

Universidad de la República Oriental del Uruguay
Facultad de Ciencias
PEDECIBA

Tesis de Doctorado

Genes con Homeobox en *Echinococcus granulosus* Estudios Morfológicos y de Expresión

Claudio Martínez Debat

Tribunal:

Dra. Cristina Arruti
Dr. Juan José Cazzulo
Dr. Norbel Galanti
Dr. José Sotelo
Dr. Arnaldo Zaha

Orientador:

Dr. Ricardo Ehrlich

Sección Bioquímica
Facultad de Ciencias
UdelaR

Montevideo

Octubre 2004



Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a mi Familia, mis Maestros y a Lisette (*in memoriam*).

Agradecimientos

A tod@s y cada un@ de mis compañer@s de la Sección Bioquímica de la FC, en especial a mis colegas del Lab. 304: Cora Chalar, Adriana Esteves, Estela Castillo, Verónica Fernández, Gabriela Alvite, Lucía Canclini, quienes colaboraron directamente conmigo en distintas etapas de este trabajo;

a Mónica Marín, Mario Señorale; Toto Sanguinetti, todo ATGen y CTAG; Madelón Portela; *Coya* Sotelo, Beatriz Garat; todos ellos testigos y en distintos grados partícipes de este largo camino recorrido.

A mis estudiantes y pasantes

A los miembros del tribunal, por sus constructivos aportes.

Por su colaboración en distintas etapas de esta tesis, a:

Alvaro Novello, sección Genética, FC;

Rodrigo Ponce, Invertebrados, FC;

Mario Piaggio, Micología, FC;

Felo García-Rodríguez, Hugo Inda, Laura del Puerto, UNCIEP, FC;

Héctor Musto, *Yuyo* Romero, Ale Zavala y Hugo Naya, Biomatemáticas, FC;

Luis Elbert y Gabriel, DIRAC, FC;

Enzo Grosso y Verónica Korenko, Ecología del piso 8, FC;

Rodolfo Wettstein y la División Biología Molecular, IIBCE;

Andrés Saralegui y Roberto Stock, IBT-UNAM, Cuernavaca, Morelos, México; Norbel Galanti y Rodolfo Paredes, Fac. de Medicina, Universidad de Chile;

Cecilia Fernández; Guillermo Oliver;

Claudio Scazzocchio, Université Paris-Sud, Orsay, France; Georges Bosquet, Université Claude Bernard, Lyon, France; Sylvia King, decanato de FC; Uriel, Marcos y Thelmo, Instituto de Biología, FC; PEDECIBA, CSIC, CONICYT-BID, MEC, CEE, RTPD *Network*.

A quienes me apoyaron y a quienes me pusieron piedras en el camino, pues estimularon mi decisión de culminar esta etapa.

A Ricardo Ehrlich, por su insistente impulso y apoyo.

A *Euterpe*, en sus diferentes manifestaciones.

A mis amigos.

A Rocío

Índice del trabajo	Página
Resumen	0
Introducción	1
Materiales y Métodos	20
Resultados	
1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de <i>E. granulosus</i>	
1.a. Genes con homeobox en <i>E. granulosus</i>	34
1.b. <i>Eghbx4</i>	39
1.c. <i>Eghbx5/EgLIM</i>	49
1.d. <i>Eghbx6</i>	65
1.e. <i>Eghbx3/Stalker</i>	71
2. Expresión de <i>Eghbx3/Stalker</i> en diferentes etapas del desarrollo de <i>E. granulosus</i> (I)	
2.a. <i>Stalker</i> en el protoescólex	90
2.b. <i>Stalker</i> en el gusano adulto	97
3. Morfología	
3.a. Morfología de la <i>yema</i>	106
3.b. Morfología del brote temprano	113
3.c. Morfología del brote elongado	116
3.d. Conteo Nuclear	121
4. Expresión de <i>Eghbx3/Stalker</i> en diferentes etapas del desarrollo de <i>E. granulosus</i> (II)	
4.a. <i>Stalker</i> en la <i>yema</i>	138
4.b. Relación entre <i>Stalker</i> y la proliferación en las <i>yemas</i>	141
4.c. <i>Stalker</i> en el brote	145
Discusión	152
Conclusiones finales y perspectivas	174
<i>Postfacio</i>	176
Bibliografía citada	177
Anexo	184

Resumen del Trabajo

Los genes con homeobox se encuentran presentes en todos los metazoarios, y sus productos están involucrados en el establecimiento y control de patrones morfológicos durante el desarrollo embrionario temprano. Asimismo, participan en la especificación de destinos celulares en etapas posteriores del desarrollo. La hidatidosis representa un problema sanitario a nivel mundial, y en el Uruguay constituye una zoonosis de carácter endémico. El agente etiológico de la enfermedad hidática es el platelminto cestode *Echinococcus granulosus*. En este trabajo, estudiamos la expresión de un gen con homeobox (*Eghbx3/Stalker*) en distintos estadios del parásito, mediante la técnica de hibridización *in situ* e *in toto*, encontrando que puede jugar un rol clave en la morfogénesis temprana del protoescólex (la forma larvaria metacesode). Su expresión, en característicos anillos que sugieren un proceso de difusión a partir de un evento focal inicial, está asociada a procesos de proliferación de la capa germinativa que darán lugar a la aparición de protoescólices. *Stalker* podría estar incluido entre los factores que determinan las opciones morfológicas en las larvas de los Cestodes, las cuales plantean interesantes problemas en relación a la determinación del número y la polaridad de los eventos de proliferación y diferenciación. En la tenia adulta, la expresión de *Stalker* aparece entre las ventosas y luego en la genitalia en maduración. Se discuten estos resultados en un contexto evolutivo general, enfatizando las aparentes homologías con otros sistemas modelo, y posibles estrategias de control del ciclo parasitario. Asimismo, presentamos aspectos novedosos acerca de la morfología durante las primeras etapas del desarrollo del protoescólex de *E. granulosus*. Realizamos un análisis de los eventos que llevan a la aparición de las estructuras visibles de la larva metacestode, presentando en detalle aspectos vinculados a la citodiferenciación y citoproliferación, y relacionándolos con la expresión de *Stalker*. Por último, analizamos las secuencias genómicas de otros tres genes con homeobox (*Eghbx4*, 5 y 6), discutiendo la importancia del hallazgo de este tipo de genes en un organismo que ocupa una posición filogenética clave para la comprensión de la evolución del plan corporal de los metazoarios.

Introducción

El Sistema en estudio y el contexto biológico

“Since the developmental process is inherited, the genome must contain the regulatory programs with which to control the pattern of genetic activity . . . We feel that to explain the magnitude of the functional and structural stage in evolution it is necessary to postulate changes in the regulatory apparatus “
(Britten & Davidson, 1971).

Una síntesis evolutiva nueva, que intenta explicar la macro y micro evolución, está emergiendo, enfocándose en tres aspectos morfológicos de la biología que los paradigmas anteriores dejaron de lado: embriología, relaciones filogenéticas y homología. En esta síntesis naciente, la acción de los genes vinculados al desarrollo e involucrados en la especificación y el crecimiento celular son críticos en la aparición de nuevos taxones (Gilbert *et al.*, 1996). En adición al descubrimiento de las remarcables homologías de los genes con homeobox y de sus dominios de expresión, se han puesto de manifiesto homologías de procesos que apoyan muchas de las anteriores homologías estructurales. Vías de desarrollo homólogas son encontradas en numerosos procesos embrionarios, y en regiones discretas, en los llamados campos morfogenéticos (revisado en De Robertis *et al.*, 1991). Estos campos aparecen como la interfase entre genotipo y fenotipo. Tal como la célula funciona como la unidad de estructura y función, el campo morfogenético se ve actualmente como la unidad onto y filogenética, cuyos cambios provocan la aparición de novedades evolutivas.

Los programas genéticos que controlan, activan y regulan los planes corporales en el desarrollo de los animales, aparecieron y tomaron forma mediante el proceso evolutivo (Revilla-I-Domingo & Davidson, 2003). El desarrollo es el proceso mediante el cual se establecen dichos planes corporales, donde distintos tipos celulares aparecen en dominios espaciales específicos -caracterizados a su vez por propiedades estructurales particulares- producto de diferentes programas de expresión génica ejecutados por las células. Durante el desarrollo embrionario, y a través del proceso de especificación regional, cada dominio corporal obtiene su propia identidad, y pasará por una progresión de estados de expresión génica regulatoria, que llevarán al establecimiento, y finalmente a la estabilización, de los programas terminales de

expresión génica, los cuales confieren propiedades únicas a cada tipo celular (Davidson, 2001).

La especificación regional durante la ontogenia comienza a partir de señales espacio-temporales. La respuesta celular a estas señales dependerá de la historia previa de la célula (estado previo de especificación) y del genotipo. Las señales pueden ser por ejemplo de tipo bioquímico, recibidas desde otras células, y afectar el curso de eventos durante el desarrollo al causar la activación o represión de genes particulares, que muchas veces codifican para factores de transcripción, en regiones particulares del organismo. Estas interacciones celulares ocurren a su vez dentro de colecciones particulares de células, que han sido identificadas como constituyentes de campos morfogenéticos (Gilbert *et al.*, 1996).

Los campos morfogenéticos asumen una actividad organizadora fundamental en el desarrollo embrionario, actuando como unidades discretas, y son producidos por las interacciones de la expresión de ciertos genes en dominios espaciales restringidos. Pueden verse así como una información que es traducida en entidades espacio-temporales definidas y modulares. Esta modularidad es clave: los módulos embrionarios (redes de interacciones génicas, campos morfogenéticos, pero también primordios de estructuras diferenciadas) están especificados genéticamente, presentan atributos autónomos y organización jerárquica, pero además son plásticos, puesto que soportan cambios en relación a su localización, momento de manifestación e interacciones con otros módulos (*bricolage*, ver Jacob, 1977; Duboule & Wilkins, 1998).

La homología de los campos morfogenéticos puede darse dentro de un mismo organismo (homología de procesos seriada), o entre diferentes organismos (homología de procesos ortóloga). La evolución del plan corporal animal puede verse entonces como la replicación y modificación de dichos campos: la cooperación entre tipos celulares "inductores" y "respondedores" es crítica, y cualquier cambio entre ellos puede alterar al desarrollo.

Vemos entonces que los programas genéticos vinculados al desarrollo se estructuran en redes regulatorias modulares. Esta noción de modularidad sirve como base para identificar y estudiar elementos individuales del genotipo o fenotipo de un organismo dado, y en múltiples niveles de la jerarquía biológica. Constituyen así unidades de selección, funcionando como individualidades en tres procesos vitales fundamentales: replicación, interacción y evolución (Gilbert, 2003).

Consisten básicamente en sistemas genómicos de regulación en *cis* y todos sus vínculos, entre ellos factores de transcripción, y componentes de las vías de señalización y del control del crecimiento (Ej.: factores de crecimiento). Estas redes han sido ampliamente conservadas durante la evolución de los metazoarios (Revilla-I-Domingo & Davidson, 2003). Esta particular configuración sistémica es conservativa, tendiendo a la aparición de homologías, y acotada por limitaciones o restricciones ("*constraints*", Hodin, 2000) propias de cada sistema. Pero es a la vez flexible: permite de hecho la co-opción o reasignación de "rutinas" o "subrutinas" regulatorias preexistentes dentro del módulo de especificación genético (a veces a través de fenómenos heterocrónicos y/o alométricos, ver Gould, 1977; Smith, 2003), posibilitando la aparición de novedades fenotípicas durante el desarrollo y, en definitiva, cambios morfológicos (Peterson y Davidson, 2000). Los sistemas modulares de redes regulatorias aparecen así como el nexo entre el desarrollo y la evolución, y su análisis provee nuevos medios de responder preguntas específicas acerca de la robustez de los procesos de desarrollo, y de la preservación de aspectos clave de dichos procesos a través del tiempo evolutivo.

Así, la asombrosa cantidad de variantes morfológicas en los seres vivos parece construida sobre un conjunto limitado de programas génicos regulatorios, organizados modularmente y manifestados bajo la forma de campos morfogenéticos. Este hecho puede llevar a pensar que puede lograrse un entendimiento básico de los procesos de desarrollo y evolución de los metazoarios mediante aproximaciones moleculares reduccionistas. Sin embargo, y dado que las manifestaciones de las innovaciones evolutivas son morfológicas, para revelar los principios subyacentes en la variedad de formas vivas es necesario integrar aproximaciones moleculares con estudios morfológicos (Hodin, 2000). En particular, el estudio de morfologías paralelas y otras convergentes, serán claves para entender la plasticidad y las limitaciones características de los módulos génicos que regulan el desarrollo y la evolución de los seres vivos.

Bilateria y Urbilateria. Los Bilateria (animales metazoarios triploblásticos que presentan simetría bilateral) se dividen, a partir de recientes trabajos de reconstrucción filogenética (Aguinaldo *et al.*, 1997) en dos grandes clados superfiléticos: los Protostomados y los Deuterostomados, y los primeros, a su vez se subdividen en Lophotrochozoarios y Ecdisozoarios. Una de las consecuencias de estos trabajos, que se basan en el análisis del ADNr 18S y en las secuencias de homeodominios (HDs) del tipo Hox, es el situar al phylum Platemintos, considerado tradicionalmente como Bilaterio basal, dentro del clado de los Lophotrochozoarios (revisado en Adoutte *et al.*, 1999; y Baguña *et al.*, 2001).

Una cuestión fundamental de la biología moderna es poder definir la naturaleza del último ancestro común entre Protostomados y Deuterostomados (el llamado Urbilateria, Kimmel, 1996), no sólo para poder entender nuestros propios orígenes, sino también para poder refinar nuestra visión acerca de los sistemas regulatorios operantes en los organismos actuales (Erwin & Davidson, 2002). Existen por lo menos tres visiones al respecto.

La primera (teoría del planuloide-aceuloide), postula un ancestro pequeño y estructuralmente simple, diploblástico, acelomado, con una red nerviosa descentralizada (Wilmer, 1990), similar quizás en su grado de organización a las larvas *planulae* de los cnidarios actuales, y a partir de la cual el resto de los filo Bilaterios evolucionó por etapas de creciente complejidad. Según este punto de vista, tradicional, los organismos actuales acelomados y pseudo-celomados serían Bilaterios basales, mientras que los celomados y segmentados serían derivados.

Otra teoría, la más moderna, postula que Urbilateria habría sido una larva primaria ciliada, con una población de células "guardadas" (*set-aside*, grupo de células que no contribuyen al desarrollo o a las funciones larvarias, y que dan lugar a una segunda ronda de desarrollo que origina las estructuras corporales del animal adulto). Esta hipótesis se basa en la suposición de que el tipo de desarrollo llamado "desarrollo indirecto máximo" (donde larvas y adultos presentan diferentes planes corporales y explotan distintos nichos ecológicos) es ancestral para los Bilaterios, y del que se habría derivado el "desarrollo directo", en el que las formas embrionarias son originadas a partir del mismo plan corporal que el animal adulto (Erwin & Davidson, 2002; Sly *et al.*, 2003).

Por último, se postula que el Urbilateria fue un animal esencialmente similar en complejidad a los Bilaterios modernos (De Robertis & Sasai, 1996). Esta teoría se basa

en la aparente homología de los sistemas genéticos regulatorios del desarrollo operantes en prácticamente todos los Bilateria, lo cual ha llevado a postular que los programas morfogenéticos generados por moléculas reguladoras específicas constituyen sinapomorfias, y tiene como corolario que partes relevantes de las estructuras corporales de insectos y humanos deberían ser consideradas homólogas.

Bajo este paradigma, Urbilateria habría sido un organismo con boca, ano, celomado, segmentado (proceso caracterizado molecularmente por la expresión de: *engrailed/En*), con polaridad ántero-posterior (A-P, caracterizado por la expresión complejo de genes *Hox*, cuya conservación estructural y de expresión secuencial constituiría el llamado *zootipo*, Slack *et al.*, 1993), polaridad dorso-ventral (D-V, *sog/chd* y *dpp/BMP-4*), un fotorreceptor primitivo (*Pax6/eyeless*), un vaso sanguíneo contráctil o corazón (*tinman/Nkx2.5* y *DMEF2*) y apéndices (*fringe*, *serrate* y otros genes) (Kimmel, 1996; De Robertis, 1997).

Por atractiva que parezca esta hipótesis, presenta por lo menos dos problemas mayores (Erwin & Davidson, 2002): por un lado la (falta de) evidencia paleontológica no apoya esta teoría (Chen *et al.*, 2004), y, aún más importante, no existe evidencia convincente de que las vías morfogenéticas *per se* estén conservadas, sino los procesos de especificación y diferenciación de los diferentes tipos celulares.

Por otro lado, bajo esta concepción, se ha planteado que los organismos actuales no celomados o pseudocelomados serían derivados y estructuralmente simplificados a partir de los celomados. En particular, los Platelminetos (sin ano, acelomados, sin segmentación verdadera, algunos de ellos sin fotorreceptores) serían organismos simplificados secundariamente (Ballavoine, 1997; Adoutte *et al.*, 1999; Baguña *et al.*, 2001).

Teniendo en cuenta todo lo expresado anteriormente, las ciertas homología genéticas encontradas entre Protostomados y Deuterostomados podrían apuntar al hecho de que los sistemas genéticos de especificación fueron reclutados (co-optados) paralelamente en distintos linajes de Protostomados y Deuterostomados, a partir de la evolución de un ancestro mucho más simple (Hodin, 2000). O, parafraseando a Jacob (1977): "Las novedades provienen de asociaciones no vistas previamente de material viejo. Crear es recombinar".

Por otra parte, los mecanismos convergentes pueden indicar una flexibilidad en las trayectorias de desarrollo dentro de un genotipo determinado, lo que se conoce como "plasticidad fenotípica" (Pigliucci, 1996). Este hecho es particularmente visible dentro de los cestodos, y en particular en *Echinococcus granulosus* (ver más adelante).

Algunos aspectos de la evolución del plan corporal

I. HOMEBOXES. Las homeoboxes son secuencias nucleotídicas que codifican sesenta aminoácidos, encontrados en ciertos factores de transcripción denominados proteínas con homeodominios (HD). El HD adopta espacialmente una estructura del tipo hélice-vuelta-hélice, a través de la cual interactúa con secuencias de ADN específicas -localizadas en regiones 5' de los genes blanco- a través de su 3ª hélice, llamada hélice de reconocimiento (Kissinger *et al.*, 1990; Gehring, 1994).

Las homeoboxes están presentes en todos los metazoarios, y sus productos están involucrados en el establecimiento y control de patrones morfológicos durante el desarrollo embrionario temprano. Asimismo, participan en la especificación de destinos celulares en etapas más tardías del desarrollo (De Robertis, 1994).

Uno de los hechos más salientes de los genes que codifican proteínas con HD, es que muchos de ellos están organizados en "agrupamientos" o *clusters* en los genomas estudiados. Estos *clusters* muestran una organización similar en grupos de animales diferentes, formando los complejos HOM-C en *Drosophila melanogaster* y más genéricamente HOX-C o Hox en vertebrados (Duboule & Dolle, 1989; Graham *et al.*, 1989; Akam, 1989). Estos complejos derivarían de un ancestro común que ya existía hace 500 millones de años (Akam *et al.*, 1994), y presentan más homología entre las secuencias de ADN de los genes "parálogos" (aquellos que ocupan la misma posición relativa en los distintos *clusters*), que entre las de los genes de un mismo agrupamiento.

Otra característica de los complejos Hox, compartida por muchos grupos de animales, es la llamada "colinearidad". Esta se refiere a una llamativa correlación entre el orden de los genes con homeoboxes dentro del agrupamiento y su patrón de expresión corporal. Otro aspecto de la colinearidad es la existencia de una jerarquía funcional entre los miembros de un *cluster*, tal que los genes que actúan más posteriormente imponen su especificidad sobre los genes que actúan más anteriormente ("regla de la prevalencia posterior", Struhl, 1983; Busturia & Morata, 1988). La significación biológica de esta jerarquización aún no ha sido elucidada, pero se cree que refleja un mecanismo de regulación compartido, dependiente de la organización cromatínica (Kondo & Duboule, 1999).

El estudio comparativo de los genes con homeobox es una herramienta poderosa para definir relaciones entre los genes vinculados al desarrollo y la evolución del plan corporal. Los datos obtenidos acerca de la organización de estos genes en complejos, así como el estudio de sus dominios de expresión durante la embriogénesis y la conservación de sus secuencias permite la subdivisión de dichos genes en clases y subclases, que habría aparecido temprano en la evolución del reino animal (De Robertis, 1994). En particular, la evolución del complejo Hox parece haber seguido diferentes caminos en Protostomados y Deuterostomados: se ha propuesto que el último ancestro común de los linajes más importantes entre los Protostomados poseía un único complejo Hox de entre ocho y once genes (Balavoine *et al.*, 2002), mientras que el ancestro común entre Cnidaria y Bilateria poseía tres genes Hox (Finnerty *et al.*, 2004).

II. Ejes corporales. Una de las sinapomorfias más característica de los Bilateria es la simetría bilateral (revisado en Finnerty, 2003). Se manifiesta a partir de la intersección de dos sistemas ortogonales de especificación corporal: el eje A-P, especificado por la acción secuencial y colineal de los genes Hox, y el D-V, especificado por *dpp* (*decapentaplegic*) y sus socios moleculares, los cuales constituirían ejemplos claros de sistemas modulares homólogos.

Los Cnidarios son considerados tradicionalmente como un grupo externo de los Bilateria y con simetría radiada (bi o tetrarradiada). Sin embargo, en el estadio adulto presentan internamente un plano de simetría bilateral (llamado "eje directivo", ya descrito en Hyman, 1940, y citado por Finnerty *et al.*, 2004), transversal al eje oral-aboral y que atraviesa la faringe. Por otro lado, presentan genes Hox, expresados en un arreglo escalonado oral-aboral, así como expresión de *dpp* en un solo lado del blastoporo (Finnerty *et al.*, 2004). La homología (y no la homoplasia o convergencia) aparece como la explicación más parsimoniosa para la conservación de estos rasgos morfológicos y moleculares.

Por lo tanto, la simetría bilateral aparecería hoy como una sinapomorfia entre los Cnidarios y los Bilaterios. Esta homología molecular no implica necesariamente una estructural: la utilización de genes homólogos entre Cnidarios y Bilaterios para el establecimiento de los dos ejes corporales primarios (A-P, D-V), sugiere que existe homología a nivel de los mecanismos moleculares, y no entre las estructuras cuyas localizaciones están regidas por estos módulos genéticos (Finnerty, 2003).

En síntesis, los análisis recientes revelan sistemas moleculares conservados en el establecimiento del patrón A-P y el eje D-V en los grupos mayores de invertebrados y vertebrados, a pesar de las grandes diferencias presentes en, por ejemplo, su modo de gastrulación. Aún así, la relación entre los ejes embrionarios y adultos no es consistente en todos los metazoarios (Holland, 2000), y los planteos de Willmer (1990), en cuanto a que el origen de la simetría en la evolución de los metazoarios es un tema aún no resuelto, enfatiza la necesidad de realizar estudios en una variedad de organismos, particularmente en los Protostomados basales, para aclarar el origen de las formas corporales de los metazoarios Bilaterios.

III. Estructuras mesodérmicas

Más allá del complejo Hox: el rol de los genes NK-2

Genes NK. Los genes con homeobox se pueden clasificar -según su similitud de secuencia- en superclases (por Ej. la *Antennapedia*, Pollard & Holland, 2000), familias (cuyo paradigma lo constituyen los genes Hox), y subfamilias (Burglin, 1994; Banerjee-Basu & Baxevanis, 2001).

Otra de las familias conservadas a lo largo de la evolución es la NK (Kim & Nirenberg, 1989). Caracterizados originalmente en *Drosophila melanogaster*, varios, aunque no todos (NK-2 y *scrou*) los genes del tipo NK están organizados en un agrupamiento cromosómico (93DE), aunque sus patrones de expresión no cumplen con la colinearidad espacial (Jagla *et al.*, 2001). El agrupamiento NK es conservado entre distintos linajes y muy antiguo, suponiéndose que es basal a todos los Bilateria (Luke *et al.*, 2003). A diferencia de los agrupamientos Hox y paraHox (Pollard & Holland, 2000), el NK no ha retenido su carácter compacto durante la evolución animal, sino que ha estado sujeto a diversos reordenamientos y dispersiones, lo que puede reflejar una plasticidad funcional remarcable.

Genes NK-2. El rasgo más conspicuo de los genes de la clase NK-2 es que un subgrupo de ellos ("cardíaco", ver Tabla Intro_NK2), se expresa en los primordios del corazón tanto en *Drosophila* como en los vertebrados, jugando un rol clave en su especificación y diferenciación, en lo que constituye un ejemplo clásico de homología durante la evolución animal.

Tabla Intro_NK2.

Proteína	dominio proteico			dominio de expresión			
Proteína NK-2	TND	HD	NK-2 SD	Endodermo	Mesodermo Cardíaco	Sistema Nervioso	Musculatura No Cardíaca
Nkx2-1 vertebrados	+	+	+	+	-	+	-
Nkx2-2 vertebrados	+	+	+	+	-	+	-
Nkx2-3 vertebrados	+	+	+	+	+	+	-
Nkx2-4 vertebrados	+	+	+	-	-	+	+
Nkx2-5 vertebrados	+	+	+	+	+	-	+
Nkx2-6 vertebrados	+	+	+	+	+	+	-
Nkx2-7 vertebrados	+	+	+	+	+	-	-
Nkx2-8 vertebrados	+	+	+	+	+	-	-
Nkx2-9 vertebrados	-	+	+	+	-	+	-
Nkx2-10 vertebrados	+	+	+	+	+	-	-
AmphiNk2-tin anfibio	+	+	+	+	+	-	+
CsNKX (<i>Ciona savignyi</i>)	+	+	+	...	...	...	...
tinman (D. melanogaster)	+	+	-	+	+	+	+
bagpipe (D. melanogaster)	-	+	+	+	-	-	+
Stalker (E. granulosus; este trabajo)	(+)	+	(+)	...	...	+?	+?

Motivos conservados y dominios de expresión de algunas proteínas NK-2 seleccionadas (modificado de Holland *et al.*, 2003; las proteínas cardiogénicas se destacan en negrita, TND: dominio "tinman", HD: homeodominio, NK2-SD: dominio específico NK2).

En *Drosophila*, el gen NK-2 *tinman* (*tin*, NK-4, Kim & Nirenberg, 1989) se expresa en todas las células de la blástula que formarán el mesodermo troncal, las que luego (durante la gastrulación, E7) sufren una invaginación y dispersión lateral. Mientras estas células se mueven dorsalmente durante la extensión de la banda germinal (E8), la expresión de *tin* desaparece del mesodermo ventral, pero se mantiene en el dorsal, debido a la actividad inductiva de *Dpp* (*decapentaplegic*). Durante esta segunda fase de expresión, *tin* especificaría los destinos celulares de los linajes de los músculos cardíacos, viscerales y somáticos (Ranganayakulu *et al.*, 1998,

y referencias citadas en este trabajo). En resumen, *tin* juega primero un rol central en la definición del patrón mesodérmico y luego en la miogénesis cardíaca.

En vertebrados, se han identificado varios genes NK-2 relacionados con *tin*. Un subgrupo (cardíaco) se expresa en las células progenitoras del corazón y/o músculos cardíacos. Sin embargo, la relación evolutiva entre estos genes y *tin* no es clara, ya que todos sus HD son más similares a los genes de *Drosophila vnd* (*ventral nervous system defective*, NK-2) y *bap* (*bagpipe*, NK-3, regulado en su expresión por *tin*). En adición, *tin* no presenta el dominio NK2 SD, característico de los genes NK-2 (Ranganayakulu *et al.*, 1998). En resumen, la cardiogénesis sería un carácter evolutivo construido a partir de un módulo genético ancestral de especificación de la musculatura visceral.

Otro hecho saliente de los genes NK-2, conservado evolutivamente desde Cnidarios hasta vertebrados, es que su transcripción está regulada por un circuito de retroalimentación positivo, autocatalítico (Thomsen *et al.*, 2004). Es destacable que, debido a esta capacidad de autorregulación presentada por ciertos factores de transcripción, el destino de las células donde éstos se expresen podría tornarse independiente de las señales posicionales, muchas veces antagónicas (i.e. activadoras y/o inhibitorias) (Meinhardt & Gierer, 2000).

La evolución temprana de los metazoarios estuvo marcada por tres transiciones mayores: la evolución de los ejes primario y secundario, y la emergencia del mesodermo. Se cree que estas transiciones fueron facilitadas por la invención o reclutamiento de módulos específicos de desarrollo y diferenciación a funciones y/o regiones corporales específicas, posibilitando la especiación celular y aparición de tejidos diferenciados. En particular, la evolución del segundo eje corporal (D-V) y del mesodermo habrían estado ligadas, ya que ambas aparecen juntas en todos los Bilaterios al mismo tiempo (Technau, 2001).

Las dos capas internas, endo y mesodermo aparecen durante o estrechamente ligadas a la gastrulación. Gastrulación significa tradicionalmente “formación del arquenterón”, la cavidad gástrica del animal adulto posterior. En la mayoría de los animales, la formación del endodermo se da simultáneamente con la del mesodermo. Sin embargo, la formación del mesodermo puede estar separada temporalmente de la formación de la cavidad gástrica. Además puede darse la gastrulación sin formación de mesodermo, tal como ocurre en los Cnidarios. La invaginación o epibolia parece constituir un carácter ancestral, aunque no está claro si el modo ancestral de

invaginación es mesenquimático o epitelial. Un modo mesenquimático de gastrulación se encuentra en algunos Hidrozoarios, clase derivada de los Cnidarios. Dado que los Antozoarios, grupo basal entre los Cnidarios, forma el mesenterio endodérmico a partir de pliegues ectodérmicos, se especula que este modo de invaginación (en la formación del mesodermo) constituye el carácter ancestral de Urbilateria (revisado en Technau & Scholz, 2003).

Existen varios tipos de proteínas vinculadas a la transición de animales diploblásticos y con simetría radiada, a triploblásticos con simetría bilateral: proteínas con dedos de Zn^{2+} de tipo GATA 4-6; *twist*, con motivos tipo bHLH (*basic helix-loop-helix*); *snail*, con dedos de Zn^{2+} tipo *Kruppel*; *brachyury*, de tipo T-box, y las que contienen HDs del tipo NK (Jagla *et al.*, 2001; Technau & Scholz, 2003). La función de los genes que especifican el meso y endodermo en Bilateria puede haber evolucionado a partir de roles más ancestrales de regulación de procesos celulares básicos tales como la motilidad, la adhesión y la proliferación.

Como un ejemplo, entre muchos, de un módulo genético conservado filogenéticamente, que involucra la participación de genes NK-2, y vinculado al desarrollo de estructuras mesodérmicas, se ha demostrado en *D. melanogaster* que *twist* activa a un conjunto de factores de transcripción, entre ellos *tinman (tin)*/NK-4 y *Mef2*, involucrados en el desarrollo y diferenciación del corazón y otros músculos no cardíacos (Gajewski *et al.*, 1997; Jagla *et al.*, 2001). En vertebrados superiores *Csx* (*Cardiac Specific homeobox*)/Nkx2.5 (ortólogo de *tin*) es indispensable para el desarrollo del corazón (Lints *et al.*, 1993; Jamali *et al.*, 2001), e interacciona con MEF2C y GATA-4 (Chen & Schwartz, 1995; Skerjanc *et al.*, 2001) durante la cardiomiogénesis.

El sistema en estudio: *Echinococcus granulosus*

“Nor ought to marvel if all the contrivances
in nature be not, as far as we can judge,
absolutely perfect. [...] The wonder indeed is, on the theory of
natural selection, that more cases
of the want of absolute perfection
have not been observed.”
(Darwin, 1859)

Posición taxonómica: (reino) Animalia; Metazoa; Eumetazoa; Bilateria; Acoelomata (Protostomia); Lophotrocozoa; (filo) Platelmintha; (clase) Cestoda; (subclase) Eucestoda; (orden) Cyclophyllidea; (familia) Taeniidae; (género) *Echinococcus*.

Platelmintos. Constituyen un *phylum* con diversas estrategias de desarrollo y tipos de vida, encontrándose especies de vida libre y parásitas. Acelomados, carecen de segmentación verdadera, órganos complejos y ano. Tradicionalmente, debido a su morfología, ciclos vitales y estrategias de desarrollo, se los ha considerado –desde un punto de vista filogenético– como uno de los grupos más basales dentro de los Bilaterios (Willmer, 1990). Más recientemente, estudios moleculares basados en secuencias de ADN ribosomal 18S y de genes con homeobox han permitido ubicar a los Platelmintos entre los Lofotrocozoarios (Aguinaldo, 1997; Balavoine, 1997; de Rosa, 1999), dentro de los Protostomados.

Cestodos. Los Cestodos, con sus ciclos de vida complejos, y dependiendo de huéspedes muy disímiles, han logrado persistir. Se han convertido en testigos de procesos tales como co-evolución, colonización y extinción en las estructuras faunísticas, y de la continuidad ecológica a escalas enormes, temporales y geográficas (Hoberg *et al.*, 1999).

Las relaciones filogenéticas existentes entre los grupos más representativos de los Cestodos permanecen poco claras (Mariaux, 1996; Hoberg *et al.*, 1999). Se precisan datos adicionales, por un lado moleculares, y por otro aquellos sobre la multiplicidad de opciones morfológicas existentes en estos organismos, particularmente a nivel de sus estadios larvarios. Dentro de la clase Eucestoda, taxón monofilético que ha sido claramente definido debido a una serie de sinapomorfias, se destaca el orden **Cyclophyllidea**, el grupo más diferenciado dentro de la clase, constituido por parásitos con hospederos anfibios, quelonios, lepidosaurianos (víboras y lagartos),

aviarios o mamíferos (Mariaux, 1996). Se han propuesto varias hipótesis para explicar el origen de los grupos de Platelminthos parásitos, y actualmente se postula que su ancestro habría parasitado saurios hoy extintos, con una posterior colonización secundaria en los mamíferos tempranos y otros vertebrados, hace aproximadamente 400 millones de años (Hoberg *et al.*, 1999). La diversificación de los Ciclofilídeos es una historia compleja que involucra muy probablemente procesos de co-especiación, co-adaptación y cambios de huéspedes, que se define en un sentido amplio como “co-evolución” (Hoberg, 1999).

***Echinococcus*.** *E. granulosus* es un “gusano plano verdadero” (subclase Eucestoda). Presenta un cuerpo triploblástico y acelomado, sin aparato digestivo y con un aparato excretor del tipo protonefridio. Los organismos adultos muestran un escólex y un cuerpo elongado (estróbila) y segmentado, el cual consiste en un arreglo lineal de órganos reproductores o proglótides. Los adultos (que se desarrollan en el intestino del perro y otros carnívoros), son capaces de reproducción sexual y son hermafroditas. Los huevos del parásito son liberados en las fecas de los huéspedes definitivos y son infectivos para los humanos, suinos, y varios herbívoros, incluyendo ganado vacuno y ovino, caballos o camellos, los que actúan como hospederos intermediarios. Al ser ingeridos, los huevos liberan las larvas oncósferas que, transportadas por el torrente sanguíneo, alcanzan a los órganos blanco, principalmente hígado y pulmones, aunque también cerebro o bazo, donde se desarrolla la forma larvaria posterior, el quiste hidático.

La forma larvaria o Metacestode es unilocular de aspecto esferoide (“quiste”) y llena de fluido (“líquido hidático”). El quiste hidático está compuesto de una capa interna (germinativa), nucleada y sincitial, sostenida por otra capa elástica, acelular (laminada), la cual a su vez está rodeada por otra externa, fibrosa (adventicia), originada en el hospedero (mamíferos herbívoros y hombre). La capa germinativa tiene la propiedad de proliferar asexual y asincrónicamente para dar protoescólices (PSCs) y vesículas hijas, las cuales presentan las mismas características morfológicas que el quiste, estando excluida la capa adventicia (Thompson, 1995).

Ejes de simetría. Un aspecto particular que reviste especial interés es el de los posibles ejes de simetría que presenta *E. granulosus*.

En su etapa larvaria -quística-, existe una aparente desorganización que impide la definición de claros ejes, salvo uno ápico-basal, donde la parte basal está marcada

por el pedúnculo del protoescólex (PSc). El PSc en formación presenta una simetría radiada con un eje ápico-basal, similar al de las formas larvianas de algunos Cnidarios (Finnerty, 2003). La simetría del PSc maduro sigue siendo radiada (tetrarradiada si se toma como referencia a las ventosas), manteniéndose el eje ápico-basal. Es de hacer notar que se han observado aparentes duplicaciones del eje ápico-basal en PScs cultivados *in vitro*, donde dos escólices parecen compartir un mismo cuerpo (L. Britos, com. pers.).

En su etapa adulta, el parásito presenta simetría radiada a nivel del escólex. La estróbila muestra una simetría bilateral aunque incompleta, ya que los gonoporos se alternan a ambos lados del cuerpo. Si bien éste presenta un claro eje antero-posterior, es discutible cuál es la parte anterior y cuál la posterior.

Desarrollo y Diferenciación en *Echinococcus granulosus*. Una característica saliente del estadio larvario de *E. granulosus* es que las larvas muestran un potencial dual a nivel del desarrollo: un protoescólex puede desarrollarse tanto hacia gusano adulto como hacia un nuevo metacestode. Este hecho, que refleja una importante plasticidad biológica (plasticidad fenotípica), sugiere que el control génico de las vías de desarrollo puede ser reprogramado dependiendo de las condiciones del entorno que lo rodea.

I. Los Modelos Tradicionales. En una de las publicaciones de referencia acerca de *Echinococcus*, Thompson, (1995) destaca diferentes etapas durante el desarrollo hacia el parásito adulto, que comprendería los siguientes procesos: proglotización, maduración, crecimiento y segmentación; que a su vez involucrarían una diferenciación germinal y otra somática. Pero es de destacar que los aspectos celulares y/o moleculares del desarrollo de *E. granulosus* no han sido aún realmente descritos.

Asimismo, Thompson (*op. cit.*) describe como “diferenciación germinal” a la proglotización, o formación secuencial de nuevos proglótides y su maduración; y denomina “diferenciación somática” al crecimiento (aumento de tamaño) y delineación somática de cada proglótide por segmentación (estrobilización). Los cuatro procesos de desarrollo mencionados ocurrirían de forma independiente, lo cual sugeriría un proceso muy complejo de citodiferenciación.

En *E. granulosus* se ha descrito una clase de célula de tipo primitivo “germinal”, que comprende aproximadamente el 24% de las células totales de la región del cuello del adulto. Estas células germinales son extremadamente sensibles a las condiciones

del entorno, como fuera demostrado en los cultivos *in vitro* de *E. granulosus* (Howell & Smyth, 1995): en algunos cultivos se producen principalmente células germinales, dando lugar a la proglotización y maduración pero no segmentación, mientras que en otros, se producen más células somáticas, que resultan en un crecimiento sin maduración sexual. Resulta atractivo especular que este tipo de células podrían constituir las llamadas células “guardadas” (*set-aside*) (ver por Ej. Peterson & Davidson, 2000), pero aún no hay datos empíricos en tal sentido.

Dado el rol central que han jugado los genes con homeoboxes en la morfogénesis y evolución de los Bilaterios, especificando el eje A-P y estructuras mesodérmicas, sería de particular atractivo examinar el rol que juega este tipo de genes en la confirmación de este modelo o en la posterior elaboración de uno nuevo para el desarrollo de *E. granulosus*.

II. Desarrollo temprano del PSc. Como primera manifestación morfológica de la aparición de un PSc, se genera un brote celular que crece desde la capa germinativa hacia la cavidad quística o lumen, dando lugar al PSc maduro y diferenciado, o a la formación de las vesículas hijas o prolíferas (Thompson, *op. cit.*). Estas últimas presentan un aspecto morfológico similar al del quiste “madre”, exceptuando la presencia de las capas adventicia y laminar. Asimismo, son capaces de formar nuevos PScs en su interior, presumiblemente mediante un mecanismo celular similar. Eventualmente, los PScs maduros e infectivos son liberados al lumen quístico.

En trabajos recientes, (Galindo *et al.*, 2002; Galindo *et al.*, 2003, Martínez *et al.*, 2004), se han sistematizado y descrito diversas etapas en el desarrollo temprano de PScs en infecciones naturales. Los brotes celulares, originados en un agrupamiento conspicuo de células en proliferación, emergen de la capa germinativa. Estos brotes tempranos se elongan mientras que las células de su base disminuyen su número, a la vez que un pedúnculo aparece caudalmente, uniendo el brote a la capa germinativa. En los brotes elongados, un proceso de diferenciación celular lleva a la aparición de las estructuras típicas del PSc. Los ganchos constituirían la primera estructura diferenciada en aparecer, en la región apical del futuro escólex. Posteriormente, el escólex muestra proyecciones y depresiones circulares, que darán lugar a las ventosas. Una vez que el PSc madura, (lo cual se correlaciona con la abundante presencia de corpúsculos calcáreos, ausentes en las etapas más tempranas del desarrollo, ver Martínez *et al.*,

2004), el pedúnculo desaparece y el PSc permanece libre, en el fluido hidático presente dentro de la cavidad quística o de la vesícula prolígera.

III. Estudios moleculares en *Echinococcus*. Varios aspectos de la biología de *Echinococcus* han sido abordados desde una perspectiva molecular, lo que es atestiguado por un importante número de trabajos en los últimos años. Uno de los aspectos estudiados es la considerable variabilidad fenotípica y genética observada entre las especies del género *Echinococcus*, donde se han identificado varias cepas distintas (revisado en Pearson *et al.*, 2002). Otros aspectos estudiados *in extenso* son la inmunología, inmunopatología e inmunodiagnóstico de *Echinococcus* y la hidatidosis (Siles-Lucas & Gottstein, 2001, revisado en Siles-Lucas & Hemphill, 2002).

Nuestro grupo de la Sección Bioquímica de la Facultad de Ciencias (UdelaR) se ha centrado en el estudio de las bases moleculares del desarrollo y la adaptación al huésped de *E. granulosus*. Se han clonado y caracterizado una serie de genes, cuyo patrón de expresión ha sido analizado en diferentes etapas del desarrollo del parásito (larvaria o Metacestode, capa germinativa fértil, gusanos adultos no fértiles), mediante un conjunto de técnicas que incluyen hibridaciones *in situ*, técnicas inmunohistoquímicas y PCRs (reacción en cadena de la polimerasa) (Oliver *et al.*, 1992; Gorfinkiel, 1993; Ehrlich *et al.*, 1994; Vispo, 1995; Martínez *et al.*, 1997; Chalar *et al.*, 1999; Lalanne, 2003; Castillo *et al.*, 2004).

