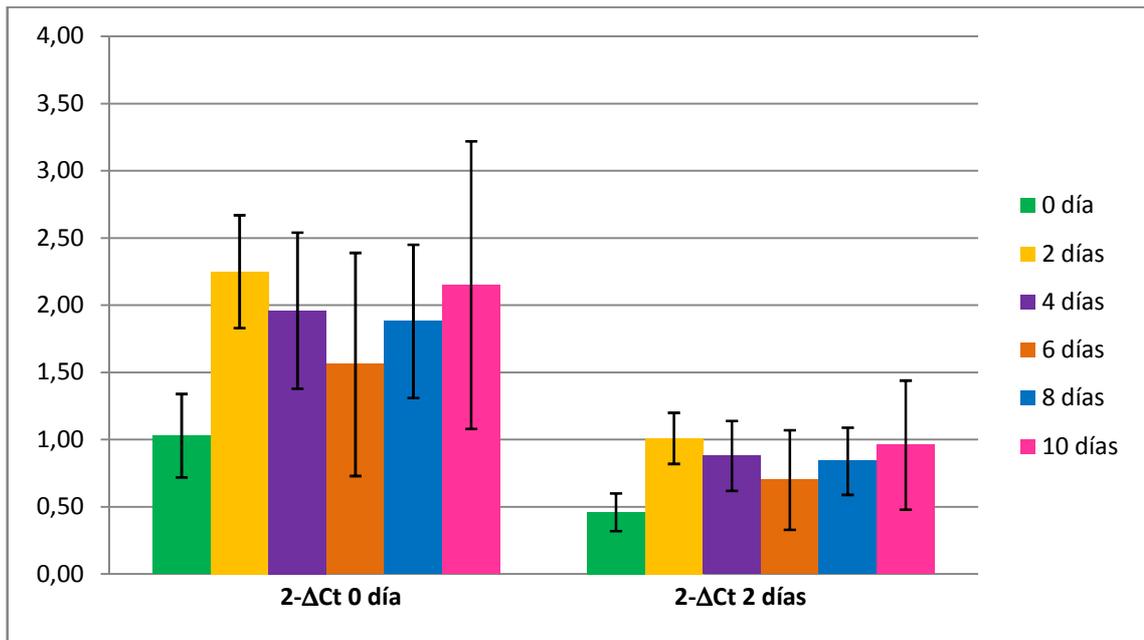
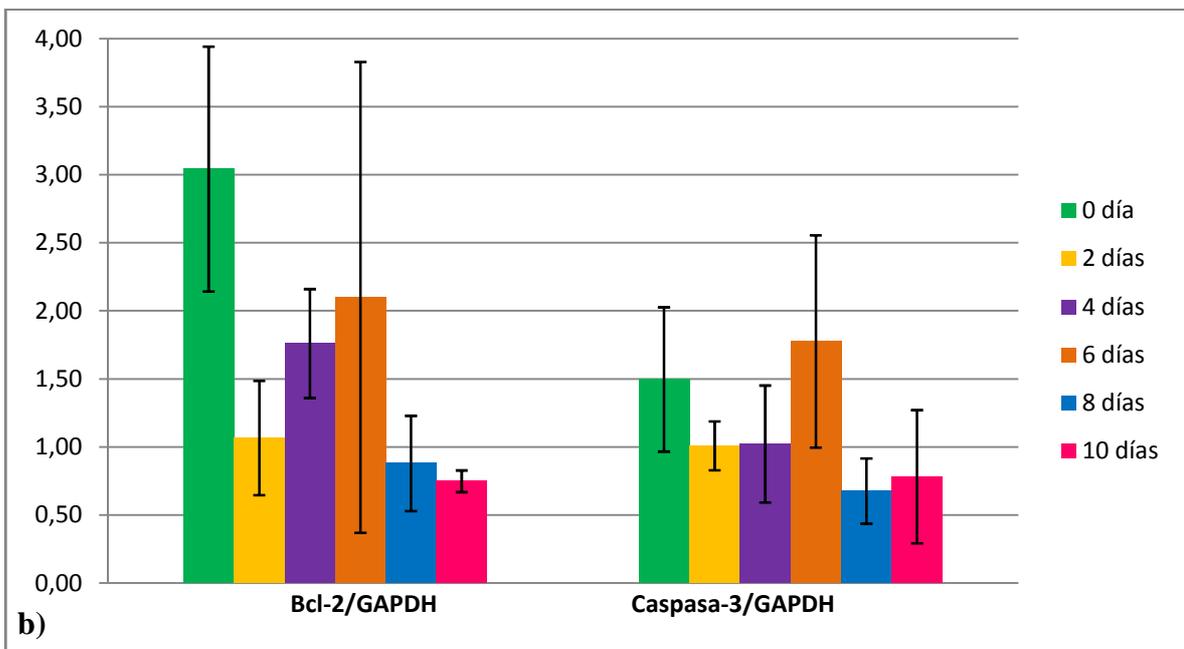
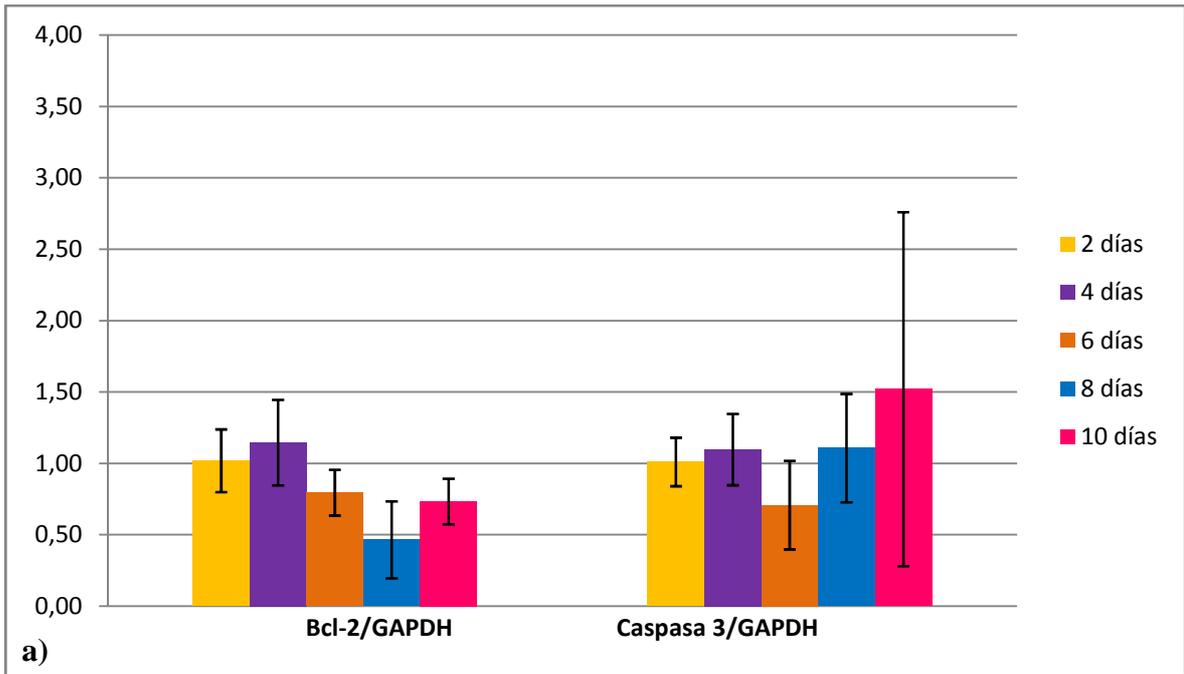


Figura 34. Análisis de la expresión del gen de referencia GAPDH a lo largo del desarrollo de *M. corti*. Se muestran los valores de $2^{-\Delta Ct}$ promedio para cada día respecto a ambas condiciones de referencia estudiadas (normalización respecto a 0 día y a 2 días de cultivo). Las barras representan la desviación estándar de cada grupo.

Como se puede observar en la Figura 34, existe una mayor variación cuando se realiza la normalización respecto al día 0 de cultivo. Normalizando respecto a la condición con 2 días de cultivo, los valores son más cercanos a 1 y por lo tanto sin cambio en el nivel de expresión. Es por este motivo que se decidió realizar los cálculos de la variación de expresión respecto al día 2.

Una vez establecido lo anterior, se procedió a realizar el cálculo de la razón de cambio de Caspasa-3 y Bcl-2 normalizada según GAPDH en tetratiridios (2d de cultivo) a lo largo del desarrollo de *M. corti*. El resultado se muestra en la Figura 35.



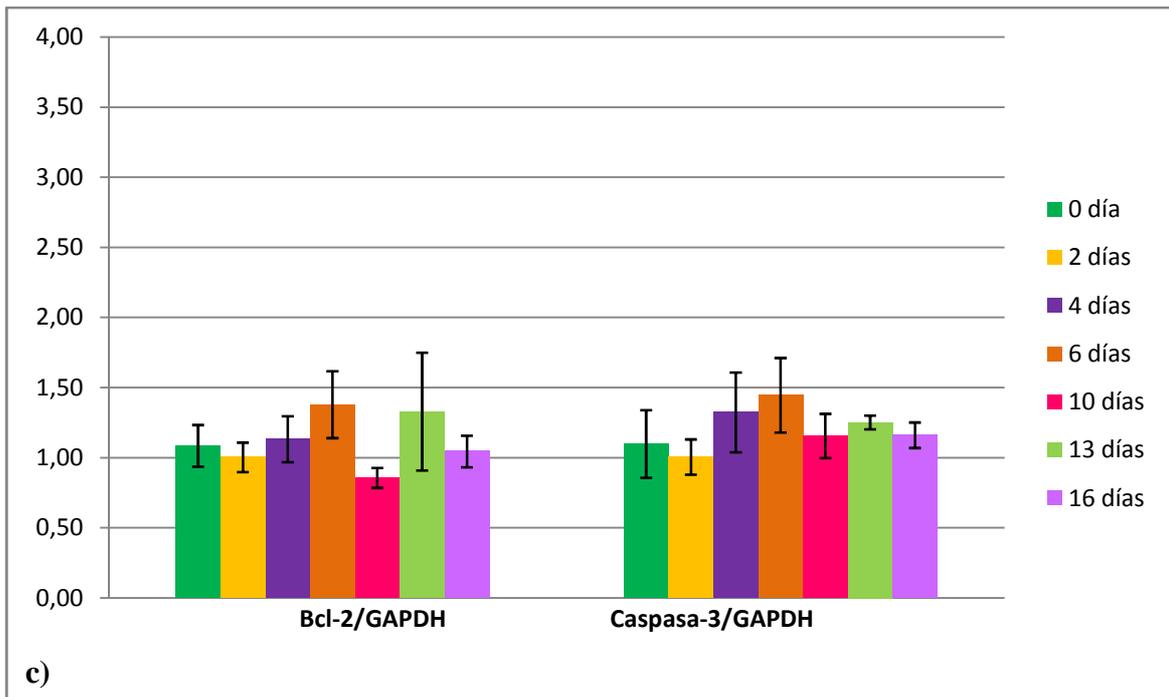


Figura 35. Razón de cambio de los genes Bcl-2 y Caspasa-3 respecto a GAPDH. Se presentan los valores promedios de la variación para cada estadio de desarrollo en 3 experimentos independientes realizados por triplicado (para el a) y el b) se partió de la misma curva de ADNc). La desviación estándar está representada mediante barras de error. Observar que en la Figura c) no se obtuvieron datos para los 8 días de cultivo.

En la Figura 35 se muestra gráficamente la razón de cambio para los genes en estudio en relación a GAPDH durante 3 experimentos independientes. En vista de los resultados obtenidos en la Figura a), se decidió ampliar el estudio de la expresión de los genes Caspasa-3 y Bcl-2 a estadios más y menos desarrollados (0, 13 y 16 días), mostrándose dichos resultados en las Figuras b) y c).

Si bien los resultados obtenidos son dispares, en todos los casos, en lo que se refiere a Bcl-2, se puede ver que los mayores niveles de expresión de este gen en *M. corti* ocurren en los primeros estadios de desarrollo, a los 2, 4 y 6 días de cultivo. Esta situación coincide con la fase de desarrollo donde comienzan a aparecer los segmentos en el organismo, para el pasaje de la fase de tetratiridio a adulto segmentado.

En el caso de 13 días de cultivo del ensayo c), si bien hay un aumento pronunciado en la expresión de Bcl-2 respecto a 10 días de cultivo, la dispersión de los valores es mayor por lo que en base a ello no podemos elaborar conclusiones sobre su expresión. Por otra parte, a los 0 días de cultivo en el ensayo b) se obtuvieron valores más elevados respecto al resto

de los días de cultivo. Esto puede deberse a que estos organismos sin cultivar se almacenaron a 4°C y se encuentran bajo estrés.

Respecto a la expresión de Caspasa-3, podemos ver en el gráfico b) y c) que el mayor nivel de expresión de dicho gen se encuentra a los 6 días de cultivo, disminuyendo a medida que avanza el desarrollo de *M. corti*. Tal como mencionamos anteriormente, en este estadio es donde comienzan a formarse los segmentos del organismo y dicho resultado es concordante con los resultados obtenidos mediante la técnica de TUNEL. Respecto al gráfico a), podemos observar que el máximo nivel de expresión de este gen ocurre a los 10 días de cultivo, sin embargo la dispersión de los valores es mayor.