Estos genes caracterizados incluyen a varios genes con homeobox, dos de los cuales (*Eghbx3/Stalker* y *Eghbx2*) están expresados en regiones y estadios del desarrollo específicos (Vispo, 1995; Gorfinkiel, 1993; Martínez *et al.*, 1997; CMD, este trabajo); y genes que, o bien presentan un patrón de expresión diferencial durante el desarrollo del parásito (*EgFABP1*, primera proteína de *Echinococcus* en ser cristalizada y cuya estructura 3D fue elucidada mediante cristalografía RX, Esteves *et al.*, 2003; Jakobsson *et al.*, 2003), o son expresados en estados funcionales particulares (*Eghsp70*, M. Marín, com. pers.; *EgGST*, Fernández *et al.*, 2000).

Se han generado de este modo marcadores moleculares que, en conjunto a técnicas más integrativas, tales como la construcción de bibliotecas de sustracción (E. Castillo, com. pers.), genómica funcional y proteómica (Fernández *et al.*, 2002; Chemale *et al.*, 2003; Adriana Esteves, com. pers.), abren la posibilidad de lograr

descifrar módulos moleculares y cascadas regulatorias en el desarrollo de *E. granulosus*, con claras implicancias potenciales en cuanto a la posibilidad de poder controlar el ciclo vital del parásito.

Homeoboxes en Platelminotos y *Echinococcus*. Se han descrito varios genes con homeoboxes en los Platelminotos: *Fasciola hepatica*, *Schistosoma mansoni*, y *Dugesia tigrina* (planaria, sin lugar a dudas el grupo más estudiado) (García-Fernandez *et al.*, 1991; Webster *et al.*, 1992; Oliver *et al.*, 1992). En este último organismo, se han caracterizado varias secuencias del tipo *Hox*, así como en *Mesocostoides vogae* (*syn. corti*), donde se han caracterizado cuatro secuencias provenientes del estadio tetratiridio: *Mvhox 1, 5, 7, 10*.

Homeoboxes en *E. granulosus*. Se han caracterizado seis secuencias genómicas con homeoboxes: tres de ellos (*Eghbx 1, 2 y 3*) presentan homologías importantes con genes de la familia *NK* de *D. melanogaster* (Kim y Nirenberg, 1989), mientras que los otros dos (*Eghbx 4 y 5*) muestran su máxima homología cuando son comparados con los genes de *Xenopus laevis goosecoid* y *X-lim*, respectivamente (Oliver *et al.*, 1992, Martínez *et al.*, 1997). Por último, el análisis de la secuencia de *Eghbx 6* indica que existe un homeobox, cuya traducción lo coloca dentro de la familia *prd* (*paired*).

Por otro lado, en recientes estudios (Lalanne, 2003, Castillo *et al.*, 2004), se han aislado seis secuencias de cADN del tipo *Hox* y provenientes del estadio PSc de *E. granulosus*, que fueron denominadas *Eghox1, 2, 3, 5, 9 y 10*. Los análisis de comparación de secuencias mostraron alta similitudes entre estos genes y los genes *Hox* de los grupos anteriores, medios y posteriores. Específicamente, *Eghox1* se alinea con *labial*, *Eghox2* con *proboscipedia*, *Eghox3* con el grupo parólogo 3, *Eghox 5* con *Hoxes* medios, y *Eghox9 y 10* con genes posteriores. Es de destacar que se han caracterizado pocos genes posteriores en Platelminotos, y ninguno, hasta el momento, en Cnidaria (Finnerty *et al.*, 2004). Estos resultados apoyan la inclusión de los Platelminotos dentro de los Protostomados, (tal como se había sugerido previamente gracias al estudio de secuencias de ADNr 18S), mostrando que poseen un conjunto completo de genes *Hox*. No hay todavía datos disponibles acerca de la organización genómica de estos genes en *E. granulosus* (ni en *M. vogae*), pero dado el alto número de genes *Hox* en estas dos especies, en adición a los de planaria, sugiere que la

organización del complejo podría haberse mantenido, y por ende el módulo de especificación A-P.

IV. Relación entre el desarrollo temprano de *E. granulosus* y la hidatidosis.

Echinococcus granulosus es un gusano plano endoparásito, agente causante de la hidatidosis, importante zoonosis que afecta a humanos y a varios animales, incluyendo animales domésticos (Thompson & Lymbery, 1995; Cabrera *et al.*, 2003).

La enfermedad hidática es producida debido a la presión mecánica ejercida por el quiste hidático en las vísceras de los huéspedes intermediarios (humanos y herbívoros). Aunque los humanos son hospederos accidentales, esta patología constituye un serio problema de salud pública en diversas áreas donde es endémica.

La hidatidosis aparece en los cinco continentes, en por lo menos cien países (Eckert, *et al.*, 2001, Eckert & Desplazes, 2004). Se encuentran altas prevalencias en varias regiones del mundo, entre ellas el Uruguay, que presenta una incidencia anual del 9.2/100.000 (datos de 1995 citados por Eckert & Desplazes, 2004).

En las dos últimas décadas se han realizado importantes esfuerzos en las áreas bioquímicas, moleculares e inmunológicas para estudiar a *E. granulosus* y la hidatidosis (Thompson & Lymbery, 1995; Fernández *et al.*, 2002; Chemale *et al.*, 2003). Sin embargo, quedan pendientes cuestiones fundamentales acerca de la biología de este cestodo, que pueden ser relevantes en el control y tratamiento de la enfermedad hidática. En particular, es necesario profundizar en el estudio de los mecanismos que controlan el desarrollo, diferenciación y crecimiento del parásito.

Por ejemplo, son necesarios estudios sistemáticos adicionales acerca de las bases morfológicas, celulares y moleculares del desarrollo temprano de la forma larvaria de *E. granulosus*, el protoscolex (PSc), para poder comprender la estrategia de infectividad del parásito, así como para encontrar blancos posibles en un diseño racional de drogas. Recientemente se ha reportado (Urrea-Paris *et al.*, 2002) que la droga *praziquantel* afecta la diferenciación del PSc sólo cuando es aplicada al comienzo de este proceso. Queda claro entonces, que el estudio del desarrollo temprano del parásito tendrá implicancias en la práctica diagnóstica y terapéutica (Eckert *et al.*, 1995).

-----*-----

Los objetivos originales del presente trabajo fueron:

- 1_ Realizar una contribución al conocimiento de los procesos de desarrollo de *Echinococcus granulosus* a través del aislamiento y caracterización de genes con homeobox.
- 2_ Caracterizar las etapas de la morfogénesis temprana del protoescólex.
- 3_ Estudiar los eventos de diferenciación y proliferación celular durante la morfogénesis del protoescólex

En este trabajo presentamos aspectos novedosos acerca de la morfología temprana del protoescólex de *Echinococcus granulosus* en formación. Se realiza un análisis de los eventos que llevan a la aparición de las estructuras visibles de la larva metacestode del parásito. Se discuten en detalle aspectos vinculados a la citodiferenciación y citoproliferación. Por otro lado, se analizan las secuencias genómicas de cuatro genes con homeobox (*Eghbx3*, 4, 5 y 6), y se discute la importancia del hallazgo de este tipo de genes en un organismo que ocupa una posición filogenética clave para la comprensión de la evolución del plan corporal de los metazoarios. Por último, se estudia la expresión de uno de estos genes (*Eghbx3/Stalker*) en distintos estadios del parásito, encontrando que puede jugar un rol clave en la morfogénesis temprana del protoescólex, así como en la del gusano adulto. Se discuten estos resultados en un contexto evolutivo general, enfatizando las aparentes homologías con otros sistemas modelo, y posibles estrategias de control del ciclo parasitario.

"The real voyage of discovery
consists not in seeing new landscapes,
but in having new eyes".
Marcel Proust

Materiales y Métodos

1. Obtención de Material Hidático
2. Extracción de ADN
3. Extracción de ARN
4. Rastreo de Bibliotecas Genómicas y de cADN
5. Sondas
6. Subclonado en vectores plasmídicos
7. Secuenciación de ADN
8. *Southern Blot*
9. *Northern Blot*
10. Hibridización *in situ in toto*
11. Tinción Nuclear y Microscopía Confocal
12. Conteo de Núcleos
13. Análisis Bioinformático
14. Abreviaciones
15. Composición química de las Soluciones

1. Obtención de Material Hidático

Quistes hidáticos frescos y fértiles fueron disecados a partir de hígados o pulmones bovinos u ovinos obtenidos en plantas de faenas de Establecimientos Frigoríficos de Montevideo, Canelones o Flores.

Los parámetros utilizados para el chequeo de la fertilidad de los quistes fueron la observación microscópica de PSCs libres o unidos a la capa germinativa (4, 20, 40 o 100X). También se consideraron otros parámetros, tales como la viabilidad aparente por tinción con eosina. Si el material no se utilizó inmediatamente se lo guardó durante tiempos cortos (no mayores que dos días) en líquido hidático con el agregado de antibióticos (Penicilina G sódica 20 µg/ml, a partir de una solución madre 20 mg/ml; y Estreptomicina 50 µg/ml, a partir de una solución madre 50 mg/ml).

2. Extracción de ADN

2.a. ADN de *E. granulosus*

El ADN genómico de *E. granulosus* fue extraído siguiendo básicamente el protocolo de McManus *et al.* (1985), modificado por nosotros: 1 Vol. de material hidático fue homogeneizado con 2 Vols. de Solución de Extracción. Se agregaron Proteinasa K (1 mg/ml) y SDS (1% conc. final). Se incubó a 50°C durante 1 hora 30'. Se desproteinizó con 2 Vol. de fenol equilibrado a pH 8.0. Las fases se separaron mediante centrifugación a 8000 rpm durante 30'. La fase orgánica se guardó para realizar una retro-extracción, y el ADN de la fase acuosa fue precipitado mediante el agregado de 0.1 Vol AcONa 3M y 2 Vols EtOH absoluto. En lo posible se recuperó el ADN con varilla de vidrio, o se centrifugó a 10000 rpm durante 20'. El ADN genómico fue lavado con EtOH 70%, secado y resuspendido en un volumen adecuado de H₂O mQ (típicamente 200 µl). La retroextracción se realizó sobre la fase orgánica mediante el agregado de Solución de Extracción y siguiendo el protocolo mencionado. El ADN fue analizado por electroforesis en geles de agarosa con bromuro de etidio y cuantificado y analizada en su pureza por espectrofotometría a $\lambda = 260$ y 280 nm.

2.b. ADN de fago Lambda

Se siguieron varios protocolos, algunos descritos en textos de alcance general (Maniatis). Otros fueron puestos a punto en nuestro laboratorio. A continuación se detalla el que rindió mejores resultados en nuestras manos:

Una u.f.p. de fago se resuspende en 500 μ l de SM, y se titula, de tal modo que queden aproximadamente 108 u.f.p. / 10 μ l. Se toman 10 μ l y se agregan 50 μ l de CaCl_2 10mM, 50 μ l de MgCl_2 10mM, 100 μ l de bacterias huésped (crecidas toda la noche y resuspendidas en $\frac{1}{2}$ Vol. SM + 0.2% D-Maltosa). La mezcla se incuba durante 10' a 37°C, y 10 μ l se inoculan a 17 ml de NZY, y se deja con fuerte agitación durante toda la noche a 37°C. Al otro día se chequea visualmente para detectar la presencia de agregados de restos bacterianos, y se agregan ADNasa I y ARNasa (5 μ g/ml conc. final), agitando lentamente durante 30' a TA. Se centrifuga a 12000 rpm durante 20'. Al sobrenadante se añaden 17 ml de mezcla de PEG 20% + NaCl 2M. Se deja 1 hora a 0°C, en hielo, y se recentrifuga a 10000 rpm durante 15'. El *pellet* se levanta con 700 μ l de Solución de Homogeneización y se incuba a 37°C, 30'. Los restos proteicos se extraen con fenol y la fase acuosa se precipita con 1 Vol de iPrOH + 1/10 Vol. AcONa 3M. Se centrifuga 30' y el precipitado de ADN se lava con EtOH al 70%. Se seca y se resuspende en 500 μ l de TE al que se agrega ARNasa 100 μ g/ml conc. final. Se incuba a 37°C durante 30', se extrae con fenol-cloroformo y se reprecipita con iPrOH. Se lava y resuspende en 100 μ l H_2O mQ.

2.c. Obtención de ADN de plásmidos

Se utilizaron diversas técnicas de extracción de ADN plasmídico, en particular la lisis alcalina, el método de ebullición o el de CTAB (C. Robello, com. pers.) dependiendo del material de partida. El ADN obtenido fue purificado por precipitaciones selectivas, resinas adecuadas o por el método de gradiente en CsCl con el agregado de bromuro de etidio

3. Extracción de ARN

El ARN total fue purificado siguiendo el procedimiento descrito por Chomzinsky & Sacchi (1987), con modificaciones (C. Chalar, com. pers.). A la suspensión de material hidático en PBS se le agregó 2 Vols de solución D. La mezcla se homogeneizó en homogeneizador mecánico y se agregó 0.1 Vols de AcONa 2M pH4. Se desproteinizó con 1 Vol de fenol a 55°C + 0.2 Vol de mezcla cloroformo – alcohol

isoamílico en vortex durante 10'. Se centrifugó a 4500 rpm, durante 15'. Se separaron las dos fases (se guardó la orgánica para realizar una retro-extracción) y el ARN de la fase acuosa se precipitó mediante el agregado de 1 Vol de iPrOH e incubación a –20°C durante toda la noche. Al otro día se centrifugó durante 20', a 6000 rpm, se resuspendió el precipitado en 400 µl de Sol. D, se pasó a tubos eppendorf y se volvió a agregar 1 Vol de iPrOH, se incubó 1 hora a –20 °C, se centrifugó 15', a máxima velocidad, se lavó dos veces con EtOH 75% y se secó bajo lámpara. Finalmente el precipitado de ARN se resuspendió en un volumen apropiado (típicamente 200 µl) de H₂O mQ y se cuantificó por espectrofotometría a $\lambda = 260$ nm. Para realizar la retro-extracción se agregó a la fase orgánica 1 Vol de Sol D y se continuó con el protocolo.

4. Rastreo de Bibliotecas Genómicas y de cADN

Las genotecas se plaquearon en densidades adecuadas en placas de Petri y se rastrearon con sondas radiactivas siguiendo técnicas corrientes (Sambrook *et al.*, 1989).

5. Sondas

5.a. Sondas radiactivas de ADN para rastreos, *Southern* o *Northern blots*

5.a.1. Preparación de la sonda. Obtención del fragmento a marcar

Se ejemplifica el protocolo con la obtención de la sonda para *Stalker*, *Eghbx3*: Se digirió el plásmido pEghbx3 con *XbaI* y *HindIII* para liberar el inserto clonado. Protocolo: 6 µl ADN + 5 ul tampón *ReactTM2* + 2.5 µl *XbaI* (12U/ul) + 2.5 µl *HindIII* (18U/µl) + agua c.s.p. 50 µl, durante 5 hr a 37°C. El digesto se corrió en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% con bromuro de etidio en TBE 0.5x. Se recortó la banda correspondiente al inserto bajo luz UV. A la banda aislada (140 µg) se le agregaron 5 volúmenes de Solución de Extracción y se incubó durante 5 min a 65°C. Se dejó enfriar hasta TA y se realizaron extracciones con fenol, fenol-cloroformo 1:1 y cloroformo. El sobrenadante acuoso fue finalmente extraído y el ADN precipitado con AcONa-EtOH. Luego de los lavados con EtOH 70%, secado del precipitado y resuspensión del mismo, se controló el procedimiento mediante un mini-gel de agarosa al 2%.

5.a.2. Preparación de la sonda. Marcado radiactivo

Las sondas fueron preparadas por el método de cebado al azar (random priming), utilizando 20-50 ng de ADN. 1.5 μ l de ADN molde (inserto purificado) en un volumen total de 11.5 μ l alcanzado con agua y 1.25 μ l de hexámeros al azar ($A_{260}=0.1/\mu$ l) fueron calentados en un tubo tipo *eppendorf* a 100°C en un baño de agua en ebullición durante 1 min., y posteriormente enfriados rápidamente en baño de hielo-agua. A esta mezcla se adicionaron (en caso de que el radio-nucleótido fuera α - 32 PdATP: 1 μ l de BSA (10mg/ml), 1 μ l dCTP 500 uM, 1 μ l dGTP 500 uM, 1 μ l dTTP 500 μ M, 3 – 5 μ Ci α - 32 PdATP, tampón (ver), 5U del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E.coli* y agua c.s.p. 11 μ l. Se incubó a TA durante 2 hr. Se agregó 4 μ l de EDTA 0.5M para detener la reacción y se llevó a 100 μ l con agua. Se tomó una alícuota de 1 μ l para estimar la eficiencia del marcado.

La sonda radioactiva fue purificada en una columna de Sephadex G-50 de 1 ml. Luego de purificada, se tomó una alícuota de 1 μ l para estimar la eficiencia del marcado.

5.a.1. Preparación de la sonda. Estimación de la eficiencia del marcado radiactivo

Las alícuotas radiactivas correspondientes a la reacción total (radiactividad incorporada + no incorporada) y a la sonda purificada por Sephadex G-50 se depositaron cuidadosamente en un papel de filtro y se dejaron secar al aire durante 5'. Luego se introdujeron en viales de centelleo a los que se agregaron 3 ml de líquido de centelleo. Las cpm se midieron por Cerenkov en un contador de centelleo líquido Beckmann LS 6000IC en el canal de tritio durante 1'.

5.b. Sondas no radiactivas de ARN

Véase apartado 10.b

5.c. Oligonucleótidos radiactivos

Los oligonucleótidos (e.g. HB-1, Burglin com. pers., 5'-AA[AG]-AT[ACGT]-TGG-TT[CT]-CA[AG]-AA[CT]-[AC]G[ACGT]-[AC]G-3') fueron radio-marcados en su extremo 5' mediante la reacción de la T4 polinucleótido kinasa (PNK).

Protocolo: 1 μ l (500 ng) de oligo + 2 μ l tampón kinasa 5x + 1 μ l PNK + 6 μ l [γ 32-P] dATP 250 mCi, H₂O csp 20 μ l; incubando 30' a 37°C.

6. Subclonado en vectores plasmídicos

Se realizó por procedimientos convencionales o siguiendo las indicaciones del fabricante.

7. Southern Blot

7.a. Digestión del ADN genómico

Se digirieron 10-15 μ g de ADN total con las ERs apropiadas, durante un período de 18 horas, a 37°C. Protocolo: 25 μ l ADN + 50 μ l tampón *ReactTM2* + 5 μ l BSA + 15 μ l espermidina + 15 μ l ER (*HindIII*, 18U/ μ l; o *PstI*; 15U/ μ l) + agua c.s.p. 500 μ l. Como control de la digestión se incubó ADN (2 μ g) en las mismas condiciones que en las digestiones pero sin el agregado de las ERs. Como control de completitud de la digestión se realizó una electroforesis en un mini-gel de agarosa al 1% en TBE donde se sembraron una alícuota de la digestión, el control de degradación inespecífica y ADN sin digerir. Luego el ADN genómico digerido fue precipitado por AcONa-EtOH y resuspendido en 25 μ l de agua.

7.b. Electroforesis

El ADN digerido se sembró en un gel de agarosa horizontal al 1% en TBE con el agregado de EtBr (2 μ g/mL, conc. final) y se sometió a un campo eléctrico de 30V, durante 16 horas. El progreso de la electroforesis se controló mediante su visualización en un transiluminador UV. Como marcador de pesos moleculares se utilizó ADN del fago Lambda digerido con *HindIII* (fragmentos en orden de tamaño creciente, en kpb: 0.564, 2.027, 2.322, 4.361, 6.557, ver).

7.c. Preparación del gel para transferencia

Una vez completada la electroforesis el gel fue sometido a HCl 0.25 M hasta 10 min después que los indicadores de migración (azul de bromofenol y xilen cianol) cambiaron de color, luego de un lavado con agua destilada, se agregó Solución de Desnaturalización (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M) durante 30 min, posteriormente se

agregó Solución de Neutralización (NaCl 1.5 M, Tris-HCl 0.5 M pH 7.2) durante 15 min. Todos estos tratamientos se realizaron a TA.

7.d. Transferencia y Fijación del ADN genómico

El ADN del gel se transfirió por capilaridad a un filtro Hybond™ N, mediante SSC 20x, durante 2 días, a TA. El ADN fue fijado al filtro mediante calor: 80°C durante 2 hr. Los filtros fueron guardados convenientemente a TA hasta su utilización.

7.e. Hibridización a alta rigurosidad

La hibridización con sondas marcadas con ³²P se realizó en un horno de hibridización, a 65°C, durante 16 hr. Previamente, el filtro se prehibridó durante por lo menos dos horas en Solución de Hibridización a la misma temperatura. La sonda desnaturalizada se agregó a esta misma solución. Los lavados post-hibridización se realizaron a alta rigurosidad, a 65°C: 20 min en 2xSSC, 0.1%SDS (2 veces) y 20 min en 0.2xSSC, 0.1%SDS.

8. Secuenciación de ADN

8.a. Secuenciación Manual

El método utilizado fue el de terminadores de cadena (Sanger), y los reactivos de Pharmacia (T7 Sequencing Kit™), utilizando los cebadores adecuados para cada ocasión. El ADN molde (2-4 µg) se desnaturalizó previamente a 37°C durante 30' en presencia de NaOH 0.2M y EDTA 2mM, con el agregado de 50 ng del iniciador adecuado. El ADN anillado se precipitó mediante el agregado de 1/10 Vol. AcONa 3M y 2½ Vols. EtOH absoluto, dejando la reacción toda la noche a -20°C. Luego de lavar el precipitado, se resuspendió en H₂O y se procedió a la secuenciación manual siguiendo las indicaciones del fabricante del Kit (T7 Sequencing™ Kit, Pharmacia LKB Technology).

8.b. Secuenciación directa de fagos λ

Procolo abreviado: 4 µg de ADN de fago + 1 µL oligo adecuado (10 µM) + H₂O csp 12 µL (Vol. final). La mezcla se somete a los siguientes ciclos de PCR: 25 x (94°C, 1'; 50°C, 1', 60°C, 1') (V. Fernández, Com. Pers.)

8.c. Secuenciación automática

Se realizaron en un equipo ABI Prism 7000 en el laboratorio CTAG de la Facultad de Ciencias siguiendo las instrucciones del equipo técnico.

9. Northern Blot

9.a. Corrida electroforética

Se realizaron en geles de agarosa 1.5 % en en Tampón de Corrida (TC) en condiciones desnaturalizantes debido al agregado de formaldehído (8% p/v), y libre de ARNasas (la cuba fue tratada previamente con H₂O₂ 30 Vols). La muestra (40 ug en 10 uL + 1.8 uL formaldehído + 15 uL formamida desionizada + 3 uL TC 10x) se desnaturalizó durante 15' a 65°C. Luego se agregaron 5 uL de Tampón de carga. La corrida se realizó a 4-5 V/cm, con recirculación de TC durante 4 horas. Luego de realizada la corrida electroforética, el gel fue fotografiado bajo luz UV.

9.b. Transferencia del ARN

Se transfirió el ARN a un filtro Hybond N (Amersham) con SSC 20x libre de ARNasas, durante dos días a TA. El ARN se fijó durante 2 horas en un horno a 80°C.

9.c Marcado radiactivo y cuantificación de la sonda

Véase apartado 5.a.

9.d. Hibridización, lavados y revelado

La hibridización se realizó en condiciones de alta rigurosidad. Se prehibridizó el filtro en Solución de Hibridación (Sambrook *et al.*, 1989), a 42°C, durante 2 horas. Esta fue cambiada por solución fresca precalentada a 42°C, se le agregó la sonda desnaturalizada y se incubó durante toda la noche a 42°C. Los lavados a alta rigurosidad consistieron en lavar con 2x SSC, 0.1% SDS, 42°C, 30'; 2x SSC, 0.1% SDS, 50°C, 30'; 1x SSC, 0.1% SDS, 50°C, 30'; 1x SSC, 0.1% SDS, 55°C, 30'. El filtro radiactivo fue monitoreado por contador Geiger, envuelto en "RolloPac" y puesto a – 80°C en un cassette de autorradiografía junto a un film sensible (típicamente Kodak X-Omat), durante el tiempo apropiado (dos días).

10. Hibridación *in situ* e *in toto*

10.a. Preparación del material

El método de hibridización *in situ* para material hidático *in toto* fue puesto a punto luego de testar cada paso de diferentes protocolos de uso corriente: Los protoescolices (PScs) y vesículas prolíferas asociadas fueron fijados en una solución

fresca (libre de ARNsas) de paraformaldehído (PAF) al 4% en PBS (solución salina tamponada de fosfato) durante una hora a TA. El fijador fue removido, y reemplazado por metanol, y el material fue guardado a -20°C hasta su utilización. Se realizó una rehidratación a través de soluciones de metanol de concentraciones 75%, 50% y 25% en PTw (1xPBS + 0.1% Tween-20). Luego de dos lavados de 10' en PTw, el material fue incubado durante otros 10' con una solución de proteinasa K ($1\mu\text{g ml}^{-1}$ en PTw) a T.A.. El material hidático fue lavado dos veces en PTw durante 5' y refijado en PAF al 4% en PBS conteniendo glutaraldehído al 0,1%. El refijado fue seguido de dos lavados con PTw.

10.b. Preparación de la sonda

Se siguió básicamente el método de C. Stern (pers. com.) con algunas modificaciones. El protocolo se resume a continuación.

10.b.1. Linearización del plásmido

El plásmido Eghbx3 fue linearizado con *HindIII* (para obtener la ribosonda antisentido) y *BamHI* (ribosonda sentido, control).

Protocolo: 6 μl del plásmido ($0.5\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$) + 3 μl tampón 10x (React™ 2 para *HindIII* y React™ 3 para *BamHI*) + 2 μl ER (10 U/ μl) + agua csp 30 μl ; 1hr, 37°C.

Se cargaron 5 μl en un minigel de agarosa-EtBr para constatar el corte completo. Se extrajeron las proteínas con una mezcla de fenol-cloroformo 1:1. Se agregó 1/10 del volumen de AcONa 3M. Se dejó precipitando toda la noche. Al otro día se centrifugó durante 30 min y se lavó el precipitado con EtOH 70%, se secó en un Speed-Vac y se resuspendió en un volumen de agua de 8 μl .

10.b.2. Transcripción *in vitro*

Se utilizaron reactivos de Boehringer-Manheim. Protocolo: 8 μl ADN + 17 μl agua + 10 μl 5x Transcription Buffer + 5 μl DIG-Ntp Mix + 5 μl DTT 100 μM + 1 μl RNAsin + 4 μl T7 (pEghbx3/Hi) o T3 (pEghbx3/Ba). Se incubó 2 hr a 37°C, luego de lo cual se agregó 4 μl DNAsa I para digerir el ADN remanente. Se puso el material en baño de hielo-agua y se corrió una alícuota de 3 μl en un minigel de agarosa-EtBr para visualizar el transcripto (este mini-gel se transfirió en seco a un filtro Hybond N para confirmar la incorporación de DIG-UTP) y luego se agregaron 30 μl de agua y 8 μl de EDTA (0.5M ,pH 8.0) para detener completamente la reacción. Se precipitaron los

transcriptos por el agregado de 10 μl LiCl 4M + 250 μl EtOH absoluto, dejando la mezcla durante toda la noche a -20°C . Luego de precipitar y lavar cuidadosamente al precipitado amarillento con EtOH 75%, el mismo se secó al aire y se resuspendió en 40 μl de agua-DEPC. Las ribosondas fueron cuantificadas mediante el método de dilución seguido de un dot-blot. El dot-blot y el filtro fueron revelados mediante el kit Genius, siguiendo las recomendaciones del fabricante. (Boehringer-Manheim).

10.c. Hibridización

Se agregó solución de hibridización (SH) y el material hidático se dejó equilibrar durante unos pocos minutos. La SH fue cambiada y el material fue prehibridizado durante dos horas a 65°C . La solución fue reemplazada por una nueva SH conteniendo la sonda de ARN marcada con digoxigenina ($2\mu\text{g ml}^{-1}$), y la hibridización se llevó a cabo durante toda la noche a 65°C . Luego de una serie de lavados: tres veces con HS a 65°C , una vez con una mezcla 1:1 de SH-TBST y tres veces con TBST a TA, la muestra fue bloqueada con suero de oveja -inactivado por calor- al 5% en TBST con BSA al 1mg/ml durante dos horas. Esta solución fue reemplazada por otra de anticuerpo anti-digoxigenina -previamente preabsorbido con polvo de material hidático- en solución de bloqueo a una concentración final 1:5000, y la muestra fue dejada durante toda la noche con agitación a 4°C . Luego de los lavados post-anticuerpo (una vez por 40' y dos veces por 20' con TBST), la muestra fue lavada dos veces durante 10' con solución de revelado, e incubados con 4.5 μl NBT y 3.5 μl BCIP por ml de solución de revelado. Luego del desarrollo de color (seguido bajo microscopio), la muestra fue lavada dos veces durante 10' con TBST, fijada en PAF al 4% en PBS y guardada a 4°C .

10.d. Post tinción nuclear de material hidático hibridizado

El material hidático hibridizado fue lavado varias veces con abundante volumen de PBST enfriado en un baño de hielo-agua, y finalmente resuspendido en 100 μl de PBS. Se agregó ARNasa A (conc. Final: 150 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y se incubó 1hr a 37°C . Se lavó dos veces con PBS a 4°C y se agregó Ioduro de Propidio $2\mu\text{g}/\text{ml}$ (conc. final: 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), se incubó 20 min a TA. Luego se lavó dos veces con volumen abundante de PBS, se montó en portaobjeto excavado y se observó en microscopio de fluorescencia.

8. Tinción Nuclear y Microscopía Confocal

Los PSCs y vesículas prolíferas asociadas fueron aislados de quistes hidáticos y fijados en una solución recién preparada de paraformaldehído (PAF) al 4% en PBS durante 1 hora a TA. El fijador fue removido, reemplazado por metanol y el material fue guardado a -20°C hasta su utilización.

El metanol fue removido mediante cuatro lavados en PBS, cada uno de 10 min. Se agregó una solución de ARNasa en PBS (volumen final 400 μl , concentración final 150 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), para remover el ARN. Luego, 750 μl de Ioduro de Propidio (IP, conc. final 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) fueron agregados a alícuotas de aproximadamente 20 μl de la muestra. Luego de una incubación de una hora en la oscuridad, la muestra teñida fue lavada dos veces con PBS, incluida en VectaShield™, y montada en portaobjetos. Los parásitos fueron visualizados en un microscopio de *scanning* confocal láser Bio Rad MRC 600, trabajando con un filtro Kalman3. Se obtuvieron *stacks* de imágenes digitales, estando cada sección o rebanada (*slice*) separada por 0.9 μm . Los *stacks* fueron visualizados mediante el software *Confocal Assistant 4.02*, de dominio público.

Por otro lado, cortes semifinos (5 μm) de parásitos fueron teñidos siguiendo el mismo procedimiento luego de ser desparafinados mediante varios pasajes por xilol y etanol, y fueron visualizados en un microscopio de epifluorescencia.

9. Conteo de Núcleos

Comenzamos por calcular el número de rebanadas ocupadas por cada núcleo, habiendo analizado 20 núcleos por *stack*, en una muestra de 7 parásitos (5 PSCs maduros y 2 formas juveniles). Para evitar una sobreestimación del número de núcleos, éstos fueron contados varias veces en rebanadas separadas por 3.6 μm e inmediatamente 2.7 μm (o sea cada 4 y 3 secciones respectivamente). Como ejemplo, y para un *stack* confocal típico de 100 secciones o rebanadas, empezamos contando en la sección 10, luego pasamos a la 14, 17, 21, 24, etc. El número obtenido fue entonces dividido por dos para obtener el número de núcleos presente en cada muestra. El programa utilizado para el conteo nuclear fue *Image J 1.25s*, que puede obtenerse en: <http://rsb.info.nih.gov/ij>. El número final fue ajustado por métodos visuales.

13. Análisis Bioinformático

Las secuencias de ADN obtenidas fueron levantadas por el programa Chromas ver.1.43 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) y corregidas manualmente.

Los alineamientos preliminares en busca de máximas homologías en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), se realizaron mediante el programa Blast en sus distintas versiones (Altschul et al., 1997; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) utilizando los parámetros por defecto y sólo las databases de metazoarios. Las secuencias de ADN, así como las traducciones conceptuales fueron trabajadas en el programa GeneRunner ver. 3.05 (Hastings Software Inc.). Mediante el mismo, se buscaron en el ADN motivos conservados (secuencia consenso de poliadenilación, secuencias consenso relativas a la presencia de intrones, sitios de restricción, etc.). Las secuencias genómicas fueron analizadas además mediante el programa *TRF* (Tandem Repeats Finder, ver. 2.02, Benson, 1999) con los parámetros de mayor y menor restricción.

Las proteínas traducidas conceptualmente fueron analizadas en cuanto a la predicción de estructuras secundarias mediante el algoritmo PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>), que utiliza la metodología de redes neuronales potenciadas (McGuffin et al., 2000).

Los alineamientos posteriores (nucleotídicos o aminoacídicos) se realizaron con el programa ClustalX (Thompson et al., 1994) utilizando a la matriz de similitud Gonnet Pam250 y se revisaron y/o corrigieron de forma manual para maximizar regiones contiguas de máxima similitud de secuencia. Los alineamientos generados en el Clustal fueron o bien levantados por el programa GeneDoc (Nicholas & Nicholas, 1997) a los efectos de armar las figuras correspondientes, o convertidos a formato .meg, para analizarlos desde el punto de vista filogenético mediante el programa MEGA ver 2.1, <http://www.megasoftware.net> (Kumar et al., 2001).

Los tests filogenéticos aplicados fueron, en el caso de secuencias aminoacídicas, el de Unión de Vecinos (NJ) y el de Máxima Parsimonia (MP). Para NJ, se tomaron como opciones de distancia a la corrección de Poisson. Para la reconstrucción filogenética por MP, se utilizaron como criterios de búsqueda del árbol óptimo a la utilización del método de intercambio de vecinos próximos (CNI) con un nivel de búsqueda de 3, con 10 replicaciones de árboles adicionados al azar -como árboles iniciales para el CNI-. En ambos casos se utilizaron todos los sitios y se realizaron 1000 réplicas de bootstrap como test de filogenia. Los árboles filogenéticos generados (originales, de consenso por *bootstrap* o condensados) fueron trabajados en el Tree Explorer del mismo programa o en el programa TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>).

14. Abreviaciones.

(k)pb: (kilo) pares de bases

A_{260} = Absorbancia a λ = 260 nm.

AcONa: acetato de sodio

BSA: albúmina de suero bovino

CTAB: hexadecil trimetil bromuro de amonio

DEPC: dietil pirocarbonato

EDTA: ácido etilen-diamino-tetraacético

ER: Endonucleasa de Restricción

EtBr: Bromuro de Etidio

EtOH: etanol, alcohol etílico

iPrOH: iso propanol

mQ: agua Milli Q

rpm: revoluciones por minuto

SDS: dodecil sulfato de sodio

u.f.p.: Unidad Formadora de Placas

TA: Temperatura Ambiente

Vol: volumen

β -MSH: beta mercaptoetanol

λ : longitud de onda

15. Composición química de soluciones.

Solución D: Tiocianato de Guanidina 4M; Sarkosyl 0.5%; Tris-HCl 20 mM, pH 7.5; β -MSH 0.1%.

Solución de Extracción ADN de geles de agarosa: 20mM Tris-HCl pH8.0; 1 mM EDTA.

Solución de Extracción ADN de material hidático: Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, EDTA 50 mM, pH 8.0; NaCl 100 mM.

Solución de Hibridización *in situ*, SH: formamida 50%; SSC 1.3x, pH 5.3; EDTA 5mM; tARN de levadura 50 μ g/ml; Tween-20, 0.2%; CHAPS 0.5%; heparina 100 μ g/ml.

Solución de Hibridización *Southern Blot*: 6xSSC, 5x Solución de Denhardt, 0.5%SDS, 100 μ g/ μ l ADN desnaturalizado de esperma de salmón.

Solución de Homogeneización Fagos: 50 mM Tris.HCl pH7.5, 5 mM EDTA pH 8.0, 0.5% SDS, NaCl 0.36 M, 2.4 mg Proteinasa K.

Solución de revelado *in situ*: 100 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl pH 9.5; 50 mM MgCl₂; 0,1% Tween-20; 2 mM levamisol.

Tampón de Corrida Northern Blot, TC: MOPS 0.2 M, AcONa 40 mM, EDTA pH 8.0 10 mM.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus***1. a. Los genes con homeobox de *E. granulosus***

Uno de los objetivos generales del presente trabajo fue el aislamiento y caracterización de secuencias con homeoboxes en *Echinococcus granulosus*. Este análisis está enmarcado en un contexto de trabajo grupal, de estudio de las bases moleculares del desarrollo del parásito en la Sección Bioquímica de la Facultad de Ciencias.

La elección del estudio de genes con homeoboxes en este organismo estuvo pautada por una serie de antecedentes que han sido revisados en parte en la Introducción de este trabajo. Por un lado, el hecho de que las homeoboxes sean secuencias conservadas a lo largo de la evolución, permitió diseñar estrategias para su aislamiento en *Echinococcus*, que han permitido clonar molecularmente, hasta el momento, catorce secuencias de este tipo (Oliver *et al.*, 1992; Lalanne, 2003; Castillo *et al.*, 2004).

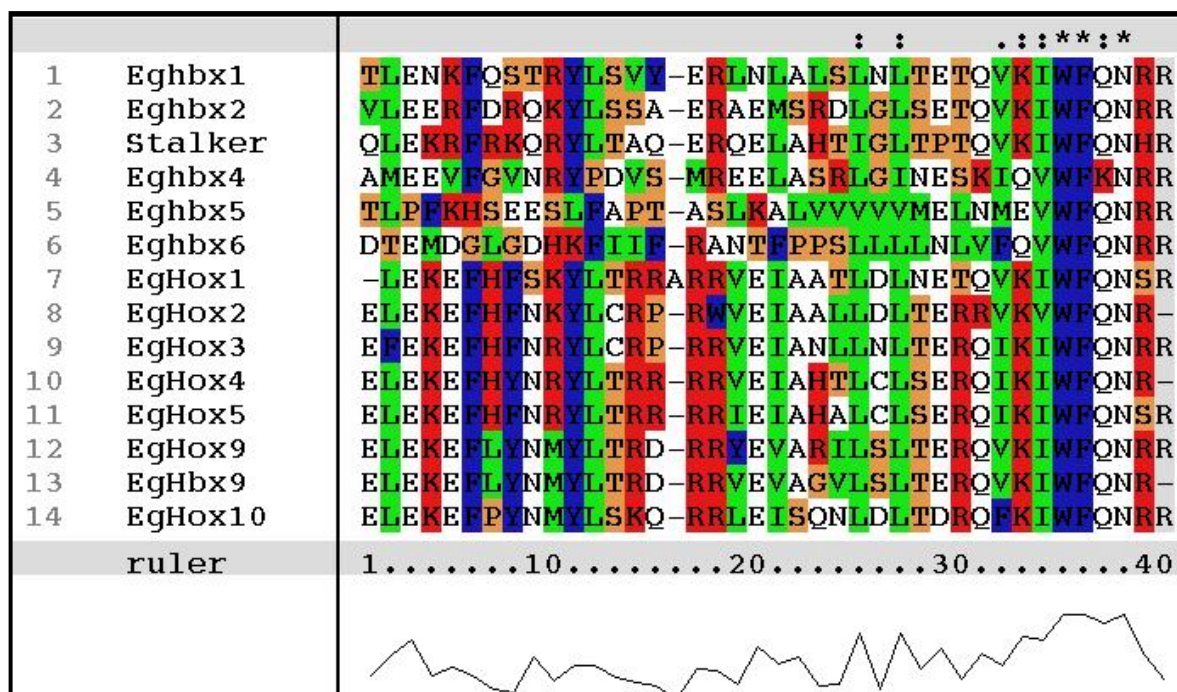
Por otro lado, y así como sucede en otros modelos biológicos, se asume que su estudio molecular y funcional nos posibilitará el poder comprender mejor la biología de este Cestodo, al permitirnos identificar actores moleculares de cascadas regulatorias involucradas en el desarrollo de las formas larvaria y adulta del parásito, quien además ocupa una posición filogenética destacada para comprender mejor la evolución del plan corporal de los metazoarios.

Por último, y teniendo en cuenta que *Echinococcus granulosus* es el agente causante de la hidatidosis, grave problema sanitario en nuestro país y motivo de preocupación creciente en otras zonas del mundo, es posible que este tipo de estudios pueda conducir finalmente a diseñar eventuales estrategias de control del ciclo parasitario y/o de diagnóstico.

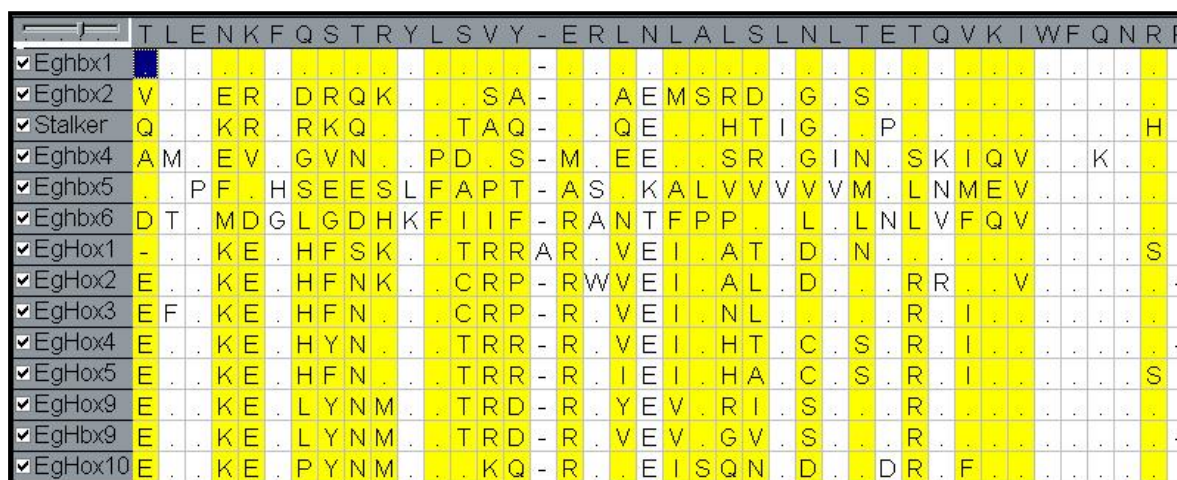
1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*

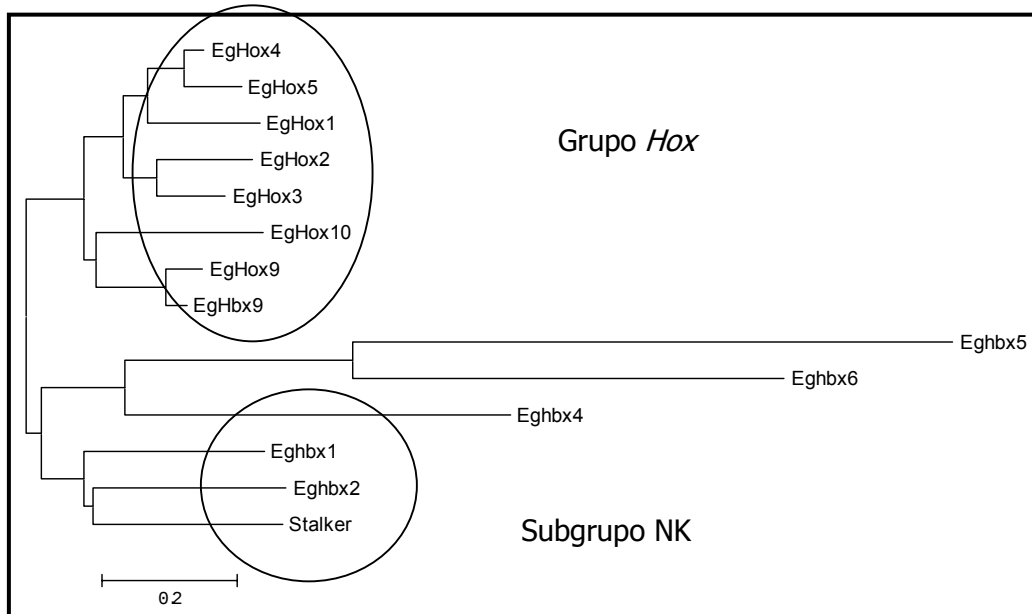
En esta sección, presentamos un estudio comparativo de las catorce secuencias con homeodominios clonadas hasta el momento en *E. granulosus*. Las zonas del HD utilizadas para el análisis son las correspondientes a los aminoácidos 13-54 del HD, o sea 41 residuos. Esto se debe a que la estrategia utilizada para clonar los genes tipo *Hox* (a partir de ARNm del estadio PSc de *E. granulosus*) recupera sólo esa parte del HD (Lalanne, 2003; Castillo *et al.*, 2004).

El estudio filogenético comparativo agrupa a los genes con homeobox de *E. granulosus* en dos grandes clados: el *Hox* y el “no-*Hox*”. Dentro de este último grupo vemos que los genes *Eghbx1*, 2 y 3 (*Stalker*) se agrupan a su vez en un “subgrupo NK”. En los árboles de reconstrucción filogenética una mayor longitud de la rama significa mayor divergencia en secuencia. Por lo tanto se puede apreciar que los genes *Eghbx4*, 5 (*EgLIM*) y 6 serían los más divergentes.

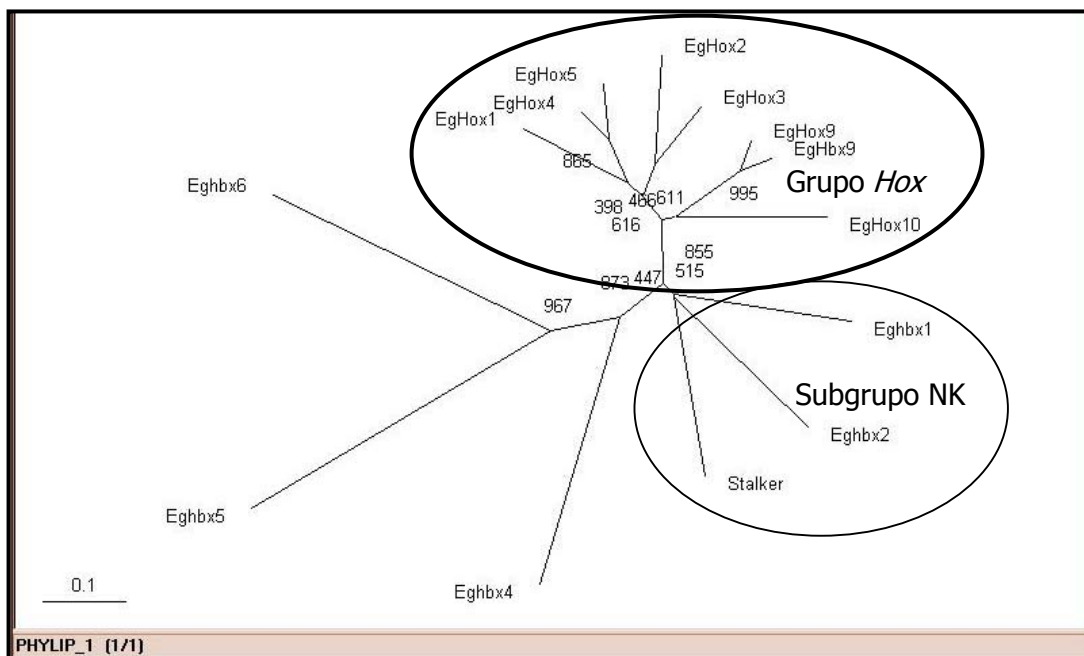
1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus***Fig. 1.**

Alineamiento de parte de los HDs de los 14 genes con homeobox aislados en *E. granulosus*, secuencias aminoacídicas.

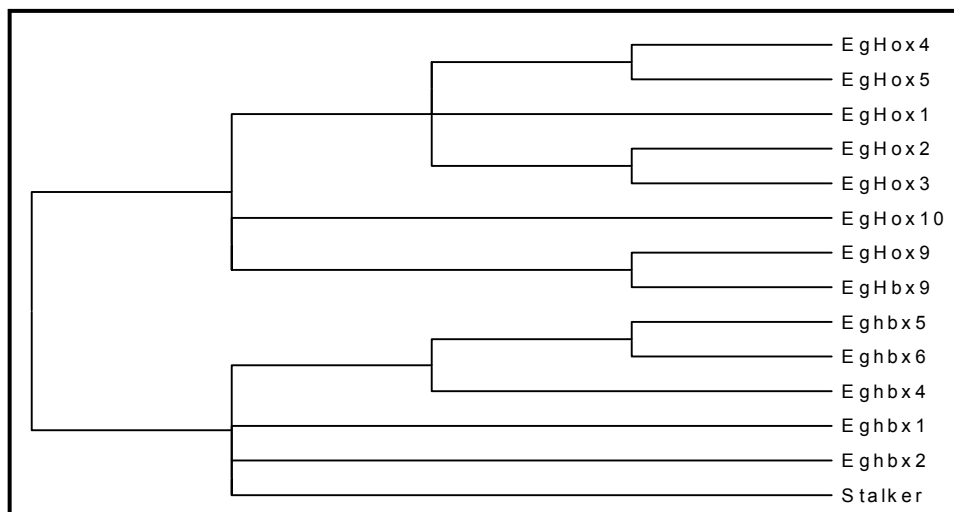
Fig. 2. Residuos informativos de parsimonia.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus***Fig. 3.**

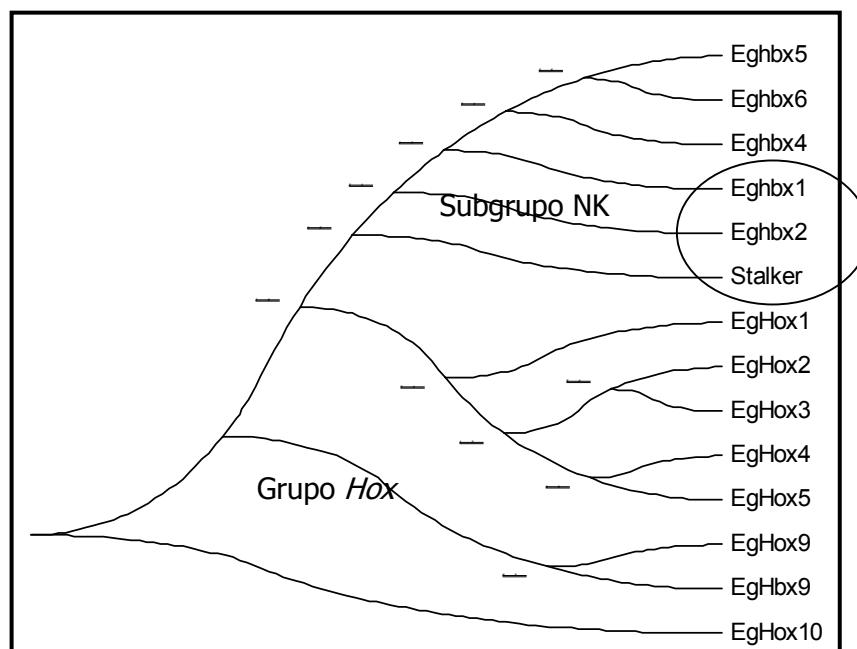
Comparación por el Método de Unión de Vecinos de las 14 secuencias con HDs de *E. granulosus*. Árbol más probable apoyado por 1000 réplicas de bootstrap. Los genes con homeobox de *E. granulosus* se agrupan en dos grandes clados: el Hox y el "no-Hox". Dentro de este último grupo vemos que los genes *EgHbx1*, 2 y 3 (*Stalker*) se agrupan a su vez en un "subgrupo NK".

Fig. 4

Comparación por el Método de Unión de Vecinos de las 14 secuencias con HDs de *E. granulosus*. Árbol consenso apoyado por 1000 réplicas de *bootstrap*

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus***Fig. 5.**

Comparación por el Método de Unión de Vecinos de las 14 secuencias con HDs de *E. granulosus*. Árbol condensado apoyado por 1000 réplicas de *bootstrap*.

Fig. 6.

Comparación por el Método de Máxima Parsimonia de las 14 secuencias con HDs de *E. granulosus*, apoyado por 100 réplicas de *bootstrap*. La topología recuperada es consistente con la del Método de Unión de Vecinos.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*

1. Análisis de secuencias con homeoboxes en el genoma de *Echinococcus granulosus*

Consideraciones preliminares.

Los Resultados de los análisis de secuencias genómicas con homeoboxes presentados en este Capítulo, extienden reportes previos (Oliver *et al.*, 1992) acerca de estas secuencias, y se presentan ordenados en subcapítulos, correspondientes a cada uno de las secuencias de ADN analizadas (*Eghbx4*, 1.b.; *Eghbx5/EgLIM*, 1.c.; *Eghbx6*, presentado por vez primera en este trabajo, 1.d y *Eghbx3/Stalker*, 1.e.).

Se presenta el análisis de cada una de las secuencias de ADN, estudiadas en cuanto a: composición nucleotídica, oligonucleótidos empleados en su estudio, motivos conservados y/o repetitivos, y posibles sitios regulatorios. Los marcos de lectura abierta que se consideran relevantes, con la traducción conceptual correspondiente, se añaden al análisis. Motivos aminoacídicos conservados, posibles estructuras secundarias y/o tridimensionales (en el caso de *Stalker*), así como un análisis filogenético son presentados en figuras, con especial énfasis en los homeodominios encontrados.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus***1.b. *Eghbx4***

Las secuencias nucleotídicas fueron clonadas a partir de rastreos utilizando el oligonucleótido degenerado HB-1 (Burglin, com. pers.) en una biblioteca genómica clonada en el fago λ EMBL4.

El criterio utilizado para el análisis de las secuencias de *Eghbx4*, *Eghbx5*/EgLIM y *Eghbx6* es básicamente el mismo que para *Eghbx3*/*Stalker*, el cual se detalla más adelante (sección 1. e.).

Así, el lector encontrará en primer lugar la secuencia nucleotídica del gen con su correspondiente traducción conceptual. Seguidamente, se analiza la secuencia nucleotídica (posible presencia de intrones, ADN repetitivo, otros motivos en el ADN).

Por último, se analiza el HD (y sus secuencias flanqueantes, si correspondiera) en cuanto a: motivos conservados y análisis filogenéticos en busca de paralogías y/u ortologías.

Las metodologías utilizadas se detallan en Materiales y Métodos.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*1.b.1. La secuencia genómica de *Eghbx4*.

Fig. 7.

¹ „
 TTGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCG.....T3, EcoRI →
AAATCTGAGGGAGGTTTTCGGGAAATGCCTCACATGAGGAGTAGTTGCGCCAGTTTTC
TCCATCACGTGTCTCCTCCTCAATTATTGCAGTGCCTCCCATTCACCCATCCAACCTAA
 TTTTCGGTTCCTGAAAAGGATTTGTGCGCAAACACAATGTGTGGGTTCGTTTCATTTCGT
 GCCCCATGAAGTTAGGTGTAAATTTAGAACTAGAAGAACTATCCTAGTAGATGGGCCCAT
 AAATCAGCCGAATCACTTGAATAACTTTGCTTTCGGATGTAAATGAACCCGAAACGG
 TCCAACTCTCATGATGAGAAATGAGTATCCAAACGAGTTTATTGTTTCGGTGCAATCACTG
 CATAGCAGAAATTCGACTTGTCTACATTGTCACTGATTTCCCTAGCGCCGTTCAATTGACA
 TAGTTGGCGATTGACTTTGGAGGGAGCATTACGAATGAGTGGAAGGGGAAATGGTAC
Z
 AACCATTAGGAAATACCAGTGAAAAGGCAAAGACTTTAGGTAGACAAAATTGTTGTTT
 TCCCCATTCTAACAGGCCATTACTACCGCACCTATGGCCACAGAATCGCACTCCCAC
 GTGGGGGAGGTTTCATAATTTACAACCTTATTTTAATCACGTGGTCTCTTCGCTGAAT
 GGATAAAGTGATAAGGTTTAAATTAACAGGCACAATGGCTGCTGCATTTAGAGCCGTTT
 GGTTTTTACGGTGTCTTAAGGTGTAAATGCGCTCCTTTTGATGCCCTTGAATGGCACA
← GSC_5
 ACAACACAAGTGCGTTTCATGCCCGGTGTGAATTGAAGAAGCTGATAGAAATCAGTGCG
 AATCAGTTTATTTCATGAGGTGTATTACATTGGAAAGGTTGCACAGTTTATTGTGGGTG
 AATATTGTGGTAGGATGGGTGGTGGTTTGGCCCTTAAACAATATATTGGACGGCAGAT
 TCGAAGTTTCACTCATTGATTCAACTCTTTATTTGACGTCGGGAGTATTATTCCAGCAT
Z
 TTTACGACATGAATTGCTTGTCGTTAGGATATCATTTGGAATATTTACCGGAAGATAGTG
 ACAGGGGTGTTAATAGTTGGACTAATGGCGGATAAACGGGATGATAATCCACTGTCCGC
 CCGCTAACACAGATTTTGCTACGAAGGACTCAGTAGGCGCACCGTATTGAACACAGTGT
R·K·Y·S·F·L·T·I·Q·F·Y·P·L·L·C·N·L·
 CTTTTTTGAAGGAAATATTCTTTCCTCACCATTCAATTCACCCATTGCTTTGTAACCT
1
 ·T·L·A·Q·A·P·S·R·R·E·R·T·I·Y·T·P·E·Q·L·E·
 AACTTTAGCCAGGCTCCATCTAGGCGCGAACGGACAATTTACACACCAGAACAACCTCG
← C102
 ·A·M·E·E·V·F·G·V·N·R·Y·P·D·V·S·M·R·E·E·
 AGGCGATGGAGGAAGTGTTCGGGTGAACAGGTATCCCGACGTGAGCATGCGCGAGGAG
← 745
 L·A·S·R·L·G·I·N·E·S·K·I·Q·V·W·F·K·N·R·R·
 CTCGCATCAAGACTCGGCATCAACGAATCGAAAATTCAGTGTGGTTCAAAAATCGTCG
← HB-1
60
 ·A·K·L·R·N·L·E·R·S·R·R·R·E·<s>
 AGCCAAGCTTCGAAATCTGGAGCGGTCAAGACGAAGGGAATAGATCGTATAGCCGCGAC
GSC_3 →
 AGATGAAGGCTTATAGTTGTTTTCTTTGTGAACGCATTTGCTCCCCCTAGTGTGCGATG
 ATGCAAGCAGTGGGTGGAAGTGATGGGTAAAGTGGCTGCAGAAATGCGGAACATAGG
Pst·I·polyA.....← T7
 AGGAGCCCCCGTTGACACCTCGAATATAGACTAACCTATTACGGGATCGGCACACAATG
 ACGGTAGCTACGTTAGTAAAATCTTCGTTTTATGGTGCAATTCAGCCTTATTGCGCTT
 GCATCTACCTCTAAGACAACAGCAAACGTATTGACAGCCACGTCCATCTGCAAAATTAG
 TGCCTAAATTTTGTCAACCGCAACAACAAATTTTGTCTCGTTACTATCAACGAGGTA
 GAAACGGCAAGTAATTTCTGGGCACCACCATCATGACCTTATTGCGAGCTACAACCACA
 ACAAATCAGCAACAGTAGAGCAAAATCGAGGTGTACAGAATGGATATGAACTCTGAC
 AGACGGTTATTGTTCTTATCGGAAAGGAGTAGTAGCTCTAGGGGAGAGAACGAAAAGTG
 AAACCATTCCTGATGATTTTATTCTAACTAAAGTTTGTACTTTCGCTGGCGGGATGG
 TCCCCAAGCTATGCCATTAGTCCACCCCGCAAACCTCATCCCTTCAATACGGTGGCAATA
 CCTTTTTACAC.....
2168

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*

En esta figura presentamos la secuencia nucleotídica (obtenida a partir de un subclon plasmídico y del clon de fago λ original) del fragmento genómico (2168 bp) que contiene parte del homeodominio (HD) de *Eghbx4*. *Eghbx4* comparte el mismo clon genómico (Eg λ 2) que *Eghbx3*, encontrándose ambos genes en un fragmento de 7 kpb sin sitio de corte interno para *Bam*HI (isoesquizómero de *Sau*3A, enzima de restricción utilizada en la construcción de la genoteca).

"T3, *Eco*RI" y "T7, *Pst*I" aluden a la polaridad del inserto en el vector plasmídico. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados en las reacciones de secuenciación se subrayan, y se indican sus nombres de referencia y polaridad.

La secuencia de la proteína traducida conceptualmente se adjunta sobre la nucleotídica y se numera a partir del inicio de la misma (entre paréntesis) y a partir del inicio del HD, que se resalta en negrita, respetando el marco de lectura.

Las señales putativas de poliadenilación, y las secuencias reconocidas por las enzimas *Eco*RI y *Pst*I se resaltan en negrita. Las secuencias reconocidas por la proteína *zeste* se subrayan y marcan con una **Z**.

Fig. 8.



Esquema del gen *Eghbx4*. Se señalan la secuencia aminoacídica deducida, el HD y la probable secuencia de poliadenilación.

1.b.2. Análisis de la secuencia genómica

1. b.2.1: Análisis de ADN repetitivo y otros motivos en el ADN

No se encontró ADN repetitivo. Tampoco se encontró la secuencia 5' CTTCTC 3' completa, característica de regiones reguladoras de otros genes de *E. granulosus*. Sí se encuentra una vez la secuencia parcial 5' TTCTC 3', y dos veces su complementaria 5' GAGAA 3' que se subrayan en la Fig. II.b.1.

Se encuentra una vez una posible secuencia de reconocimiento para la proteína *zeste* 5' YGAGYG 3' (pos. 483), y un sitio putativo de formación del *ariat* 5' YNYTRAY 3' (pos. 1156).

1. b.3. El homeodominio de *Eghbx4* y secuencia parcial de la proteína

Tabla 1 Sitios aminoacídicos funcionales conservados

Sitios	Secuencia consenso	Sitios en la Secuencia
fosforilación por PK2	([ST]x(2)[DE])	SRRE, SMRE (negrita)
fosforilación por PKC	([ST]x[RK])	SRR, SMR (subrayados)
miristoilización	(G{EDRKHPFYW}X(2)[STAGCN]{P})	GINESK (itálicas)
fosforilación por PKA	([RK]2x[ST])	RKYS (itálicas subrayadas)

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*

Los sitios conservados fueron analizados por *Prosite* (Generunner), y se detallan debajo. No se encuentran trectos homopoliméricos (HPAA).

>Eghbx4

RKYSSFLTIQFYPLLCNFTLAQAPSRRERTIYTPEQLEAMEEVFGVNRYPDVSMREEELAS
RLGINESKIQVWFKNRRAKLRNLERSRRE

Fig. 9. Secuencia aminoacídica deducida del HD de *Eghbx4*.

1	10	20	30	40	50	60
S	R	R	E	R	T	I
Y	T	P	E	Q	L	E
A	M	E	E	V	F	G
V	N	R	Y	P	D	V
S	M	R	E	E	L	A
S	R	L	G	I	N	E
S	K	I	Q	V	W	F
K	N	R	R	A	K	L
R	N	L	E	R	S	R
R	R	E				
	H 1		H 2		H 3	

En negrita se destacan los residuos aminoacídicos característicos de la familia *prd* (paired, Banerjee-Basu S & Baxevari, AD, 2001). La Lys50 se destaca en itálica y es características de los genes tipo *goosecoid* u *orthodenticle*.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus***II. b. 4. Análisis Filogenético del HD de *Eghbx4*.****Tabla 2.** Comparación del HD de *Eghbx4* con los HDs más similares luego de realizar un alineamiento BLAST (Altschul *et al.*, 1997) con secuencias de otros metazoarios depositadas en el GenBank.

	1	10	20	30	40	50
(P55813)Eghbx4 [<i>E. granulosus</i>] 100%	SRRERTIYTPEQLEAMEEVFGVNRYPDVSMREELASRLGINESKIQVWFKNRRRAKLRLNLE					
(AE003444) otd gene prod. [<i>D. melanogaster</i>] 60%	LCYPGVNTRKQ	TF RA	DVL AL KT	IF	V LKINLP RV	C .
(AB057732) Cs-OTX [<i>Ciona savignyi</i>] anémona 60%	.	TF RA	DIL AL KT	IF	V LKINLP RV	C .
(AF129932) hbx prot. Otx [<i>Herdmania curvata</i>] 60%	.	TF RA	DVL AL KT	IF	V LKINLP RV	C .
(AF099746) Otx [<i>Petromyzon marinus</i>] 58%	.	TF RA	DVL SLFSKT	IF	V LKINLP RV	C .
(AJ223614) otd-2 prot. [<i>Tribolium castaneum</i>] 62%	QRKQ	TF RA	DVL AL KT	IF	V LKINLP RV	C .
(AB028220) Pf-Otx [<i>Ptychodera flava</i>] gusano enteropneusto 60%	.	TF RA	DVL SL SKT	IF	V LKINLP RV	C QQ
(D84062) otx/otd rel. homeoprot. [<i>Halocynthia roretzi</i>] 60%	.	TF RA	DIL AL AKT	IF	V LKINLP RV	C .
(AF079559) hbx prot. BIX1 [<i>X. laevis</i>] 42%	QMSN K	VYSSDLARL QY RT M	IHQ	M RQM LP R	Q	S ARRQG
(AF465939) prd-like HD T.F. Shox [<i>Branchiostoma floridae</i>] 50%	.	S NF L	QEL RL DETH	AF	SQ LS ARV	Q CRKQE
(AF081351) HD prot. Mix-4 [<i>X. laevis</i>] 50%	QMSN K	VYS SD ARL QY RT M	IHQ	M RQM LP R	Q	S A RQG
(AY036005) otd-rel. hbx 5 [<i>Danio rerio</i>] 50%	.	TFTRA	DVL AL SKT	IF	V LKINLP RV	K C QQQ
(AAAB01008849) agCP10800 [<i>Anopheles gambiae</i> str. PEST] 50%	LLKRKQRRSRTTFTS	L KA TRTQ	YTR	TTNLT AR	S	R .
(AAAB01008846) agCP13270 [<i>Anopheles gambiae</i> str. PEST] 50%	.	Q HFTSQ	HEL QT SR	M T	I MWTNLT ARVR	W KR
(AJ289023) gsc hbx T.F. [<i>Platynereis dumerilii</i>] 53%	MRVGQKRK	H FTE	L AT AKTH	VML	MKVDLK ERVE	W .
(B42768) homeotic prot. gsc - African clawed frog 60%	.	H FTD	L NL QETK	VGT Q	RRVHLR EKVE	W .
(NM_006883) short stature hbx, isoform b; growth control factor, X- linked; pseudoautosomal hbx-containing osteogenic gene [<i>H. sapiens</i>] 60%	.	S NFTL	NEL RL DETH	AF	SQ LS ARV	Q C K
(AF053459) PaxC T.F. [<i>Acropora millepora</i>] 51%	.	N TFS	EML KE EKSH	AT	KIDMS ARV	S W RHQ
P56915 GSC HUMAN Hbx prot. Gsc 60%	.	H F D	L NL QETK	GT Q	RKVHLR EKVE	W .
(D87748) prd-type HD T.F. [<i>Rattus norvegicus</i>] 57%	.	T NF GW	EL KA NESH	F A V	DLV RV	Q W KK
(AF079561) hbx prot. BIX3 [<i>X. laevis</i>] 47%	QMSN K	VYS SD ARL QY RT M	IHQ	M RQM LL R	Q	S AKRQG

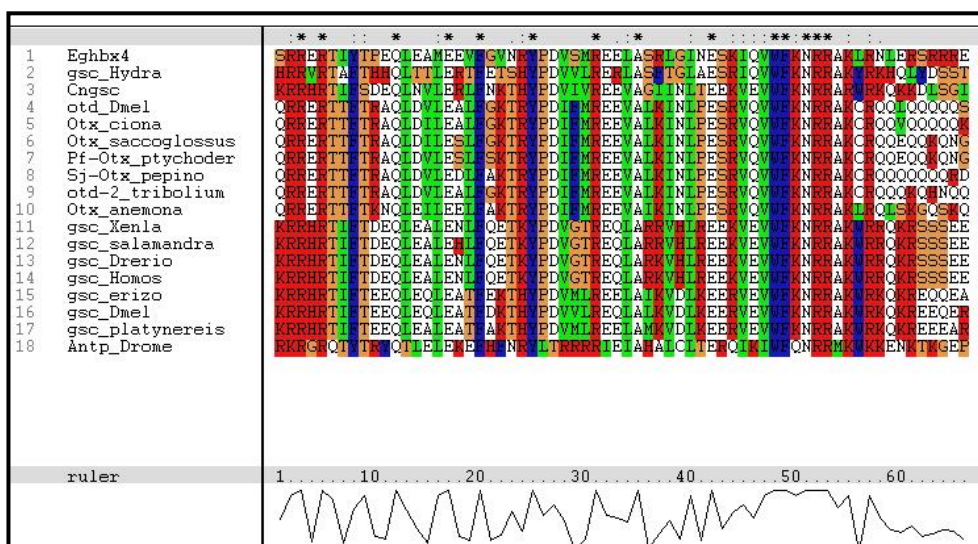
1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*

(U15276) cartilage homeoprot. 1 prec. [<i>X. laevis</i>] 50%	CDSNVSSSKK H TF SL EL K QKTH YV Q L TELT ARV Q W KR
(AF315231) gsc T.F. [<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>] Gsc erizo de mar 48%	HMDLLARNQKRK H F E QL AT EKTH ML IKVDLKEERVE WR
(AE003589) al gene product [D. melanogaster] 58%	. Y TF SF EL KA SRTH FT MKI LT AR Q W KQ
(AB071147) aristaless prot. [<i>Gryllus bimaculatus</i>] 58%	. Y TF SF EL KA TRTH FT IKI LT AR Q W KQ
(NM_079889) eyeless [<i>D. melanogaster</i>] 55%	.Q N SF ND IDSL KE ERTH FA R GKI LP AR S W RE
(U52968) gsc [D. Melanogaster] 55%	. HRT F E QL AT DKTH VL Q LKVDLK ERVE W .
(AY465181) [<i>Nematostella vectensis</i>] Otx-like HD T.F. (anémona) 47%	. TTFTKN ILE L AKT DIF V IKINLPESRV RRAK Q SKG
(AB041043) Sj-Otx mRNA for otd [<i>Stichopus japonicus</i>] (holoturio, pepino de mar) 47%	QTTTPDPPrKQ TT TRA DVL DL AKT DIF V LK INLPESRV CRQQQ
(AB001938) gsc [<i>Cynops pyrrhogaster</i>] (salamandra) 50%	SSSEE . H F DE AL HL QETK GTREQ RVHLREEKVE WRRQKR
(AY313153) [<i>Saccoglossus kowalevskii</i>] otd (otx) gusano hemicordado 38%	PLHYFCNPRKQ E TF RA DIL SLF KTRYP IF V LKINLPESRV CRQQEQKQ
(AJ223614) Otd-2 [<i>Tribolium castaneum</i>] 33%	QRKQ TF RA DVLEALFGKTRYP IF V LKINLPESRV CRQQQKQHNQQ
(AF183398) Cngsc [<i>Hydra vulgaris</i>] 50%	K H FSD NVL RL NKTH IV V GIINLTEEKVE WRK

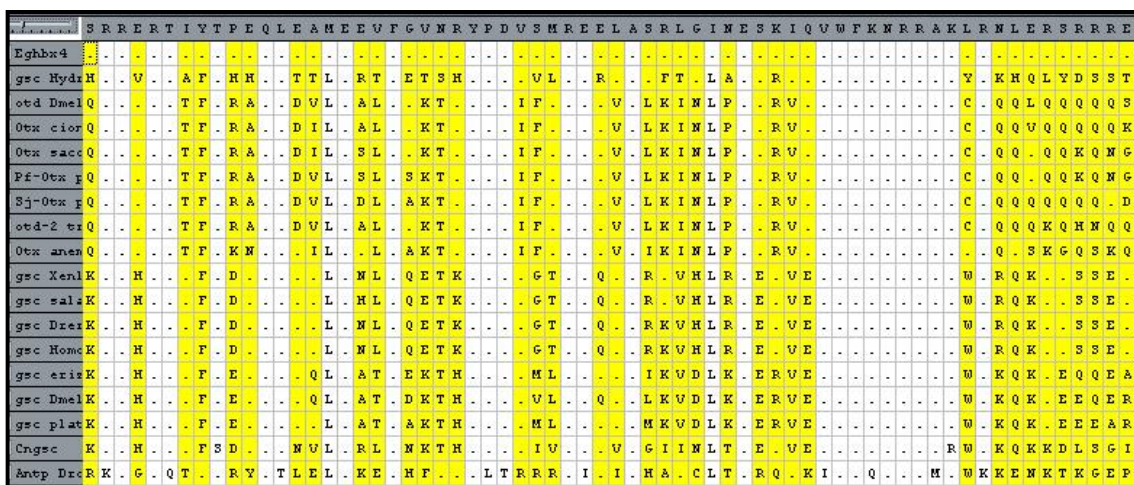
El HD de *Eghbx4* presenta una serie de aminoácidos característicos de la familia de HDs *paired*, en particular presenta similitudes con HDs de las subfamilias *orthodenticle* y *goosecoid*. Columna izq.: N° de acceso en GenBank; nombre del gen, especie a la que pertenece el mismo (nombre científico y/o común); porcentaje de similitud. Columna de la der.: secuencia del HD. Los espacios en blanco corresponden a identidades. (Abreviaciones: D.: Drosophila, gsc: goosecoid, H.: Homo, X.: Xenopus, hbx: homeobox, HD: homeodomain, otd: orthodenticle, prd: paired, Prec.: precursor, prot.: protein, rel.: related, T.F.: transcription factor, Prod.: product.).

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus***Fig. 10.**

Alineamiento del HD de *Eghbx4* tal como se obtiene del análisis de por el programa ClustalX.

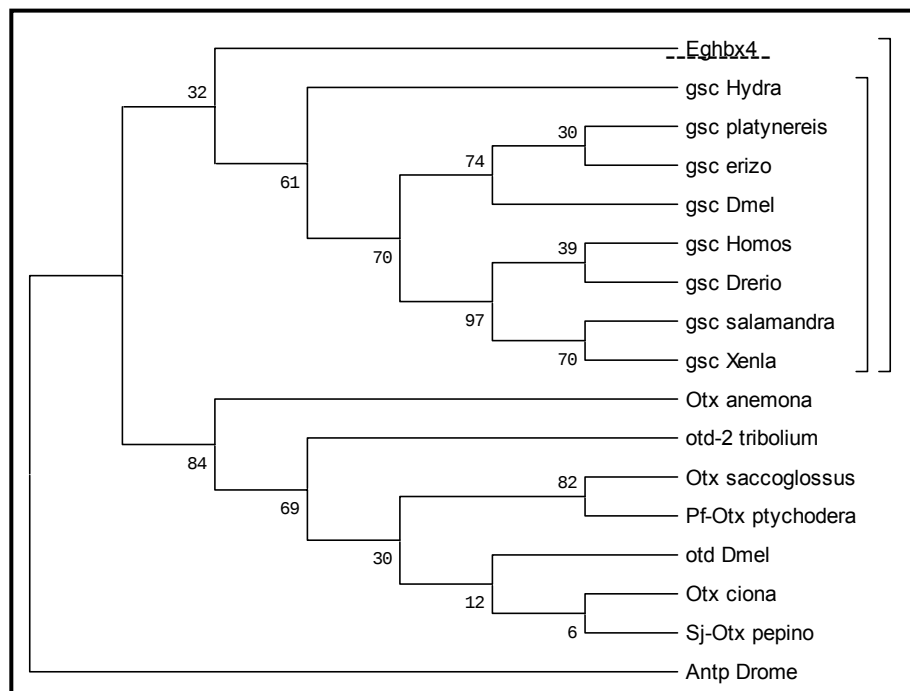


Con el fin de poder clasificar al HD de *Eghbx4* se aplicaron métodos clásicos de reconstrucción filogenética. Se utilizaron los HD de *goosecoid* y *orthodenticle* (*gsc*, *otd*, *D. melanogaster*) como referencia.

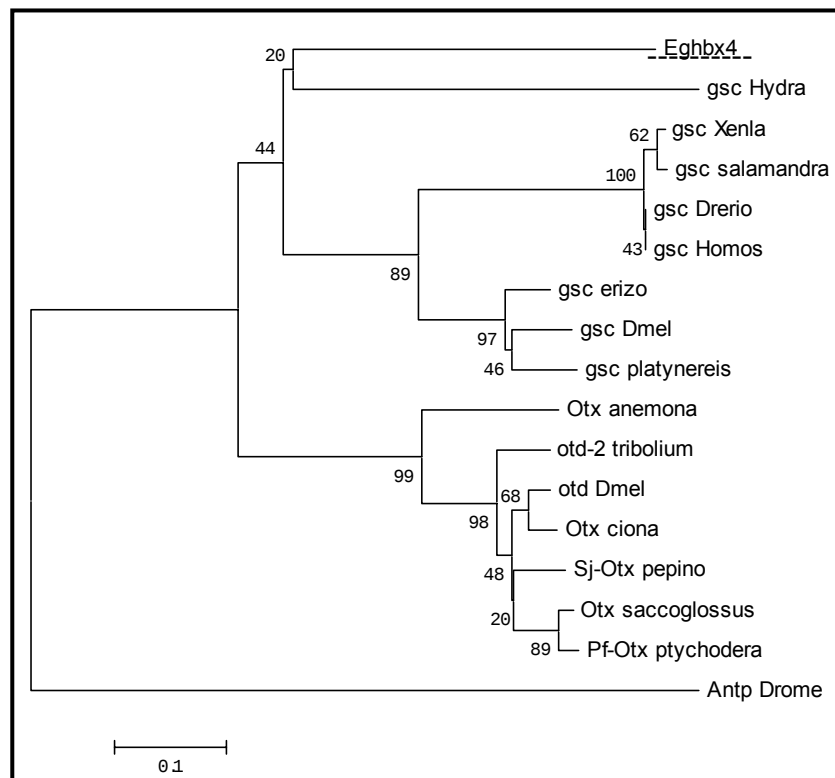
Fig. 11.

Sitios informativos de parsimonia (38/60, en amarillo). La secuencia del HD de *Eghbx4* se ubica en la fila superior.

1.

Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus***Fig. 12.**

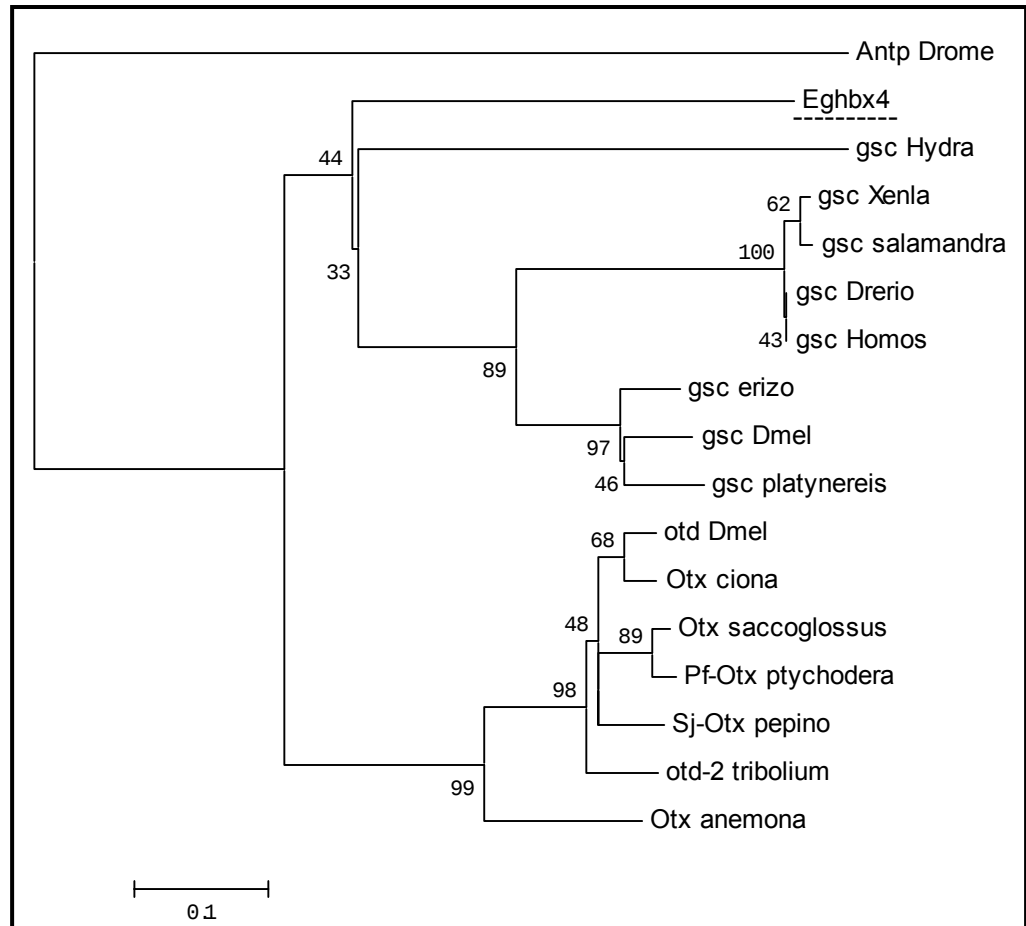
Análisis filogenético por el método de Máxima Parsimonia del HD de *Eghbx4*. Se utilizó el HD de *Antennapedia* (*D. melanogaster*) como grupo externo. Se muestra en la figura el árbol consenso recuperado luego de 100 réplicas de *bootstrap*.

Fig. 13.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*

Análisis filogenético por el método de Unión de Vecinos del HD de *Eghbx4*. Se utilizó el HD de *Antennapedia* (*D. melanogaster*) como grupo externo. Se muestra el árbol más probable, recuperado luego de 1000 réplicas de *bootstrap*.

Fig. 14.



Análisis filogenético por el método de Unión de Vecinos del HD de *Eghbx4*. Se utilizó el HD de *Antennapedia* (*D. melanogaster*) como grupo externo. Se muestra el árbol consenso, recuperado luego de 1000 réplicas de *bootstrap*.

A partir de estos resultados, podemos asignar una paralogía entre *Eghbx4* y los genes del clado *gooseoid* (*gsc*).

Resultados.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*.

1.c. *Eghbx5*/*EgLIM*

1.c.1. La secuencia genómica.

Eghbx5 (GenBank N° X66821, Oliver *et al.*, 1992) fue aislado en el mismo rastreo en que se aislaron *Eghbx3/4*. El fago *Egλ3* presenta un inserto de 11 kpb del que secuenciaron 3544 pb a partir de un subclon plasmídico con un inserto de aproximadamente 6 kpb.

Fig. 15. Secuencia nucleotídica (obtenida a partir de un subclon plasmídico) del fragmento genómico que contiene a *Eghbx5*.

La secuencia presentada (3544 bp) se divide en tres regiones, una (Región 1, 1063 bp) comenzando en el extremo "T3" del plásmido, otra (Región 2, 1423 bp), central, y la última (Región 3, 1058 bp), que finaliza en el extremo "T7". No se alcanzó el solapamiento de las tres regiones. Las Regiones 1 y 2 presentan marcos abiertos de lectura: la 1 contiene parte de un dominio LIM y de un HD, mientras que la 2 contiene el resto del HD (3ª hélice).

La secuencia genómica presenta una serie de ADNs repetitivos, de posible función reguladora. En particular, En las regiones 2 y 3 se encuentra varias veces el motivo CTTCTC, que aparece en regiones regulatorias de otros genes de *E. granulosus*.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*.