Los resultados variables que se obtuvieron se pueden deber a que los organismos se vean influenciados por factores ambientales, como la densidad de población y/o factores fisiológicos como requerimientos metabólicos. Es por este motivo que realizar los análisis con un mayor número de réplicas tanto técnicas como biológicas permitirá confirmar los resultados preliminares obtenidos en este trabajo.

Los resultados logrados se relacionan con los obtenidos por [Pellettieri et al., 2010](#) donde se observó que la remodelación de los tejidos en planarias se caracteriza por cambios espaciales y temporales en la apoptosis. Allí se vió que estos organismos son capaces de regular la tasa de apoptosis para promover los cambios morfológicos en el desarrollo de los tejidos en respuesta a diversos estímulos ambientales (por ejemplo, lesiones o disponibilidad de nutrientes). También se vió que la muerte celular está regulada por Bcl-2, determinando su alto grado de conservación evolutiva, ya que se puede encontrar en animales desde *C. elegans* hasta los seres humanos ([Cotter, 2009](#); [Danial y Korsmeyer, 2004](#)).

5.2.c) Estudio de la expresión temporal de los genes Caspasa-3 como marcador de células apoptóticas, y Bcl-2 como marcador de supervivencia celular, en ejemplares irradiados de *M. corti*

Otro estudio realizado, como se mencionó previamente en la sección Materiales y Métodos, fue el análisis de la variación en la expresión de Bcl-2 y Caspasa-3 de tetratiridios de *M. corti* en ejemplares irradiados a diferentes dosis y posteriormente cultivados durante 1 y 5 días, respecto a organismos sin irradiar. En otros organismos se ha comprobado que la irradiación disminuye la proliferación debido a que elimina las únicas células con capacidad proliferativa ([DeMulder et al., 2010](#); [Eisenhoffer et al., 2008](#); [Galloni, 2012](#)).

Para el estudio mencionado se realizaron los cálculos en base a los valores obtenidos para 0 Gy en cada condición de cultivo. En la Figura 36 se presenta de manera gráfica el resultado de dicho experimento:

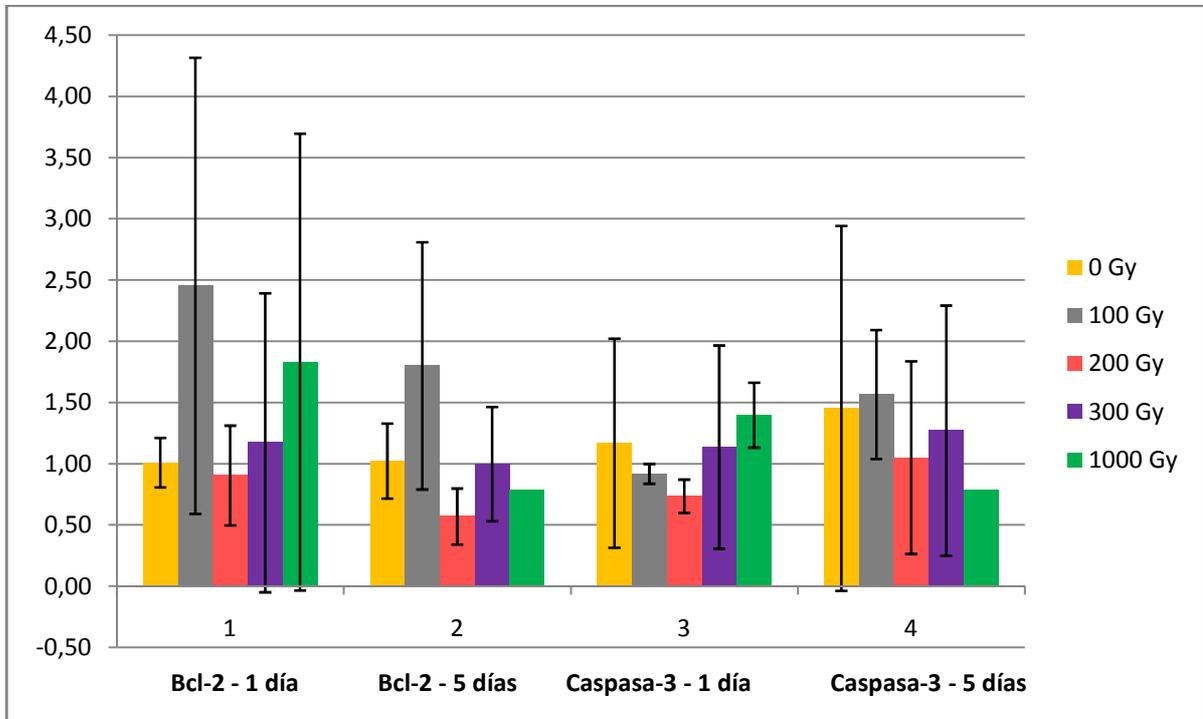


Figura 36. Variación de la expresión de los genes Bcl-2 y Caspasa-3 de *M. corti* irradiados a diferentes dosis y cultivados durante 1 y 5 días, respecto a los organismos no irradiados.

A partir de la Figura 36 y respecto a la expresión de Bcl-2 en *M. corti*, podemos inferir que bajo las diferentes condiciones estudiadas, los niveles de expresión de dicho gen son mayores al día siguiente de la irradiación en relación a los resultados obtenidos luego de 5 días de la misma. En este último grupo se puede observar que, a excepción del valor correspondiente a 100 Gy, todos los niveles de expresión obtenidos son menores al nivel de expresión de los organismos no irradiados.

En lo que respecta a Caspasa-3 podemos observar, en términos generales, que a medida que aumenta la dosis de radiación recibida aumentan también los niveles de expresión en el grupo cultivado durante 1 día luego del proceso de irradiación, mientras que lo contrario ocurre con los ejemplares cultivados durante 5 días luego del mismo proceso. En este último grupo ocurre algo similar a lo explicado previamente para Bcl-2, ya que los niveles de expresión a las dosis máximas recibidas son menores que los valores correspondientes para los organismos no irradiados. Con el fin de

afirmar los resultados obtenidos se podría aplicar la técnica TUNEL en los organismos irradiados de forma de poder visualizar y contabilizar las células apoptóticas de cada condición estudiada.

Para elaborar conclusiones en base a los resultados obtenidos se debería repetir el experimento con un mayor número de réplicas, lo cual permitiría confirmar los resultados obtenidos en este ensayo y así poder comenzar a formular hipótesis sobre los roles de Bcl-2 y Caspasa-3 en el desarrollo de *M. corti*. Además, se debería estudiar el nivel de expresión de dichos genes en tiempos intermedios a los establecidos en este estudio, así como también en estadíos posteriores, ya que podría ocurrir que los estadíos analizados no provean suficiente tiempo para que se altere el patrón de expresión ante el estímulo de la irradiación o que por el contrario, sea lo suficiente para que recuperen su nivel de expresión normal.

Existen estudios similares que han determinado que la sensibilidad a la radiación en platelmintos depende en gran medida de la especie tratada (Lange, 1968). Por ejemplo para *Dugesia ryukyuensis*, la dosis letal equivale a 4.4 - 8.8 Gy (Kobayashi *et al.*, 2008) mientras que para *Dugesia japonica* corresponde a 30 Gy (Salveti *et al.*, 2002, 2005, 2009; Rossi *et al.*, 2006; Orii *et al.*, 1999). Además, se ha observado que luego del proceso de irradiación y debido a la eliminación del sistema de células madre, los organismos son incapaces de llevar a cabo determinados procesos biológicos como la homeostasis, la renovación celular y la regeneración de tejidos (Salveti *et al.*, 2009; Kobayashi *et al.*, 2008; Rossi *et al.*, 2007; Bagnúña *et al.*, 1989; Brøndsted, 1969).

Un estudio sobre *M. lignano* ha demostrado que para eliminar por completo las células madre de dicho organismo es necesario una exposición fraccionada a la radiación de forma de eliminar los neoblastos quiescentes (Bode *et al.*, 2006) que se puedan activar mediante la irradiación (DeMulder *et al.*, 2010). En este estudio se irradió a ejemplares de esta especie y se estudió la curva de supervivencia donde se vió que: 1) la supervivencia es inversamente proporcional a la dosis de radiación administrada (una dosis de 210 Gy resulta letal); 2) sin importar la dosis de radiación aplicada se observa que la supervivencia es casi del 100% durante los primeros 10 días y es seguida de una fuerte caída durante la tercera semana después de la irradiación, (3) la mayoría de los ejemplares tratados que sobreviven a la primeras 3 semanas después de la irradiación se recuperan por completo, recuperando su morfología normal, el comportamiento y la reproducción dentro de las 6 semanas (DeMulder *et al.*, 2010).

En *M. lignano* también se pudo determinar que durante los primeros 10 días luego de la irradiación no se observan cambios en los fenotipos de los ejemplares irradiados, por lo que se cree que las células somáticas no son dañadas y que la muerte del organismo ocurre debido a la no renovación de los tejidos por la depleción de las células madre (DeMulder *et al.*, 2010).

5.2.d) Estudio de la actividad de Caspasa-3 en diferentes estadios de desarrollo de *M. corti*

Otra forma de estudiar la expresión del gen Caspasa-3 de *M. corti* fue a través de la medición de la actividad de su proteína a lo largo de diferentes estadios de desarrollo. Para ello, y con el fin de partir de la misma cantidad de muestra en todas las condiciones estudiadas, se determinó la cantidad a utilizar para cada ensayo mediante la cuantificación del material en balanza de precisión y mediante el uso de un fluorímetro Qubit.

Luego de procesar las muestras tal como se describe en la Sección Materiales y Métodos, se midieron los valores de actividad de la Caspasa-3 en un fluorímetro, así como también la autofluorescencia propia de los reactivos del kit. Una vez determinada la actividad de la proteína en las muestras de ambos grupos estudiados, con y sin inhibidor de Caspasa-3, se calculó la actividad por cada μg de muestra y se graficó en función de los días de cultivo. Los resultados se pueden observar en la Figura 37.

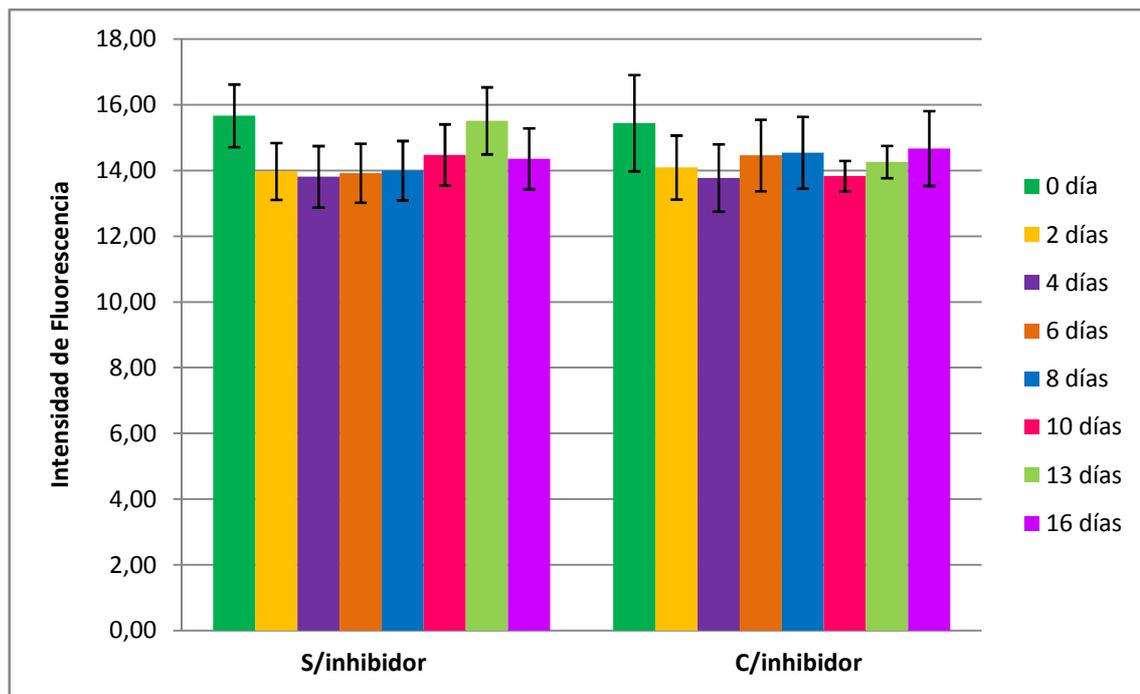


Figura 37. Actividad de Caspasa-3 de las muestras correspondientes a *M. corti* en diferentes estadios de desarrollo, con y sin inhibidor.