(vector)

TTGTATACCCCGCCCCTTTCGAG T3, *Sal I* →

1 59

R Q H M V R L L G S V A Y H A Y C F R C

GTCGACAGCACATGGTCCGACTGCTAGGATCTGTTGCCTATCACGCTTA**CTGCTTCCGC**

| |

V L C A R C L S T G D E W S I P R R W

TGCGTCCTCTGCGCGCGCTGTCTTTCTACGGGGGATGAGTGGTCGATCCCCCGGCGATG

| | **Z**

R T I C L H G A R H L H H Q P E T L P F

CGGTACGATTTGTCTGCATGGAGCACGGCACCTCCACCACCAACCAGAGACTTTGCCAT

K H S E E S L F A P T A S L K A L V V V

TTAAACACTCCGAGGAGTCCCTCTCGCTCCGACAGCATCTTTGAAGGCAT**TGGTGGTGG**

| | |

V V M E L N M E V (G K K I N V E A <s>

TGGTGGT**GATGG**AGTTAAACATGGAGGTAGGTAAAAAATAAATGTAGAAGCTTGATTG

| | | | **

TCATTTGTCTTTAATGATGAGTGAGCAGGTGGCTGATGGAAGCAGTGCAATTAATTGCT

Z

TTTAGTTTGTTCAGTATCTTTAAAAATCTTTTAGTTTCTGCTATATTAGGCCTCAAATC

AGAAAGTTTATTTATATTTAAGCAGTTTACACTTTTATTTTTTTTTTGTGTTTGAATGTG

TGCTATGGTAATAAGTTTTGTTATGTAGATTTTGTGTTAACACTATAAGTTGCAGGTAG

GTGGTAACGCTCCTTGGCCTCTTGTGTCCCATAAAAAAGGGTCTGAGAttCTCCAAAAT

TTGAATAATGAGGAGTAAACAGCCTAGGAAATTTTATGTTTGCAAACAAAAGGGTGTTC

ATAAACTGACTGGGGAGACCCTTATACTCTCCAGATAAATCAAAGAGTTCTGAGGTCT

TTACTTGGCTTTACTGTTTTTTTTTGTGTTTCAATGAGTTTAACTGGGGGACACCTTTA

CTGTATTTAAAATTGACTTGATAACTACCTTCCATTTGGATTGCAAACGCCTACTTGTG

GAAAGTATGAATGAGTCTAGTTGCATCATTGCCACTTATTTTTTTTATCCTTATTTGGTC

CCTTTACAACCAGAAACAGACAGAGAAACCATATATTACGAGCACCAGGACTTTTACGC

TTCCACAGAAGCTGGTCTGGGTCACCTTCGTATC**CAGCGAACCGGAGCAGGAACGGGAGA**

T

| | |

CGACTCGCCCATGTACACGAGCAACCTGGAAGGCGATGACCAATCGGAGGAGTGTTGGAC

TCGAGCTGGCCGAAATGGAGGGAGAGGTGGAGGGCGGATCAAAGCCACCTCGGGACCA

GATGAAGCTAGT

1063

Resultados.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*.

b) Región 2:

1	59
ATAATTAAAAGAATTGTGGAAGTGTGCAGGAATCTCGTGCATCCTTAGGCCTTGAAGAA	
ATCATTTAAAAATATCACTTCTCTTAAACTTGCTTCCCAACGTCTATCATACCTTTGCA	
TAAGTAATTAACATGTTATAGTATGGTGTCCAGGCTGCGATTATAAATGGGTAAACAAT	
TCAGAGTGAAAAAGCTATTCTTCTCTATACACGTTATTGTTTCCAAACGCTTTGAAGAT	
	← C1o1
GAAGTCCCATGGGAGCCTCTTTCTTTTCTGATCTCGCCTATCAGAGGTCGGAAAGGGAC	
GAAAAGATAGCCAGTGAGCATAAATGCTTGTCTTTTCGCCTCAGGAAATAAGAAGTGTTA	
AACAAAAAGTCCAAAAAATATGTAAGTATAATTTAA CCTCCC AAATAAAGTTTAAAT	
GAAATTGTGAATATTTTGGGAATCCGTGCTAGGCTATTGCAAAGGTGAACAAGTAGACA	
GTTTGTGTACGAAGTGTAGAAAGGGGCGAAATGGGGGGGGGGAATGAGGAGGTATTAA	
	← 291
AGCCAGCAGAAATGCACTAATCCCCGACTTAAATGGCATCGACAGGCTTCACACTAGCC	
ATTCTAATCCCTCTCCCGCCTGTCCATGTGCGTACGTGCGTGAGCATCCGTTTCCTGCT	
TGCTGCTTCGACTCCGTGACGTGGCCTTCCCCCCCC CCTCCC CGTGTCCCCCTTCCATT	
	← 43
AAACGGAGGCGGCAATGAGAGCGGATTATACGCTTTTTCATTTGCTATTGTTGTGAGTGA	
	Z
AAATCTCACTTCTCTAGTTTTCATTCACTCACGCCATACTTTAGGATTTCGTCTTGAACTC	
	Z
TCGGTTTTTTTATTAAAGTGACTTCCACCTTCCCTGATATGCTTTACAAAAGCGCTCCTAT	
ACATGTGTCACTGAAATATAAGCAAATTCCTATTTTGGAAATTGGATTCTTTTCCAAAA	
ATCCTCCGTTTCAAGAATTACACATTAATAATGTCTGCTTTTATGCATGCTAAGGTGTT	
	788 →
TGTGGAATGCGATCCCCGGGAAATATCTCAATTAAAAATCACACCAGCTCGTTTTTTTA	
ACTGTACATTTTACGTCCTCCAAGTAAATGAGAAAGTAGTTATTGAGTAATTGTTTGT	
V W F Q N R R S K E R R M K H V S A L	
ATAGGTATGGTTCCAAAATCGTCGCAGTAAGGAGCGT CGGATGAAACACGTATCGGCGC	
** ← HB-1	5a →
G V R R S F F Q Q Q H H N H H H P V R	
TGGGAGTACGAAGGTCCTTCTTCCAGCAGCAACATCACAATCACCACCACCCTGTCCGA	
R I R M G A V A W R N Q W C P S L E P A	
CGAATTCGGATGGGAGCGGTGGCGTGGCGAAAC CCAGTGGTGTCTTCGCTTGAACCAGC	
	← 5b
S F G P D D L P P E V M A D V L H I P V	
CTCCTTCGGGCCTGACGACCTG CCTCCC GAAGTAATGGCGGACGTGTTACATATACCAG	
L P P P P P L L P P P G Y Q T G L F C	
TCCTTCCACCGCCGCCGCGCCACTACTTCCACCTCCAGGATATCAGACTGGTCTTTTCTGC	
V E	
GTCGAGG	
1417 1423	

Resultados.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*.

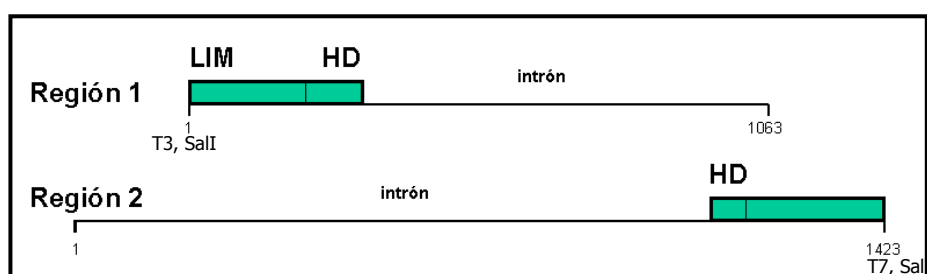
c) Región 3:

```

1                                                                 59
TATTTAGCATCTTCGGTACTGCAAAGCGTAAAGCTTCTCTTAATTTTCATTCGGCTGAAA
TGGTTTGGGTGGCGAATTGGCTAATCACAATTGAGGGGCGCGTATTTTGTATGTGGAGGA
CAGCGCTTTTATAATGAGACTGGACTAGGATGTTTACCGTCATTTTTTCTCTCACCCTT
CTCGCATTTTGGAGGGGTTGGGAGGGTAGGAGCGTGGGAGCATGCGAAGGAGATGCTGG
|           |           |           |
AAAGAGGCCAAAAAATTGGCCACCACAGGGGATGGGTAGAAGGGGTGAGAGAAGGGGTG
|           |           |           |
GGCGTGATCGACTTCGCGGTCATCCTTTGGGAAATGAAGGAGTAGGAATAATGCTTCAT
TTGGCTGCGTGAGATGAAATCCTTCATGCAGGGCCATATATATATATATGGGGAGGGAT
|           |           |           |
ATGGAGGGACATCGGCAAAGTTAATTAGCCCGAAAGTTAATCCTCTGTCTCGAGTGATA
|           |           |           | Z
GGCCGCCACAGCTATCAAGCCTGTCAATCCGGGAAGTGAATCGTTCAGGCAAAGGTGAT
CATTGCGTGCTTGGTCGAGTGGTGTACACCATATTGTTATCTCAAAGCTCAGAGTGCAA
|           |           |           | Z
TCGCTGTCTTTTTCCAGATCGCATTAATATTACCGGTTGTCTAATGCGGCCTTGTGAC
AGGCGGACGGAGTTGAGTATGCCAACCTAATATTAATGTTTAGTTACTCAGAGGACTTC
ACACCAGCTCATTTTAATGGCATCGTATTAACTATTCCCTTATGGACTACTGCTTCAGC
ACGACCACCATCTCCTCCTGGATGTCCTGTCATTGTTTTACAAAGTTTCACTTCAGTCG
GTGAAACTAATTGATTGTTTTGGACCTCTTAGCTCCTTCAGCCGTAGTATACGAGATG
GTAGTAGTTCTTCTCGGCAACAAGAAATCTTGAATGAGTGATTCGTTCAGACCAGTCTG
|           |           |           | Z
AGGGCAAACGAGAGAAGTAAAAGGAACCTTATAGAGATAATGTTGGCCACTGCATCTAC
GGTGAAGGTGGGCTGTTTATTTATGCCAGGCGGAAGGATCCGTTGACCTGCAGG.1058
1003                                                                 Sal I, ← T7

```

Fig. 16. Esquema general de *Eghbx5*/ *EgLIM*



“T3, *SalI*” y “T7, *SalI*” aluden a la polaridad del inserto en el vector plasmídico. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados en las reacciones de secuenciación se subrayan, y se indican sus nombres de referencia y polaridad.

La secuencia de la proteína traducida conceptualmente se adjunta sobre la nucleotídica y se numera a partir del inicio de la misma (entre paréntesis) y a partir del inicio del HD, que se resalta en negrita, respetando el marco de lectura.

Las señales putativas de poliadenilación, y las secuencias reconocidas por las enzimas *EcoRI* y *PstI* se resaltan en negrita. Los sitios de reconocimiento putativos de la proteína *zeste* se subrayan y marcan con una **Z**.

Las secuencias de ADN repetitivo en tándem (ver más adelante, para su análisis) se marcan en negrita y los monómeros se señalan debajo de la secuencia.

Resultados.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*.

1.c.2. Análisis de la secuencia genómica.

Fig. 17. Análisis del Intrón. Análisis de los sitios de corte y empalme putativos con alta probabilidad. (Reese *et al.*, 1997; http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html).

Sitio putativo donador: La secuencia resultado del análisis (score: 0.97/1.00) está subrayada. Los asteriscos en negrita (*) señalan el sitio de corte putativo.

```
V V M E L N M E V (G K K I N V E A <s>
TGGTGGTGATGGAGTTAAACATGGAGGTAGGTAAAAAATAAATGTAGAAGCTTGA
          **
```

Sitio putativo aceptor: La secuencia del resultado del análisis (score: 0.97) su destaca con negrita. Se destaca en *itálicas* el tracto de polipirimidinas característico de los sitios aceptores. El sitio putativo de empalme (AG) se subraya y marca con *.

```
ACTGTACATTTTACGTCCTCCAAGTAAATGAGAAAGTAGTTATTGAGTAATTGTTTGT
V W F Q N R R S K E R R M K H V S A L
ATAGGTATGGTTCCAAAATCGTCGCAGTAAGGAGCGTCGGATGAAACACGTATCGGC
          **
```

Fig. 18. Análisis de ADN repetitivo y otros motivos en el ADN.

ADN repetitivo en tándem (Tandem Repeat Finder, Benson, 1999):

a) Región1:

Repetitivo 1) Indices: 50--79 Score: 40

Tamaño del período: 9 Número de copias: 3.3 Consensus
size: 9

```
          *
50 CTGCTTCCG
1  CTGCGTCCG
```

```
          *
59 CTGCGTCCT
1  CTGCGTCCG
```

```
          **
68 CTGCGCGCG
1  CTGCGTCCG
```

Estadísticas :

Matches: 16, Mismatches: 5, Indels: 0

0.76 0.24 0.00

Los matches están distribuidos entre estas distancias:

9 16 1.00

Composición en bases: A:0.00, C:0.43, G:0.30, T:0.27

Patrón consenso (9 bp):

CTGCGTCCG

Resultados.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*.

Repetitivo 2) Indices: 228--248 Score: 37

Tamaño del período: 3 Número de copias: 7.0 Tamaño del consenso: 3

```

                *
228 TGG TGG TGG TGG TGG TGA TGG
   1 TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG
```

Estadísticas:

Matches: 16, Mismatches: 2, Indels: 0
0.89 0.11 0.00

Los matches están distribuidos entre estas distancias:
3 16 1.00

Composición en bases: A:0.05, C:0.00, G:0.62, T:0.33

Patrón consenso (3 bp):
TGG

Repetitivo 3) Indices: 977--1001 Score: 40

Tamaño del período: 12 Número de copias: 2.0 Tamaño del consenso: 13

```

977 CAGCGAACCGGAG
   1 CAGCGAACCGGAG
```

```

                *
990 CAG-GAACGGGAG
   1 CAGCGAACCGGAG
```

Estadísticas:

Matches: 11, Mismatches: 1, Indels: 1
0.85 0.08 0.08

Los matches están distribuidos entre estas distancias:
12 8 0.73
13 3 0.27

Composición en bases: A:0.32, C:0.24, G:0.44, T:0.00

Patrón consenso (13 bp):
CAGCGAACCGGAG

Resultados.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*.

b) Región 2:

```
Indices: 674--705   Score: 30
  Tamaño del período: 6   Número de copias: 5.0   Tamaño del
consenso: 6
          *           *           *           *
    674 CCTTCC CCCCCC CCTCCC CGTGTCCC CCTTCC
      1 CCTCCC CCTCCC CCTCCC C--CTCCC CCTCCC
Patrón consenso (6 bp):
CCTCCC
```

En esta región 2 se encuentra tres veces el motivo CTTCTC, que aparece en regiones regulatorias de otros genes de *E. granulosus*, y se destaca en itálicas.

c) Región 3:

```
Repetitivo 1)   Indices: 196--224   Score: 38
  Tamaño del período: 8   Número de copias: 3.6   Tamaño del
consenso: 8
```

```
          *
    196 TGGGAGGG
      1 TGGGAGCG

          *
    204 TAGGAGCG
      1 TGGGAGCG

          *
    212 TGGGAGCA
      1 TGGGAGCG

          *
    220 TGCGA
      1 TGGGA
```

Estadísticas:

```
Matches: 16,   Mismatches: 5,   Indels: 0
      0.76           0.24           0.00
```

Los *matches* están distribuidos entre estas distancias:
8 16 1.00

Composición en bases: A:0.21, C:0.10, G:0.55, T:0.14

Patrón consenso (8 bp):
TGGGAGCG

Resultados.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*.

Repetitivo 2) Indices: 263--295 Score: 49

Tamaño del período: 12 Número de copias: 2.5 Tamaño del consenso: 13

*

```
263 AGGGGATGGGTAGA
   1 AGGGG-TGAGTAGA
```

```
277 AGGGGTGAG-AGA
   1 AGGGGTGAGTAGA
```

```
289 AGGGGTG
   1 AGGGGTG
```

Estadísticas:

Matches: 18, Mismatches: 1, Indels: 2
0.86 0.05 0.10

Los matches están distribuidos entre estas distancias:

12	10	0.56
13	3	0.17
14	5	0.28

Composición en bases: A:0.27, C:0.00, G:0.61, T:0.12

Patrón consenso (13 bp):
AGGGGTGAGTAGA

Repetitivo 3) Indices: 400--428 Score: 36

Tamaño del período: 10 Número de copias: 2.6 Tamaño del consenso: 11

```
400 ATATGGGGAGGG
   1 ATAT-GGGAGGG
```

```
412 ATAT-GGAGGG
   1 ATATGGGAGGG
```

* *

```
422 ACATCGG
   1 ATATGGG
```

Estadísticas:

Matches: 15, Mismatches: 1, Indels: 3
0.79 0.05 0.16

Los matches están distribuidos entre estas distancias:

10	9	0.60
11	2	0.13
12	4	0.27

Resultados.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*.

Composición en bases: A:0.28, C:0.07, G:0.48, T:0.17

Patrón consenso (11 bp):

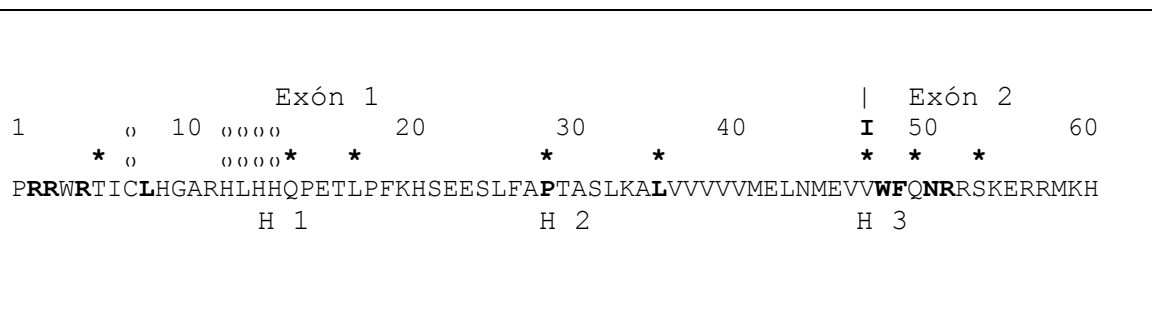
ATATGGGAGGG

El análisis de ADN repetitivo se justifica por su posible relación con la regulación de la expresión génica. En particular, el ADN repetitivo en tándem puede constituir zonas reconocidas por distintos factores de transcripción.

Nota: En esta región 3 se encuentra también tres veces el motivo CTTCTC, que aparece en regiones regulatorias de otros genes de *E. granulosus*, y se destaca en *itálicas*.

1.c.3. El homeodominio de *Eghbx5/EgLIM*

Fig. 19. Secuencia aminoacídica del HD de *Eghbx5*.



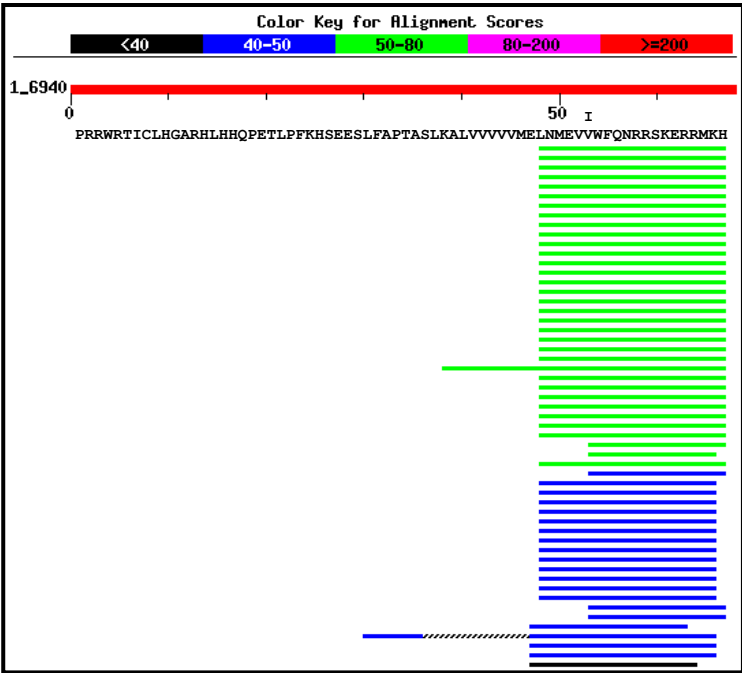
Los * sobre la misma marcan los residuos característicos de la familia LIM. Los residuos en negrita son conservados con otros HDs, según Banerjee-Basu S & Baxevani, AD (2001). La "I" marca la ubicación del intrón. Los pares de paréntesis () marcan posibles inserciones. Por debajo de la secuencia se señalan las tres hélices α del HD.

Resultados.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*.

1.c.4. Análisis Filogenético.

Fig 20.



Resultado de un análisis BLAST del HD de *Eghbx5*. La subsecuencia LNMEV--VWFQNRRSKERRMKH (a ambos lados del intrón, señalado por I) arrojó los resultados más significativos.

Tabla 3. Comparación del homeodominio (HD) de *Eghbx5* con los HDs más similares luego de realizar un alineamiento BLAST (Altschul *et al.*, 1997) con secuencias de otros metazoarios depositadas en el GenBank.

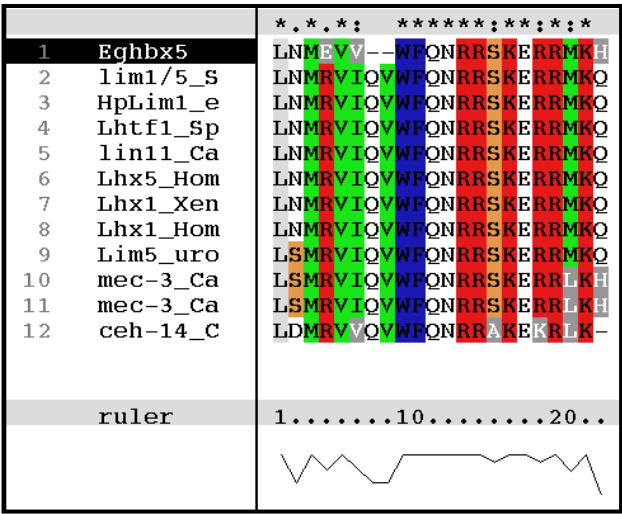
(PC1215) <i>Eghbx5</i> [<i>E. granulosus</i>] 100%	PRRWRTICLHGARHLHHQPETLPFKHSEESLFAPTASLKALVVVVVME-- I LNMEV--VWFQNRRSKERRMKH
(NP_005559.2) Lhx1. [<i>H. sapiens</i>] 81%	. R IQ Q
(CAA45353.1) ScLim1 [<i>X. laevis</i>] 81%	. R IQ Q
(NP_571291.1) Lhx5 [<i>H. sapiens</i>] 81%	. R IQ Q
(CAA38240.1) lin11 [<i>C.elegans</i>] 81%	. R IQ Q
(AAQ01662.1) Lim HD trp fact 1 [<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>] 81 %	. R IQ Q
(AAP79290.2) lim 1/5 [<i>Saccoglossus kowalevskii</i>] 81%	. R IQ Q
(BAB13725) HpLim1 [<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>] echinodermata 81%	. R IQ Q
(AAL56442) sim. LIM 5 [<i>Oikopleura dioica</i>] Chordata; Urochordata; Appendicularia; Oikopleuridae; Oikopleura. 77 %	. S R IQ Q
(CAB02885.3) mec-3 [<i>C. elegans</i>] 77%	. S R IQ L H
(NP_509273.1) ceh-14 [<i>C. elegans</i>] 66%	. D R VQ L .
(CAA45377.1) mec-3 [<i>Caenorhabditis vulgaris</i>] 61%	-----ETG S R IQ L H

Columna izq.: N° de acceso en Genbank; nombre del gen, especie a la que pertenece el mismo (nombre científico y/o común); porcentaje de similitud. Columna de la der.: secuencia del HD. Los espacios en blanco corresponden a identidades. La I marca la posición del intrón. (Abreviaciones: D: *Drosophila*, fact: factor, H: Homo, HD: homeodominio, prot: proteína, trp: transcription, X: *Xenopus*, C: *Caenorhabditis*).

Resultados.

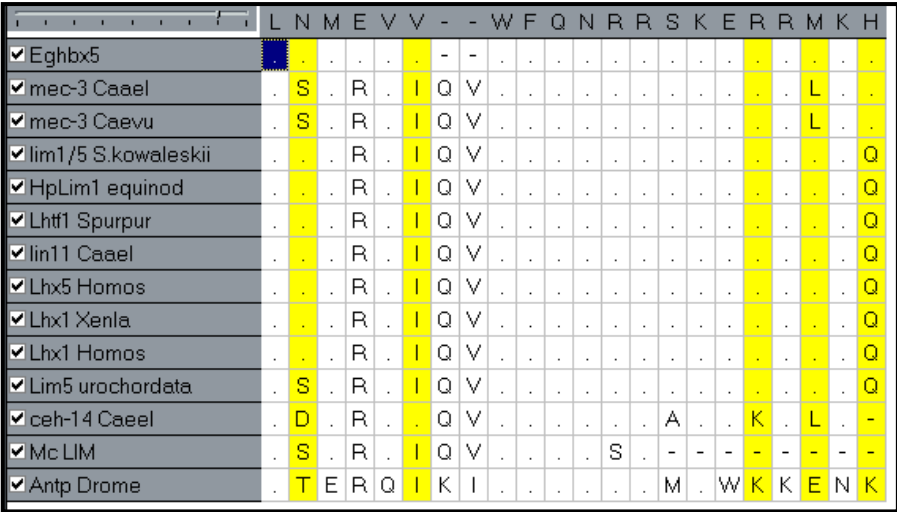
1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*.

Fig 21. Resultado del alineamiento de esta región de la proteína realizado por el programa Clustal X.



Los * sobre la secuencia marcan identidades los : y . denotan sustituciones conservativas con distintos grados. Las sombras de color corresponden a tipos aminoacídicos según IUPAC. Las sombras grises con letras blancas marcan los residuos atípicos. El HD de *Eghbx5* presenta sus máximas identidades de secuencia con los genes HD-LIM de la subfamilia lin-11.

Fig 22. Reconstrucción filogenética. Sitios informativos de parsimonia.

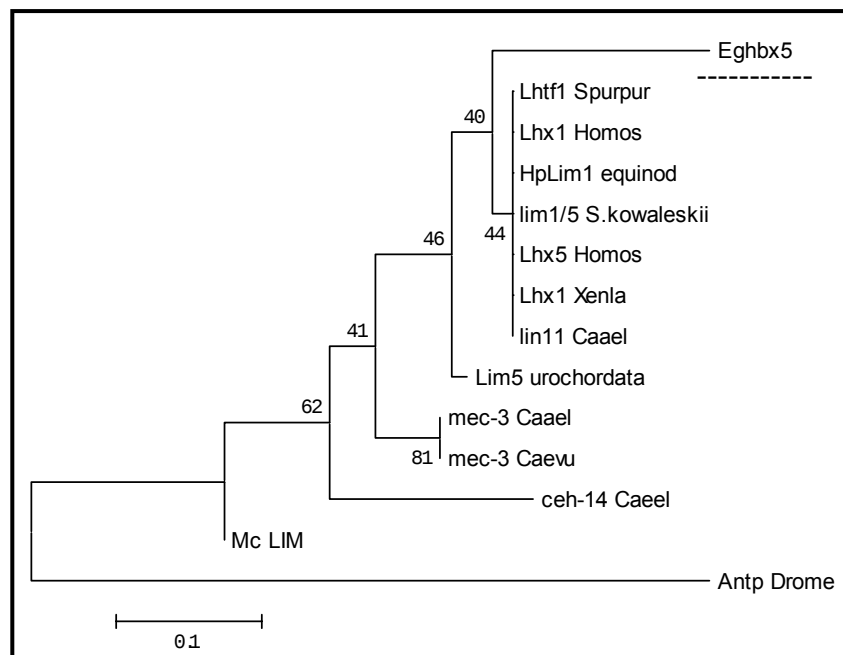


Sitios informativos de parsimonia con el agregado de *Antennapedia* (*D. melanogaster*) como grupo externo. Se agrega además la secuencia McLIM (Lalanne *et al.*, 2004).

Resultados.

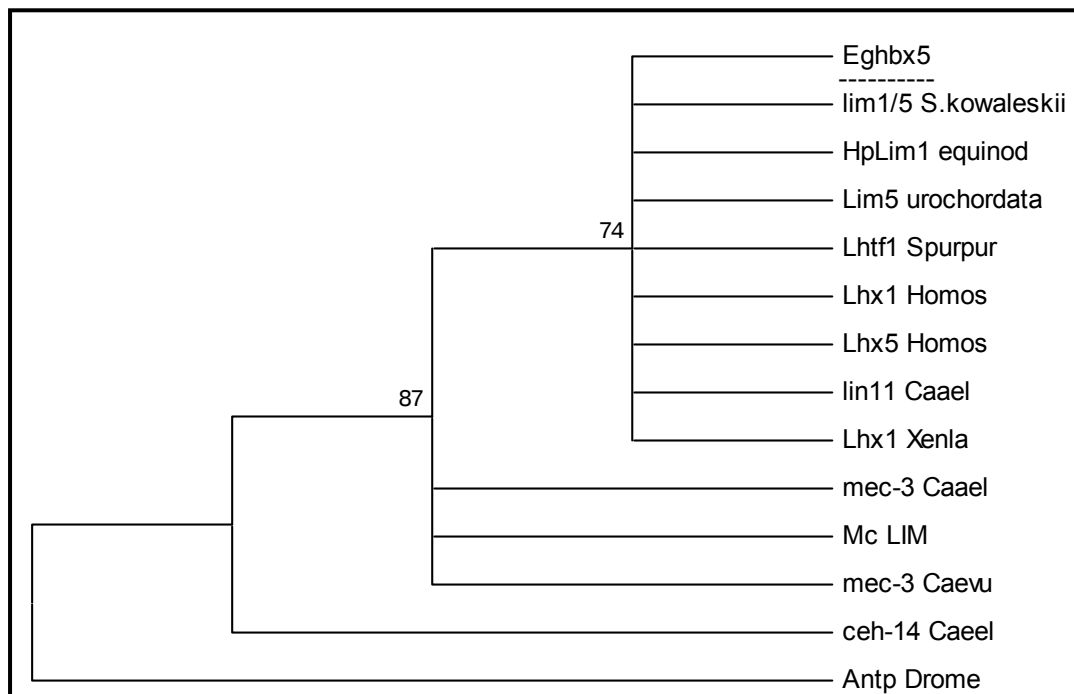
1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*.

Fig. 23.



Análisis filogenético por el método de Unión de Vecinos de esta región del HD de *Eghbx5*. Se utilizó el HD de *Antennapedia* (*D. melanogaster*) como grupo externo. Se muestra el árbol más probable, recuperado luego de 1000 réplicas de *bootstrap*.

Fig. 24.



Análisis filogenético por el método de Máxima Parsimonia del HD de esta región del HD de *Eghbx5*. Se utilizó el HD de *Antennapedia* (*D. melanogaster*) como grupo externo. Se muestra en la figura el árbol consenso recuperado luego de 100 réplicas de *bootstrap*.

Resultados.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*.

1.c.5. Análisis de toda la secuencia aminoacídica putativa de Eghbx5/EgLIM.

Fig. 25 y Tabla 4. La secuencia aminoacídica putativa de EgLIM.

1	10	20	30	40	50	60
RQHMVRL	LGSVAY	HAYCFR	CVLCAR	<u>CLSTGDE</u>	<u>WSIPRR</u>	<u>WRTICL</u>
						HGARHLHHQ
						PETLPFKH
						SEE
	70	80	I	90	100	110
SLFAPTA	SLK	ALV	VVVV	MELN	MEV	VWFQ
						NRRSK
						ERRMK
						HVSAL
						GVR
						RSFF
						QQQH
						HNHH
						HPVR
						RI
130	140	150	160	170	180	
RMGAV	AWRNQ	WCPS	LEPAS	FGPDD	LPPEV	MADV
						LH
						IPV
						L
						PPPP
						PL
						PP
						PGY
						QTGL
						FCVE

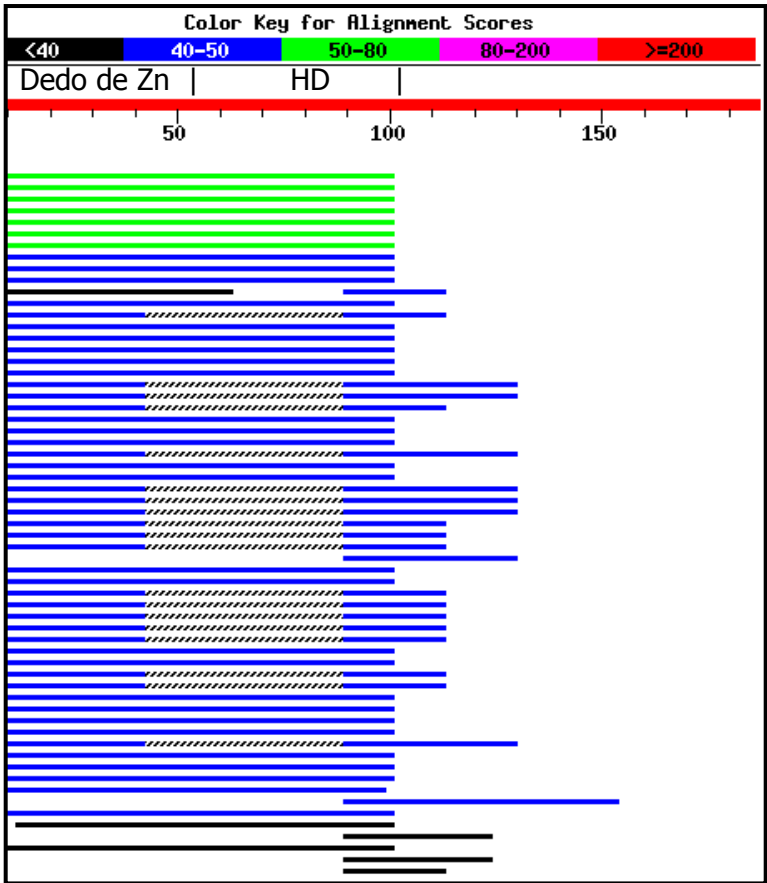
Los aminoácidos en negrita corresponden a los residuos característicos de los dominios LIM. El HD está subrayado. La numeración es arbitraria.

Sitios	Secuencia consenso	Sitios en la Secuencia
fosforilación por PK2	([ST]x(2)[DE])	STGD, TGDE
fosforilación por PKC	([ST]x[RK])	SLK
HPAA		VVVVV, QQQ, HHNHHH, LPPPPPLPPPP

Sitios conservados analizados por Prosite (GeneRunner), subrayados en la figura anterior. Asimismo, se resaltan en negrita aquellos presentes en el HD. Las regiones homopoliméricas (HPAA) se resaltan en itálicas.

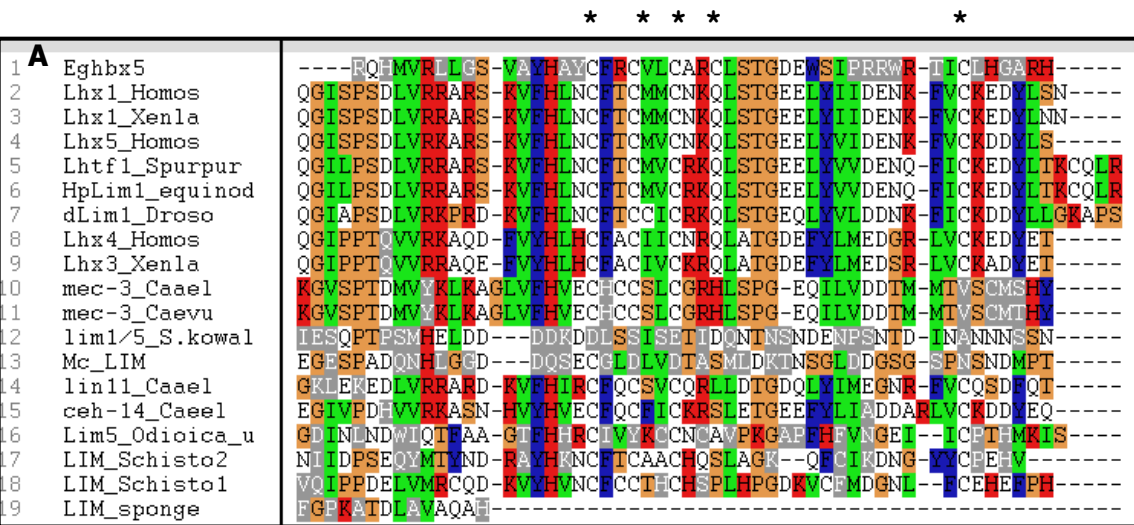
Resultados.
1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*.

Fig. 26. Análisis por BLAST P de EgLIM.



Las secuencias con mayor identidad con la secuencia analizada (187 aminoácidos) son básicamente las mismas que se encuentran al analizar sólo el HD, con el agregado de Lhx3 (*Homo sapiens* y otros vertebrados) y Lhx4 (*Xenopus laevis*).

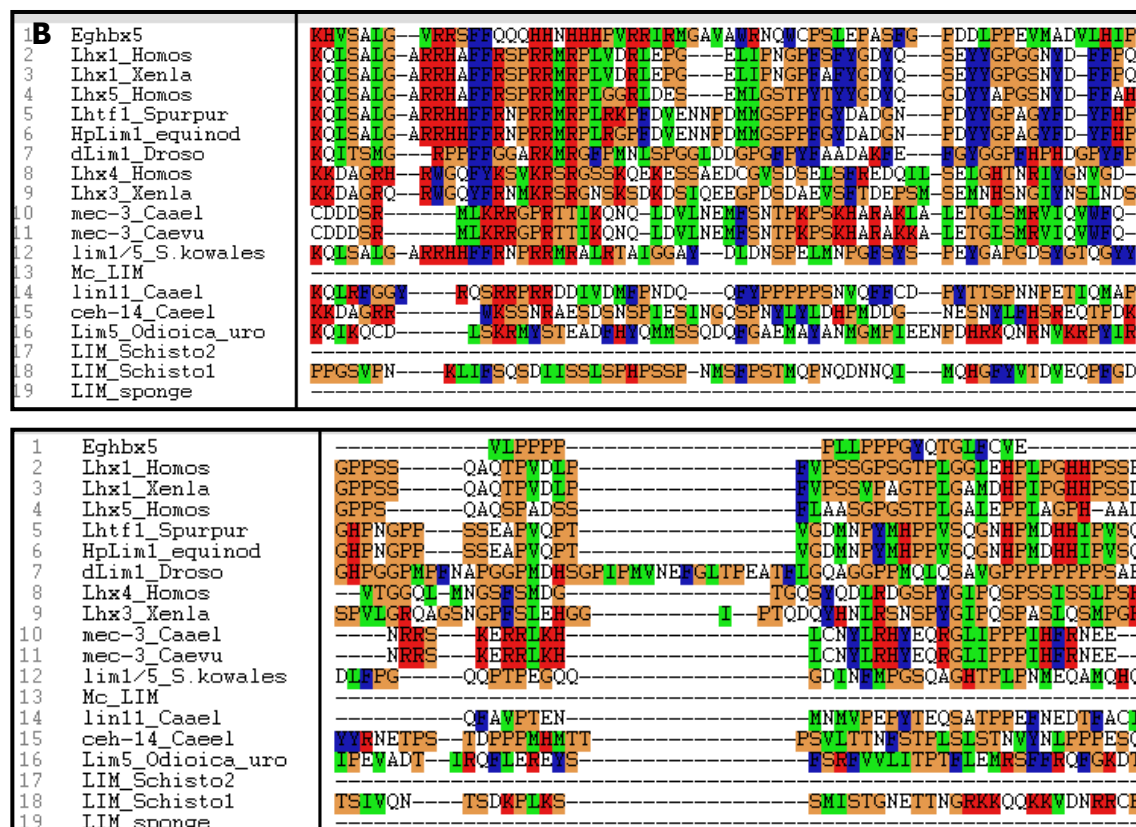
Fig. 27. Alineamiento mediante Clustal X de la secuencia de EgLIM con las más representativas obtenidas a partir del análisis por BLAST P.



A: Zona del dedo de Zn (LIM). Se marcan con un * los residuos de cisteína (C) característicos del dedo de Zn tipo LIM. Se agregó la secuencia de McLIM (*Mesocestoides vogae syn. corti*, Lalanne *et al.*, 2004) con fines comparativos.

Resultados.

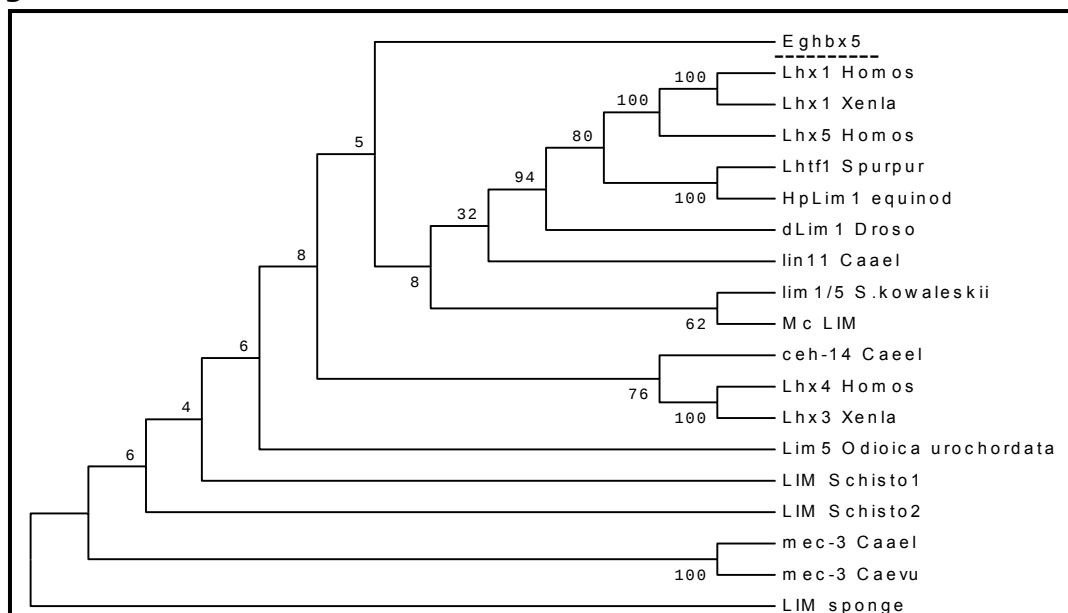
1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*.



B: Zona C-terminal con respecto al HD.

Como se aprecia en la figura, en esta zona existe una alta divergencia entre la secuencia de EglIM y las otras proteínas utilizadas en el alineamiento.

Fig. 28.

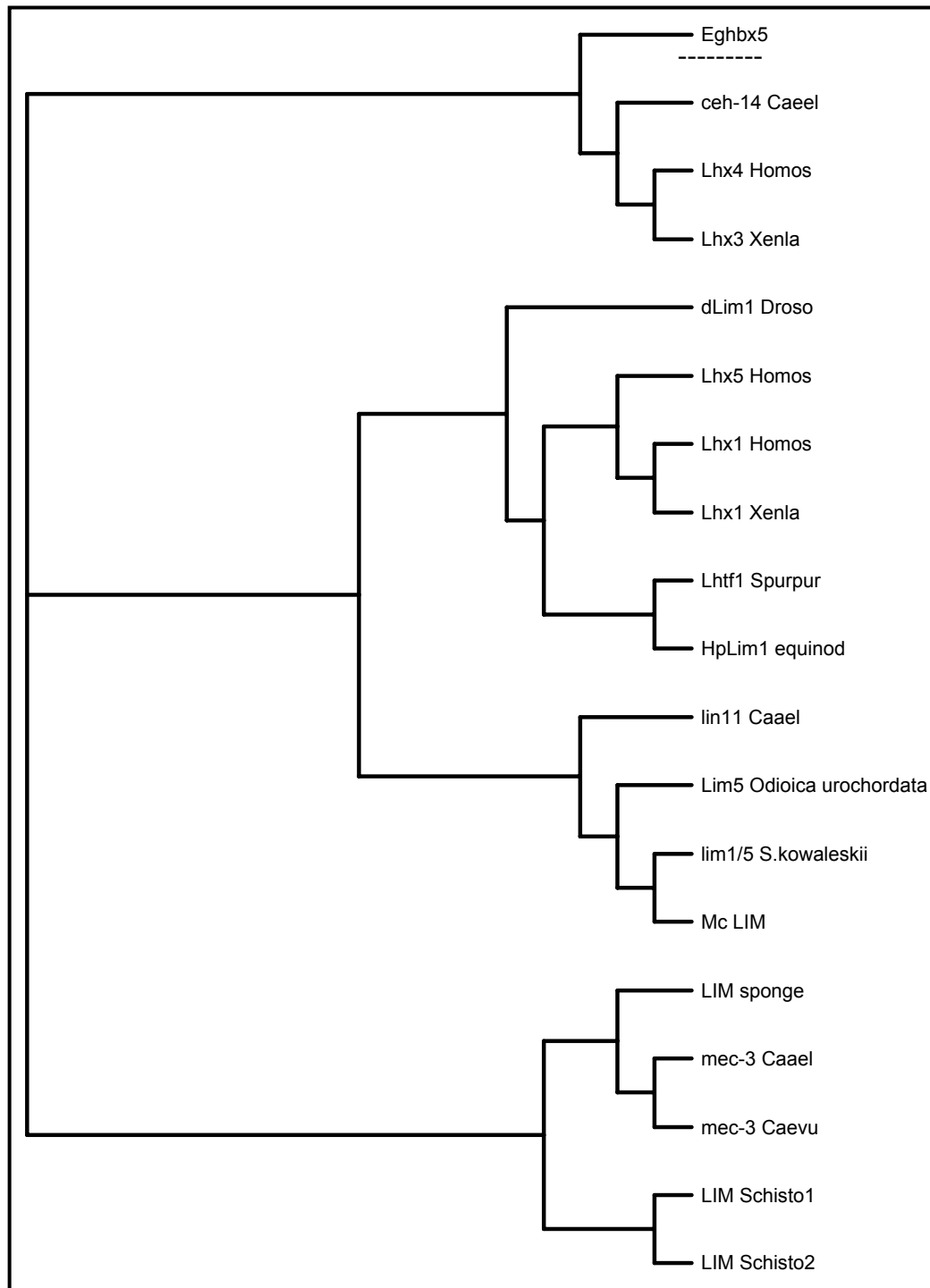


Reconstrucción filogenética mediante el Método de Máxima Parsimonia, con el soporte de 100 réplicas de *bootstrap*.

Resultados.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*.

Fig. 29.

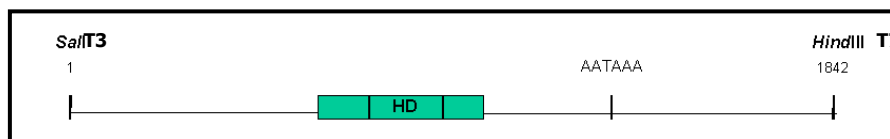


Reconstrucción filogenética mediante el Método de Unión de Vecinos, con el soporte de 1000 réplicas de *bootstrap*. La secuencia de EgLIM aparece como altamente divergente, dificultando su clasificación exacta dentro de las proteínas HD-LIM.

Eghbx6 fue aislado en un rastreo independiente, realizado por el autor de este trabajo, pero utilizando la misma estrategia que para clonar a los restantes genes con homeobox.

Fig. 30. Secuencia nucleotídica (1842 bp, obtenida a partir de un sub-clon plasmídico) del fragmento genómico que contiene parte del homeodominio (HD) de *Eghbx6*.

65

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus***Fig. 31. Esquema general de *Eghbx6***

"T3, *SalI*" y "T7, *HindIII*" aluden a la polaridad del inserto en el vector plasmídico. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados en las reacciones de secuenciación se subrayan, y se indican sus nombres de referencia y polaridad.

La secuencia de la proteína traducida conceptualmente se adjunta sobre la nucleotídica a partir del inicio del HD, que se resalta en negrita, respetando el marco de lectura. La señal putativa de poliadenilación, y las secuencias reconocidas por las enzimas *SalI* y *HindIII* se resaltan en negrita. No se encuentra el motivo 5' CTTCTC 3', que aparece en regiones regulatorias de otros genes de *E. granulosus*, pero sí las semi-secuencias CTTCT, TTCTC, GAGAA, AGAAG, que se destacan en *itálicas*. Los sitios putativos de pegado de la proteína *zeste* se subrayan y se señalan con una **Z**.

1. d.2. La secuencia aminoacídica de *Eghbx6***Fig. 32.**

	1		10		20		30	
GLDKQKDAPRQLISQ	LILGVGQKASGIH	IDTEMDGLGDHKFI	<u>IFRANTFP</u>					
			*		S			
40		50		60				
PSLLLLNLVVFQVWFQ	NRRTKWRNGCSRYGK	CEIDGRQSSTYICFK						
*	i	***h***	*	*	S			

La numeración comienza con el primer residuo del HD. Los residuos subrayados son característicos de las secuencias *prd* (2/10), según Schneitz *et al.*, 1993. La "i" debajo de la secuencia denota un residuo invariante según Galliot *et al.*, 1999 (1/6). La "h" denota un residuo altamente conservado (1/3). No se encuentra ningún (0/4) residuo que caracteriza las subfamilias dentro de los HDs tipo *prd*.

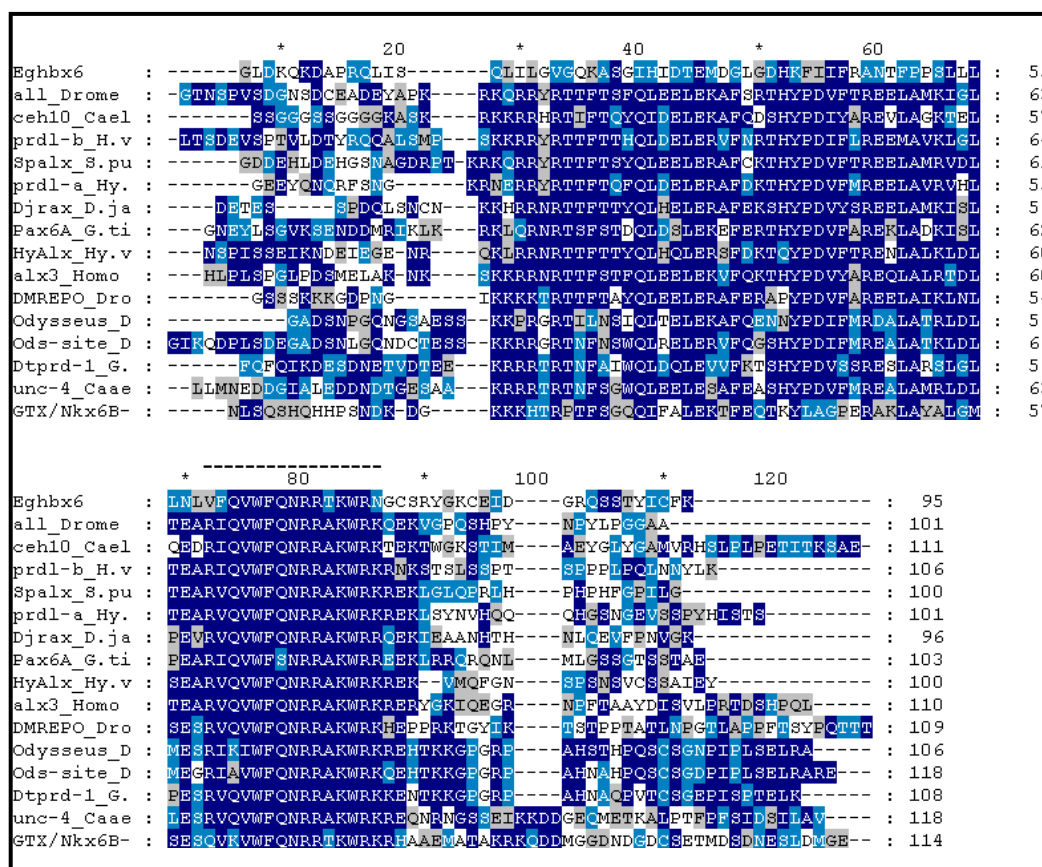
1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus***Fig. 33 y Tabla 5.**

>Eghbx6

GLDKQKDAPRQLISQLILGV**GQKASG**IHID**TEMD**GLGDHKFIIIFRANTFP**PSLLLLNL**V
 FQVWFQNRRTKWRNGCSRYGKCEIDGRQSS**TYICFK**

Sitios	Secuencia consenso	Sitios en la Secuencia
fosforilación por PK2	([ST]x(2)[DE])	TEMD
Miristoilización	(G{EDRKHPFYW}X(2)[STAGCN]{P})	GQKASG
HPAA		LLLLNL

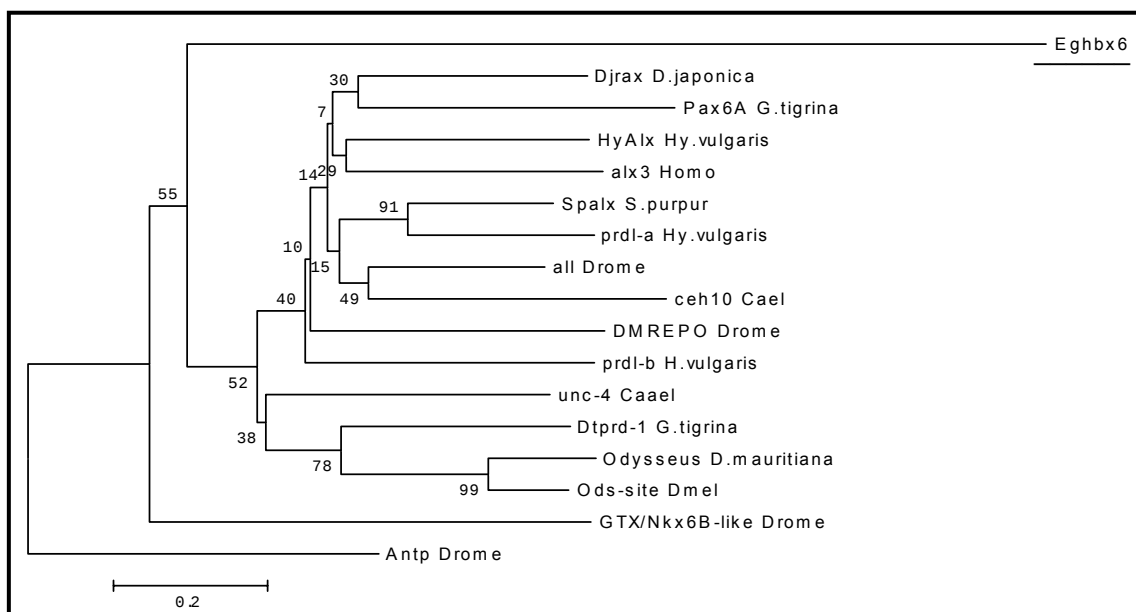
Sitios funcionales conservados analizados por *Prosites* (GeneRunner), resaltados en negrita en la figura que acompaña a la tabla.

1.d.3. Análisis Filogenético**Fig. 34.** Alineamiento mediante BLAST de la secuencia aminoacídica putativa de Eghbx6 con otras secuencias con HDs de la familia *paired*.

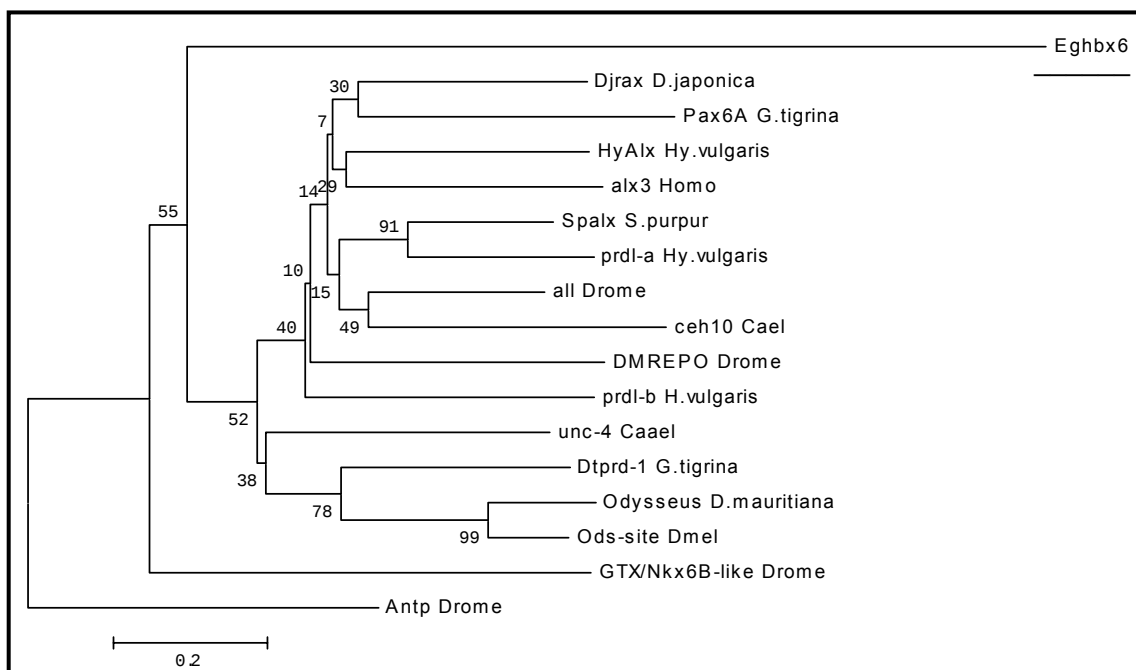
Tal como se aprecia en la figura, no existen zonas evidentes con similitud de secuencias por fuera del HD. Dentro del HD, salvo en la zona de la 3ª hélice (señalada en la figura por una línea ---), no existe una similitud de secuencia importante entre el HD de *Eghbx6* y el resto de las proteínas utilizadas en el alineamiento.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus***Tabla 6.** Comparación de regiones de homología de Eghbx6 con otras proteínas con HD de la familia *prd*.

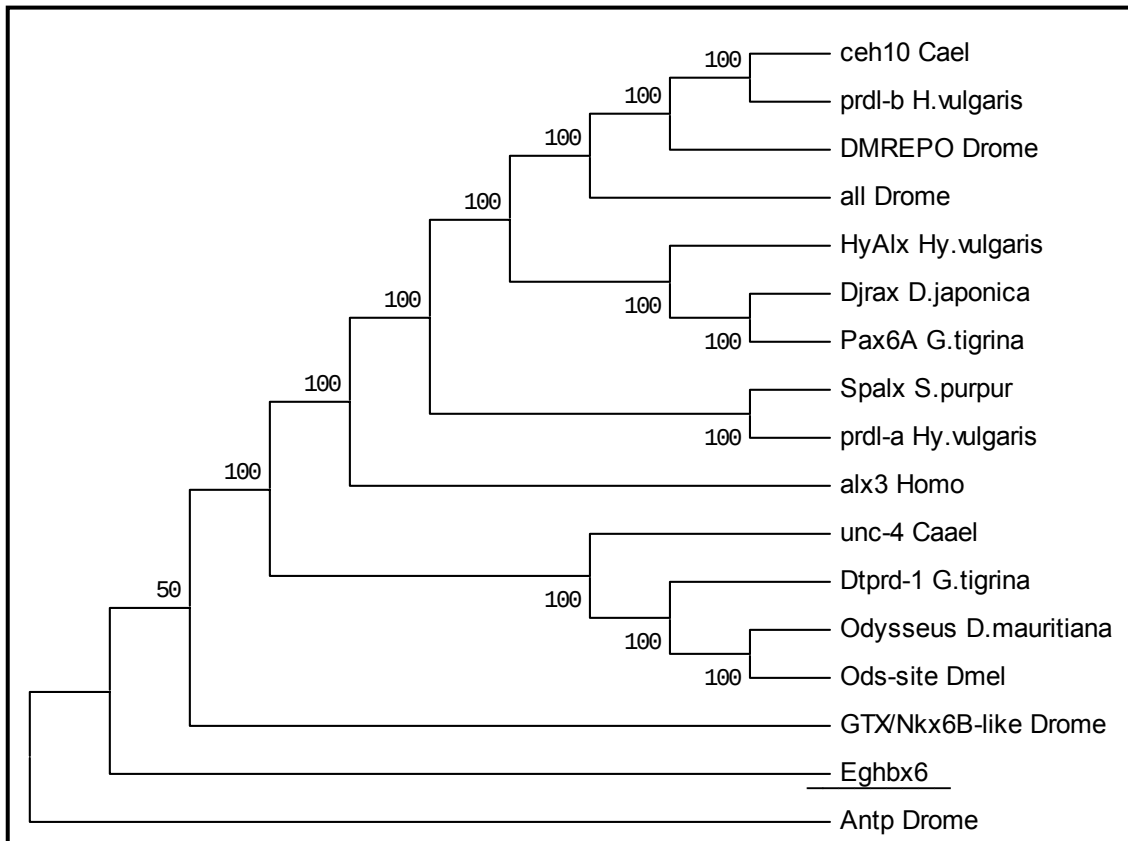
Eghbx6 [<i>Echinococcus granulosus</i>] 100%	GLDKQKDAPRQLISQ 1 10 20 30 40 LILGVGQKASGIHIDTEM DGLGDHKFII FRANTFPPSLLLLNLVF 50 60 QVWFQNRRTKWRNGCSRYGKCEIDGRQSSTY
(NM_006492) aristaleless-like hbx 3 Alx3 [<i>Homo sapiens</i>] 60 %	A...KR-E....IQ-E..NPF.
(NM_007441)arist aleless 3 ALX3 [<i>Mus musculus</i>] 60%	A...KR-E....MQ-E..NPF.
(X81403) alx3 [<i>Mesocricetus auratus</i>] 60%	A...KR-E....MQ-E..NPF.
(X64904)hbx prot (otd subfamily) unc-4 [<i>Caenorhabditis elegans</i>] 44%	QRY_ IFRANTFPPSLLLLNLVFQVWFQNRRTKWRN-GCSRYGKCEI---DGRQSST SBT_ V.MREALAMR.D..ESRV.....A...KREQN.N.SS..KKD..E.ME.
(23831508) TLX3 _HUMAN T- cell (Homeobox protein Hox- 11L2) [<i>H. sapiens</i>] 44 %	QRY_ SLLLLNLVFQVWFQNRRTKWRNGCSRYGKCEIDGRQSS SBT_ ..KMTDAQVKT.....RQTAE--ER.A..Q.A.
(NM_078665) Ods-site hbx [<i>D. melanogaster</i>] 44%	QRY_GDHKFII FRANTFPPSLLLLNLVFQVWFQNRRTKWR SBT_.S.YPD..MREALATK.D.MEGRIA.....A...
(L08401) al aristaleless [<i>D. melanogaster</i>] 58% (c/gaps)	Qry_ QVWFQNRRTKWRNGCSRYGKCEIDGRQSSTY Sbt_A...-----Q.KV.P..HP.
(NP_840087) posterior neuron-specific hbx Pnx [<i>Danio rerio</i>] 34%	Qry_HKFII FRANTFPPSLLLLNLVFQVWFQNRRTKWRNGCSRYG Sbt_ YLSV ERHCIAS A G SETQVKI KKELDGH
(AAP79283) developing brain hbx dbx [<i>Saccoglossus kowalevskii</i>].65%	Query: QVWFQNRRTKWRNGCSR Sbjct: .KI M SKE .

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus***Fig. 35.**

Análisis filogenético por el método de Unión de Vecinos de las regiones más conservadas del HD de *Eghbx6*. Se utilizó el HD de *Antennapedia* (*D. melanogaster*) como grupo externo. Se muestra el árbol más probable, recuperado luego de 1000 réplicas de *bootstrap*.

Fig. 36.

Análisis filogenético por el método de Unión de Vecinos de las regiones más conservadas del HD de *Eghbx6*. Se utilizó el HD de *Antennapedia* (*D. melanogaster*) como grupo externo. Se muestra el árbol consenso recuperado luego de 1000 réplicas de *bootstrap*.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus***Fig. 37.**

Análisis filogenético por el método de Máxima Parsimonia de las regiones más conservadas del HD de *Eghbx6*. Se utilizó el HD de *Antennapedia* (*D. melanogaster*) como grupo externo. Se muestra el árbol consenso recuperado luego de 100 réplicas de *bootstrap*.

El HD de *Eghbx6* es altamente divergente, mas puede ser clasificado tentativamente dentro de la familia *paired*, subfamilia *aristaless*.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus***1. e. *Eghbx3*/ *Stalker***

La secuencia del gen *Stalker* fue obtenida a partir del clon del fago λ original (Eg λ 2) y de un subclon plasmídico.

Las figuras de esta sección muestran en primer lugar la secuencia nucleotídica genómica, con la traducción conceptual de los marcos de lectura que consideramos relevantes.

En la Fig. 38 se resaltan una serie de motivos nucleotídicos en la secuencia de ADN, que consideramos de importancia destacar:

- Sitios de corte para las enzimas de restricción utilizadas en el subclonado,
- Oligonucleótidos utilizados en la secuenciación,
- ADN repetitivo en tándem (con sus repeticiones esquematizadas por debajo de la secuencia nucleotídica) (Sección 1.e.2.2, Fig. 41),
- Señales de reconocimiento de proteínas NK-2 (involucradas en el circuito de autocatálisis de estas proteínas con homeodominio, HD) (ver además Fig. 42),
- Señales de reconocimiento de proteínas GATA (factores de transcripción con dedos de Zinc y que participan en algunas de las mismas redes autorregulatorias que las proteínas NK-2 y que interaccionan bioquímicamente con ellas),
- Señales conservadas con otros genes de *E. granulosus*,
- Secuencia putativa de inicio de la traducción (con el módulo consenso descrito por Kozak señalado por debajo de la secuencia nucleotídica),
- Señales presuntamente involucradas en el procesamiento del intrón (ver además Fig. 40).

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*

Las figuras posteriores muestran algunos aspectos detallados del análisis de la secuencia nucleotídica:

- Análisis del intrón (Sección 1.e.2, Fig. 40)
- Análisis del ADN repetitivo en tándem (Fig. 41)
- Análisis del número de copias de *Stalker* en el genoma de *E. granulosus*, mediante ensayo de *Southern* blot en condiciones de alta rigurosidad (Fig. 43).

La traducción conceptual se detalla por encima de la secuencia nucleotídica en la Fig. 38, con el HD resaltado en negrita.

El análisis del péptido codificado por *Stalker* se presenta en detalle en las siguientes figuras:

- En primer lugar se analiza el HD de *Stalker*, el cual puede ser clasificado como perteneciente a la clase de HDs NK-2, dentro de la familia NK, debido a la presencia de una serie de residuos característicos (Sección 1.e.3, Fig. 44),
- Modelización 3D del HD de *Stalker*, que coincide con la de otros HDs NK-2 cuya estructura 3D fue resuelta experimentalmente (Fig. 45-48),
- Análisis filogenético (Sección 1.e.4) del HD, con el fin de buscar paralogías u ortologías con secuencias de HDs de otros organismos. A partir del análisis bioinformático de alineamientos de secuencias (utilizando sólo aquellas que presentaran una mayor identidad con el HD de *Stalker* Tabla 7; Fig. 49) y métodos de reconstrucción filogenética (Unión de Vecinos y Máxima Parsimonia, Figs. 50-53), vemos que el HD de *Stalker* se agrupa consistentemente en un clado que incluye a los genes de la clase NK-2, subclase NK2.2, junto a NK-2 (*vnd*) de *Drosophila melanogaster*.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*

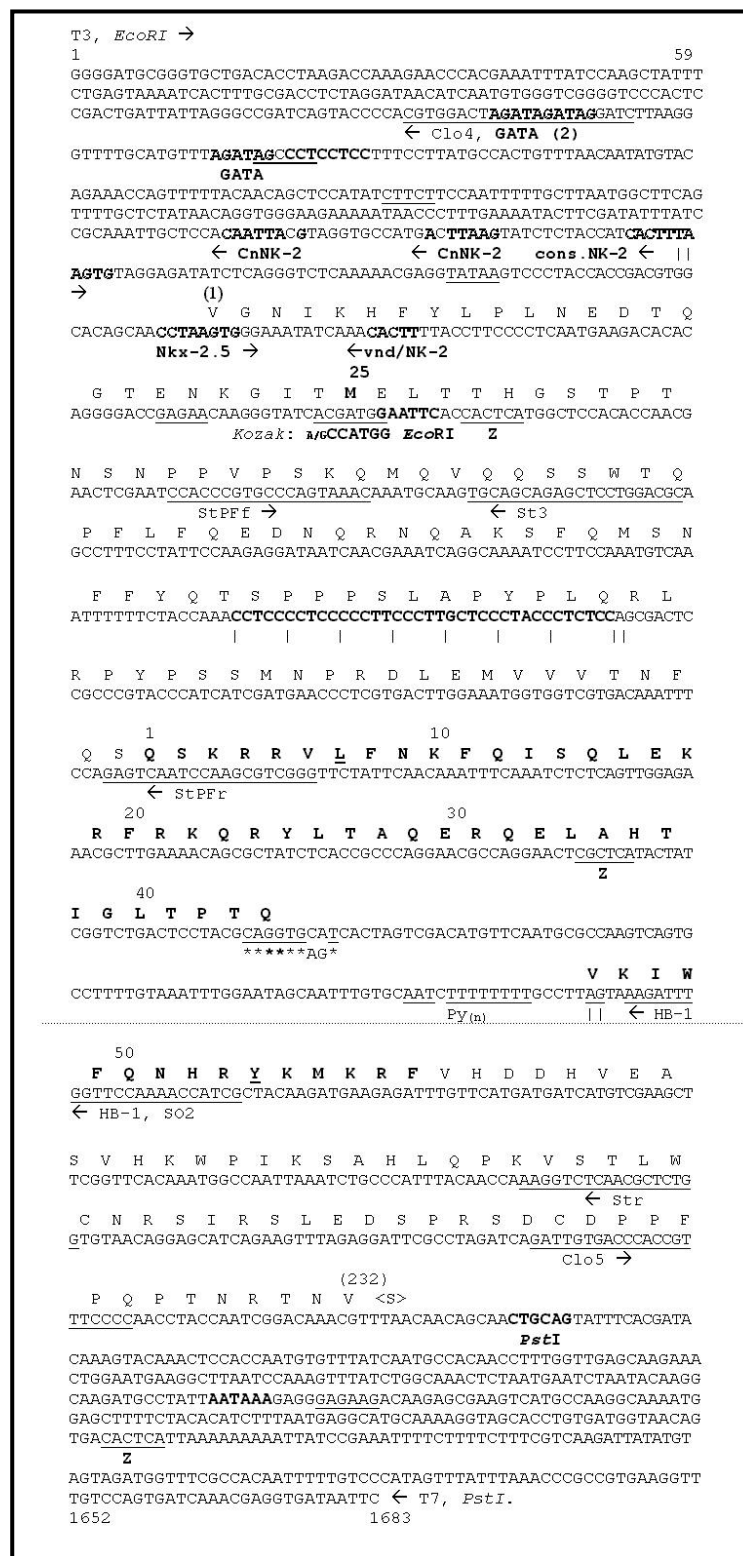
La última parte de esta sección incluye el análisis de las zonas extra-HD de Stalker. En primer lugar se presenta la búsqueda de sitios aminoacídicos conservados y con posible relevancia funcional (Fig. 54; Tabla 8).

Se presenta asimismo el alineamiento de partes de la proteína Stalker con motivos consenso encontrados en otras proteínas NK-2. Este análisis es relevante, ya que otro criterio utilizado para la clasificación de las proteínas con HD es el estudio de la presencia de motivos aminoacídicos característicos en estas zonas. En particular, para las proteínas NK-2 se han descrito dos dominios extra-HD: un dominio TND/*eh-1* en la zona N-terminal (presente de manera parcial en Stalker, Fig. 55), y un dominio NK-2 SD (*NK-2 specific domain*) hacia el extremo C-terminal, presente en casi todas las proteínas NK-2, y también presente parcialmente en Stalker (Fig. 56; Tabla NK2_Intro).

La última figura presenta el análisis de posibles estructuras secundarias de la secuencia aminoacídica total (Fig. 57). Se observa que no parece haber tramos de estructura secundaria significativos por fuera del HD.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*

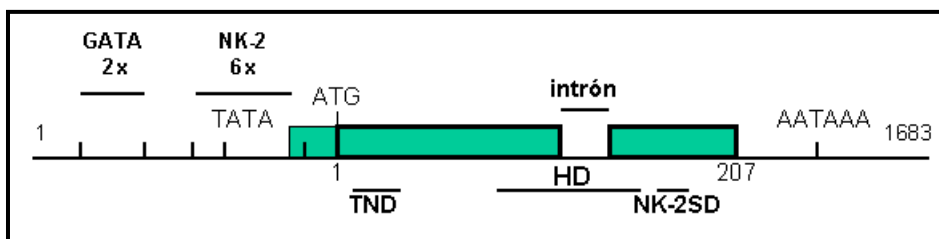
1.e.1. La secuencia genómica

Fig. 38.Secuencia nucleotídica (1683 bp) de *Stalker* y traducción conceptual de la misma.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*

La secuencia nucleotídica de *Stalker* (GenBank N° X66819, Oliver *et al.*, 1992) fue aislada a partir de un clon genómico de fago λ EMBL-4 (Eg λ 2), recuperado a partir de un rastreo con el oligonucleótido degenerado HB-1 (Burglin, com. pers.). Su inserto fue fragmentado y subclonado en un vector plasmídico para su posterior análisis.

"T3, *EcoRI*" y "T7, *PstI*" aluden a la polaridad del inserto en el vector plasmídico. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados en las reacciones de secuenciación se subrayan, y se indican sus nombres de referencia y polaridad. La secuencia de ADN repetitiva en tándem (unidad: 5' CCTCC 3') se resalta en negrita, así como la señal probable de poliadenilación, y las secuencias reconocidas por las enzimas *EcoRI* y *PstI*. Los sitios de reconocimiento putativos de la proteína *zeste* se subrayan y marcan con una **Z**. Las características de las secuencias intervinientes en el procesado del intrón se detallan por debajo de la secuencia principal y se discuten en la sección 1.e.2. La secuencia de la proteína traducida conceptualmente se adjunta sobre la nucleotídica y se numera a partir del inicio de la misma (entre paréntesis) y a partir del inicio del HD, que se resalta en negrita, respetando el marco de lectura. La M25 se resalta en negrita, con la secuencia de Kozak por debajo de la misma, también en negrita. Una posible "caja TATA" (5' TATAA 3') se subraya, así como una posible secuencia de poliadenilación (5' AATAAA 3'). Los sitios de posible autocatálisis se resaltan con contornos, y los nombres de las proteínas NK-2 que los reconocerían se detallan con negritas, por debajo de la secuencia. Asimismo, los sitios putativos de pegado de proteínas tipo GATA (5' WGATAR 3') también se destacan con contornos. Secuencias conservadas con otros genes de *E. granulosus* (5' CTTCTC 3') se subrayan.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus***Fig. 39. Esquema general del gen *Stalker*.**

Por encima del esquema se detallan sitios relevantes en el ADN, con sus posiciones relativas. Por debajo del mismo se detallan los motivos encontrados en la secuencia aminoacídica. GATA: secuencia de pegado de proteínas GATA; NK-2: secuencias de pegado de proteínas con HD NK-2 (ver más adelante); ATG: posible codón de iniciación de la traducción; TATA: posible "caja TATA"; AATAAA: posible sitio de poliadenilación; TND: motivo TND/eh-1 (ver más adelante); HD: homeodominio; NK-2 SD: dominio específico NK-2 (ver más adelante).

Según este esquema, la proteína traducida constaría de 207 residuos aminoacídicos y tendría un Peso Molecular aproximado de 24.500 Da.

1.e.2. Análisis de la secuencia genómica**Fig. 40. Análisis del Intrón.** Análisis de los sitios de corte y empalme putativos con alta probabilidad (Reese *et al.*, 1997; http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html, y programa GeneRunner)

Sitio donador probable: La secuencia resultado del análisis está subrayada. Los nucleótidos idénticos al consenso esperado están marcados con un * por debajo de la secuencia nucleotídica. Los asteriscos en negrita (*) señalan el sitio de corte probable. Asimismo, las únicas dos diferencias (CA en vez de GA) se señalan.

40
I G L T P T Q
CGGTCTGACTCCTACGCGAGGTGCATCACTAGTCGACATGTTCAATGCGCCAAGTCAGTG
*****AG*

Sitio aceptor probable: La secuencia del resultado del análisis su destaca con negrita. Se subraya el tracto de polipirimidinas característico de los sitios aceptores. El sitio putativo de empalme (AG) se subraya y marca con *.

CCTTTTGTAAATTTGGAATAGCAATTTGTGCAATCTTTTTTTTGCCTTAGTAAAGATTT
Py(n) **

50
F Q N H R Y
GGTTCCAAAACCATCGCTAC

La secuencia codificante se encuentra interrumpida por un intrón de 89 Nts. de longitud, en una posición conservada con otros intrones presentes en varios HDs (Burglin, 1994). El análisis de los sitios putativos de corte y empalme muestra con una muy alta probabilidad de que los sitios mostrados son los correctos.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus***1.e.2.2. Análisis de ADN repetitivo y otros motivos en el ADN****Fig. 41.** Búsqueda de ADN repetitivo en tándem (Tandem Repeat Finder, Benson, 1999)

```

Indices: 724--759  Score: 30
      Tamaño del período: 5  Número de copias: 7.4  Tamaño
del consenso: 5

              *      * *      *      *
      724 CCTCC CCTCCC CCTTC CCT-T GCT-C CCTAC CCTCT CC
        1 CCTCC CCT-CC CCTCC CCTCC CCTCC CCTCC CCTCC CC

Estadísticas:
Matches: 22,  Mismatches: 7,  Indels: 4
      0.67              0.21              0.12

Los matches están distribuidos entre estas distancias:
      4      4      0.18
      5     13      0.59
      6      5      0.23

Composición en bases: A:0.03, C:0.67, G:0.03, T:0.28

Patrón consenso (5 pb):
CCTCC

```

El análisis presentado en la Figura permite evidenciar la presencia de un ADN repetitivo (5' CCTCC 3') en la secuencia genómica codificante de *Stalker*. No se encontró la secuencia 5' CTTCTC 3' completa, característica de regiones reguladoras de otros genes de *E. granulosus*, pero sí se encontró una vez su complementaria 5' GAGAAG 3', que se subraya en la Fig. 38. Sí se encuentra una vez la secuencia parcial 5' CTTCT 3', y dos veces su complementaria 5' GAGAA 3' que se subrayan en la misma figura.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus***Fig. 42.****Posibles sitios de autorregulación por parte de homeoproteínas NK-2**

A.	
cons_nk2_dir	CACTTTAGTGT----
Nkx-2.5_dir	CACCTAAGTGGG---
CnNK-2_rev1	TACGTAATTGTG---
CnNK-2_rev2	TACTTAAGTCA----
cons_nk2_rev	ACTTAAAGTGAT---
vnd/NK-2_rev	-GTAAAACTGTTTGA
	* *
Consenso STALKER	NACN^T_AAAGTGN
B.	
Nkx-2.2	T ^T _C AAGT ^A _G ^C _G TT
(Watada et al., 2000)	
Nkx-2.2	CTNNAGTG (alta afinidad)
	C ^T _A TAATTN (baja afinidad)
(Chen / Schwartz, 1995)	
vnd/nk2	CAAGTG
(Damante et al., 1994)	
CnNk-2	C ^T _A TAATTG
(Thomsen et al., 2004)	
Consenso NK-2	T^T_CAAGTG
(Harvey, 1996)	
	* . ** . **
Consenso General	CNNAA^G_TTG

La zona 5' con respecto al marco abierto de lectura presenta una serie (6) de posibles sitios de pegado de factores de transcripción con HD tipo NK-2, lo que abre la posibilidad de que este gen se encuentre autorregulado. Este hecho es característico en este tipo de genes (Thomsen *et al.*, 2004), cuyos productos están involucrados en circuitos autorregulatorios, que estabilizan y potencian su propia expresión.

A: Análisis de la zona del gen *Stalker*, entre los nucleótidos 368 y 509 (Fig. 38); dir: directo, rev: reverso. Los sitios se alinearon mediante Clustal X.

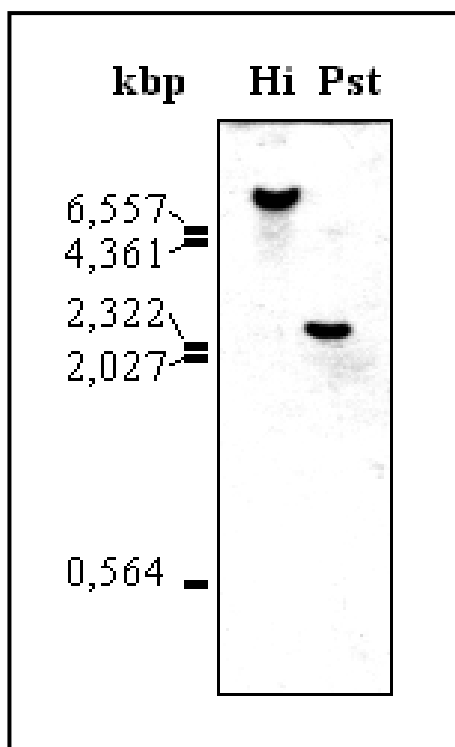
B: Alineamiento entre la secuencia consenso de Stalker deducida con sitios funcionales encontrados en otros sistemas (las referencias se encuentran por debajo de cada sitio): NKx-2.2, NKx-2.5 (*Mus musculus*), vnd/NK-2 (*D. melanogaster*), CnNK-2 (*Hydra vulgaris*).

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*

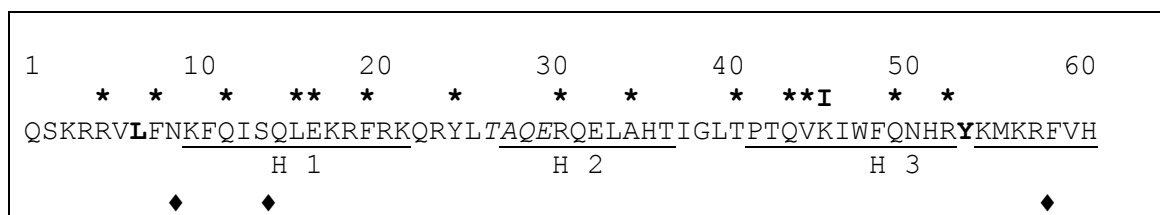
Organización genómica de *Stalker*: *Southern Blot*

El gen *Stalker* se encuentra presente en copia única en el genoma de *E. granulosus*.

Fig. 43.



Análisis por *Southern Blot* en condiciones de alta rigurosidad del número de copias de *Stalker* en el genoma de *E. granulosus*, así como de la especificidad de la reacción de Hibridización *in situ*. La sonda empleada fue el inserto liberado por *Bam* HI y *Hind* III. Como marcador de peso molecular se utilizó ADN de fago λ digerido con *Hind* III.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus***1.e.3. El homeodominio de Stalker****Fig. 44.** Secuencia aminoacídica del HD de Stalker

El HD de Stalker puede ser clasificado dentro de la superfamilia *Antennapedia*, familia *NK*, clase NK-2, subclase NK-2.2.

Presenta los dos residuos más característicos de las proteínas parálogas de la clase NK-2 (L7 e Y54).

Los * sobre la misma marcan los residuos característicos de la familia NK según Banerjee-Basu S & Baxevani, AD (2001). La "I" marca la ubicación del intrón. El HD comienza con un sitio de localización nuclear NLS parcial (QSKRR). Existe un sitio consenso de fosforilación por la enzima quinasa de caseína II (CKII: TAQE, pos. 28 – 30 del HD, en *itálicas*), presente en todas las proteínas de la clase NK-2 (Kasahara & Izumo, 1999). Los dos residuos característicos adicionales de la clase NK-2 (L7 e Y54) se destacan en **negrita**. Por debajo de la secuencia se señalan las tres hélices α del HD.

Asimismo, el HD de Stalker presenta una serie de aminoácidos diferentes a todas las secuencias NK-2 (doce, ver más adelante, Fig. II.a.4.2) y tres residuos no encontrados en ningún HD (marcados por un ♦).

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*

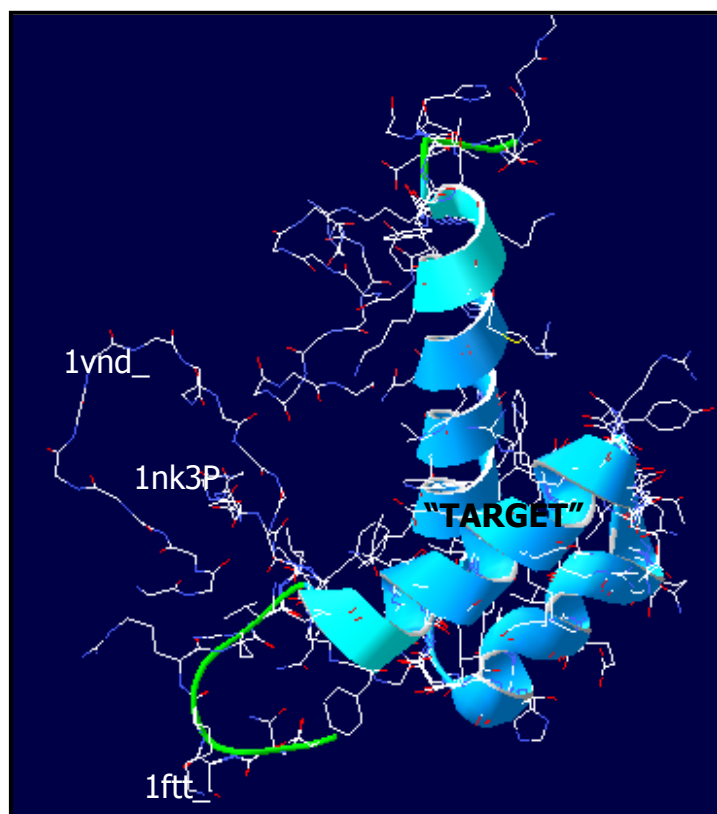
Estructura 3D del HD de Stalker, modelizada mediante el servicio *on-line* SWISS-MODEL (Guex & Peitsch, 1997; Peitsch, 1995; Schwede *et al.*, 2003). La predicción estructural se basó en una primera búsqueda de estructuras con un alto porcentaje de identidad y resueltas por métodos experimentales (RX, NMR) basada en un alineamiento BLAST con una $P(N) = 0.00001$ y la construcción de un modelo primario.

Fig. 45.