Observando los resultados mostrados en la Figura 37 podemos decir que en el grupo tratado sin inhibidor se puede observar que hay un incremento gradual leve a medida que aumentan los días de cultivo de los ejemplares de *M. corti* estudiados. Si bien a los 0 días de cultivo se obtuvieron valores más elevados respecto al resto de los días, esto se puede deber a que los organismos sin cultivar se almacenaron a 4°C y se encuentran bajo estrés.

En referencia a los resultados logrados con el grupo tratado con inhibidor, vemos que los niveles de actividad varían levemente entre sí y a su vez, levemente también respecto al grupo sin inhibidor. A pesar de que este ensayo se realizó una única vez por motivos de tiempo, razón por la cual no se pueden extraer conclusiones, sí podemos decir que en este caso el inhibidor empleado no funcionó adecuadamente para estudiar la actividad de Caspasa-3 en *M. corti*. Una posible causa de ello puede ser que la concentración del mismo no haya sido la adecuada, siendo necesario realizar una curva con diferentes concentraciones de inhibidor y analizar la variación en la actividad de Caspasa-3.

Con el fin de confirmar lo dicho previamente se debería repetir nuevamente el experimento buscando un inhibidor de Caspasa-3 más específico para *M. corti*. Además, con el objetivo de seguir indagando en el

fenómeno de la apoptosis, se podría tratar a un grupo de ejemplares de *M. corti* con un agente proapoptótico y estudiar la actividad de la Caspasa-3 en ellos.

Existe un trabajo similar al realizado cuyo objetivo consiste en caracterizar la función de la apoptosis en las diferentes etapas de desarrollo de *S. japonicum*, sugiriendo que este proceso juega un rol determinante en cada etapa estudiada. En dicho trabajo se analiza la expresión de algunos genes relacionados a este proceso mediante qPCR y a través de la medición de la actividad de las Caspasa-3 y la Caspasa-7. Allí se pudo determinar que la expresión de genes como p53 y Caspasa 7 decrece gradualmente desde el estadio de schistosómula a gusano adulto, mientras que Caspasa-3 y Bcl-2 mantienen su nivel básicamente constante en cada una de las etapas estudiadas. Además, se observó que los gusanos machos presentan niveles superiores de actividad de caspasa que los gusanos hembras (Han *et al.*, 2012).

5.3) Identificación de las Caspasas codificadas en el genoma de *M. corti* que podrían participar en el proceso apoptótico de las células de dicho organismo

Para llevar a cabo este objetivo se procedió, en una primera instancia, a hacer un análisis bioinformático en la base de datos KEGG con el fin de identificar las Caspasas que participan en el proceso apoptótico. Allí se encuentran almacenadas las vías metabólicas de diversos organismos, entre los cuales figura *S. mansoni* como único representante de los platelmintos, sin embargo, aún no se ha publicado dicha vía para este organismo.

A pesar de esta carencia, mediante el estudio de las vías que conducen a la apoptosis en el resto de los organismos, fue posible determinar que, además de la Caspasa-3 previamente amplificada y clonada en *M. corti*, también podrían llegar a participar las Caspasas 6, 7, 8, 9, 10 y 12. A continuación se expone la vía metabólica de la apoptosis para *Homo sapiens*, donde en rojo se recuadran las Caspasas de interés.

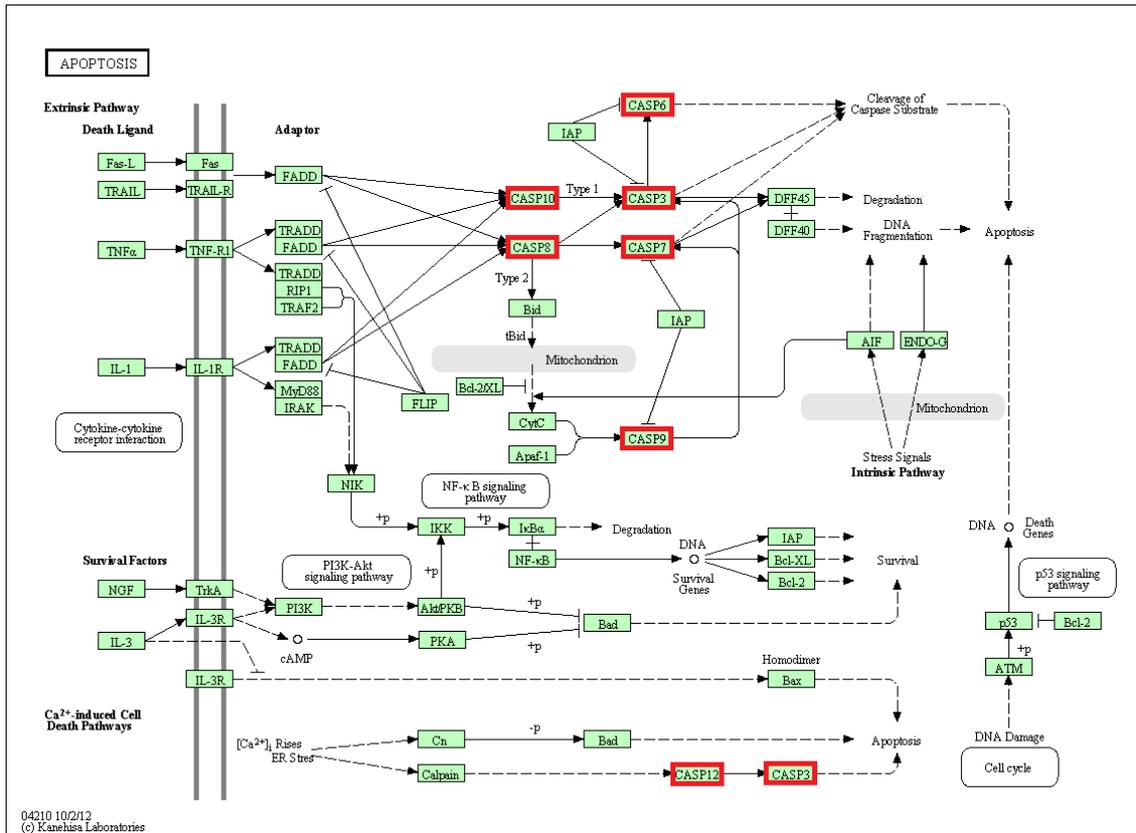


Figura 38. Vía metabólica del proceso apoptótico en *Homo sapiens*. Con recuadros en verde se señalan las moléculas presentes en este organismo mientras que con recuadros en rojo se señala la presencia de diversas Caspasas que participan en esta vía.

Al no estar publicada la vía de la apoptosis para *S. mansoni* en esta base de datos, se dificulta el trabajo en la búsqueda de las proteínas homólogas en el genoma de *M. corti* ya que, por la relación evolutiva cercana que ambos organismos mantienen, podría pensarse que de encontrarse las Caspasas participantes en el primero, también podrían ser codificadas por *M. corti*.

En vista de la dificultad mencionada es que se decidió plantear una búsqueda alternativa de las Caspasas en *M. corti*. La misma consistió, en una primera instancia, en buscar las secuencias aminoacídicas de estas proteínas en otros platelmintos que estén almacenados en bases de datos, para luego realizar alineamientos (resultados no mostrados) y así encontrar regiones conservadas. Y en una segunda instancia, con ellas, llevar a cabo la búsqueda de los homólogos en *M. corti* a través de la herramienta TBlastN.

Mediante la estrategia de búsqueda planteada únicamente se encontraron registros de Caspasa-7 y Caspasa-8 en otros platelmintos. Una vez realizado el alineamiento con las proteínas mencionadas y determinadas

cuáles son las regiones conservadas para cada una de las Caspasas, se procedió a buscar el homólogo de estas proteínas en *M. corti* mediante la realización de un TBlastN. En las Figuras 39 y 40 se muestra el resultado obtenido para las Caspasas estudiadas:

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	Reading Frame	High Score	Sum Probability P(N)	N
MCOS.scaffold.00041.203801	+2	346	8.2e-55	3
MCOS.contig.01357.22378	+2	169	1.3e-12	2
MCOS.contig.00660.52410	-3	178	1.9e-12	1
MCOS.scaffold.00021.258854	-1	148	2.9e-08	1


```

>MCOS.scaffold.00041.203801
[Full Sequence]

      Length = 203,801

      Score = 346 (126.9 bits), Expect = 8.2e-55, Sum P(3) = 8.2e-55
      Identities = 77/139 (55%), Positives = 92/139 (66%), Frame = +2
      [HSP Sequence]

Query:   15 SPCDNDTEASPPVDSVQIAPAVKVEKSFNSKML----MP--PE---SQSDTPSYKROAV 65
          S CD D ++ P VDS + AV V + S+ + P PE SQ T ++ V
Sbjct: 62918 SACDRDVSDDLQVDSAHVTMAVNVRCSSDVFIEHAHFPKPELHQSQEFTVVFHELPTV 63097

Query:   66 EPAVHHRAAASFVYKTRAPRRGTCLIIISVDTFKAALRLPNRPGAGVDLRKLEDTFHFLDF 125
          +P + H + ASFVYKTRAPRRGTCLIIISVDTFK AL LP RPGA VDL+ LEDTF LDF
Sbjct: 63098 DPLLSHHSTASFVYKTRAPRRGTCLIIISVDTFKALCLPCRPGADVLDKLNLEDTFQSLDF 63277

Query:   126 DVKIYQNPSAAQILSIVEA 144
          DVK YQNP+AA I +I+EA
Sbjct: 63278 DVKSYQNPTAAMITAIIEA 63334

      Score = 283 (104.7 bits), Expect = 8.2e-55, Sum P(3) = 8.2e-55
      Identities = 51/61 (83%), Positives = 56/61 (91%), Frame = +1
      [HSP Sequence]

Query:   145 ESSVNHADADYFACVILTHGDDCGSIYGTGPIISLDQLIHPFRGNTCPGLAGPKMFFIQ 204
          ES+ +HADAD FACVILTHGD+ GS+YGTGPI LDQLIHPFRG+TCP LAGPKMFFIQ
Sbjct: 63856 ESTASHADADCFACVILTHGDEGGSVYGTGPIIHLQLIHPFRGDTCPGLAGPKMFFIQ 64035

Query:   205 V 205
          V
Sbjct: 64036 V 64038

```

Figura 39. Resultado del TBlastN realizado con la región conservada de las siguientes Caspasas-7 en los siguientes organismos: *S. mansoni* - GenBank: ACU88130.1; *S. japonicum* - GeneDB: Sjp_0039420; *H. sapiens* - GenBank: AAH15799.1; *T. soium* (1) - GeneDB: TsM_000625800; *T. colium* (2) - GeneDB: TsM_000122200.

```

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:
Reading High Smallest
Frame Score Probability
P(N) N
MCOS.contig.01357.22378 +2 1025 2.4e-159 4
MCOS.scaffold.00339.83778 -3 268 1.7e-17 2
MCOS.scaffold.00021.258854 -1 182 1.0e-13 2
MCOS.scaffold.00041.263801 +1 135 3.5e-08 4
MCOS.contig.00660.52410 -3 163 1.3e-06 2
MCOS.contig.02015.11032 -3 87 0.59 2

>MCOS.contig.01357.22378
[Full Sequence]
Length = 22,378
Score = 1025 (365.9 bits), Expect = 2.4e-159, Sum P(4) = 2.4e-159
Identities = 200/265 (75%), Positives = 219/265 (82%), Frame = +2
[HSP Sequence]
Query: 393 FQNRGGCDKDEKRVKVFVFCGLGFLVKVLRNLSSGEMRSELAFIGNKTDHSAYDAFIAVIM 452
F NRGGCDKDEKRVKVF LGLVKVLRNLSSGEMRSEL FIG KTDH+AYD F+AV+M
Sbjct: 2686 F*NRGGCDKDEKRVKVFVFDLGLGFLVKVLRNLSSGEMRSELKFIGRKTQHTAYDCFAVAVM 2785

Query: 453 THGGLGELYGVNGDAFPVHQLTDFTAERCPSLAGKPKLFFIQACRGDEYQLGYALPATG 512
HGGLGELYGVNGDAFPVHQLT DFTAE+CPSLAGKPKLFFIQACRGDEYQLGYALP
Sbjct: 2786 AHGGLGELYGVNGDAFPVHQLTDFDFAEKCPSLAGKPKLFFIQACRGDEYQLGYALPVQS 2965

Query: 513 NTEDAVTSMPGSAIPNPLOIGVTQXXXXXXXXXXXXXXXXXPAIIVAALKPRKQRLVVPNYAD 572
N E+ P + NP ++ +PAI AAKLPRKQRLV++AD
Sbjct: 2966 NAEE-----PPQVVTNPPRV----ESASNPVYISSGKDOEPAIAAALKPRKQRLVPSFAD 3118

Query: 573 FLLSYATLAGFKAORDPQGSYIYIQTLCHELMHGRSRSLLDIVT5VHREVSEKVFREVE 632
FLLSYATLAGFKAORD +QGS+YIQTLCHEL++SR RSLLDIVT5VHREVSE+VRE +
Sbjct: 3119 FLLSYATLAGFKAORDAKQGSMYIQTLCHELVYGRVRSLLDIVT5VHREVSEKVFREAD 3288

Query: 633 SPDEEGTIVFQDTPEVRHILTRHWQF 657
SP+ EGI+FQDTPEVRHILTRHWQF
Sbjct: 3299 SPDEEGTIVFQDTPEVRHILTRHWQF 3373

Score = 296 (109.3 bits), Expect = 2.4e-159, Sum P(4) = 2.4e-159
Identities = 75/178 (42%), Positives = 96/178 (53%), Frame = +2
[HSP Sequence]
Query: 138 NNYAMARLLCSYGAPRHSNHCQGTTPFALAKYVLRNTEKMTKLLASFSPTSSNT--SVT 195
++YAMARLLCSYGA PR SHN QGDTP L+KYVLRN+KMTKLL+SFSP155 + S
Sbjct: 1430 SSYAMARLLCSYGARPRQSHNSQGTPLVLSKYVLRNSKMTKLLSFSPTSSPQSKRSTV 1609

Query: 196 DNFEDONEETRIKEDAEAPMLKPPSPTEFLRRVAKASEVDS5SC--RKLQQLIRXXXXX 253
ED + +ED +P+ P ES+L AK+S VDS +L+T +
Sbjct: 1610 STSEIDIDAIONTEEDAVILPVLP----ESSLNLAKSSTVDSGAIATRLRRTGVVAAMAT 1777

Query: 254 XXXXXXXXXXXXXXXXSPSGEASN--GESTLG---RPLYHREVKSTIPQGLDMKVD5 306
+ S S+ T+G RPLYHRE K +G + V S
Sbjct: 1778 KVAALSPRNDIAETMSTSSLPLSSVDNETIGVSPRPLYHREKVAFTGKKSIFVGS 1951

Score = 229 (85.7 bits), Expect = 2.4e-159, Sum P(4) = 2.4e-159
Identities = 39/48 (81%), Positives = 45/48 (93%), Frame = +1
[HSP Sequence]
Query: 347 VHRPRPVSLKARRKASLMDPVEYYPMASPRRGICVINNMITYMHPKQF 394
VH+PRPV L+ARRKAS MDP EYYPMASP+RGICV+INNMITYMHP+FF
Sbjct: 2389 VHQPRPVPLRARRKASLMDPSEYYPMASPKRGICVINNMITYMHPQFR 2532

```

Figura 40. Resultado del TblastN realizado con la región conservada de las siguientes Caspasas-8 en los siguientes organismos: *E. granulosus* – GeneDB: EgrG_000417900; *E. multilocularis* – GenBank: CDS36952.1; *S. mansoni* - GeneDB: Smp_141270; *T. solium* – GeneDB: TsM_000713200; *H. microstoma* - CDS29941.1

Observando las Figuras 39 y 40 podemos inferir que las Caspasas-7 y 8 se encuentran codificadas en el genoma de *M. corti* pudiendo ser partícipes del proceso apoptótico en dicho organismo. La primera de ellas, tal como se mencionó en la Introducción, corresponde al grupo de Caspasas ejecutoras, mientras que la segunda al grupo de las iniciadoras del proceso apoptótico.

Como se mencionó previamente, por medio de la estrategia ya descrita fue posible encontrar presentes en otros platelmintos a las Caspasas 3, 7 y 8;

sin embargo esto no ocurrió para las Caspasa 6, 9, 10 y 12. Es así como se decidió realizar alineamientos de estas últimas Caspasas correspondientes a otros organismos con el motivo de encontrar regiones conservadas y así proceder de la misma manera que se hizo para la búsqueda de las Caspasas-7 y 8. En las Figuras 41 a 44, se muestran los resultados obtenidos por medio de la realización de un TblastN de algunas proteínas contra el genoma de *M. corti*.

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	Reading Frame	High Score	Smallest Sum Probability P(N)	N
MCOS.contig.01357.22378	+2	189	8.9e-20	2
MCOS.scaffold.00041.203801	+1	171	1.7e-15	2
MCOS.scaffold.00021.258854	-1	203	4.3e-15	1
MCOS.contig.00660.52410	-3	150	2.4e-14	3


```

>MCOS.contig.01357.22378
[Full Sequence]

      Length = 22,378

      Score = 189 (71.6 bits), Expect = 8.9e-20, Sum P(2) = 8.9e-20
      Identities = 46/147 (31%), Positives = 77/147 (52%), Frame = +2
      [HSP Sequence]

Query:   5  RRGTNADRNLTRRFSDLGFVEVKCFNDLRAEELLLKIHEVSTSS-HIDADCFICVFLSHG 63
          R G + D + + F DLGF VK +L + E+ ++ + + H DCF+ V ++HG
Sbjct: 2615 RGGCDKDEKRVEKVFGLGFLVKVLRNLSSGEMRSELKFIGRKTHTAYDCFVAVVMAHG 2794

Query:   64  EGNHVYAYDAK-IEIQLTGLFKGDKCQSLVVGKPKIFIIQACRGSQHDVP-VVPLDM-VD 120
          +Y + + + LT F +KC SL GKPK+F IQACRG ++ + +P+ +
Sbjct: 2795 GLGELYGVNGDAFPVHQLTFDFTAECPSLAGKPKLFFIQACRGDEVQLGYALPVQSNAE 2974

Query:   121 HQTDKLDNVTQVDAAS--VYTL PAGAD 145
          + N +V++AS +Y + +G D
Sbjct: 2975 EPPQVVTNPPRVESASNPLY-ISSGKD 3052

      Score = 94 (38.1 bits), Expect = 8.9e-20, Sum P(2) = 8.9e-20
      Identities = 18/41 (43%), Positives = 25/41 (60%), Frame = +2
      [HSP Sequence]

Query:   140 LPAGADFLMCYSVAEGYYSHRETVNGSWYIQDLCEMLARYG 180
          +P+ ADFL+ Y+ G+ + R+ GS YIQ LC L YG
Sbjct: 3101 VPSFADFLLSYATLAGFKAQRDAKQGS MYIQLCHHLEVY G 3223

```

Figura 41. Resultado del TblastN realizado con la región conservada de las siguientes Caspasas-6 en los siguientes organismos: *M. musculus* – GenBank: EDL12225.1; *X. laevis* - GenBank: NP_001081406.1; *D. pulex* - GenBank: AFI39934.1; *S. litura* - GenBank: AFJ04536.1.

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	Reading Frame	High Score	Smallest Sum Probability P(N)	N
MCOS.contig.01357.22378	+2	304	8.1e-26	1
MCOS.scaffold.00021.258854	-1	220	6.8e-17	1
MCOS.contig.00660.52410	-3	131	3.1e-14	3
MCOS.scaffold.00041.203801	+1	124	2.5e-06	4

>MCOS.contig.01357.22378
[\[Full Sequence\]](#)

Length = 22,378

Score = 304 (112.1 bits), Expect = 8.1e-26, P = 8.1e-26
 Identities = 77/229 (33%), Positives = 120/229 (52%), Frame = +2
[\[HSP Sequence\]](#)

Query: 20 NRRGSNIDCDKLEQRFKALNFIVEVKLNLTQKQIKHALHTLSKK-DHSQYDCCVVIILSH 78
 NR G + D ++E+ F L F+V+V NL+ +++ L + +K DH+ YDC V ++++H

Sbjct: 2612 NRGGCDKDEKRVEKVFGLGFLVKVLRNLSSGEMRSELKFIGRKT DHTAYDCFVAVVMAH 2791

Query: 79 GTEVSHSRFPGAVYGVGDGQCISVQNIITNYLNGQHCPQLQSKPKLFFIQACGGDEKDTGFE 138
 G +YGV+G V +T + CPSL KPCLFFIQAC GDE G+

Sbjct: 2792 GGL-----GELYGVNGDAFPVHQLTFDFTAECPSLAGKPKLFFIQACRGDEYQLGYA 2950

Query: 139 --VSSDEAEP-----SPGGADDQTD--IPXXXXXXXXXXXXEVDKASL-PTPSDILVS 188
 V S+ EP +P + ++ I ++ K L P+ +D L+S

Sbjct: 2951 LPVQSNAAEPPQVVTNPPRVESASNPLYISSGKDEPAIAAAKLPKQRLVPSFADFLLS 3130

Query: 189 YSTFPGYVSWRDPQSGSWYVETLDRILEENAAVHDLATMLTMVNNDVSQ 237
 Y+T G+ + RD + GS Y++TL LE V L ++T V+ +VS+

Sbjct: 3131 YATLAGFKAQRDAKQGSYMIQTLCHHLEVYGRVRSLLDIVTSVHREVSE 3277

Figura 42. Resultado del TblastN realizado con la región conservada de las siguientes Caspasas-9 en los siguientes organismos: *X. laevis* - GenBank: NP_001079035.1; *C. striata* - GenBank: CCW28913.1; *M. musculus* – GenBank: AAH56447.1; *S. frugiperda* - GenBank: AHF70712.1.

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	Reading Frame	High Score	Smallest Sum Probability P(N)	N
MCOS.scaffold.00021.258854	-1	228	6.2e-19	2
MCOS.contig.01357.22378	+2	225	1.9e-17	1
MCOS.scaffold.00041.203801	+1	148	1.5e-13	2
MCOS.contig.00660.52410	-3	118	1.2e-06	2

>MCOS.scaffold.00021.258854
[Full Sequence]

Length = 258,854

Score = 228 (85.3 bits), Expect = 6.2e-19, Sum P(2) = 6.2e-19
Identities = 65/221 (29%), Positives = 115/221 (52%), Frame = -1
[HSP Sequence]

Query: 3 REGTMTDESCLQDVFRLWGF--ETVVNRDCSSDMMLSLQLNLRKDHSMDCVCCILSH 60
R G++ D S LQ +F +G+ E +++ D S + SL + +H++D + +SH
Sbjct: 257933 RVGSLEDVSALQALFSDIGYCVVLLDPDFRS-LDSSLKAFIRSPNHKVDAGGLIVMSH 257757

Query: 61 GQKGSVYIGDQTVLQKEPLNGLKCSSLAEPKLFQACQGNSEQKAVYIESDGD 120
G + +Y DG+ + + +LA KPK QAC+G + + +SD T
Sbjct: 257756 GLQDIYITSDGKLFINDILNVFTNKS L PALAGKPKILFQACRGEEDRGCMLTSDV-T 257580

Query: 121 SGV---IESDAVAVKDS----IPSDADYLMAMSTVPSFVSRYRRTNGSWFIQSLCQNLVQ 173
G+ IE K++ +P +D ++A ST+P FVS+R GSWFIQ L ++ +
Sbjct: 257579 RGIPSPIEFVDAPTKNASHKCLPYMSDCVIAYSTLPGFVSNRCEKQGSWFIQVLV-DVFR 257403

Query: 174 MVPSGYDLVSI LTKVNADVSKKTDALGIKKMPQPAFTLRK 214
S + ++ +LT+VN + +++ K Q+ QP+ TL +
Sbjct: 257402 KYASTFHVLELLTEVNRMRVEESQHREFK-QITQPSNTLTR 257283

Score = 57 (25.1 bits), Expect = 6.2e-19, Sum P(2) = 6.2e-19
Identities = 12/25 (48%), Positives = 15/25 (60%), Frame = -3
[HSP Sequence]

Query: 202 KKQMPQPAFTLRKKVVFPIPKAPAP 226
+KQ+PQ + L K V F IP AP
Sbjct: 169833 QKQIPQKTYGLSKLVEFTIPSRDAP 169759

Figura 43. Resultado del TblastN realizado con la región conservada de las siguientes Caspasas-10 en los siguientes organismos: *C. striata* - GenBank: AGN52667.1; *S. scrofa* - GenBank: BAH57972.1; *H. sapiens* - GenBank: CAD32372.1; *G. morhua* - GenBank: ADG85728.1.

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	Reading Frame	High Score	Smallest Sum Probability P(N)	N
MCOS.contig.01357.22378	+2	132	9.5e-06	1
MCOS.scaffold.00021.258854	-1	140	2.5e-05	2

>MCOS.contig.01357.22378
[Full Sequence]

Length = 22,378

Score = 132 (51.5 bits), Expect = 9.5e-06, P = 9.5e-06
Identities = 37/110 (33%), Positives = 55/110 (50%), Frame = +2
[HSP Sequence]

Query: 87 NRHGSEVDLLGMQDLLES LGYSVVEKVNLTALEMEIVLRLFAARQEHSSDSTILVFMH 146
NR G + D ++ + LG+ V NL++ EM L+ + +H + D + V M+H
Sbjct: 2612 NRGGCDKDEKRVKVFGLGFLVKVLRNLSSGEMRSELKFIGRKTDTHTAYDCFVAVVMAH 2791

Query: 147 GILDGMCVVKHRDQEPDILHDDTILKIFNNRNCQSLREKPKVIMQACRG 196
G L + GV + D P +H T F C SL KPK+ +QACRG
Sbjct: 2792 GGLGELYGV-NGDAFP--VHQLTF--DFTAECPSLAGKPKLFFIQACRG 2926

Figura 44. Resultado del TblastN realizado con la región conservada de las siguientes Caspasas-12 en los siguientes organismos: *M. musculus* - GenBank: AAH28979.1; *R.*

norvegicus - GenBank: NP_569106.1; *M. brandtii* - GenBank: EPQ01865.1; *P. alecto* - GenBank: ELK16528.1.