C:\ADN\SPDBV37sp5\spdbv\temp\AlignPrv1.txt									
TARGET	5		SQSKRRVLF	NKFQISQLEK	RFRKQRYLTA	QERQELAHTI			
1ftt	0		MRPKRRVLF	SQAQVYELER	RFRKQRYLSA	PEREHLASMI			
1nk3P	100		KKPKRRVLF	TKAQTYELER	RFRQQRYSLSA	PEREHLASLI			
1vnd	1	ASDGLPN---	-KKPKRRVLF	TKAQTYELER	RFRQQRYSLSA	PEREHLASLI			
			.	*****	.	*	..**	**	*..**.*
								**	** *
TARGET	44	GLTPTQVKIW	FQNHRYKMKR	FVHDD					
1ftt	39	HLTPTQVKIW	FQNHRYKMKR	QAKDKAAQQ					
1nk3P	139	RLTPTQVKIW	FQNHRYKTKR	AQNE					
1vnd	47	RLTPTQVKIW	FQNHRYKTKR	AQNEKGYEGH	P				
			*****	*****	**				

Alineamiento primario del HD de Stalker ("TARGET", en la figura anterior) con las secuencias experimentalmente con mayor identidad y cuyas estructuras estaban resueltas. Seguidamente el modelo primario se refinó gracias a estos moldes específicos (1ftt_.pdb, *H. sapiens*, 1nk3P.pdb y 1vnd_.pdb, *D. melanogaster*).

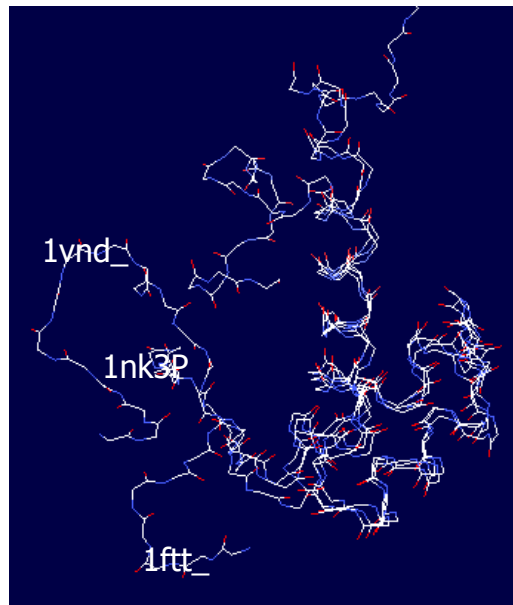
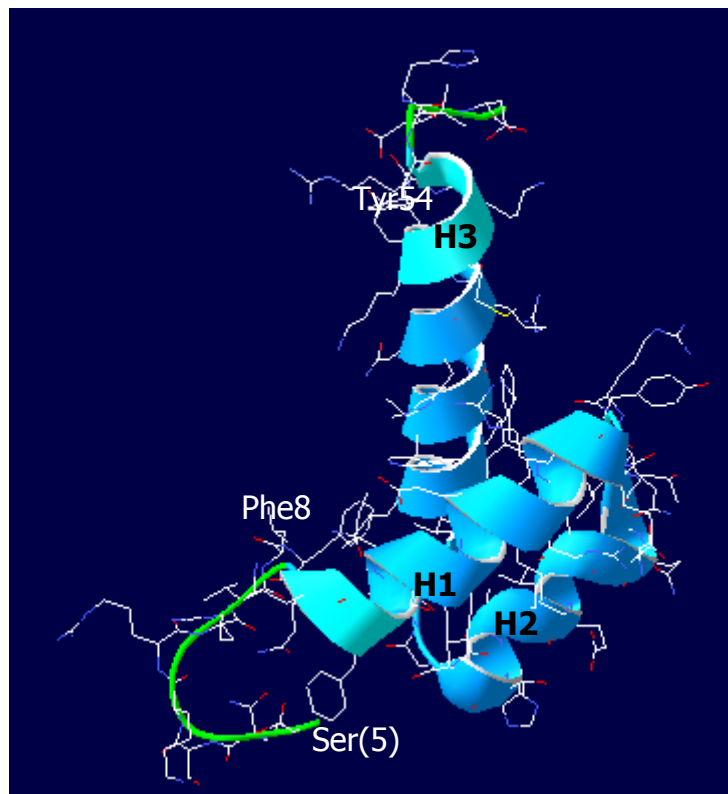
Fig. 46.



Superposición espacial de las cuatro estructuras

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus***Fig. 47.**

Las estructuras de 1ftt_.pdb, 1nk3P.pdb y 1vnd_.pdb sin la del HD de Stalker

**Fig. 48.** La estructura del HD de Stalker aislada

Se señalan las tres hélices α (H1-3), los aminoácidos característicos de las proteínas NK-2 (F8, Y54) así como el primer residuo utilizado en el modelado (Ser (5), véase Fig. II.a.3.3.).

La modelización de la estructura tridimensional del HD de *Stalker* muestra una estructura clásica de tres hélices alfa, separadas por zonas cortas sin estructura definida. En particular la estructura hélice-vuelta-hélice (H2 y 3), de reconocimiento del ADN y característica de todos los HDs, se encuentra bien conservada.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*

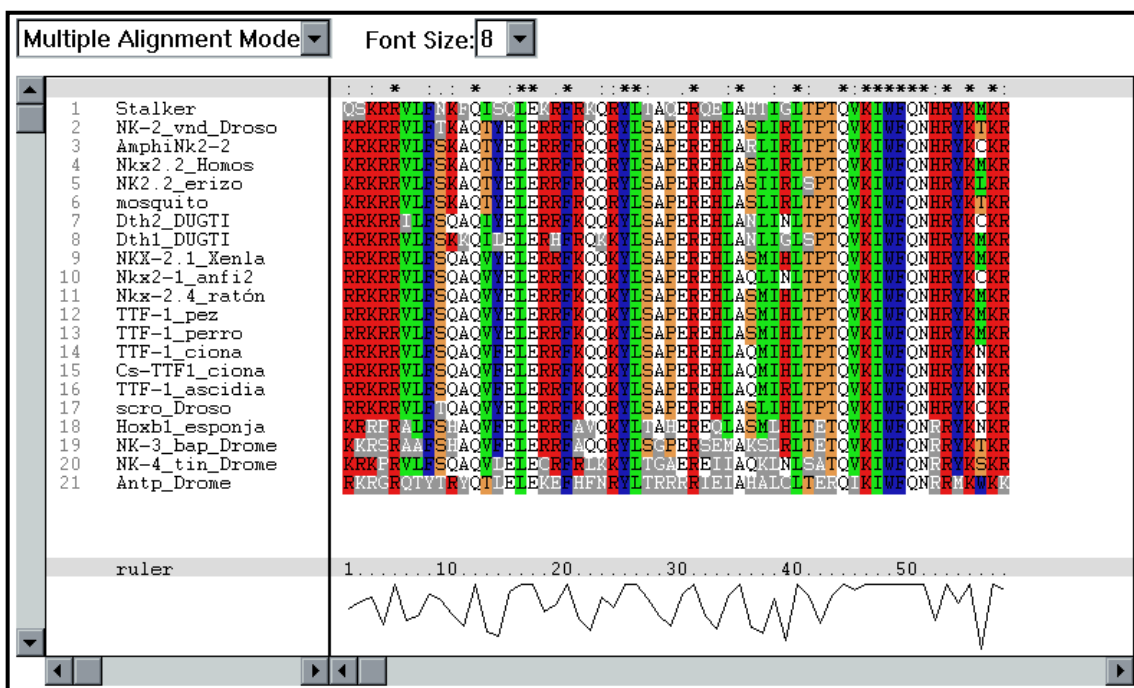
1.e.4. Tabla 7. Análisis Filogenético. Comparación del homeodominio (HD) codificado por *Eghbx3/Stalker* con los HDs más similares luego de realizar un alineamiento BLAST (Altschul *et al.*, 1997) con secuencias de otros metazoarios depositadas en el GenBank.

	1	10	20	30	40	50	60
(X66819) <i>Eghbx3, Stalker</i> [<i>E. granulosus</i>] 100%	QSKRRVLFNKFQISQLEKRFRKQRYLTAQERQELAHTIGLTPTQVKIWFQNHRYKMKRFVH						
(P43698) Thyroid nuclear factor 1 (TTF-1) (Hbx prot Nkx-2.1) [<i>Canis familiaris</i>] 68%	RR	SQA VYE	R KQ K	S P EH	SM H		
(AAD01958) Nkx2-2 [<i>Branchiostoma floridae</i>] anfioxo 73%	KR	S A TYE	R Q	S P EH	L R		C
(XP_306291) ENSANGP00000013812 [<i>Anopheles gambiae</i>] 72%	KR	S A TYE	R Q	S P EH	SL R		T
(O95096) Nkx-2.2 [<i>H. Sapiens</i>] 73%	KR	S A TYE	R Q	S P EH	SL R		
(Q00400) Dth-2 [<i>Girardia tigrina</i>] 70%	KR	S K LE	R QKK	S P EH	NL G S		
(P22808) (Ventral nervous system defective prot) vnd (NK-2) [<i>D. melanogaster</i>] 72%	KR	T A TYE	R Q	S P EH	SL R		T
(AAS58444) NK2.2 [<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>] 70%	KR	S A TYE	R Q	S P EH	SI R S		L
(BAB32434) thyroid trp fact-1 [<i>Lethenteron japonicum</i>] 68%	RR	SQA VYE	R KQ K	S P EH	SM H		
(AAF26436) hbx prot Scarecrow (scro) [<i>Drosophila melanogaster</i>] 68%	RR	TQA VYE	R KQ	S P EH	SL H		C
(Q9EQM3) NKX2.4 [<i>Mus musculus</i>] 68%	RR	SQA VYE	R KQ K	S P EH	SM H		
(AAK69025) NKX-2.1 [<i>Xenopus laevis</i>] 68%	RR	SQA VYE	R KQ K	S P EH	SM H		
(BAB68343) Cs-TTF1 [<i>Ciona savignyi</i>] ascidia 68%	RR	SQA VFE	R KQ K	S P EH	QM H		N
(AAC35350) Nkx2-1 [<i>Branchiostoma floridae</i>] 68%	RR	SQA VYE	R KQ.K..S P	EH QL	N		C
(CAA08756) TTF-1 [<i>Ciona intestinalis</i>] 67%	RR	SQA VFE	R KQ K	S P EH	QM H		N
(BAA33413) TTF-1 [<i>Halocynthia roretzi</i>] 67%	RR	SQA VFE	R KQ K	S P EH	QM R		N
(Q00401) Dth-1 (HMH-1) [<i>Girardia tigrina</i>] 63%	RR	I SQAQIYE	R KQ K	S P EH	NL N		C .
(P22711) (tinman, Msh-2, NK-4) [<i>D. melanogaster</i>] 50%	KKR.P..	SQA VLE	C LKK	GA EII	QKLN SA	R S	GD
(P22809) (bagpipe, NK-3) [<i>D. melanogaster</i>] 50%	KKRS.AA	SHA VFE	R AQ	SGP SEM	KSLR E	R T	KQ

Columna izq.: N° de acceso en GenBank; nombre del gen, especie a la que pertenece el mismo (nombre científico y/o común); porcentaje de similitud. Columna de la der.: secuencia del HD. Los espacios en blanco corresponden a identidades. (Abreviaciones: D.: *Drosophila*, fact.: factor, H.: Homo, hbx: homeobox, HD: homeodominio, prot.: proteína, trp.: transcription, X.: *Xenopus*).

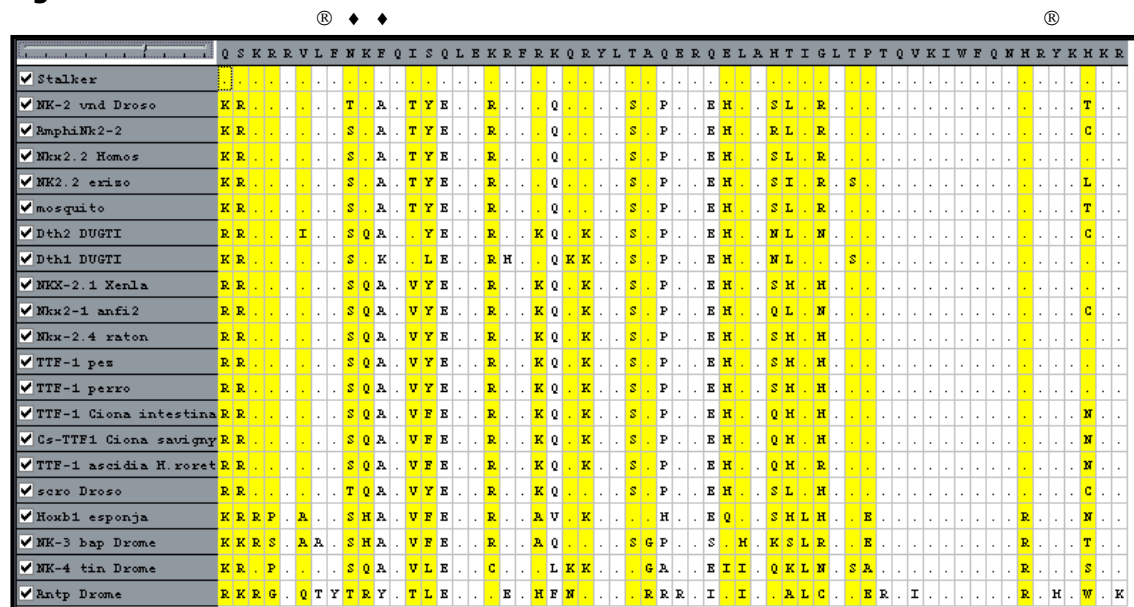
1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*

Fig. 49.

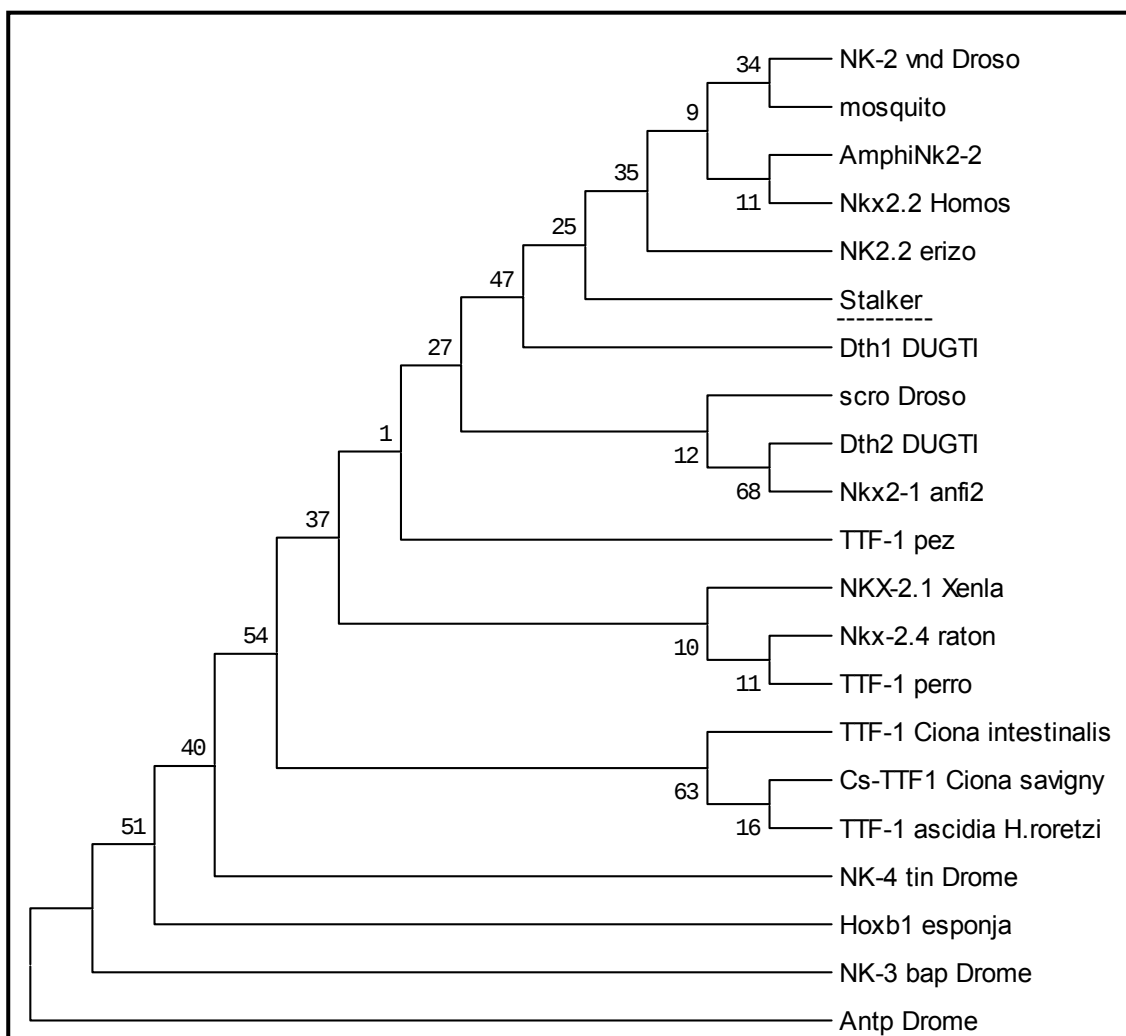


Alineamiento del HD de Stalker tal como se obtiene del análisis de las 21 secuencias elegidas por el programa ClustalX. Se utilizó el HD de *Antennapedia* (*D. melanogaster*) como referencia.

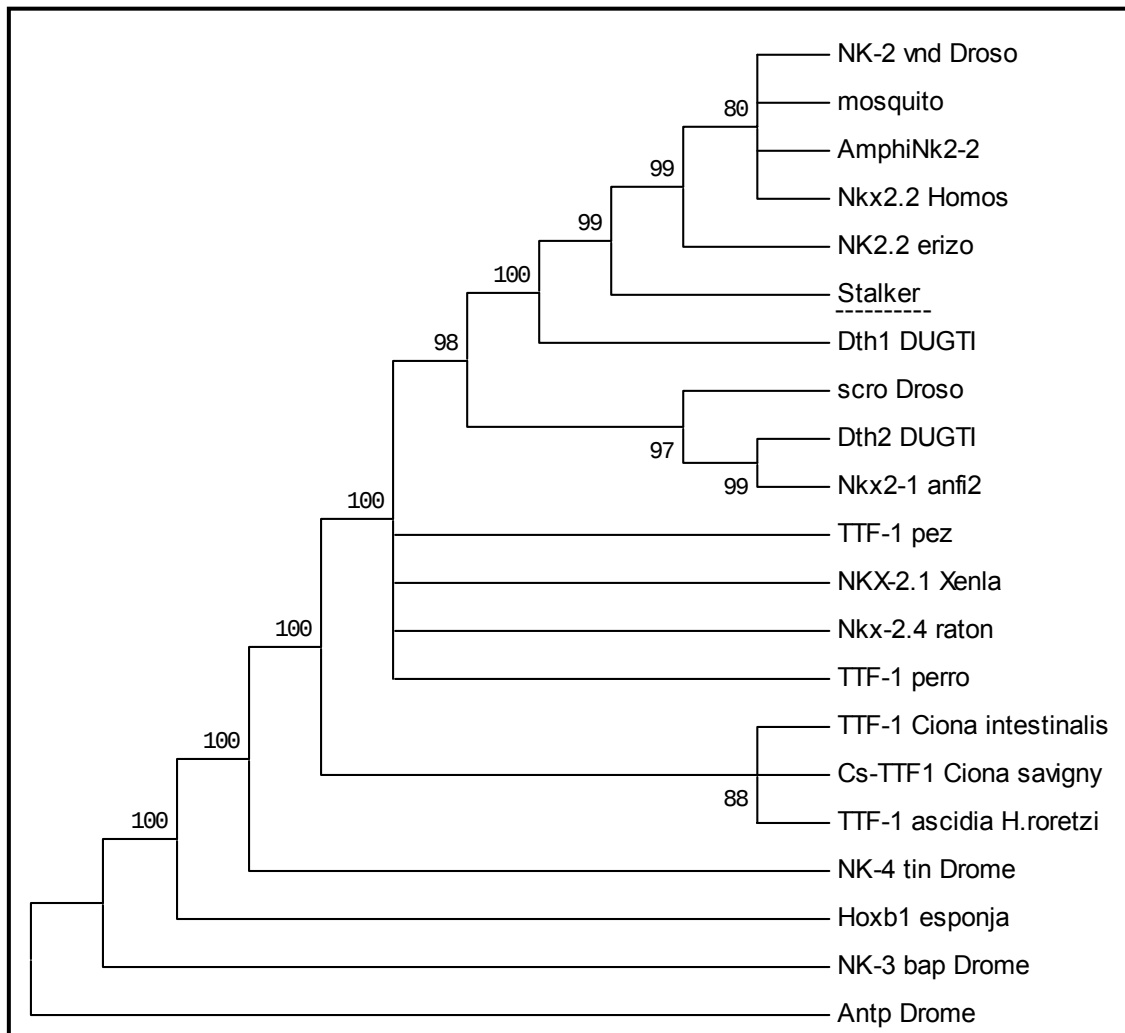
Fig. 50.



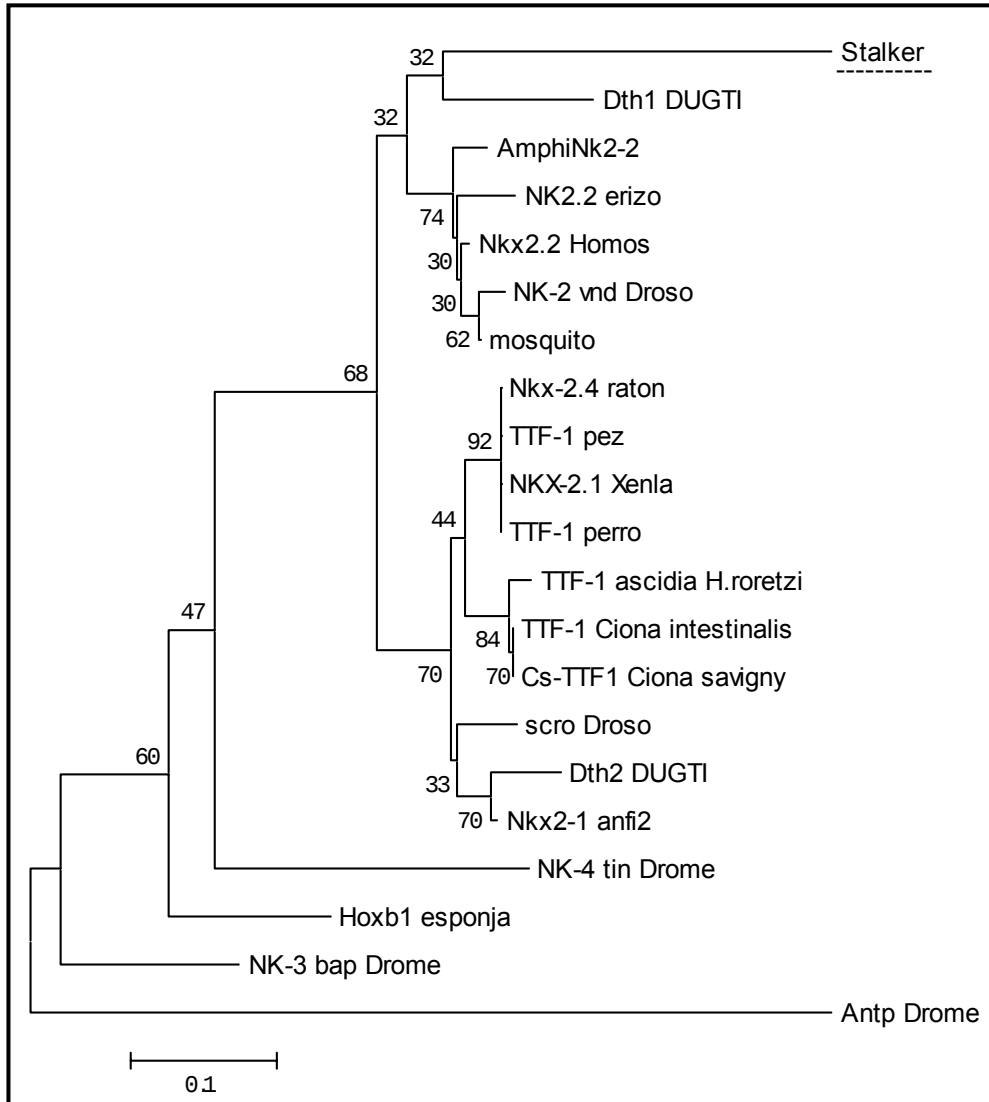
Sitios informativos de parsimonia (en amarillo). La secuencia del HD de *Stalker* se ubica en la fila superior. Los aminoácidos más característicos de la subfamilia de HDs NK2 se marcan con ®, y los atípicos se marcan con ♦.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus***Fig. 51.**

Análisis filogenético por el método de Máxima Parsimonia del HD de *Stalker*. Se utilizó el HD de *Antennapedia* (*D. melanogaster*) como grupo externo. Se muestra en la figura el primer árbol recuperado luego de 100 réplicas de *bootstrap*. El HD de *Stalker* puede ser clasificado dentro de la subfamilia NK2.2.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus***Fig. 52.**

Análisis filogenético por el método de Máxima Parsimonia del HD de Stalker. Se utilizó el HD de *Antennapedia* (*D. melanogaster*) como grupo externo. Se muestra en la figura el árbol consenso recuperado luego de 100 réplicas de *bootstrap*. El HD de *Stalker* puede ser clasificado dentro de la subfamilia NK2.2.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus***Fig. 53.**

Análisis filogenético por el método de Unión de Vecinos del HD de Stalker. Se utilizó el HD de *Antennapedia* (*D. melanogaster*) como grupo externo. Se muestra el árbol más probable, recuperado luego de 1000 réplicas de *bootstrap*. De acuerdo a los dos métodos de reconstrucción filogenética utilizados, el HD de *Stalker* puede ser clasificado dentro de la subfamilia NK2.2, dentro de la familia de HDs NK2.

1. Secuencias con homeoboxes en el genoma de *E. granulosus*

1. e. 5. Análisis de zonas extra-HD en la proteína

Fig. 54.

MELTTHG	<u>STPTNS</u>	SNPPVPSK	<i>QMQVQQS</i>	SWTQPF	FLFQEDNQRNQA	KSFQMS	NFFYQTS	<i>PPPSLAP</i>
65	YPLQRLRPYPSSMNPRDLEMVVVTN	FQS	<u>SKRRVLFNKFQI</u>	SOLEK	FRFRKQRYL	TAQE	RQELAH	
129	T	GLTPTQ	VKIWFQ	NHRYKMKRFVHDDHVEASVHKWPIKSAHLQPKVSTLWCNRSIRSLEDSPR				
	<u>SDC</u>							
193	<i>DPPFPQ</i>	<u>PTNRTNV</u>	<S>					

La secuencia aminoacídica putativa de *Eghbx3/Stalker*. El HD está subrayado. La numeración es arbitraria. La secuencia putativa TN/*eh-1* se remarca en negrita.

Tabla 8. Sitios aminoacídicos funcionales conservados

Sitios	Secuencia consenso	Sitios en la Secuencia
Asn-glicosilación	(N{P}[ST]{P})	NRSI, NRTN
fosforilación por PK2	([ST]x(2)[DE])	SQLE, TAQE, SLED, SDCD
fosforilación por PKC	([ST]x[RK])	SKR, SIR, SPR, TNR
Miristoilización	(G{EDRKHPFYW}X(2)[STAGCN]{P})	GSTPTN, GLTPTQ
HPAA		QMQVQQ, PPPSLAPYP, PPFPQP

Sitios conservados analizados por *ProSite* (GeneRunner), subrayados en la figura anterior. Asimismo, se resaltan en negrita aquellos presentes en el HD. Las regiones homopoliméricas (HPAA) se resaltan en itálicas.

Fig. 55.

	52	74								
Stalker_eh1	SWTQPF	FLFQEDNQRNQA--KSFQMS								
consenso_eh1	HRALP	F	SI--DNILSLDFGRKKVS							
	:	**	:	**	.	:	:	:	:	*

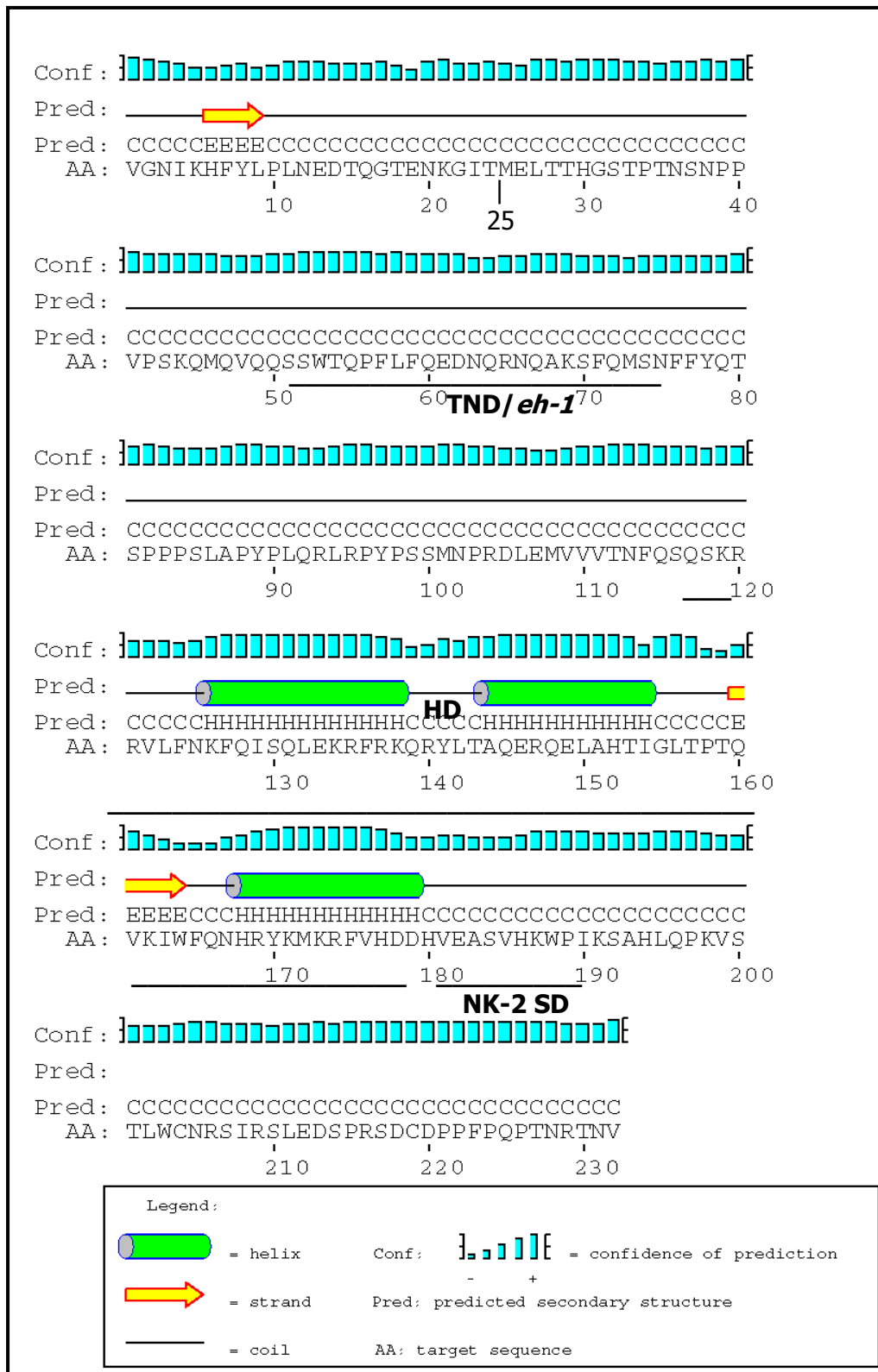
Alineamiento del dominio TN/*eh-1* consenso con el putativo de Stalker. La numeración corresponde arbitrariamente a la de Stalker. La F57 (pos. 6 del dominio), invariable en este tipo de dominio, está remarcada en negrita.

Fig. 56.

	179
Stalker_Ct	VEASVH-K.-W-P
NK2_SD	VAVPVLV _{R/K} DGKP
	* . . * * *

Alineamiento del dominio *NK2-SD* consenso con el putativo de Stalker. La numeración corresponde arbitrariamente a la de Stalker.

Fig. 57.



Posibles estructuras secundarias de Stalker analizadas por PSIPRED (McGuffin *et al.*, 2000). Se subrayan el HD y los posibles motivos TND/*eh-1* y NK-2 SD. Nótese la ausencia de estructuras secundarias por fuera del HD de *Stalker*.

2. Expresión de *Eghbx3/Stalker* en diferentes etapas del desarrollo de *E. granulosus* (I)

“Nada en este mundo es un regalo.
Lo que ha de aprenderse
debe aprenderse arduamente.”

Carlos Castaneda, *Las enseñanzas de Don Juan*, 1974.

Consideraciones preliminares

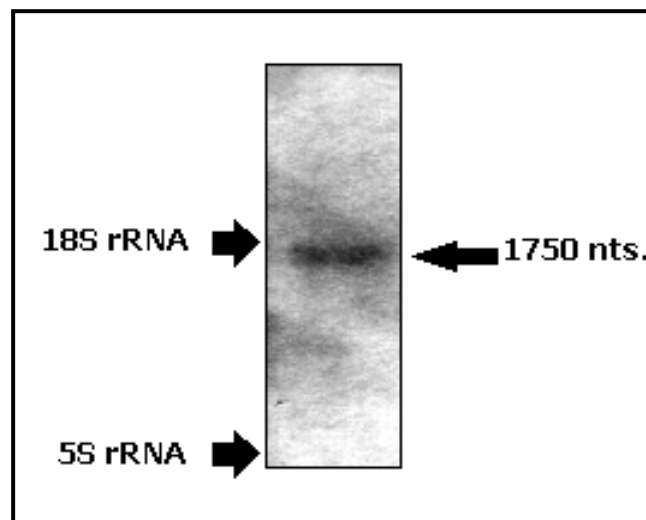
En un organismo como *Echinococcus granulosus*, inaccesible por el momento a estrategias tales como las de mantener su ciclo vital completo *in vitro*, o a las de genética reversa, los estudios *in situ* constituyen una ventana privilegiada para poder observar sus estrategias biológicas.

La estrategia utilizada fue la de realizar hibridizaciones *in situ* en material hidático *in toto*, utilizando la ribosonda antisentido del gen. Los estadíos analizados por esta técnica incluyen a todos los posibles operables con un margen razonable de bioseguridad: larvario (capa germinativa, *yema*, brote y protoescólex) y adultos en etapas previas a la ovogénesis. Se trabajó con el material *in toto* debido a que consideramos que era la mejor estrategia para estudiar a un gen con homeobox (por lo tanto factor transcripcional) con bajos niveles de expresión.

Los controles realizados para estas reacciones consistieron en el empleo, en paralelo, de ribosondas sentido de *Stalker* u otros genes de *E. granulosus*, así como de otras ribosondas antisentido.

2. Expresión de *Eghbx3/Stalker* en diferentes etapas del desarrollo de *E. granulosus* (I)**2.a. *Stalker* en el Protoescólex maduro de *E. granulosus***

La expresión de *Stalker* en el PSc maduro de *E. granulosus* evidencia claramente el pedúnculo (*stalk*, en inglés) del mismo (Martínez *et al.*, 1997). Esta reacción específica nos llevó a denominar a *Eghbx3* como *Stalker*. Existe además una tenue reacción subvesicular con la ribosonda antisentido, en la parte basal del soma, que permanece luego de que el pedúnculo es reabsorbido. Como experimentos control, se realizaron ensayos de *Southern* y *Northern* blots, así como reacciones con la ribosonda sentido de *Eghbx3*.

Northern blot**Fig 58.**

Análisis por *Northern Blot* en condiciones de alta rigurosidad del transcripto de *Stalker* en el estadio PSc de *E. granulosus*, así como de la especificidad de la reacción de Hibridización *in situ*. La sonda empleada fue el inserto liberado por *Bam* HI y *Hind* III.

2. Expresión de *Eghbx3/Stalker* en diferentes etapas del desarrollo de *E. granulosus* (I)

Fig. 59.

Stalker en el pedúnculo (P) del PSc maduro.

Otros detalles morfológicos: vesícula (ves), ventosas (V), corona de ganchos (G), corpúsculos calcáreos (cc). (Tiempo de Reacción, TR: 30 min., B ~ 50 µm)

2. Expresión de *Eghbx3/Stalker* en diferentes etapas del desarrollo de *E. granulosus* (I)

2. Expresión de *Eghbx3/Stalker* en diferentes etapas del desarrollo de *E. granulosus* (I)

Fig. 60. (arr. izq.)

En muchos ejemplares se aprecia, además, una señal más tenue sub-vesicular (sv; P: pedúnculo, rP: restos del pedúnculo). (TR: 1hr 30min., B ~ 100 μ m)

Fig. 61. (abajo der.)

En este preparado, se aprecia claramente la marca de *Stalker* en los pedúnculos o restos de pedúnculos (rP) de los PScs. Además se aprecia una marca más tenue en la región sub-vesicular en los ejemplares del centro (evaginado) y en el de abajo a la izquierda. (TR: 30min., B ~ 150 μ m).

2. Expresión de *Eghbx3/Stalker* en diferentes etapas del desarrollo de *E. granulosus* (I)

2. Expresión de *Eghbx3/Stalker* en diferentes etapas del desarrollo de *E. granulosus* (I)

Fig. 62.

En este racimo de PScs unidos a la CG, se aprecian los pedúnculos marcados por *Stalker*, en particular en algunos ejemplares aparece más teñida la zona adyacente al cuerpo del PSc e incluso la zona más basal del soma.

Existe además reacción a nivel de parte de la CG asociada, en parches (Pa).

(TR: 1hr 30min., B ~ 150 µm).

Fig. 63.

En esta preparación, la señal de *Stalker* en los PScs maduros y libres de CG aparece en todas sus variedades: fuerte señal en restos de pedúnculo y señal mucho más tenue en la zona sub-vesicular en el ejemplar evaginado (arr. centro) y en el invaginado (abajo der.); señal fuerte en la zona basal (sub-vesicular) del PSc y señal más tenue en el pedúnculo cortado (abajo izq.).

(TR: 1hr 30min., B ~ 150 µm).

Fig. 64.

Reacción control con la sonda sentido de *Stalker*.

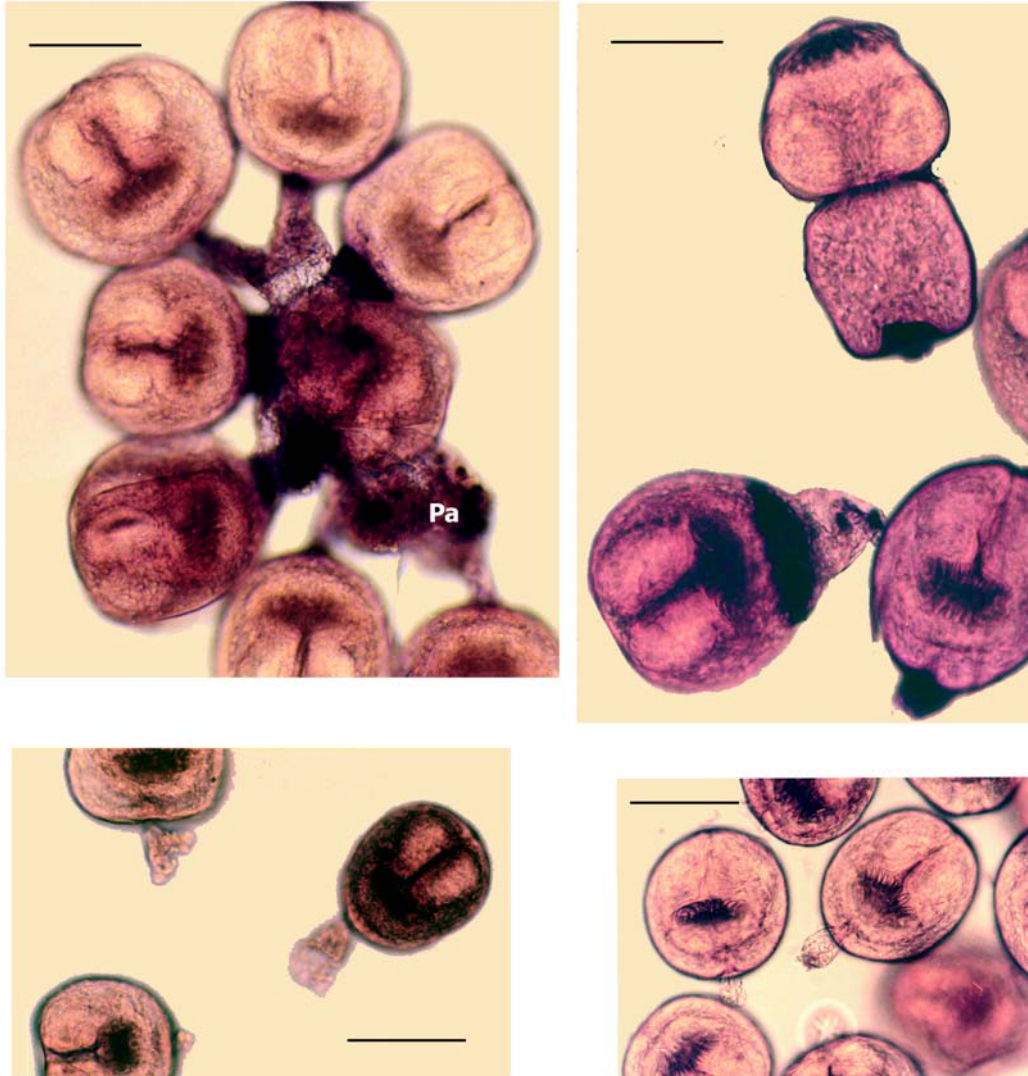
(TR: 1hr 30min., B ~ 150 µm).

Fig. 65.

Otra reacción control con la sonda sentido de *Stalker*.

(TR: 30min., B ~ 200 µm).

Nota: Una reacción control adicional (PScs en distintos estadios de maduración, unidos a la CG) se muestra en la Fig. 106.

2. Expresión de *Eghbx3/Stalker* en diferentes etapas del desarrollo de *E. granulosus* (I)

2. Expresión de *Eghbx3/Stalker* en diferentes etapas del desarrollo de *E. granulosus* (I)**2.b. *Stalker* en el gusano adulto**

"And then their flesh and bones were strangely merged
 Forever to be joined as one. [...]
 "We are the one". Demi-god and nymph are now made one.
 Both had given everything they had.
 A lover's dream had been fulfilled at last.
 Forever still beneath the lake."

Peter Gabriel / Genesis: *The Fountain of Salmacis*, Nursery Crime (1971).

El estudio de la expresión de *Stalker* en muestras de gusanos adultos ingravidos (estadios E3-6, Smyth & McManus, 1989, p.252) de *E. granulosus* evidencia la presencia de su ARN mensajero en dos zonas: por un lado en el extremo apical de la tenia, el escólex, entre las ventosas; y por el otro en la estróbila, en la genitalia de las proglótides en maduración, en testículos y ovarios. En las proglótides más inmaduras la señal se da sobre todo en los testículos y sólo en las proglótides más maduras aparece también en los ovarios, lo cual puede reflejar el carácter de hermafroditismo protándrico de este Cestodo.

En estas últimas no existe señal a nivel de tegumento ni en la capa muscular subtegumentaria. Tampoco hay señal de *Stalker* en vagina, *vas deferens*, cirro, saco del cirro, gonoporo o en las glándulas vitelógenas. Los controles consistieron en la utilización de la sonda sentido de *EgCyc* (ciclofilina, con la que no se obtuvo ninguna señal) y en la sonda antisentido de *EgTRX* (tiorredoxina, de expresión ubicua). El estadio final de maduración de la tenia (E7) no fue analizado.

2. Expresión de *Eghbx3/Stalker* en diferentes etapas del desarrollo de *E. granulosus* (I)

Fig. 66. (arr. izq.)

Expresión de *Stalker* en una tenia estadio E3 (B ~ 250 μ m).

(V.: ventosa, R: rostelo, C.: cuello, P.: proglótide, gen.: genitalia femenina y masculina, B: barra de calibración).

Fig. 67. (arr. der.)

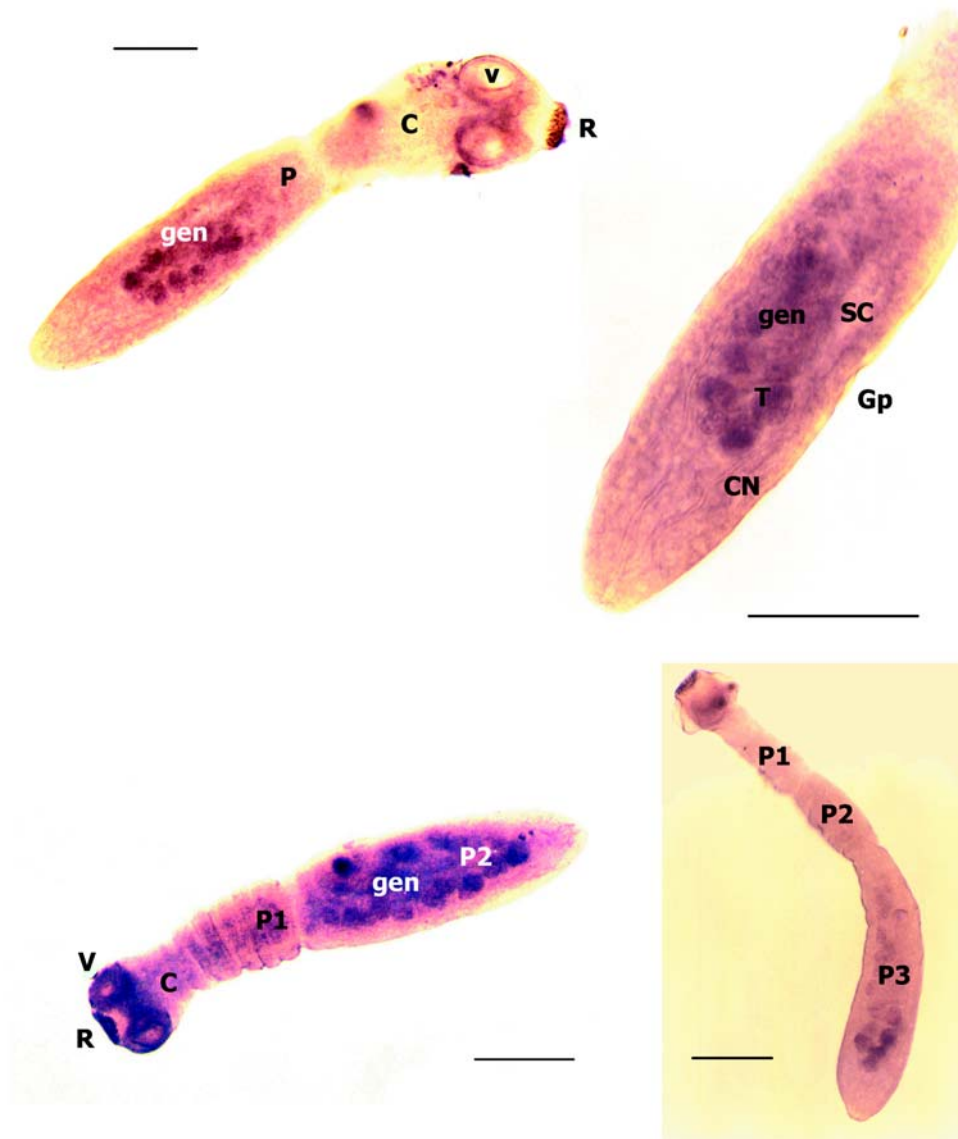
Detalle de la foto anterior mostrando el gonoporo (GP), el saco del cirro (SC) y los cordones nerviosos (CN). (B ~ 400 μ m).

Fig. 68. (abajo izq.)

Stalker en una tenia de dos proglótides (E3): P₁, inmadura y P₂, madura. (B ~ 250 μ m).

Fig 69. (abajo der.)

Stalker en una tenia de tres proglótides (P₁, P₂ y P₃, E6) (B ~ 250 μ m).

2. Expresión de *Eghbx3/Stalker* en diferentes etapas del desarrollo de *E. granulosus* (I)

2. Expresión de *Eghbx3/Stalker* en diferentes etapas del desarrollo de *E. granulosus* (I)

Fig. 70.

Detalle de la expresión de *Stalker* en la última proglótide de una tenia de tres segmentos (E5).

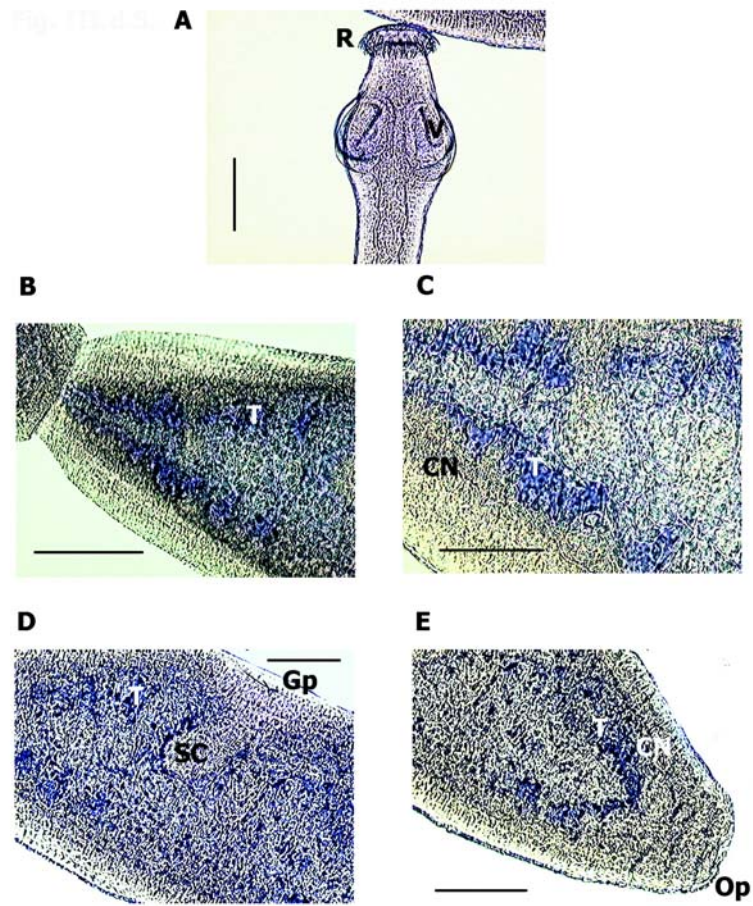
A: *Stalker* en el escólex (B ~ 200 μ m) (R: rostelo, V: ventosa)

B: Detalle del sector anterior de la última proglótide (B ~ 100 μ m)

C: sector anterior de la última proglótide (B ~ 150 μ m)

D: sector medio de la última proglótide (B ~ 250 μ m) (T: testis, U: útero, SC: saco del cirro, flecha, GP: gonoporo)

E: Sector terminal del gusano (B ~ 250 μ m) (T: testis, CN: Cordón nervioso, Op: opérculo)

2. Expresión de *Eghbx3/Stalker* en diferentes etapas del desarrollo de *E. granulosus* (I)

2. Expresión de *Eghbx3/Stalker* en diferentes etapas del desarrollo de *E. granulosus* (I)

Fig. 71.

Detalle de la expresión de *Stalker* en la última proglótide de otra tenia en estadio 6.

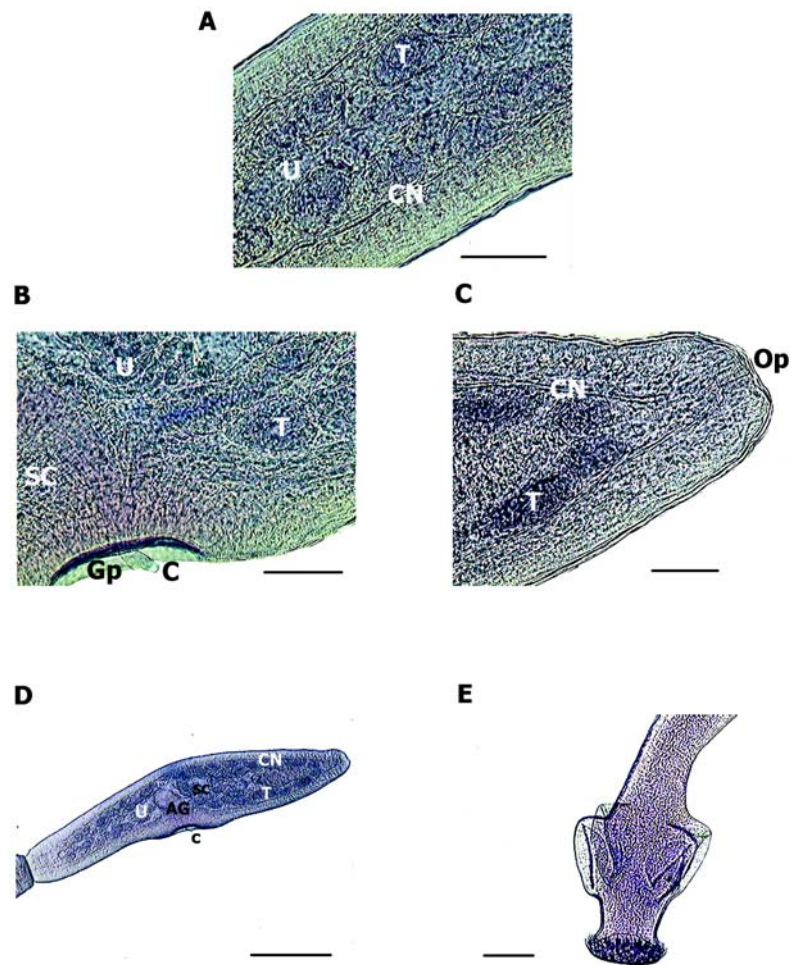
A: sector medio de la proglótide (B ~ 200 μm)

B: Detalle de la zona del gonoporo (B ~ 100 μm)

C: detalle de la zona terminal (B ~ 200 μm)

D: vista panorámica del último segmento de la tenia (B ~ 400 μm) (AG: Atrio Genital)

E: detalle del escólex de la tenia (B ~ 250 μm)

2. Expresión de *Eghbx3/Stalker* en diferentes etapas del desarrollo de *E. granulosus* (I)

2. Expresión de *Eghbx3/Stalker* en diferentes etapas del desarrollo de *E. granulosus* (I)

Fig 72. (izq.)

Control con la sonda sentido de *EgCyc* (ciclofilina) en una tenia E4 (B ~ 250 μ m).
No se observa reacción.

Fig 73. (der.)

Reacción control con la sonda antisentido de *EgTrx* (tiorredoxina) en una tenia E6 (B ~ 250 μ m).

Nótese la expresión ubicua de *EgTrx*.

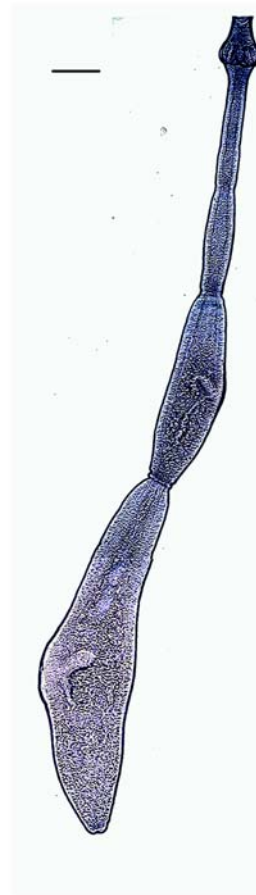
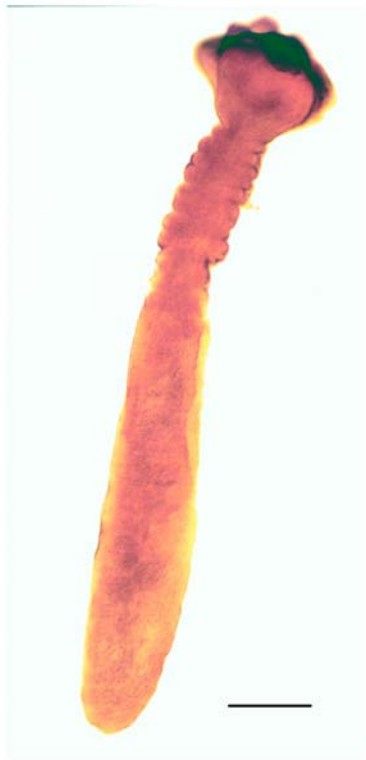
2. Expresión de *Eghbx3/Stalker* en diferentes etapas del desarrollo de *E. granulosus* (I)

Fig. III.4.8.

Consideraciones preliminares

Este Subcapítulo describe aspectos morfológicos durante el desarrollo temprano del protoescólex (PSc) de *Echinococcus granulosus*. Si bien cronológicamente éste resultó el último aspecto estudiado, los resultados obtenidos durante estos estudios nos posibilitaron caracterizar mejor el patrón de expresión de *Stalker* (*Eghbx3*, ver Subcapítulos 2 y 4).

3. Estudios Morfológicos

El estudio morfológico surgió de iniciativas tendientes a caracterizar los procesos proliferativos y la organización celular durante el desarrollo del protoescólex de *E. granulatus*, y como consecuencia del hallazgo del peculiar patrón de expresión de *Stalker* en el PSc y la capa germinativa asociada al mismo.

Estudios previos (ver por Ej. Galindo *et al.*, 2003) realizados mediante la incorporación de [³H]-T mostraron una importante actividad proliferativa en los estadios más tempranos de la morfogénesis del PSc, y una baja actividad en el PSc maduro.

Se eligió la metodología de tinción del ADN de material hidático *in toto* con Ioduro de Propidio (IP) y el examen del resultado de la reacción por microscopía confocal láser. Los resultados obtenidos al observar PScs maduros y sus formas juveniles mostraron estructuras tales como diversos *septos* y el *foramen*, no descritos en detalle anteriormente.

Paralelamente, las muestras teñidas con IP fueron observadas en detalle en un microscopio de epifluorescencia, donde se nos revelaron otras estructuras típicas del PSc en desarrollo.

Este análisis morfológico se subdivide en varias Secciones, utilizando como criterio para su ordenamiento, la cronología de los eventos que llevan a la formación del PSc a partir de los agrupamientos celulares (*yemas*) en la capa germinativa del quiste y en la de las vesículas prolíferas. Así, presentamos (3.a) la morfología de la *yema*, (3.b) la del brote temprano, (3.c.1) la del brote elongado temprano y (3.c.2) la del tardío.

Como última Sección de este subcapítulo (3.d), se presenta el conteo nuclear de tres muestras de PScs teñidas con IP. Las dos primeras, (3.d.1-2) en brotes elongados tempranos, y la tercera (3.d.3), en un PSc maduro invaginado. El procedimiento, descrito en el Capítulo Materiales y Métodos (ver además Martínez *et al.*, 2004), consistió en generar conjuntos de datos (*data sets*) compuestos por apilamientos (*stacks*) de imágenes (rebanadas o *slices*) separadas entre sí por 0.9 μ m. El estudio incluyó a dos PScs maduros invaginados adicionales.

3.a. Morfología de la yema

En este Subcapítulo se describen algunos aspectos morfológicos de las primeras etapas del desarrollo del PSc: la formación de agrupamientos celulares con aspecto de anillos o *yemas* (dependiendo del ángulo de observación) en la capa germinativa del quiste o en vesículas prolíferas.

Estas estructuras serán de particular relevancia en este trabajo ya que constituyen zonas de expresión del gen con homeobox *Stalker* (*Eghbx3*), lo que será presentado en detalle en la Sección 4.a.

Por otro lado, y tal como se aprecia en las Figs. 74 y 75, estas yemas de proliferación celular (ver Galindo *et al.*, 2002) son visibles en el exterior de la vesícula prolífera, mientras que la maduración del PSc ocurre en el interior de la misma, tal como se observa en las mismas imágenes, que permiten apreciar, además, la asincronía en la aparición y maduración de los PScs.

Por último, en la Fig. 76, se puede apreciar una *yema* observada desde un plano superior, la que aparece formada por un brote central (Fig. 76 A, B) rodeado de un *anillo* o *aro* lateral (Fig. 76 C, D). Estas imágenes muestran que esta estructura es hueca, presentando un claro *foramen* central.

Fig. 74. (arriba)

La etapa inicial durante el desarrollo del PSc es un conspicuo agrupamiento de células en zonas específicas -y con aspecto de parches- de la capa germinativa (CG), y a la que denominamos *yema* (*y*).

La *yema* presenta aquí un aspecto esferoide con un diámetro aproximado de 100 μm . La distribución nuclear en la misma es aparentemente homogénea, y se destaca sobre la CG, escasa en núcleos. En una vesícula prolígera (VP), nuestras observaciones sugieren que este agrupamiento se produce en el exterior de la CG, lo que plantea un interesante problema de polaridad de la CG. Se aprecian asimismo dos PScs dentro de la membrana de la VP. La imagen proviene de la combinación de una imagen de epifluorescencia (tinción nuclear con Ioduro de Propidio, IP, imagen reversa) y una imagen de microscopía de contraste de fase. (B $\sim$ 100 μm).

Fig. 75. (abajo)

Izq.: Vista lateral de una *yema*, con aspecto de casquete y con dimensiones aproximadas de 200 μm (diámetro) x 35 μm (altura máxima), en el exterior de una vesícula prolígera, sobre la CG que presenta aquí un espesor aproximado de 5 μm .

En el interior de la VP se aprecian más de diez PScs maduros, reconocibles por sus estructuras características (ganchos, G; ventosas, V), ilustrando la asincronía en la aparición de PScs. Imagen de microscopía de contraste diferencial (DIC).

Der. arriba: Tinción con IP, imagen reversa.

Der. abajo: Imagen superpuesta de las dos anteriores, la imagen de tinción con IP fue procesada para visualizar los núcleos teñidos tal como se apreciaron en el microscopio de fluorescencia (Barra de calibración, B $\sim$ 100 μm).

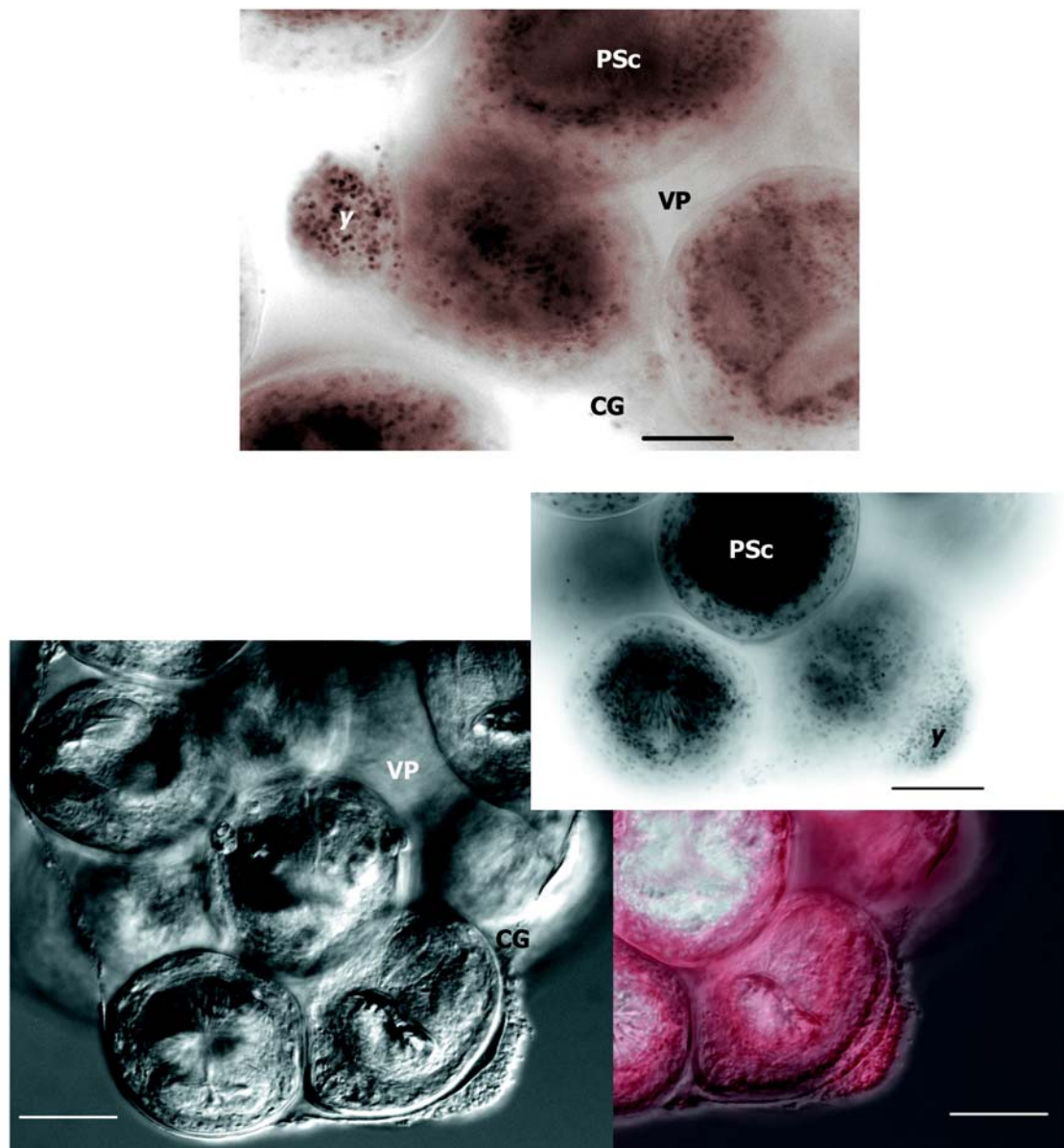


Fig. 76.

A: Imagen DIC de una *yema* de la capa germinativa presentando un brote central, y observada perpendicularmente desde un plano superior a la CG. La zona asociada al brote se extiende radialmente, y es rodeada por un anillo rico en núcleos (An) que llega a tener unos 200-300 μm de diámetro. El diámetro del brote en sí, de aspecto semi esferoide, es de 150-200 μm .

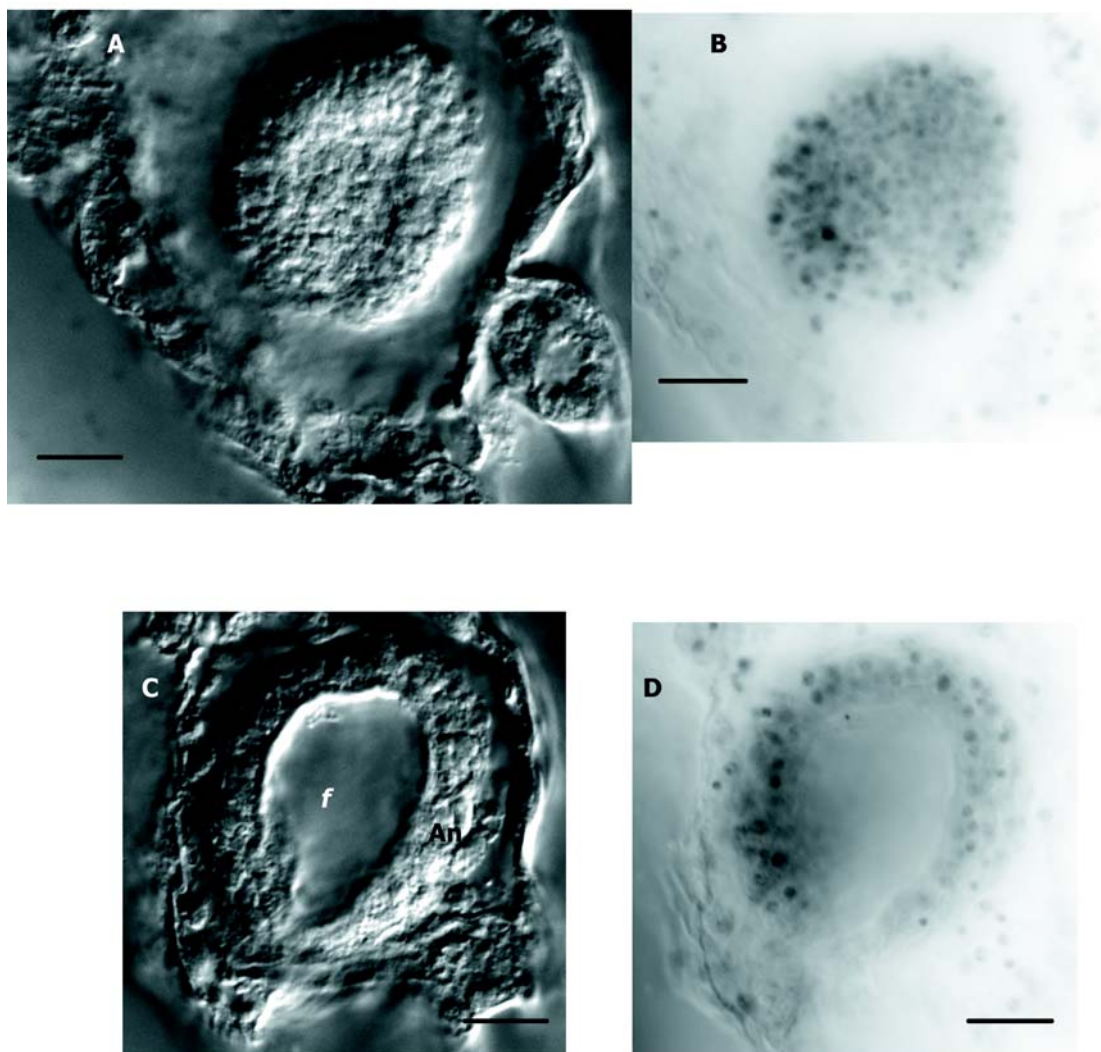
B: Tinción nuclear (IP, imagen reversa) de la misma muestra y en el mismo plano.

C: Imagen DIC de la misma *yema* en un plano más inferior.

En este plano, se visualiza un *foramen* (f), con un diámetro de 80-130 μm . El espesor de la pared del brote es de unas 40 μm .

D: Tinción nuclear (IP, imagen reversa) observada en el mismo plano que en C. (B $\sim$ 50 μm)

En su conjunto, toda la estructura presenta una geometría circular, con simetría radiada. Sus dimensiones no son despreciables, tomando en cuenta el tamaño del PSc maduro (típicamente 100-200 x 200-250 μm).

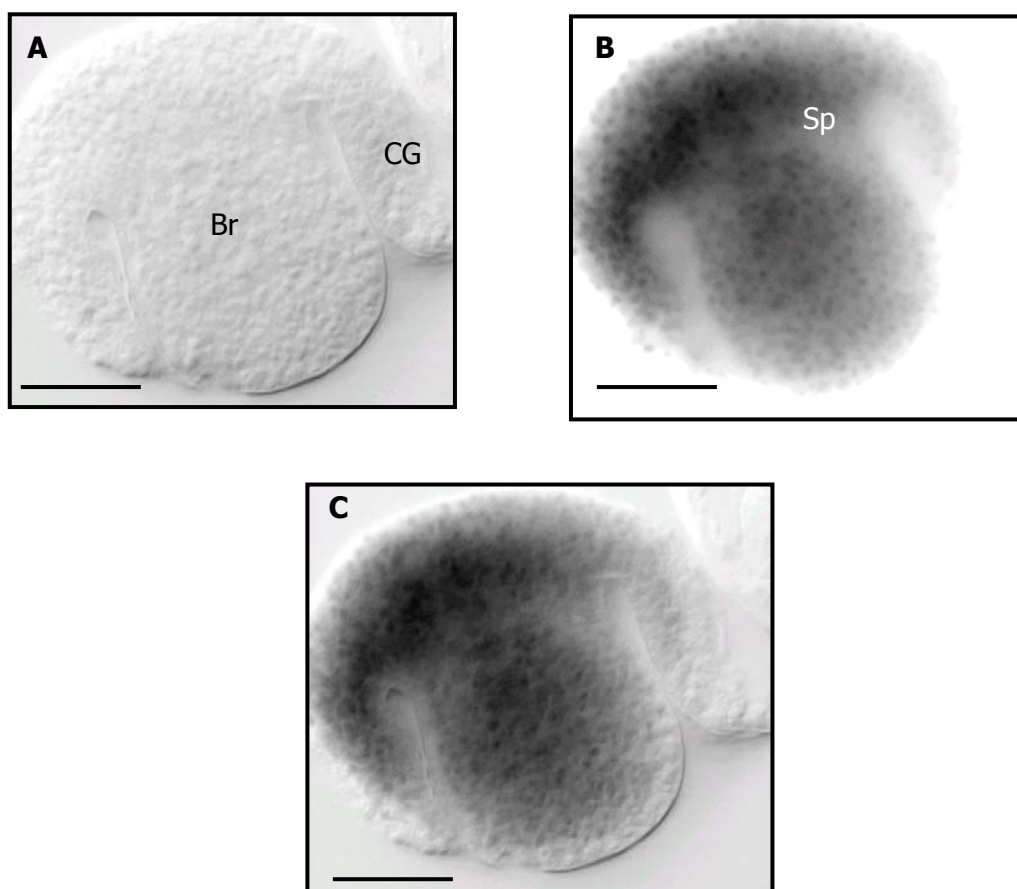


3.b. Morfología del brote temprano

La *yema* evoluciona luego hacia el brote temprano, de aspecto primero semiesférico y luego más elongado en el sentido del eje baso-apical. El brote temprano es hueco, con un *foramen* más importante

En las siguientes imágenes, se muestra cómo el brote temprano comienza a constituir un territorio celular separado por un *septo* (definido en este trabajo como una zona morfológicamente aparente y que separa dos dominios o territorios celulares contiguos). Este *septo* aparece en la zona donde luego se desarrollará el pedúnculo, y delimita dos territorios tempranos: el de las células que se agrupan en el cuerpo del PSc (sobre todo en su extremo apical) y el de las que quedan en la CG. de la capa germinativa que lo origina.

Fig. 77.



Brote (Br) temprano emergiendo de la capa germinativa (CG). Las células del brote esferoide, el cual presenta un diámetro aparente de unas 100 μm , comienzan a separarse de la CG. Un *septo* (Sp) comienza a evidenciarse, separando el brote de la CG, en la zona donde aparecerá luego el pedúnculo. Muestra: material hidático fértil *in toto*.

A: Imagen DIC; B: Núcleos teñidos con ioduro de propidio (IP), imagen reversa.

C: Superposición de A y B.

(B ~ 50 μm)

Fig. 78.

Brote elongado temprano, abandonando la forma esferoide para presentar una forma algo elongada en el eje baso-apical (200 x 150 μm), con restos de CG en su extremo basal y rodeado de PSc maduros invaginados y libres de CG. El *septo* del brote es más visible, el pedúnculo comienza a formarse. La distribución nuclear no es uniforme, concentrándose en la zona meso-apical.

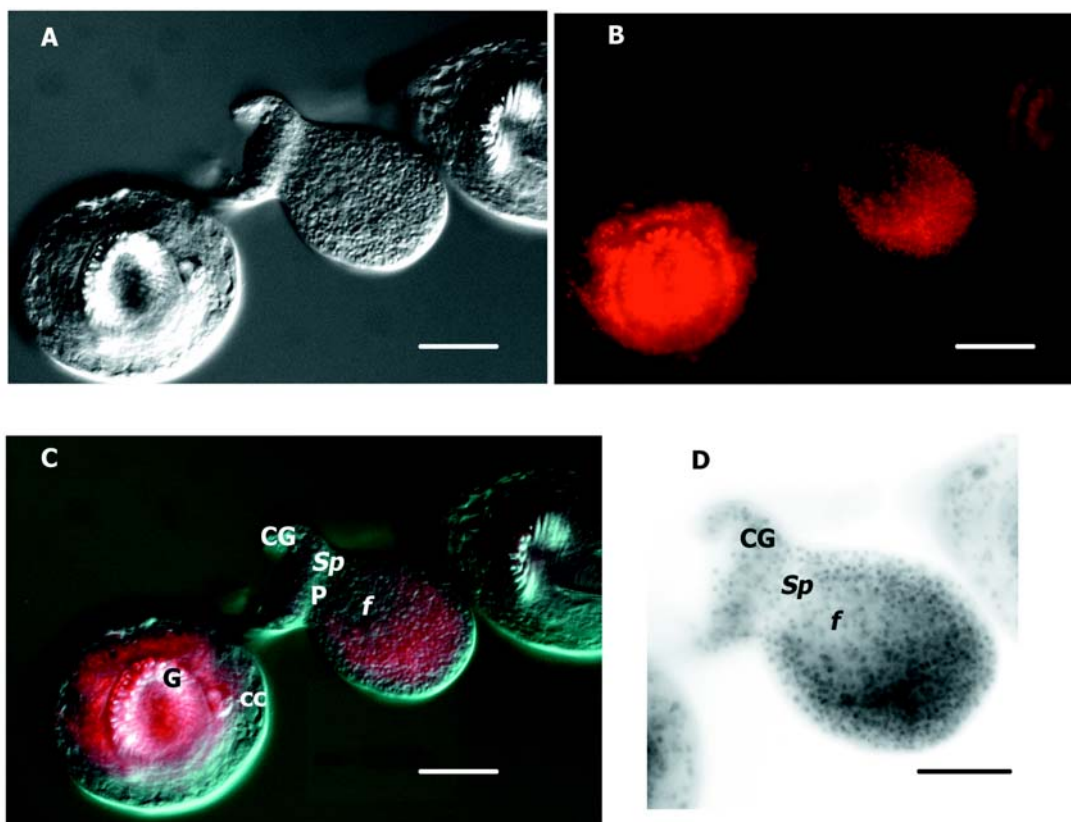
A: Imagen DIC

B: Núcleos teñidos con IP, imagen reprocesada para apreciar el color original de la tinción

C: Superposición de A y B

D: Detalle del brote. Imagen reversa de la tinción nuclear. El *septo* se aprecia claramente, así como el foramen (*f*)

(G: ganchos, V: ventosas, CC: corpúsculos calcáreos, P: pedúnculo, B $\sim$ 100 μm).

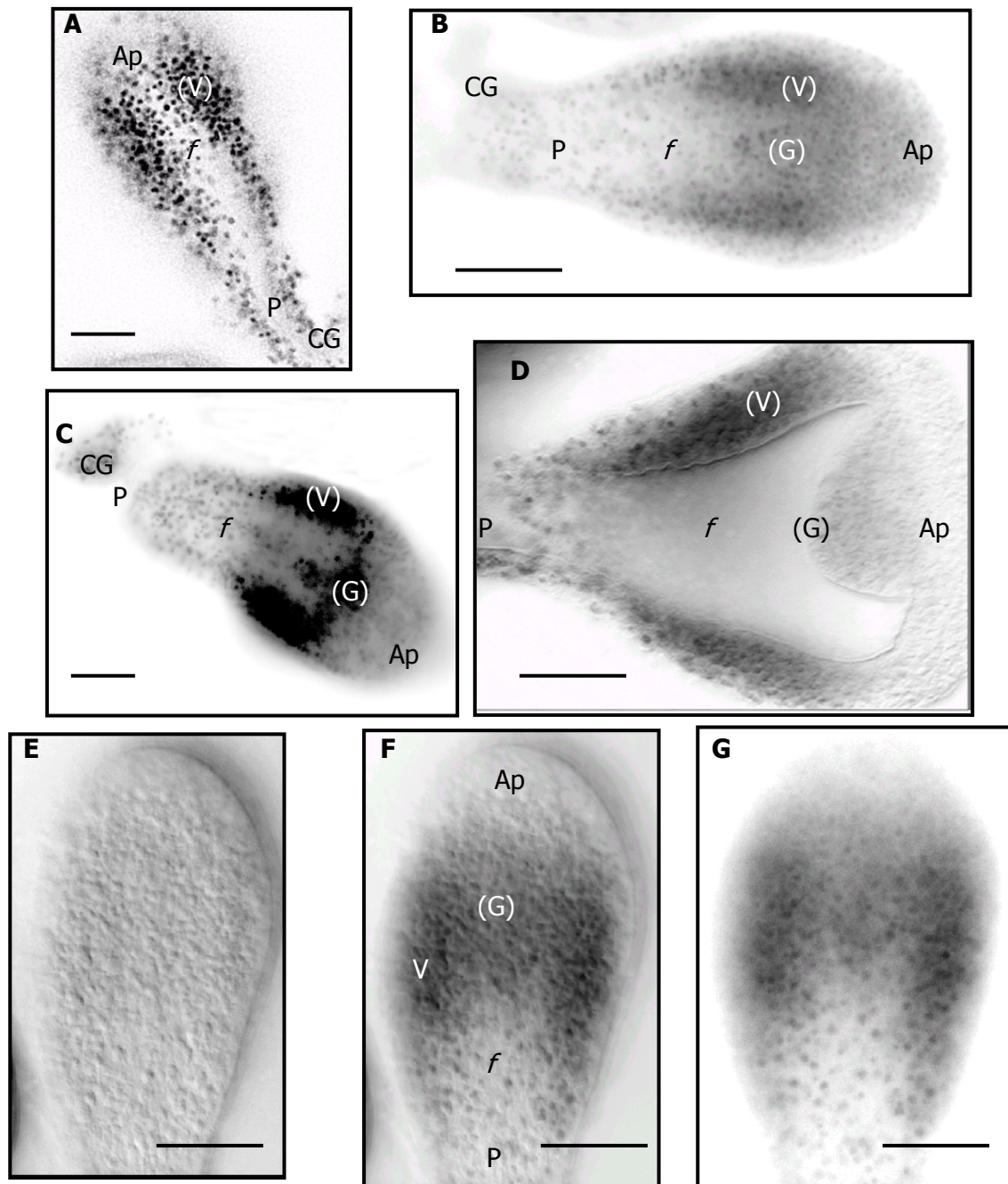


3.c.1. Morfología del brote elongado

El brote elongado se caracteriza por poseer un eje baso-apical (B-Ap) muy evidente y por no presentar aún ninguna de las estructuras características del PSc maduro (ventosas, rostelo, ganchos, corpúsculos calcáreos). El pedúnculo en formación, estructura hueca y escasa en células y que liga al brote elongado a la CG, es aquí evidente y tiene aproximadamente la mitad de la longitud total del brote elongado.

El *foramen* toma en esta etapa la forma de una "copa", cuyo "tallo" atraviesa el pedúnculo hasta llegar a la CG y cuyo "cáliz" rodea a una zona central del PSc, de alta densidad celular, y es a su vez rodeado por otra zona muy densa en células, la zona prospectiva de las ventosas. El plano que cierra el extremo apical del *foramen*, o sea el "borde" de la copa, forma un *septo* que separa la zona central mencionada anteriormente (que pensamos constituye el primordio de la almohadilla rostelar y los ganchos) de la zona más apical, que está prácticamente desprovisto de células.

La distribución nuclear es aquí heterogénea (Figs. 79 A, B, C, D, F, G), concentrándose en las zonas meso-laterales y meso-apicales.

Fig. 79.

Brote elongado unido a la Capa Germinativa (CG). Los brotes tienen un tamaño de 120-160 (eje B-Ap) x 50-75 μm (diámetro máximo en la zona prospectiva de las ventosas, V). El *foramen* (*f*, presentando unas dimensiones de 100 μm en el eje B-Ap x 50-60 μm en la zona de la copa y 20 μm en la zona del tallo) es bien evidente, así como el pedúnculo (P) en formación (de unas 20 μm de diámetro).

Los núcleos se concentran en dos zonas: una lateral, donde aparecerán las ventosas (V, de forma elipsoide de 25-35 x 10-15 μm) y una central, donde presumiblemente se formarán los ganchos (G). La zona más apical (Ap) aparece casi desprovista de núcleos, así como la zona del pedúnculo y el *foramen*.

A, C, G: Tinción nuclear con IP. Imagen reversa. (B ~ 25 μm)

B, D, F: Superposición de una tinción nuclear con IP (imagen reversa) y microscopía DIC. F es la superposición de E y G (B ~ 25 μm).

E: Imagen DIC. (B ~ 25 μm).

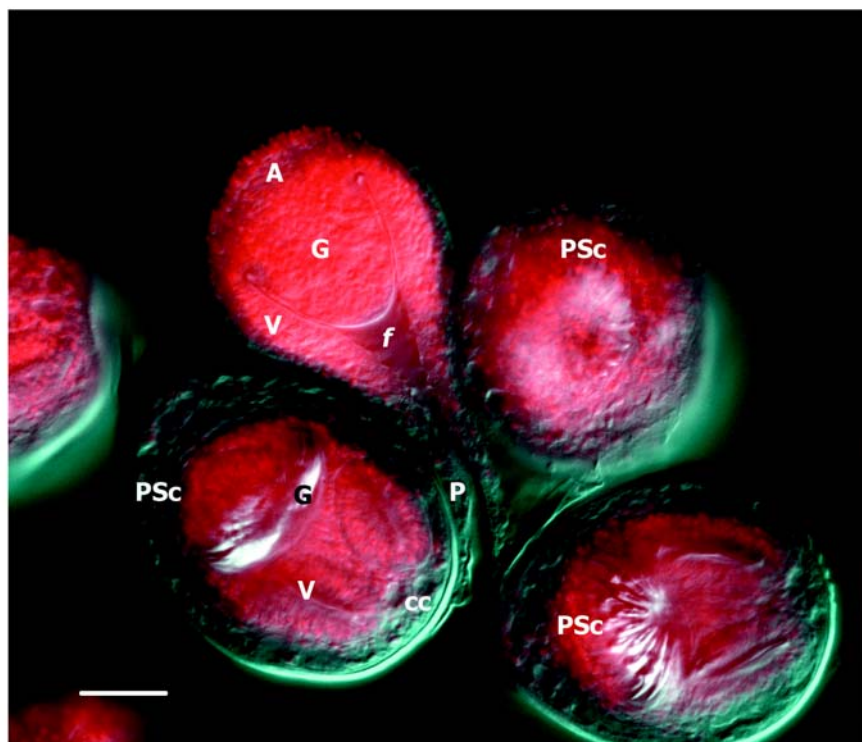
Fig. 80.