En vista de los resultados mostrados en las Figuras 41 a 44, y basándonos en los valores de *score* obtenidos en esta primera aproximación, podemos deducir que de las 4 Caspasas buscadas, la única que estaría codificada en el genoma de *M. corti* sería la Caspasa-9, ya que las restantes presentan valores de *score* muy bajos.

De esta forma, se han encontrado 4 Caspasas codificadas en el genoma de *M. corti*, la 8 y la 9 pertenecientes al grupo de las Caspasas iniciadoras, y la 3 y la 7 pertenecientes al grupo de Caspasas ejecutoras. En base a ello podemos pensar que dichas Caspasas podrían participar en el mecanismo molecular del proceso apoptótico de *M. corti*, siendo el mismo similar al de otros platelmintos. En la Figura 45 se muestran las Caspasas mencionadas enmarcadas en el diagrama del proceso apoptótico.

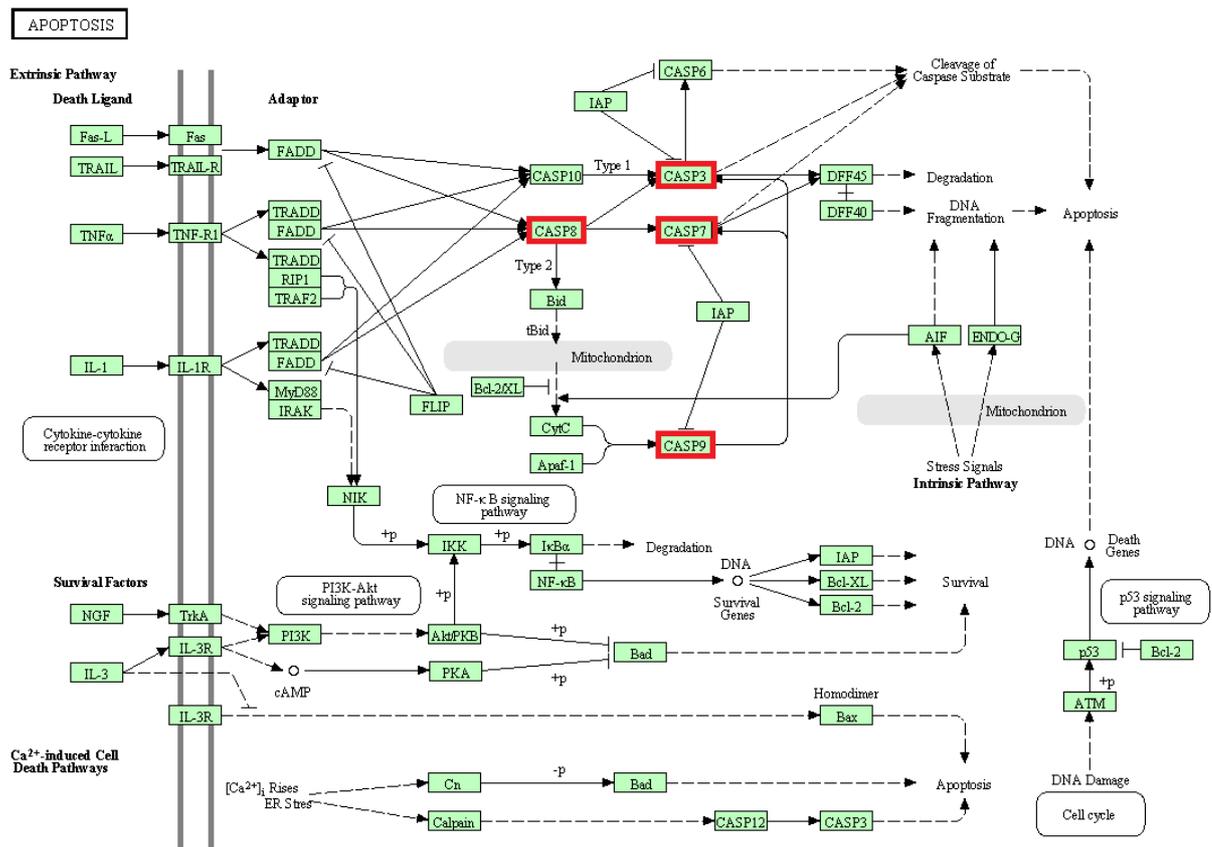


Figura 45. Vía metabólica del proceso apoptótico en *Homo sapiens*. Con recuadros en verde se señalan las moléculas presentes para este organismo mientras que con recuadros en rojo se señala las Caspasas encontradas en el genoma de *M. corti*, las cuales podrían participar en el proceso apoptótico en dicho organismo.

6) Conclusiones y perspectivas

Por medio del análisis de micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión, se logró identificar y caracterizar morfológicamente a las células apoptóticas de *M. corti*. En ellas se pueden observar los eventos característicos del proceso en estudio, presentando características muy similares a las descritas en otros platelmintos.

Mediante la técnica TUNEL se pudo cuantificar y establecer el patrón témporo-espacial de las células apoptóticas a lo largo del desarrollo de *M. corti*, concluyendo que los valores máximos de células apoptóticas se alcanzan en un estadio intermedio de desarrollo (4-6 días de cultivo) del cestodo.

Se propone para un trabajo futuro incorporar la técnica de citometría de flujo al estudio, donde, usando el mismo kit que se empleó para el análisis de TUNEL, se podría llevar a cabo la cuantificación celular logrando información que valide el resultado obtenido en este trabajo.

En referencia a los genes de Caspasa-3 y Bcl-2, los mismos pudieron ser amplificados por PCR y clonados exitosamente, comprobando estos resultados mediante secuenciación. Como trabajo a futuro se podrían generar anticuerpos específicos para este cestodo que reconozcan las proteínas estudiadas, analizar su estructura y determinar si presentan un rol específico en un momento determinado de la biología del parásito.

Hemos generado sondas marcadas con digoxigenina para llevar adelante experimentos de hibridación *in situ* en cortes histológicos seriados del parásito para determinar el patrón de expresión de los genes Caspasa-3 y Bcl-2 en los distintos estadios del ciclo de vida de *M. corti*. Se han conseguido resultados preliminares (no mostrados) sobre los cuales resta profundizar.

Respecto a los estudios de los niveles de expresión de los genes Caspasa-3 y Bcl-2 durante el desarrollo de *M. corti*, si bien se deberían repetir con un mayor número de réplicas, tanto técnicas como biológicas, se lograron buenos resultados primarios pudiendo establecer una relación entre los niveles de expresión de ambos genes. Se pudo determinar que los máximos niveles de expresión de Bcl-2 se alcanzan en los primeros días de cultivo del organismo, mientras que los niveles de Caspasa-3 son mayores en un estadio de desarrollo intermedio, siendo este resultado concordante con los obtenidos mediante la técnica TUNEL en este trabajo y con los obtenidos en otros estudios en planarias.

Por último, en relación a la búsqueda de las Caspasas en el genoma de *M. corti*, habrían indicios de que en el mismo, además de la Caspasa-3, se encuentran codificadas las Caspasas 7, 8 y 9, pudiendo participar del proceso apoptótico del organismo en estudio. Estos resultados alientan a pensar que, al igual que el mecanismo de proliferación celular, el mecanismo molecular del proceso apoptótico también se encuentra conservado en los platelmintos.

Pensamos que los resultados obtenidos en el estudio realizado aportan al conocimiento de la biología de los cestodos, contribuyendo a la generación de estrategias futuras para su erradicación.

Nuestros resultados son la primera contribución a la identificación de células apoptóticas durante el desarrollo estrobilar de un cestodo, y a la caracterización de posibles marcadores moleculares de apoptosis y supervivencia, indicando, como se mencionó previamente, la conservación evolutiva de estos procesos.

Apéndice 1

Soluciones

- Buffer de carga 6X: 0,25% Azul de bromofenol, 0,25% Azul de xilencianol, 30% Glicerol
- Buffer de Lisis: 50mM Tris – HCl pH 8; 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 1mM PMSF (Sigma – Aldrich).
- Buffer TAE 1X: 40 mM Tris base, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA; pH 8,4
- Cuantificación de sondas marcadas con Digoxigenina:
 - a. Buffer 1: 100 mM Tris – HCl pH 7,5, 150 mM NaCl.
 - b. Buffer 2: 0,5% w/v agente de bloqueo (Boehringer) en buffer 1
 - c. Buffer 3: 100 mM Tris – HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂.
 - d. Buffer de revelado: 330 µg/ml NBT (Amresco), 167 µg/ml BCIP (Amresco) en Buffer 3
- Hanks: 9,8 g/l sales de Hanks (Sigma - Aldrich, catálogo número H6136, Lote 087K83012), 350 mg/l NaHCO₃ (Fluka). Se ajustó el pH a 7,5 y se esterilizó por filtración
- Medio LB (Luria – Bertani): 1% Triptona, 0,5% Extracto de Levadura, 1% NaCl, pH 7,0
- Medio RPMI 1640 modificado: 10,4 g/l RPMI (Sigma - Aldrich, catálogo número R4130, Lote 049K8307), 4,2 g/l NaHCO₃ (Fluka), 4,3 g/l Glucosa (Sigma - Aldrich), 4,8 g/l extracto de levadura (Sigma - Aldrich). Se ajustó el pH a 7,5, se agregó gentamicina 50 µg/ml concentración final y se esterilizó por filtración
- PBS (Buffer Fosfato salino): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄. Se ajustó el pH a 7,4 y se esterilizó por autoclavado. En el caso de utilizarlo para extracción de ARN se utilizó PBS en

tabletas (Sigma – Aldrich, catálogo número P4417) disueltas en agua DEPC (Sigma – Aldrich)

- PHEM: 25mM HEPES, 10mM EGTA, 60mM PIPES, 2mM MgCl₂.
Ajustar pH a 7,2 - 7,6 con KOH

- PFA 4%: Paraformaldehído 4% diluido en PBS

Apéndice 2

Secuencia de cebadores degenerados para amplificar el gen de Caspasa-3 de *M. corti*

Caspasa-3		
Cebador Fw: ATHAAYCARCGNGAYTTY	%GC= 22,2	Tm= 42,5°C
Cebador Rv: NARYTCYTGDATRWACCA	%GC= 22,2	Tm= 42,5°C

Secuencia de cebadores específicos para amplificar el gen de Caspasa-3 de *M. corti*

Caspasa-3		
Cebador Fw: GGCTTTGCGCGTGAGGGTGGGA	%GC= 66,7	Tm= 65,2°C
Cebador Rv: TCAAAACCTACCGGCGCACAC	%GC= 57,1	Tm= 60,5°C
Amplificación: 277pb		
Secuencia esperada: GGCTTTGCGCGTGAGGGTGGAGTTGACGGTGACCATCTGCTTCATGCCGT GGGAGTTGCGCTGGCCCGTGTTGCGACTCGTAGAGGAGGGCCACCTTTTCG CGCCACCACCGTCAGCAAGGAGGCCACGTCGTGACTCTTGCCGGACTCC TTCGCCGCTTTGATGACGGCGCACAACTCCTGGATGAACCAACTGCCTGT CTGAGAATTGCGCCACGCGAAGTAGCCTACAATTTGCAGCCAAAAAGTGT ACAATTAGTGTGCGCCGGTAGGTTTTGA		

Secuencia de cebadores específicos para amplificar el gen de Bcl-2 de *M. corti*

Bcl-2		
Cebador Fw: CCCAGCCACCCTGTTCAACTATG	%GC= 56,5	Tm= 59,9°C
Cebador Rv: TTCCGAAGTCTTCCCAACTAC	%GC= 47,6	Tm= 54,2°C
Amplificación: 280pb		

Secuencia esperada:

CCCAGCCACCCTGTTCAACTATGAAGGTCTTAAGGCGACGATCTATGAAAGAGGCGG
TAAGATCGACTAGTTTATTCAAGGACTGTAAATCGTGATTAGCTTTGATTTTTTTGGCA
GCACTTTGAAGTATGGCAAACATGGAAACGATCCGACCCCAATTGACATGCTCGAACA
GATTCTCGAGGATATTGGAGTAGCTAGTCAGCACATGTTCAATATCCTTATCAAAAACA
CCATCGACAAGCTGGAAAGTAGGTGCGTAGTTGGGAAGACTTCGGAA

Secuencia de cebadores específicos de *M. corti* para amplificar un fragmento del gen de Caspasa-3 mediante qPCR

Caspasa-3		
Cebador Fw: GGCTTTGCGCGTGAGGGTGGGA	%GC= 66,7	Tm= 65,2°C
Cebador Rv: CCTCCTTGCTGACGGTGGTGG	%GC= 66,7	Tm= 62,7°C
Amplificación: 122pb		
Secuencia esperada: GGCTTTGCGCGTGAGGGTGGAGTTGACGGTGACCATCTGCTTCATGCCGT GGGAGTTGCGCTGGCCCGTGTTGACTCGTAGAGGAGGGCCACCTTTCC GCCACCACCGTCAGCAAGGAGG		

Secuencia de cebadores específicos de *M. corti* para amplificar un fragmento del gen de Bcl-2 mediante qPCR

Bcl-2		
Cebador Fw: CCCAGCCACCCTGTTCAACTATG	%GC= 56,5	Tm= 59,9°C
Cebador Rv: GCCATACTTCAAAGTGCTGCC	%GC= 52,4	Tm= 56,9°C
Amplificación: 133pb		
Secuencia esperada: CCCAGCCACCCTGTTCAACTATGAAGGTCTTAAGGCGACGATCTATGAAAG AGGCGGTAAGATCGACTAGTTTATTCAAGGACTGTAAATCGTGATTAGCTT TGATTTTTTTGGCAGCACTTTGAAGTATGGC		

Apéndice 3

Figura 33 - Cálculo de eficiencia de cebadores para qPCR

Concentración	Log. (concentración)	Ct Caspasa-3	Ct Bcl-2
5,00E-02	-1,30	3,69	3,78
5,00E-02	-1,30	3,79	3,81
5,00E-02	-1,30	3,74	3,76
5,00E-03	-2,30	3,72	3,69
5,00E-03	-2,30	3,64	3,63
5,00E-03	-2,30	3,66	3,64
5,00E-04	-3,30	5,06	6,31
5,00E-04	-3,30	6,54	4,71
5,00E-04	-3,30	4,73	5,21
5,00E-05	-4,30	8,43	10,13
5,00E-05	-4,30	10,33	8,83
5,00E-05	-4,30	7,50	8,93
5,00E-06	-5,30	12,18	14,35
5,00E-06	-5,30	13,71	12,25
5,00E-06	-5,30	11,74	11,77

Figura 34 – Expresión del gen de referencia (GAPDH)

Muestra	Ct
0 día GAPDH	10,21
0 día GAPDH	10,51
0 día GAPDH	11,10
2 días GAPDH	9,67
2 días GAPDH	9,53
2 días GAPDH	9,16
4 días GAPDH	9,84
4 días GAPDH	9,22
4 días GAPDH	9,98
6 días GAPDH	10,07
6 días GAPDH	10,95
6 días GAPDH	9,32
8 días GAPDH	10,11
8 días GAPDH	9,28
8 días GAPDH	9,83

10 días GAPDH	8,95
10 días GAPDH	10,56
10 días GAPDH	9,44

Figura 35 – Variación de la expresión de Bcl-2 y Caspasa-3 respecto a GAPDH

a)

Días	Ct Bcl-2	Ct Caspasa-3	Ct GAPDH
0	3,85	4,08	3,63
	3,98	3,98	3,78
	3,82	3,77	3,94
2	3,89	3,90	3,78
	3,83	3,92	3,70
	4,06	4,15	3,67
4	3,76	3,73	3,64
	3,86	3,70	3,67
	4,02	3,76	4,21
6	3,76	3,93	3,93
	4,03	3,86	4,07
	4,02	4,01	4,53
8	XXX	3,91	4,04
	XXX	XXX	4,06
	XXX	4,59	XXX
10	4,14	4,05	3,79
	XXX	3,84	3,97
	4,23	3,80	3,71
13	3,75	3,64	3,65
	3,71	3,54	3,63
	3,61	XXX	4,26
16	3,79	3,73	3,75
	4,01	3,89	3,75

b)

Días	Ct Bcl-2	Ct Caspasa-3	Ct GAPDH
2	15,82	14,53	9,53
	15,54	15,19	9,13
	15,04	14,32	9,30
4	15,48	14,02	9,02
	14,65	13,94	8,84
	15,15	15,11	9,45
6	14,55	XXX	8,37
	16,09	14,97	9,50
	16,05	15,71	9,32
8	15,83	14,01	9,28
	16,62	14,75	9,14
	17,45	14,70	9,24
10	15,37	13,03	8,99
	15,40	14,98	8,93
	16,65	XXX	9,63

c)

Días	Ct Bcl-2	Ct Caspasa-3	Ct GAPDH
0	15,63	17,24	10,21
	15,04	16,63	10,51
	15,94	17,94	11,10
2	16,92	16,73	9,67
	15,54	17,04	9,53
	15,37	16,17	9,16
4	15,80	16,62	9,84
	14,57	XXX	9,22
	15,76	17,65	9,98
6	14,53	16,11	10,07
	17,06	16,98	10,95
	15,95	16,70	9,32
8	16,78	17,50	10,11
	15,47	16,89	9,28
	17,25	18,30	9,83
10	15,96	17,04	8,95
	17,56	17,32	10,56
	16,17	17,74	9,44

Figura 36 – Variación de la expresión de Bcl-2 y Caspasa-3 en *M. corti* irradiados respecto a *M. corti* no irradiados

Días	Dosis (Gy)	Ct Bcl-2	Ct Caspasa-3	Ct GAPDH	
1	0	17,55	18,49	11,89	
		18,57	18,27	13,32	
	100	16,26	18,71	12,72	
		17,72	18,26	12,45	
	200	17,96	18,80	12,76	
		18,78	19,05	12,63	
	300	19,40	18,89	12,25	
		17,98	18,54	13,55	
	500	20,10	18,96	12,76	
		16,12	18,51	13,87	
	1000	19,49	18,57	13,07	
		18,32	19,63	14,52	
	5	0	17,25	18,25	11,23
			19,84	18,81	14,44
100		17,27	18,33	12,89	
		18,82	17,97	13,23	
200		17,87	18,42	11,71	
		20,73	18,74	13,73	
300		17,70	17,97	11,41	
		18,71	18,11	13,41	
500		18,63	18,07	11,89	
		19,30	18,68	13,37	
1000		18,68	18,67	12,63	

Figura 37. Intensidad de fluorescencia de las muestras correspondientes a *M. corti* en diferentes estadios de desarrollo, con y sin inhibidor

Experimento	Días							
	0	2	4	6	8	10	13	16
S/inhibidor	535,960	489,162	487,294	477,868	498,700	483,902	519,362	475,937
S/inhibidor	540,424	481,283	484,287	487,454	561,292	550,514	587,574	531,870
S/inhibidor	596,805	538,747	544,983	538,064	554,876	520,250	577,859	534,462
C/inhibidor	493,164	467,526	460,961	475,511	488,281	476,078	496,139	478,408
C/inhibidor	560,336	533,047	522,983	540,783	547,011	507,354	529,751	552,401
C/inhibidor	595,764	521,642	528,420	545,330	533,143	501,958	522,759	544,930

Bibliografía

- Aboobaker, A. A. (2011). Planarian stem cells: A simple paradigm for regeneration. *Trends Cell Biol* 21: 304–311
- Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403–410
- Ashkenazi, A.; Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281: 1305–8
- Ax, P. (1996). *Multicellular Animals - A New Approach to the Phylogenetic Order in Nature* – Vol. I, Berlín. Springer Verlag
- Baguñá, J. (1976). Mitosis in the intact and regenerating planarian *Dugesia mediterranea* n. sp. II. *J Exp Zool* 195: 65–79
- Baguñá, J.; Romero, R. (1981). Quantitative analysis of cell types during growth, degrowth and regeneration in the planarians *Dugesia mediterranea* and *Dugesia tigrina*. *Hydrobiologia* 84: 181–194
- Baguñá, J.; Saló, E.; Auladell, C. (1989). Regeneration and pattern formation in planarians III. Evidence that neoblasts are totipotent stem cells and the source of blastema cells. *Development* 107: 77–86
- Baguñá, J.; Riutort, M. (2004). Molecular phylogeny of the Platyhelminthes. *Can. J. Zool.* 82: 168-193
- Baguñá, J. (2012). The planarian neoblast: the rambling history of its origin and some current black boxes. *Int J Dev Biol* 56: 19–37
- Bangs, P.; White, K. (2000). Regulation and execution of apoptosis during *Drosophila* development. *Dev Dyn* 218: 68-79
- Barrett, N. J.; Smyth, J. D.; Ong, S. J. (1982). Spontaneous sexual differentiation of *Mesocestoides Corti* tetrathyridia *in vitro*. *Int. J. Parasitol.* 12 (4): 315-322
- Berenguer, J. (2006). Manual de Parasitología: Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. 1º ed. España. Universidad de Barcelona
- Bergmann, A.; Agapite, J.; Steller, H. (1998). Mechanisms and control of programmed cell death in invertebrates. *Oncogene* 17: 3215-3223

- Betchaku, T. (1967). Isolation of planarian neoblasts and their behavior *in vitro* with some aspects of the mechanism of the formation of regeneration blastema. *J Exp Zool* 164: 407–433
- Bode, A.; Salvenmoser, W.; Nimeth, K.; Mahlknecht, M.; Adamski, Z.; Rieger, R. M.; Peter, R.; Ladurner, P. (2006) Immunogold-labelled S-phase neoblasts, total neoblast number, their distribution, and evidence for arrested neoblasts in *Macrostomum lignano* (Platyhelminthes, Rhabditophora). *Cell Tissue Res* 325: 577–587
- Bolla, R.I.; Roberts, L. S. (1971). Developmental physiology of cestodes, IX. Cytological characteristics of the germinative region of *Hymenolepis diminuta*. *Journal of Parasitology* 57: 267-277
- Bratton, D. L.; Fadok, V. A.; Richter, D. A.; Kailey, J. M.; Guthrie, L. A.; Henson, P. M. (1997). Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* 272: 26159–65
- Britos, L.; Lalanne, A.I.; Castillo, E.; Cota, G.; Señorale, M.; Marín, M. (2007). *Mesocestoides corti* (syn. *vogae*, cestoda): characterization of genes encoding cysteine-rich secreted proteins (CRISP). *Exp Parasitol.* 116(2):95-102
- Brøndsted, H. V. (1969). Planarian regeneration. 1° ed. Oxford, New York. *Pergamon Press*
- Brusca, R. C.; Brusca, G. J. (2003). *Invertebrates*. Sunderland, Mass., Sinauer Associates.
- Calow, P. (1981). Growth in lower invertebrates. *Comp Anim Nutr* 4: 53–76
- Cascales Angosto, M. (2003). Bases moleculares de la apoptosis. *Anal. Real Acad. Nal. Farm.*, VOL. 69 (1)
- Casciola, R. L.; Rosen, A.; Petri, M.; Schlissel, M. (1996). Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci* 93: 1624–1629
- Cohen, G. M. (1997). Caspases: The executioners of apoptosis. *Biochem J* 326: 1-16
- Cory, S.; Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2: 647–56

- Costábile, A. (2013). Superfamilia SCP/TAPS del cestodo *Mesocestoides corti*. Contribución a la dilucidación del rol de estas proteínas durante el desarrollo estrobilar. Tesis de maestría. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay
- Cotter, T. G. (2009). Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer* 9: 501–507
- Coucouvani, E.; Martin, G. R. (1995). Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. *Cell* 83: 279–287
- Coward, S. J. (1974). Chromatoid bodies in somatic cells of the planarian: observations on their behavior during mitosis. *Anat Rec* 180: 533–545
- Crosbie, P. R. ; Nadler, S. A. ; Platzer, E. G. ; Kerner, C.; Mariaux, J.; Boyce, W. M. (2000). Molecular systematics of *Mesocestoides* spp (cestoda: mesocestoididae) from domestic dogs (*Canis familiaris*) and coyotes (*Canis latrans*). *J Parasitol* 86 (2): 350–357
- Chalar, C. (2010). Biología del corpúsculo calcáreo: una aproximación bioquímica, molecular y celular. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. PEDECIBA - Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay
- Choi, W. Y.; Kim, B. C.; Choi, H. S. (1967). The first case of human infection with tapeworms of the genus *Mesocestoides* in Korea. *Kisaengchunghak Chapchi*, 5 (1): 60-64.
- Danial, N. N.; Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116: 205–219
- De Moraes Mourao, M.; Dinguirard, N.; Franco, G. R.; Yoshino, T. P. (2009). Phenotypic screen of early-developing larvae of the blood fluke, *Schistosoma mansoni*, using RNA interference. *PLoS Negl Trop Dis* 3 (8): e502. doi: 10.1371/journal.pntd.0000502
- DeMulder, K.; Pfister, D.; Kualess, G.; Egger, B.; Seppi, T.; Eichberger, P.; Borgonie, G.; Ladurner, P. (2010). Potential of *Macrostomum lignano* to recover from γ -ray irradiation. *Cell Tissue Res* 339: 527–542
- Debnath, J.; Baehrecke, E. H.; Kroemer, G. (2005). Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy* 1: 66–74
- Delves, P.; Martin, S.; Burton, D.; Roitt, I. (2008). “Inmunología – Fundamentos”. 11^a ed., Editorial Médica Panamericana.

- Domínguez, M. F.; Koziol, U.; Porro, V.; Costábile, A.; Estrade, S.; Tort, J.; Bollati-Fogolin, M.; Castillo, E. (2014). A new approach for the characterization of proliferative cells in cestodes. *Exp Parasitol* 138: 25–9
- Douglas, L.T. (1961). The development of organ systems in nematotaeniid cestodes. I. Early histogenesis and formation of reproductive structures in *Baerietta diana* (Helfer. 1948). *J Parasitol* 47: 669-680
- Egger, B.; Steinke, D.; Tarui, H.; De Mulder, K.; Arendt, D.; Borgonie, G.; Funayama, N.; Gschwentner, R.; Hartenstein, V.; Hobmayer, B.; Hooge, M.; Hroudá, M.; Ishida, S.; Kobayashi, C.; Kuales, G.; Nishimura, O.; Pfister, D.; Rieger, R.; Salvenmoser, W.; Smith, J.; Technau, U.; Tyler, S.; Agata, K.; Salzburger, W.; Ladurner, P. (2009). To be or not to be a flatworm: the acoele controversy. *PLoS One* 4, e5502.
- Eisenhoffer, G. T.; Kang, H.; Sánchez Alvarado, A. (2008). Molecular analysis of stem cells and their descendants during cell turnover and regeneration in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Cell Stem Cell* 3: 327–339
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 35 (4): 495–516
- Eom, K. S.; Kim, S. H.; Rim, H. J. (1992). Second case of human infection with *Mesocestoides lineatus* in Korea. *Korean J Parasitol* 30 (2): 147-150
- Esposti, M. D. (2002). The roles of Bid. *Apoptosis* 7: 433–40
- Extavour, C. G. M. (2007). Evolution of the bilaterian germ line: lineage origin and modulation of specification mechanisms. *Int Comp Biol* 47: 770–785
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791
- Fernández, C.; Gregory, W. F.; Loke, P.; Maizels, R. M. (2002). Full-length-enriched cDNA libraries from *Echinococcus granulosus* contain separate populations of oligo-capped and trans-spliced transcripts and a high level of predicted signal peptide sequences. *Molecular & Biochemical Parasitology* 122: 171-180
- Formigli, L.; Papucci, L.; Tani, A.; Schiavone, N.; Tempestini, A.; Orlandini, G. E.; Capaccioli, S.; Orlandini, S. Z. (2000). Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol* 182: 41–9

- Fraser, A. G. (1999). Programmed cell death in *C. elegans*. *Cancer Metast Rev* 18: 285-294
- Fuchs, Y.; Steller, H. (2011). Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* 147(4): 742-58
- Fuentes, M. V.; Galan-Puchades, M. T.; Malone, J. B. (2003). Short report: a new case report of human *Mesocestoides* infection in the United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 68 (5): 566-567
- Fujise, K.; Zhang, D.; Liu, J.; Yeh, E. T. H. (2000). Regulation of Apoptosis and Cell Cycle Progression by MCL1. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (50): 399458-39465
- Galindo, M.; Paredes, R.; Marchant, C.; Mino, V.; Galanti, N. (2003). Regionalization of DNA and protein synthesis in developing stages of the parasitic platyhelminth *Echinococcus granulosus*. *J Cell Biochem* 90: 294-303
- Galloni, M. (2012). Global irradiation effects, stem cell genes and rare transcripts in the planarian transcriptoma. *Int. J. Dev. Biol.* 56: 103-116.
- Gao, Y. Z. H. (1998). Caspase. *Foreign Med Sci (Mol Biol)* 20: 145–149
- González-Estévez, C.; Saló, E. (2010). Autophagy and apoptosis in planarians. *Apoptosis* 15 (3): 279-92
- Gustafsson, M. K. S. (1990). The cells of a cestode. *Diphyllobothrium dendriticum* as a model in cell biology. *Acta Acad Abo Ser B* 50: 13-44
- Hacker, G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* 301: 5–17
- Hale, A. J.; Smith, C. A.; Sutherland, L. C.; Stoneman, V. E.; Longthorne, V. L.; Culhane, A. C.; Williams, G. T. (1996). Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem* 236: 1-26
- Han, H.; Peng, J.; Gobert, G. N.; Hong, Y.; Zhang, M.; Han, Y.; Fu, Z.; Shi, Y.; Xu, J.; Lin, J.; Tao, J. (2012). Apoptosis phenomenon in the schistosomulum and adult worm life cycle stages of *Schistosoma japonicum*. *Parasitol Int* 62 (2): 100-8
- Handberg-Thorsager, M.; Saló, E. (2007). The planarian nanos-like gene Smednos is expressed in germline and eye precursor cells during development and regeneration. *Dev Genes Evol* 217 (5): 403-11
- Harman, D. (1992). Role of free radicals in aging and disease. *Ann N Y Acad Sci* 673: 126–41

- Hay, E. D.; Coward, S. J. (1975). Fine structure studies on the planarian, *Dugesia*: I. Nature of the "neoblast" and other cell types in noninjured worms. *J Ultrastruct Res* 50: 1–21
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407 (6805): 770-6
- Higuchi, S.; Hayashi, T.; Hori, I.; Shibata, N.; Sakamoto, H.; Agata, K. (2007). Characterization and categorization of fluorescence activated cell sorted planarian stem cells by ultrastructural analysis. *Dev Growth Differ* 49: 571-581
- Hori, I. (1982). An ultrastructural study of the chromatoid body in planarian regenerative cells. *J Electron Microsc* 31:63–72
- Hu, S.; Snipas, S. J.; Vincenz, C.; Salvesen, G.; Dixit, V. M. (1998). Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease. *J Biol Chem* 273: 29648–53
- Igney, F. H.; Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2: 277–88
- Jacobson, M. D.; Weil, M.; Raff, M. C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* 88 (3): 347-54
- Kang, S. J.; Wang, S.; Kuida, K.; Yuan, J. (2002). Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulating apoptosis and cytokine maturation during septic shock response. *Cell Death Differ* 9: 1115–25
- Kawamoto, F.; Fujioka, H.; Mizuno, S.; Kumada, N.; Vogt, M. (1986). Studies on the post-larval development of cestodes of the genus *Mesocestoides*: shedding and further development of *M. lineatus* and *M. corti* tetrathyridia *in vivo*. *Int J Parasitol* 16 (4): 323-331
- Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239–257
- King, R. S.; Newmark, P. A. (2012). The cell biology of regeneration. *J Cell Biol* 196: 553–562
- Koenig, U.; Eckhart, L.; Tschachler, E. (2001). Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. *Biochem Biophys Res Commun* 285: 1150–4
- Kothakota, S.; Azuma, T.; Reinhard, C.; Klippel, A.; Tang, J.; Chu, K.; McGarry, T. J.; Kirschner, M. W.; Kohts, K.; Kwiatkowski, D.J.; Williams, L. T. (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278: 294–8

- Kobayashi, K.; Hashiguchi, T.; Ichikawa, T.; Ishino, Y.; Hoshi, M.; Matsumoto, M. (2008). Neoblast-enriched fraction rescues eye formation in eye-defective planarian “menashi” *Dugesia ryukyuensis*. *Dev Growth Differ* 50: 689–696
- Koziol, U. (2009). Caracterización de células proliferantes en *Mesocestoides corti* (Cestoda), y de genes pumilio como posibles marcadores moleculares de las mismas. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. PEDECIBA - Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay
- Koziol, U.; Castillo, E. (2011). Cell proliferation and differentiation in cestodes. *Transworld Research Network*. 37/661 (2)
- Koziol, U.; Costábile, A.; Domínguez, M. F.; Iriarte, A.; Alvite, G.; Kun, A.; Castillo, E. (2011). Developmental expression of high molecular weight tropomyosin isoforms in *Mesocestoides corti*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 175: 181–191
- Koziol, U.; Rauschendorfer, T.; Zanon Rodriguez, L.; Krohne, G.; Brehm, K. (2014). The unique stem cell system of the immortal larva of the human parasite *Echinococcus multilocularis*. *Evodevo* 5 (1): 10
- Kurosaka, K.; Takahashi, M.; Watanabe, N.; Kobayashi, Y. (2003). Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol* 171: 4672–9
- Ladurner, P.; Rieger, R.; Baguñá, J. (2000). Spatial distribution and differentiation potential of stem cells in hatchlings and adults in the marine platyhelminth *Macrostomum sp.*: a bromodeoxyuridine analysis. *Dev Biol* 226: 231-241
- Lalanne, A.I. (2003). Estudios moleculares del desarrollo de cestodos: genes Hox y LIM-homeobox de *Echinococcus granulosus* y *Mesocestoides corti*. Tesis de maestría. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- Lalanne, A. I.; Britos, L.; Ehrlich, R.; Castillo, E. (2004). *Mesocestoides corti*: a LIM-homeobox gene upregulated during strobilar development. *Exp Parasitol* 108 (3-4): 169-175
- Lange, C. S. (1968). Studies on the cellular basis of radiation lethality. I. The pattern of mortality in the whole-body irradiated planarian (Tricladida, Paludicola). *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 13: 511–530
- Lee, E. F.; Clarke, O. B.; Evangelista, M.; Feng, Z.; Speed, T. P. (2011). Discovery and molecular characterization of a Bcl-2-regulated cell death pathway in schistosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (17): 6999-7003

- Li, H.; Zhu, H.; Xu, C. J.; Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94: 491–501
- Lippens, S.; Hoste, E.; Vandenabeele, P.; Agostinis, P.; Declercq, W. (2009). Cell death in the skin. *Apoptosis* 14: 549 – 569
- Littlewood, D. T. J. (2006). The evolution of parasitism in flatworms. In: Maule, A.G., Marks, N.J. (Eds.), *Parasitic Flatworms. Molecular Biology, Biochemistry, Immunology, Physiology*, CABI Publishing, Oxfordshire.
- Liu, Q. A.; Hengartner, M. O. (1999). The molecular mechanism of programmed cell death in *C. elegans*. *Ann NY Acad Sci.* 887: 92-104
- Liu, F. T.; Newland, A. C.; Jia, L. (2003). Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia. *Biochem Biophys Res Commun* 310: 956–62
- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402–408.
- Lobo, D.; Beane, W. S.; Levin, M. (2012). Modeling planarian regeneration: A primer for reverse-engineering the worm. *PLoS Comput Biol* 8: e1002481
- Locksley, R. M.; Killeen, N.; Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104: 487–501
- Loos-Frank, B. (1991). One or two intermediate hosts in the life of *Mesocestoides (Cyclophyllidea, Mesocestoididae)? Parasitol Res* 77: 726-728
- Malikova, M. A.; Van Stry, M.; Symes, K. (2007). Apoptosis regulates notochord development in *Xenopus*. *Dev Biol* 311 (2): 434-48
- Markell, E. K.; Voge, M.; John, D. T. (1992). *Medical Parasitology*. 7^a ed. México, W. B. Saunders Company.
- Markoski, M. M.; Bizarro, C. V.; Farias, S.; Espinoza, I.; Galanti, N.; Zaha, A.; Ferreira, H. B. (2003). Vitro segmentation induction of *Mesocestoides corti* (Cestoda) tetrathyridia. *J Parasitol* 89 (1): 27-34
- Meier, P.; Evan, G. (1998). Dying like flies. *Cell* 95: 295-298
- Meier, P.; Finch, A.; Evan, G. (2000). Apoptosis in development. *Nature* 407: 796-801

- Merchant, M. T.; Corella, C.; Willms, K. (1997). Autoradiographic analysis of the germinative tissue in evaginated *Taenia solium* metacestodes. *J Parasitol* 83: 363-367
- Metzstein, M. M.; Stanfield, G. M.; Horvitz, H. R. (1998). Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *TIG* 14: 410-416
- Mori, C.; Nakamura, N.; Kimura, S.; Irie, H.; Takigawa, T.; Shiota, K. (1995) Programmed cell death in the interdigital tissue of the fetal mouse limb is apoptosis with DNA fragmentation. *Anat Rec* 242:103–110
- Morita, M.; Best, J. B. (1984). Electron microscopic studies of planarian regeneration. *J Exp Zool* 229: 425–436
- Nakagawa, T.; Zhu, H.; Morishima, N.; Li, E.; Xu, J.; Yankner, B. A.; Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmicreticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403: 98–103
- Newmeyer, D. D.; Bossy-Wetzel, E.; Kluck, R. M.; Wolf, B. B.; Beere, H. M.; Green, D. R. (2000). Bcl-xL does not inhibit the function of Apaf-1. *Cell Death Differ* 7:402–7
- Newmark, P. A.; Reddien, P. W.; Cebria, F.; Sanchez Alvarado, A. (2003). Ingestion of bacterially expressed double-stranded RNA inhibits gene expression in planarians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 1: 11861-11865
- Newmark, P. A.; Sanchez Alvarado, A. (2000). Bromodeoxyuridine specifically labels the regenerative stem cells of planarians. *Dev Biol* 220: 142–153
- Nijhawan, D.; Honarpour, N.; Wang, X. (2000). Apoptosis in neural development and disease. *Annu Rev Neurosci* 23:73–87
- Nimeth, K.; Ladurner, P.; Gschwentner, R.; Salvenmoser, W.; Rieger, R. (2002) Cell renewal and apoptosis in *macrostomum* sp. [Lignano]. *Cell Biol Int* 26 (9): 801-15
- Nimeth, K. T.; Mahlkecht, M.; Mezzanato, A.; Peter, R.; Rieger, R.; Ladurner, P. (2004). Stem cell dynamics during growth, feeding, and starvation in the basal flatworm *Macrostomum* sp. (Platyhelminthes). *Dev Dyn* 230: 91-99
- Nodono, H.; Ishino, Y.; Hoshi, M.; Matsumoto, M. (2012). Stem cells from innate sexual but not acquired sexual planarians have the capability to form a sexual individual. *Mol Reprod Dev* 79 (11): 757-66

- Norbury, C. J.; Hickson, I. D. (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 367–401
- Novak, M. (1972). Quantitative studies on the growth and multiplication of tetrathyridia of *Mesocestoides corti* Hoeppli, 1925 (Cestoda: *Cyclophyllidea*) in rodents. *Can J Zool* 50 (9): 1189-1196
- Oda, E.; Ohki, R.; Murasawa, H.; Nemoto, J.; Shibue, T.; Yamashita, T.; Tokino, T.; Taniguchi, T.; Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288: 1053–8
- Opferman, J. T.; Korsmeyer, S. J. (2003). Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol* 4: 410–5
- Orii, H.; Kato, K.; Umesono, Y.; Agata, K.; Watanabe, K. (1999). The planarian HOM/HOX homeobox gene (plox) expressed along anterior-posterior axis. *Dev Biol* 210: 73–87
- Orii, H.; Sakurai, T.; Watanabe, K. (2005). Distribution of the stem cells (neoblasts) in the planarian *Dugesia japonica*. *Dev Genes Evol* 215: 143-157
- Osborne, B. A. (1996). Apoptosis and the maintenance of homeostasis in the immune system. *Curr Opin Immunol* 8: 245–54.
- Oviedo, N. J.; Newmark, P. A.; Sánchez Alvarado, A. (2003). Allometric scaling and proportion regulation in the freshwater planarian *Schmidtea mediterranea*. *Dev Dyn* 226: 326–333
- Ozawa, T. (1995). Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases. *Biochim Biophys Acta* 1271: 177–89
- Padgett, K. A.; Boyce, W. M. (2005). Ants as first intermediate hosts of *Mesocestoides* on San Miguel Island, USA. *J Helminthol* 79, 67-73
- Pedersen, K. J. (1959). Cytological studies on the planarian neoblast. *Zeitschrift fuer Zellforschung* 50: 799–817
- Pellettieri, J.; Fitzgerald, P.; Watanabe, S.; Mancuso, J.; Green, D. R.; Sánchez Alvarado, A. (2010). Cell death and tissue remodeling in planarian regeneration. *Dev Biol* 338:76–85
- Pellettieri, J.; Sánchez Alvarado, A. (2007). Cell Turnover and Adult Tissue Homeostasis: From Humans to Planarians. *Annu. Rev. Genet.* 41: 83–105

- Peng, J.; Yang, Y.; Feng, X.; Cheng, G.; Lin, J. (2010). Molecular characterizations of an inhibitor of apoptosis from *Schistosoma japonicum*. *Parasitol Res* 106 (4): 967–76
- Peter, R.; Gschwentner, R.; Schürmann, W.; Rieger, R. M.; Ladrner, P. (2004). The significance of stem cells in free-living flatworms: one common source for all cells in the adult. *Journal of Applied Biomedicine* 2: 21-35
- Pfister, D.; De Mulder, K.; Philipp, I.; Kuales, G.; Hrouda, M.; Eichberger, P.; Borgonie, G.; Hartenstein, V.; Ladurner, P. (2007). The exceptional stem cell system of *Macrostomum lignano*: screening for gene expression and studying cell proliferation by hydroxyurea treatment and irradiation. *Front Zool* 4, 9
- Rai, N. K.; Tripathi, K.; Sharma, D.; Shukla, V. K. (2005). Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds* 4: 138–44
- Reddien, P. W. (2011). Constitutive gene expression and the specification of tissue identity in adult planarian biology. *Trends Genet* 27: 277–285
- Reddien, P.W. (2013). Specialized progenitors and regeneration. *Development* 140: 951–957
- Reddien, P. W.; Bermange, A. L.; Murfitt, K. J.; Jennings, J. R.; Sanchez Alvarado, A. (2005). Identification of genes needed for regeneration, stem cell function, and tissue homeostasis by systematic gene perturbation in planaria. *Dev Cell* 8: 635-649
- Reddien, P. W.; Sanchez Alvarado, A. (2004). Fundamentals of planarian regeneration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 725–757
- Renehan, A. G.; Booth, C.; Potten, C. S. (2001). What is apoptosis, and why is it important? *Bmj* 322: 1536–8
- Reuter, M.; Kreshchenko, N. (2004). Flatworm asexual multiplication implicates stem cells and regeneration. *Can J Zool* 82: 334-356
- Rink, J. C. (2013). Stem cell systems and regeneration in planaria. *Dev Genes Evol* 223: 67-84
- Robb, S. M.; Ross, E.; Alvarado, A. S. (2008). SmedGD: the *Schmidtea mediterranea* genome database. *Nucleic Acids Res* 36: D599– D606
- Rosenberg, S. (2011). Mammalian apoptosis in a parasitic worm. *PNAS* 17: 6695-6696

- Rossi, L.; Salvetti, A.; Lena, A.; Batistoni, R.; Deri, P.; Pugliesi, C.; Loreti, E.; Gremigni, V. (2006). DjPiwi-1, a member of the PAZ-Piwi gene family, defines a subpopulation of planarian stem cells. *Dev Genes Evol* 216: 335-346
- Rossi, L.; Salvetti, A.; Marincola, F. M.; Lena, A.; Deri, P.; Mannini, L.; Batistoni, R.; Wang, E.; Gremigni, V. (2007). Deciphering the molecular machinery of stem cells: a look at the neoblast gene expression profile. *Genome Biol* 8: R62
- Rossi, L.; Salvetti, A.; Batistoni, R.; Deri, P.; Gremigni, V. (2008). Planarians, a tale of stem cells. *Cell Mol Life Sci* 65: 16-23
- Ruppert, E.; Barnes, R. (1996). *Zoología de los invertebrados*. 6ª ed. España, Mc Graw-Hill Interamericana.
- Saelens, X.; Festjens, N.; Vande Walle, L.; van Gurp, M.; van Loo, G.; Vandenabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23: 2861–74
- Sakahira, H.; Enari, M.; Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391: 96–9
- Saló, E.; Baguñá, J. (1984). Regeneration and pattern formation in planarians. I. The pattern of mitosis in anterior and posterior regeneration in *Dugesia (G) tigrina*, and a new proposal for blastema formation. *J Embryol Exp Morphol* 83: 63–80
- Salvetti, A.; Rossi, L.; Deri, P.; Batistoni, R. (2000). An MCM2-related gene is expressed in proliferating cells of intact and regenerating planarians. *Dev Dyn* 218: 603-614
- Salvetti, A.; Lena, A.; Rossi, L.; Deri, P.; Cecchettini, A.; Batistoni, R.; Gremigni, V. (2002). Characterization of DeY1, a novel Y-box gene specifically expressed in differentiating male germ cells of planarians. *Gene Expr Patterns* 2: 195–200
- Salvetti, A.; Rossi, L.; Lena, A.; Batistoni, R.; Deri, P.; Rainaldi, G.; Locci, M. T.; Evangelista, M.; Gremigni, V. (2005). DjPum, a homologue of *Drosophila* Pumilio, is essential to planarian stem cell maintenance. *Development* 132: 1863-1874
- Salvetti, A.; Rossi, L.; Bonuccelli, L.; Lena, A.; Pugliesi, C.; Rainaldi, G.; Evangelista, M.; Gremigni, V. (2009). Adult stem cell plasticity: neoblast repopulation in non-lethally irradiated planarians. *Dev Biol* 328: 305–314

- Sanchez Alvarado, A.; Newmark, P. A. (1999). Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 5049-5054
- Sanchez Alvarado, A.; Newmark, P. A.; Robb, S. M.; Juste, R. (2002). The *Schmidtea mediterranea* database as a molecular resource for studying platyhelminthes, stem cells and regeneration. *Development* 129: 5659-5665
- Sánchez Alvarado, A.; Reddien, P. W.; Newmark, P.; Nusbaum, C. (2003). Proposal for the sequencing of a new target genome: white paper for a planarian genome project. Project. http://genome.wustl.edu/images/uploads/Whitepaper/Schmidtea_mediterranea_WP.pdf
- Sasidharan, V.; Lu, Y. C.; Bansal, D.; Dasari, P.; Poduval, D.; Seshasayee, A.; Resch, A. M.; Graveley, B. R.; Palakodeti, D. (2013). Identification of neoblast- and regeneration-specific miRNAs in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *RNA* 19: 1394–1404
- Sato, K.; Shibata, N.; Orii, H. (2006). Identification and origin of the germline stem cells as revealed by the expression of nanos-related gene in planarians. *Dev Growth Differ* 48: 615–628
- Savill, J.; Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407: 784–8
- Slee, E. A.; Adrain, C.; Martin, S. J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 276: 7320–6
- Specht, D.; Voge, M. (1965). Asexual Multiplication of *Mesocestoides* Tetrathyridia in Laboratory Animals. *J Parasitol* 51: 268-272
- Sperandio, S.; de Belle, I.; Bredesen, D. E. (2000). An alternative, non-apoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 14376–81
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, FilipSKI A, and Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*: 30 2725-2729.
- Tran, M. H.; Freitas, T. C.; Cooper, L.; Gaze, S.; Gatton, M. L.; Jones, M. K.; Lovas, E.; Pearce, E. J.; Loukas, A. (2010). Suppression of mRNAs Encoding Tegument Tetraspanins from *Schistosoma mansoni* results in impaired tegument turnover. *PLoS Pathog* 6 (4): e1000840

- Tyler, S.; Hooge, M. (2004). Comparative morphology of the body wall of flatworms (Platyhelminthes). *Can J Zool* 82: 194–210
- Vaux, D. L.; Korsmeyer, S. J. (1999). Cell death in development. *Cell* 96: 245-254
- Ventura Gallegos, J. L.; Gómez González, E. O.; Zentella Dehesa, A. (1999). Caspasas: Una cascada de proteasas implicadas en la muerte celular por apoptosis. BEB. Boletín de educación Bioquímica, Méjico. 18 (4): 153-165
- Vernooy, S. Y.; Copeland, J.; Ghaboosi, N.; Griffin, E. E.; Yoo, S. J.; Hay, B. A. (2000). Cell death regulation in *Drosophila*: conservation of mechanism and unique insights. *J Cell Biol* 150: F69-76
- Wagner, D. E.; Wang, I. E.; Reddien, P. W. (2011). Clonogenic neoblasts are pluripotent adult stem cells that underlie planarian regeneration. *Science* 13: 811–816
- Wang, Y.; Zayas, R. M.; Guo, T.; Newmark, P. A. (2007). Nanos function is essential for development and regeneration of planarian germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 5901–5906
- Waseem, N. H.; Lane D. P. (1990). Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J Cell Sci* 96: 121-9
- Webster, J. D. (1949). Fragmentary studies on the life history of the cestode *Mesocestoides latus*. *J Parasitol* 35: 83-90
- Wenemoser, D.; Reddien, P. W. (2010). Planarian regeneration involves distinct stem cell responses to wounds and tissue absence. *Dev Biol* 344: 979–991
- Wickens, M.; Bernstein, D. S.; Kimble, J.; Parker, R. (2002). A PUF family portrait: 3'UTR regulation as a way of life. *Trends Genet* 18: 150-157
- Wikgren, B. J.; Gustafsson, M.; Knuts, G. (1971). Primary Anlage Formation in Diphyllbothriid Tapeworms. *Z Parasitenkd* 36: 131-139
- Wilmer, P. G. (1990). Invertebrate relationships. Patterns in animal evolution. Cambridge University Press, Cambridge
- Yang, E.; Zha, J.; Jockel, J.; Boise, L. H.; Thompson, C. B.; Korsmeyer, S. J. (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80: 285–91

Young, N. D.; Campbell, B. E.; Hall, R. S.; Jex, A. R.; Cantacessi, C.; Laha, T.; Sohn, W. M.; Sripa, B.; Loukas, A.; Brindley, P. J.; Gasser, R. B. (2010). Unlocking the transcriptomes of two carcinogenic parasites, *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini*. *PLoS Negl Trop Dis* 4 (6): e719. doi: 10.1371/journal.pntd.0000719

Zayas, R. M.; Hernández, A.; Habermann, B.; Wang, Y.; Stary, J. M.; Newmark, P. A. (2005). The planarian *Schmidtea mediterranea* as a model for epigenetic germ cell specification: analysis of ESTs from the hermaphroditic strain. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 18491–18496

Zha, J.; Harada, H.; Yang, E.; Jockel, J.; Korsmeyer, S. J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87: 619–28

Zhou, Y.; Zheng, H.; Chen, Y.; Zhang, L.; Wang, K. (2009). The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host–parasite interplay. *Nature* 460 (7253): 345–351

Zuzarte-Luis, V.; Hurlle, J. M. (2005). Programmed cell death in the embryonic vertebrate limb. *Semin Cell Dev Biol* 16: 261–269