Acúmulo de un brote elongado y tres PSCs maduros invaginados, caracterizados por la presencia de estructuras completamente diferenciadas (Ventosas, V; Ganchos, G y Corpúsculos Calcáreos, cc), unidos a la CG.

El brote elongado presenta una longitud total de 280 μm , con un diámetro máximo de unas 150 μm en la zona las ventosas (V) y un pedúnculo (P) en formación de 35 μm de ancho.

Nótese la forma de copa que adopta el conspicuo *foramen* (*f*) central, de unas 150 μm de largo (eje B-Ap) x 100 μm en el borde de la copa que rodea a la zona prospectiva de los ganchos (G). La base del cáliz tiene aproximadamente 40 μm y el tallo unas 10-15 μm .

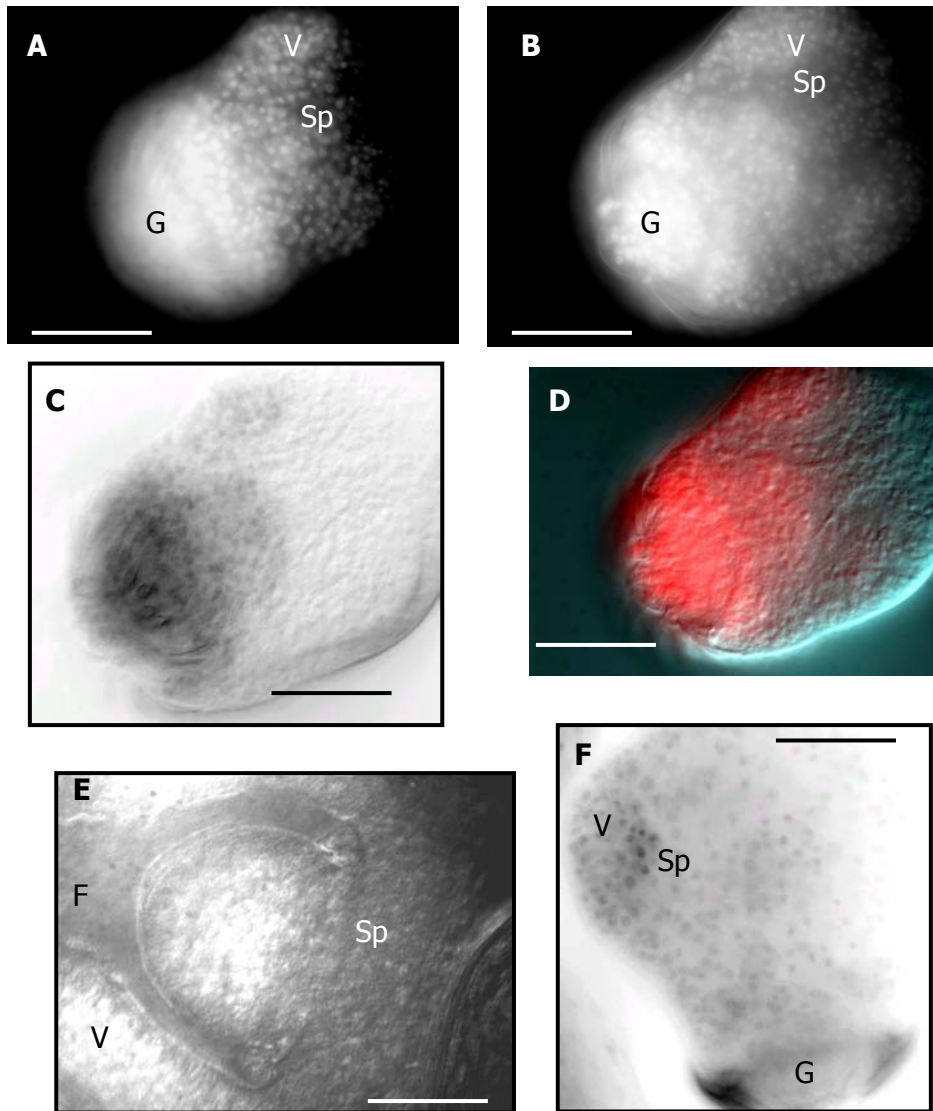
Superposición de imagen DIC y tinción nuclear con IP reprocesada para apreciar los colores originales de la tinción. (B $\sim$ 50 μm).



3.c.2. Morfología del brote elongado tardío

El brote elongado tardío se caracteriza por la aparición incipiente de estructuras morfológicas características del PSc: ganchos (G) y ventosas (V). Además es notoria la presencia de *septos* (Sp) que separan físicamente los territorios donde aparecerán las diferentes estructuras. La distribución nuclear es heterogénea, concentrándose en la zona prospectiva de las ventosas. No se aprecian todavía corpúsculos calcáreos.

Fig 81.



A, B: Dos planos de tinciones nucleares con IP. La zona de formación de las ventosas (V) mantiene una forma elipsoide de unas 100 x 65 μm .

C: Superposición de diferentes planos de reacciones con IP (imágenes inversas) y DIC.

D: Superposición de diferentes planos de reacciones con IP (imágenes reprocesadas para recuperar el color original de la tinción) y DIC. A, B, C y D corresponden a una misma muestra con ganchos incipientes (B $\sim$ 100 μm).

E: Superposición de reacción IP y microscopía DIC en otra muestra. (B $\sim$ 20 μm).

F: Tinción nuclear con IP de otra muestra diferente con ganchos (G) ya formados, imagen inversa. La zona prospectiva de las ventosas (V) es una elipsoide de 140 x 70 μm (B $\sim$ 50 μm).

3.d. Diferenciación y Proliferación: Conteo de Núcleos en brotes tempranos, brotes elongados y PScs maduros

Para determinar el número de núcleos presentes en muestras de brotes elongados y PScs maduros, se tiñeron los mismos con IP en muestras (material hidático fértil proveniente de infecciones naturales) fijadas con PAF y se realizaron observaciones en un microscopio confocal, lo cual produjo un conjunto de datos compuesto por apilamientos de imágenes que fueron analizadas sistemáticamente (luego de ser invertidas a sus negativos) por diferentes programas informáticos (ver Materiales y Métodos). En este Subcapítulo se muestra un ejemplo del conteo nuclear de dos brotes elongados tempranos (3.d.1-2.) y un PSc maduro invaginado (3.d.3.). En este último eliminamos manualmente de la imagen a la zona de los ganchos, pues distorsionaba el conteo. La señal obtenida en todas las muestras analizadas es muy clara en las primeras imágenes, y se va haciendo más difusa a medida que avanzamos en el eje z, hacia “abajo”, en la dirección de la iluminación láser. Esto se debe a la opacidad de la muestra, que apaga la señal láser a medida que penetra en el soma del protoescólex. Los conteos se realizaron varias veces en forma independiente. Adicionalmente, estimamos el número de núcleos en brotes tempranos unidos a la capa germinativa a partir de imágenes de cortes seriados de 5 μm , asumiendo una geometría esferoide del brote (Martínez *et al.*, 2004).

Al final de esta Sección, se presenta una tabla resumiendo los resultados obtenidos (Tabla 9).

El hecho saliente es que no existe una diferencia significativa entre el número de núcleos presentes en el brote temprano, las formas juveniles (brotes tempranos) o el Psc maduro, cuya significación se discutirá en el próximo Capítulo.

Por último, se presenta una tinción control (Fig. 89), en la que se tiñeron los núcleos presentes en cortes histológicos semifinos (5 μ m de espesor) con IP, a partir de material hidático incluido en parafina, se observaron los preparados en un microscopio de epifluorescencia y se contaron los núcleos presentes en el mismo, utilizando el mismo procedimiento descrito anteriormente. Como se aprecia en dicha figura, no parece existir diferencia apreciable entre el patrón de tinción nuclear, el número de núcleos presentes en esta imagen, y los datos presentados en las secciones 3.d.1-3.

3.d.1. Conteo de Núcleos en brotes elongados

En las siguientes tres secciones (3.d.1-3) se presentan series de fotografías que corresponden a los planos generados por el microscopio confocal laser, a medida que se avanza en el eje "z", en dirección arriba-abajo.

Las imágenes mostradas en estas tres secciones son las utilizadas para el cálculo del número de núcleos presentes en las distintas muestras.

En cada figura perteneciente a los conteos nucleares, se aclara (arriba) a qué rebanda (*slice*) corresponde, con respecto a las totales del apilamiento (*stack*). Debajo de la misma se destaca el número de núcleos calculado para dicha imagen. Al final de cada conteo se adjunta el cálculo del total de núcleos presentes.

Subcapítulos 3.d.1-2.

Conteo de Núcleos en formas juveniles del PSc (brotes elongados)

Al recorrer la serie de imágenes correspondientes a dos ejemplares juveniles (GUA1.PIC, 3.d.1. y GUA2.PIC, 3.d.2.), no se observan ninguna de las estructuras características del PSc maduro (rostelo, ventosas, ganchos), pero sí una estructura característica de las formas juveniles: el *foramen* (Figs. 85<9-19>; 86<4-19>).

En las dos primeras figuras de esta sección (Figs. 82-83) se muestra un ejemplo de cómo se observaron (por microscopía DIC y de epifluorescencia) las muestras analizadas en el microscopio confocal láser.

Fig. 82. (arriba)

Microfotografía por contraste de fase de la muestra analizada. (Barra de calibración, B ~ 100 μm). Muestra: GUA1.PIC (muestra de brote elongado N° 1).

Fig. 83. (abajo)

Superposición del contraste de fase con la tinción nuclear con Ioduro de Propidio. (B ~ 100 μm). Muestra: GUA1.PIC (muestra de brote elongado N° 1).

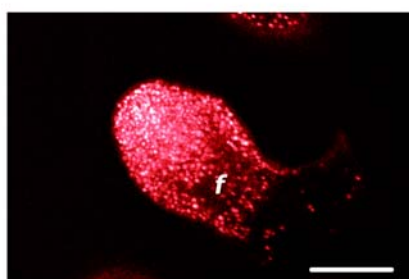
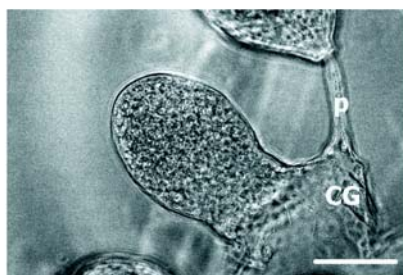


Fig. 84 (1-24). Conteo Nuclear. (# = Número de Núcleos)

Muestra: GUA1.PIC (muestra de brote elongado N° 1).

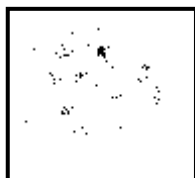
Número estimado= 1633 ± 40 .

1. 13/96

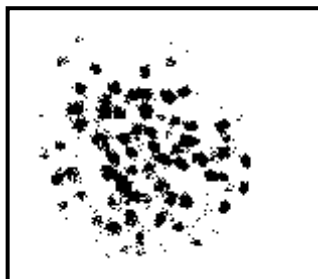
(rebanada 13 de un apilamiento de 96 rebanadas totales, cada una de 0.9 μm de espesor)

2. 17/96

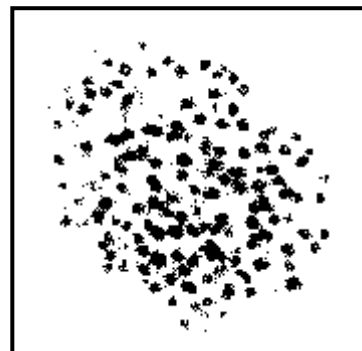
3. 20/96



1



40

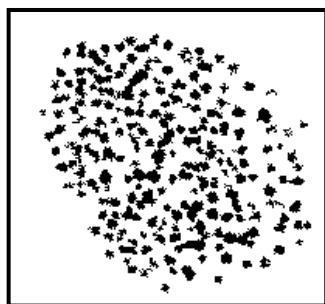


92

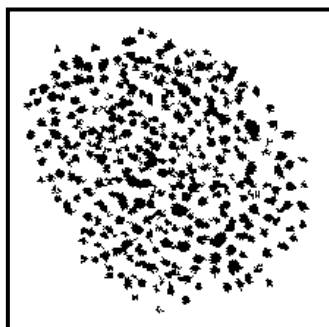
4. 24/96

5. 27/96

6. 31/96



150



180



#225

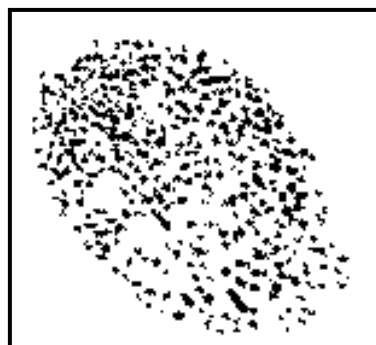
7. 34/968.

8. 38/96

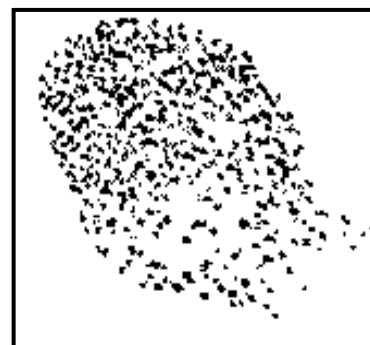
9. 41/96



250



265



261

10. 45/96



244

11. 48/96



212

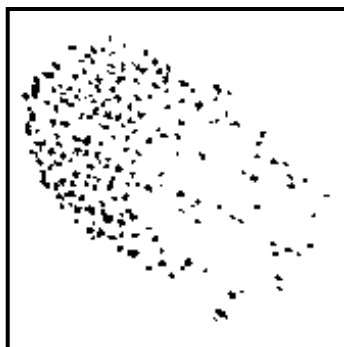
12. 52/96 (# 240); 13. 55/96 (# 125, faltan las imágenes).

14. 59/96



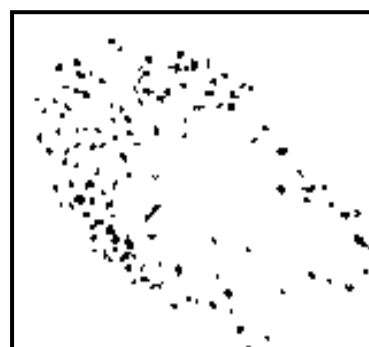
187

15. 62/96



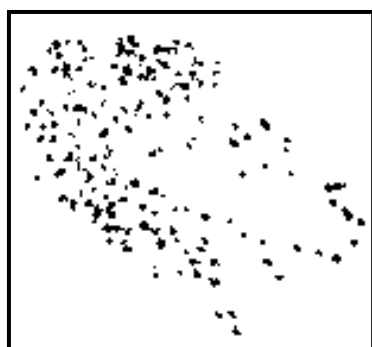
191

16. 66/96



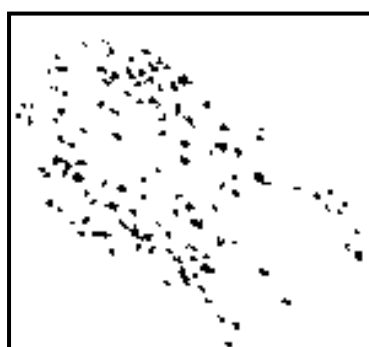
123

17. 69/96



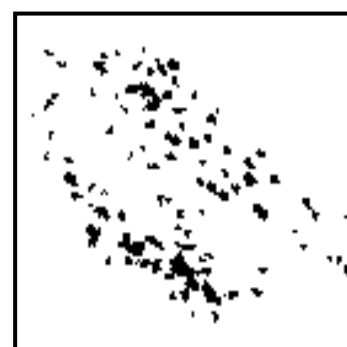
138

18. 73/96



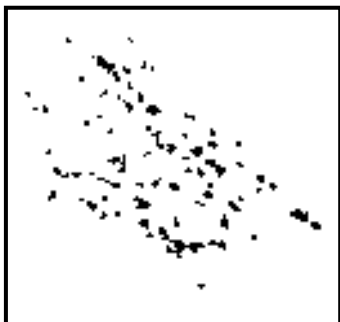
115

19. 76/96



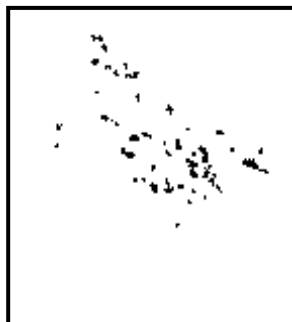
81

20. 80/96



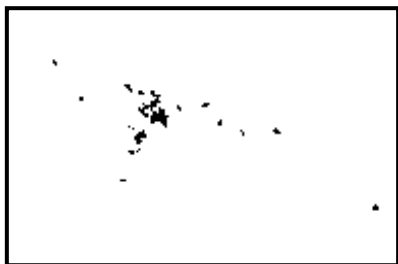
71

21. 83/96



46

22. 87/96



16

23. 90/96



12

24. 94/96

0

Fig 85 (1-24)

Muestra: GUA2.PIC (muestra de brote elongado N° 2).

Número estimado = 1693 ± 46 .

1. 27/109

(slice 27 de un *stack* de 109 totales)

12

2. 31/109



20

3. 34/109



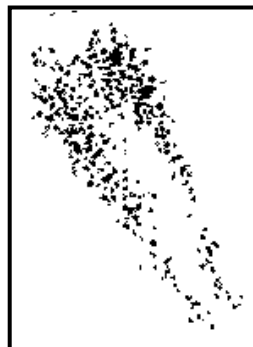
50

4. 38/109



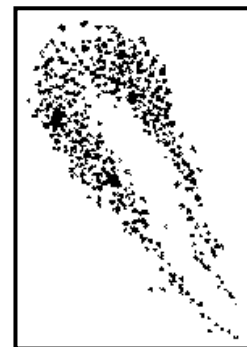
100

5. 41/109



160

6. 45/109



200

7. 48/109



200

8. 52/109



210

9. 55/109



233

10. 59/109



205

11. 62/109



203

12. 66/109



195

13. 69/109



200

14. 73/109



210

15. 76/109



218

16. 80/109



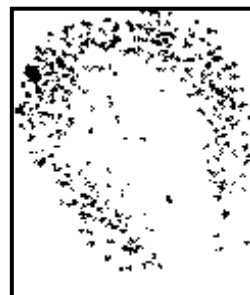
215

17. 83/109



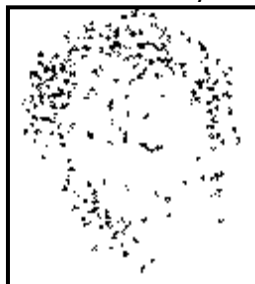
200

18. 87/109



180

19. 90/109



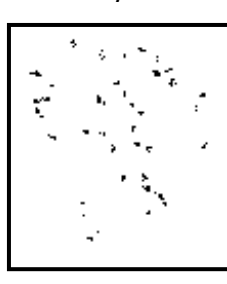
155

20. 94/109



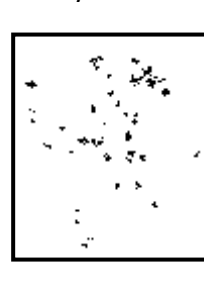
135

21. 97/109



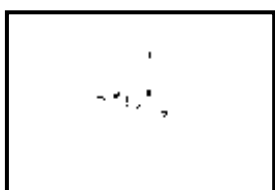
40

22. 101/109



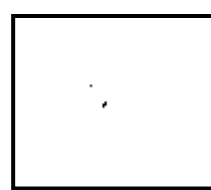
35

23. 104/109



7

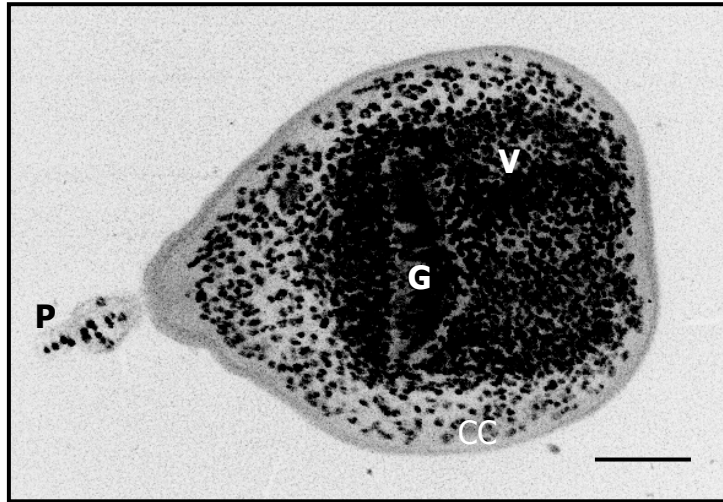
24. 108/109



2

3.d.3. Conteo de Núcleos en PScs maduros

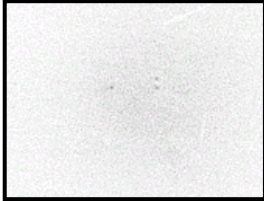
El PSc maduro difiere de las formas juveniles en que presenta estructuras características del mismo: rostelo, ventosas, corpúsculos calcáreos (CCs). En la serie de fotografías de un PSc invaginado que se presentan en esta subsección (una muestra de cinco totales analizadas por este método, muestra PSC7.PIC), las ventosas (V) son muy aparentes, delineadas por los núcleos de las células presuntamente musculares (Figs. 88<12-14>). Los CCs se aprecian como "huecos" en la zona parenquimatosa (ver por Ej. Fig. 88<18>.). Los ganchos fueron removidos manualmente de muchas tomas (<7-23>), ya que distorsionaban el conteo nuclear. Éstos se aprecian claramente en la Fig. que abre este subcapítulo (Fig. 87). Otra característica del PSc maduro es la presencia del pedúnculo (P, Figs. 87 y 88<9-12>), el que parece constar en este caso de trece células.

Fig. 86.

Proyección máxima en el eje Z de los núcleos de la muestra analizada (microscopía confocal, imagen en negativo), superpuesta a una imagen de microscopía de contraste de fases tradicional. (G: ganchos, V: ventosas, CC: corpúsculos calcáreos, P: pedúnculo; B ~ 50 μ m). Muestra: PS7.PIC (muestra N° 5).

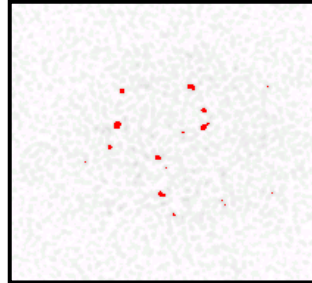
Figs 87 (1-28)Número estimado = 1750 ± 125 .

1. 10/109

(slice 10 de un *stack* de 109 totales)

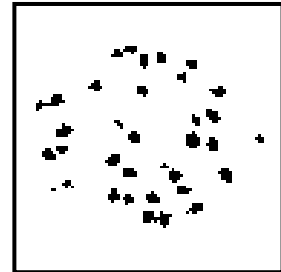
3

2. 13/109



8

3. 17/109



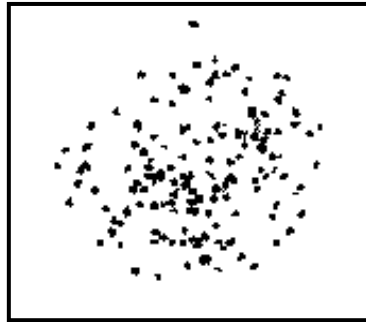
33

4. 20/109



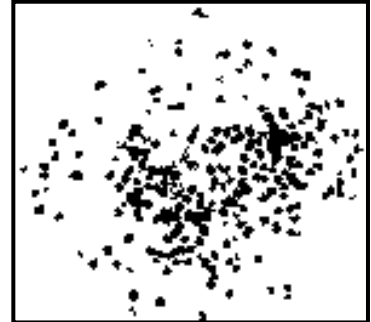
54

5. 24/109



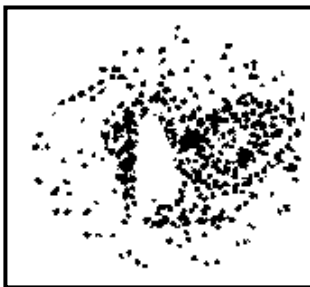
108

6. 27/109



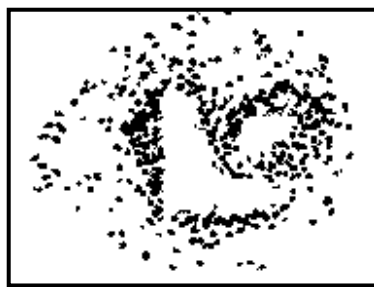
130

7. 31/109



162

8. 34/109



172

9. 38/109



205

10. 41/109



241

11. 45/109



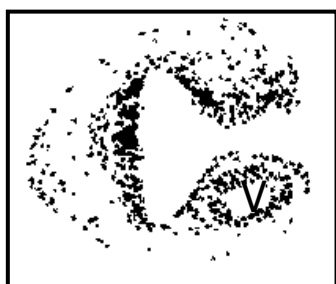
216

12. 48/109



212

13. 52/109



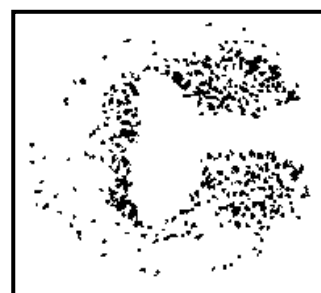
215

14. 55/109



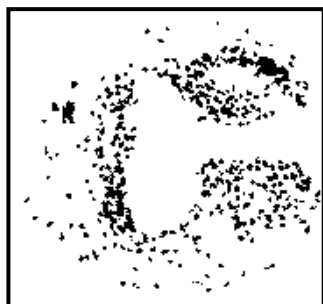
185

15. 59/109



230

16. 62/109



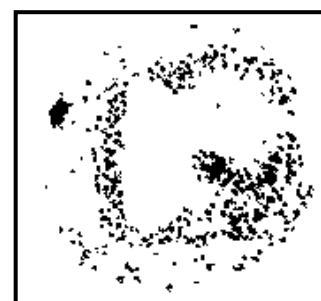
222

17. 66/109



194

18. 69/109



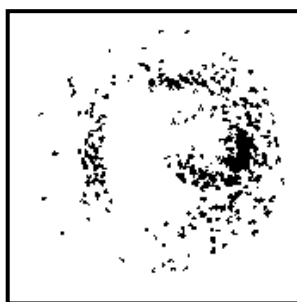
193

19. 73/109q



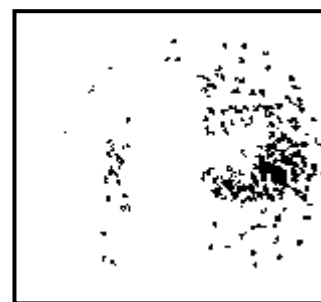
192

20. 76/109



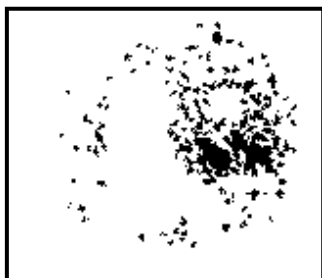
165

21. 80/109



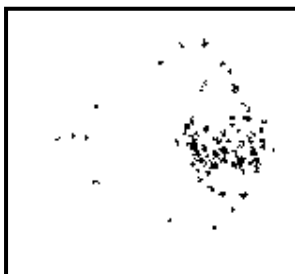
104

22. 83/109



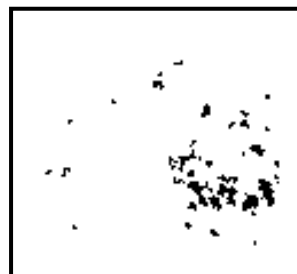
110

23. 87/109



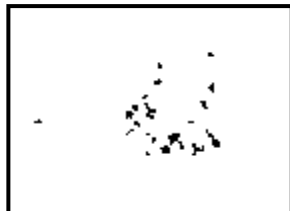
70

24. 90/109



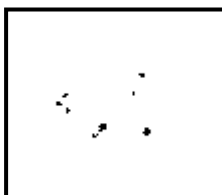
36

25. 94/109



22

26. 97/109



10

27. 101/109



6

28. 104/109

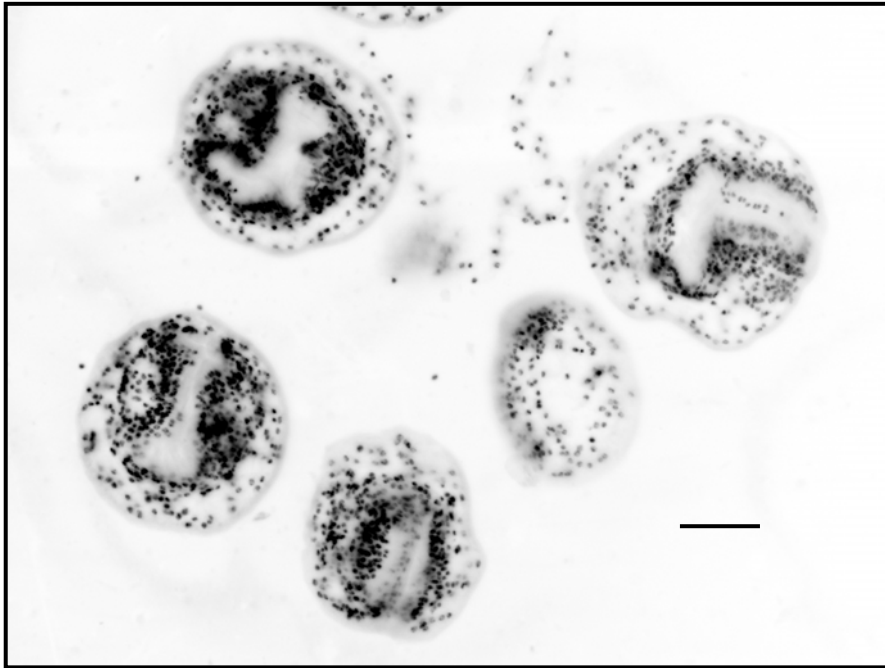


2

Tabla 9. Estimación del número de núcleos presentes en tres estadíos (brote temprano, brote elongado y PSc maduro) del desarrollo del protoescólex de *E. granulosus*.

<i>Muestra</i>	N° de núcleos
PSc Maduro 1	1940
PSc Maduro 2	1703
PSc Maduro 3	1656
PSc Maduro 4	1617
PSc Maduro 5	1750
Promedio ± S.D.	1733 ± 126
Brote elongado 1	1633
Brote elongado 2	1693
Promedio ± S.D.	1663 ± 42
Brote temprano	~ 1550

Resumen del conteo nuclear en tres estadíos en el desarrollo del protoescólex de *E. granulosus*. Dentro de los márgenes de error, las diferencias del número de núcleos en los tres estadíos analizados no son significativos.

Fig. 88.

Control del conteo nuclear. Un corte semifino (5 μm) se tiñó con IP y se observó en un microscopio de epifluorescencia. (B $\sim$ 100 μm).

4. Expresión de *Eghbx3/Stalker* en diferentes etapas del desarrollo de *E. granulosus* (II)

“[...] ... un acechador no se coloca nunca al frente.

Está siempre observando detrás de la escena.

[...] ... los acechadores aprenden a tener una inagotable capacidad de improvisación.”

Carlos Castaneda, *El Don del Águila*, p. 284 (1982).

Expresión de *Stalker* en los estadios más tempranos del desarrollo de *E. granulosus*

En esta última Sección se presentan resultados de la expresión del gen con homeobox *Stalker* en los estadios más tempranos del desarrollo de *E. granulosus*.

Los Resultados obtenidos muestran que el gen *Stalker* está involucrado en los eventos tempranos que llevan a la diferenciación del Protoscólex (PSc) a partir de la Capa Germinativa. En esta parte del trabajo se presentan figuras, ordenadas según la cronología de eventos de diferenciación tal como se presentan en el Subcapítulo 3 relativo a estudios morfológicos. Estas muestran la expresión de *Stalker* en el primer evento de proliferación y diferenciación de la capa germinativa (CG): la formación de la *yema*.

Por último, y a modo de integración de los resultados morfológicos (Subcapítulo 3) y de expresión de *Stalker* en los distintos estadios de desarrollo de *E. granulosus* (2, 4), se presenta la Tabla 10.

4. Expresión de *Eghbx3/Stalker* en diferentes etapas del desarrollo de *E. granulosus* (II)

4.a. *Stalker* en la yema

La expresión de *Stalker* durante el desarrollo del PSc comienza en la etapa más temprana del mismo, en la capa germinativa (CG). La señal, débil en el conjunto de la CG, pero concentrada en algunas zonas pequeñas con formas de parches, señalaría zonas de proliferación temprana, que constituirían los primordios del PSc.

Fig. 89.

Expresión de *Stalker* (analizada por hibridización *in situ* con la sonda antisentido marcada con DIG 11-dUTP *in toto* sobre material hidático fértil proveniente de infecciones naturales) en el pedúnculo de los PSc y CG asociada.

Nótese la fuerte señal en la yema (y) con forma de anillo. P: Pedúnculo. (Tiempo de reacción, TR: 1hr. 30 min., B ~ 100 µm).

Fig. 90.

Expresión de *Stalker* en el pedúnculo (P) de los PSc y CG asociada.

Nótese la fuerte señal en la yema (Y) con forma de anillo. (TR: 1hr. 30 min., B ~ 100 µm).

Fig. 91.

Expresión de *Stalker* en el pedúnculo de los PSc y CG asociada.

Nótese la fuerte señal en la yema (Y) con forma de anillo. (TR: 30 min., B ~ 50 µm).

Fig. 92.

Expresión de *Stalker* en el pedúnculo de los PSc y CG asociada.

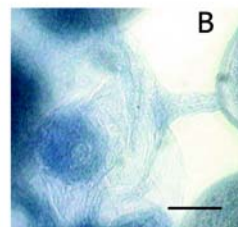
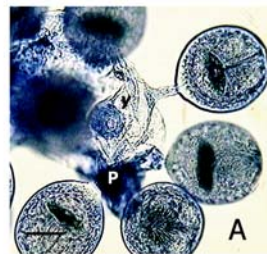
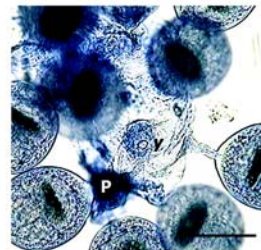
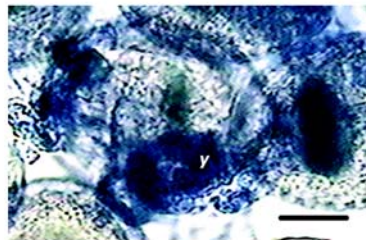
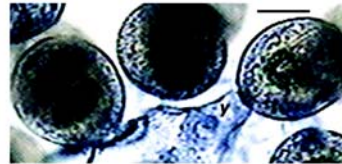
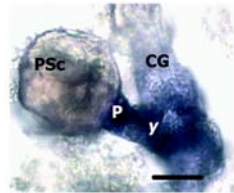
Nótese la fuerte señal en la yema (Y) con forma de anillo. (TR: 1 hr. 30 min., B ~ 100 µm).

Fig. 93.

A. Expresión de *Stalker* en el pedúnculo de los PSc y CG asociada.

Nótese la fuerte señal en la yema (Y) con forma de anillo.

B. Detalle de la reacción anterior (TR: 30 min., B ~ 50 µm).

4. Expresión de *Eghbx3/Stalker* en diferentes etapas del desarrollo de *E. granulosus* (II)

4.b. Relación entre *Stalker* y la proliferación en las *yemas*

En esta sección se presentan tinciones nucleares con Ioduro de Propidio sobre material hidático previamente hibridizado con la ribosonda *Stalker* antisentido y revelado con fosfatasa alcalina. Las zonas de alta concentración nuclear (proliferativas) aparecen rodeadas por zonas de expresión de *Stalker*. En los controles, realizados con la ribosonda sentido, se aprecian las zonas proliferativas pero sin reacción de la fosfatasa alcalina.

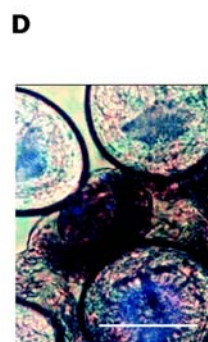
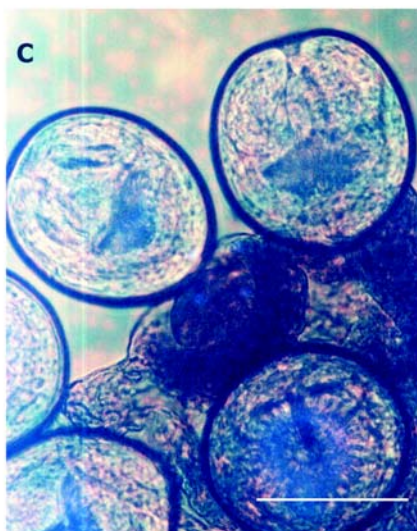
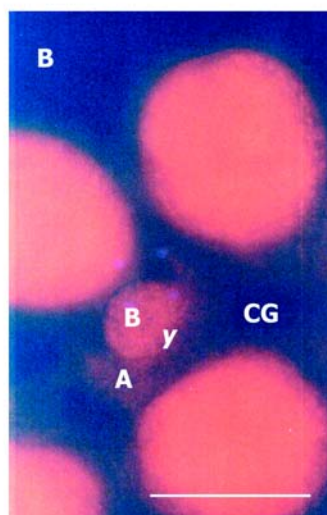
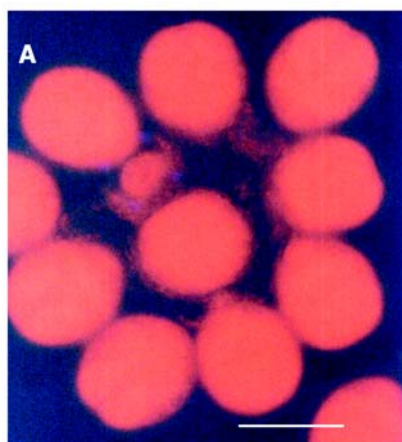
Fig. 94.

A. Tinción de núcleos con Ioduro de Propidio en un racimo de PSc unidos a la CG. Se aprecia una *yema* en proliferación (y) con un brote interno (b). (B ~ 100 μ m)

B: Detalle de la reacción anterior

C: Reacción de *Stalker* (1 hr. 30 min.) en la misma *yema* y brote

D: Combinación de las imágenes anteriores. (B ~ 100 μ m)

4 Expresión de *Eghbx3/Stalker* en diferentes etapas del desarrollo de *E. granulosus* (II)

4 Expresión de *Eghbx3/Stalker* en diferentes etapas del desarrollo de *E. granulosus* (II)**Fig. 95.** (arriba)

A: Tinción de núcleos con Ioduro de Propidio en un racimo de PSc unidos a la CG. Se aprecia una *yema* en proliferación (Y)

B: Combinación de las imágenes anteriores

C: Reacción de *Stalker* (5 hr.) en la misma yema

(B ~ 100 μm)

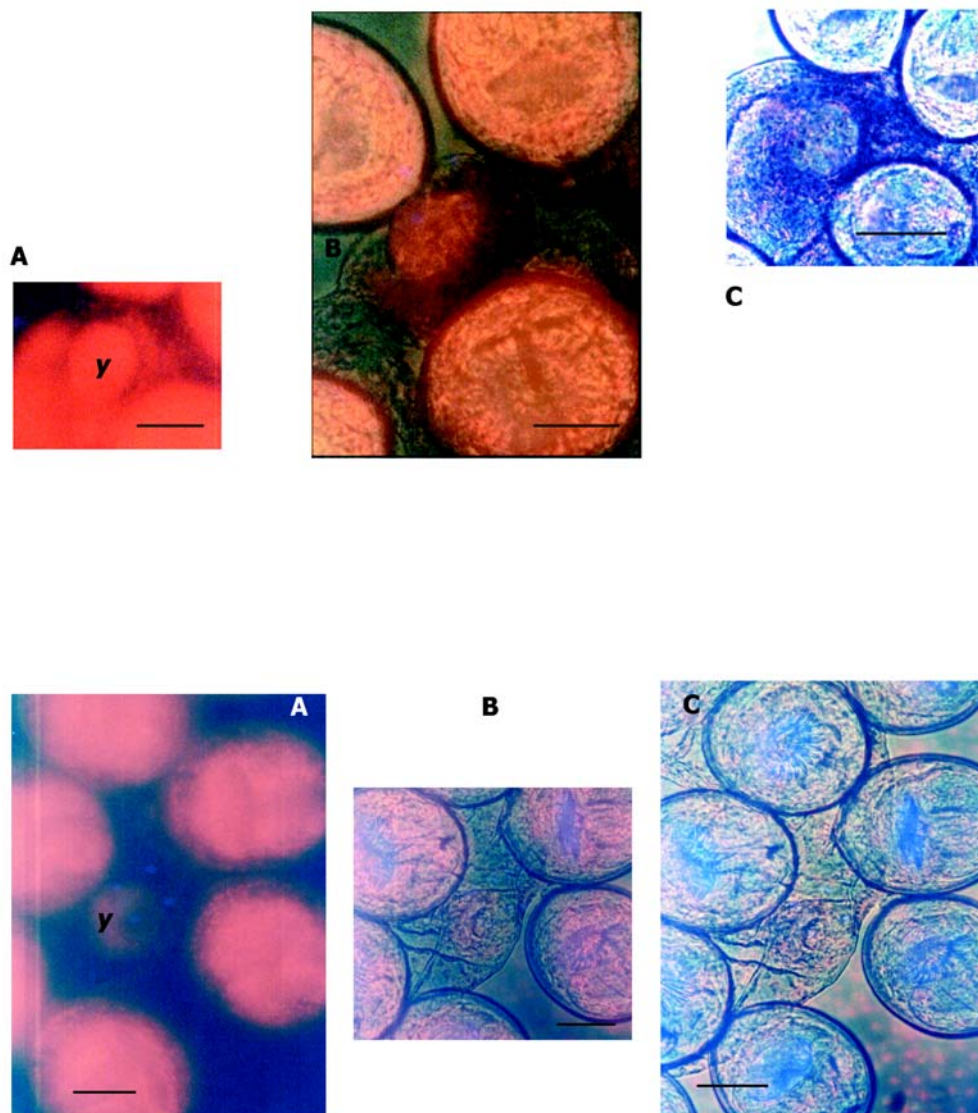
Fig. 96. Controles (abajo)

A: Tinción nuclear con IP

B: Combinación de las dos imágenes anteriores

C: Reacción con la sonda *Stalker* sentido

(TR: 1hr 30 min., B ~ 100 μm).

4 Expresión de *Eghbx3/Stalker* en diferentes etapas del desarrollo de *E. granulosus* (II)

4.c. *Stalker* en el brote

La expresión de *Stalker* continúa en las etapas posteriores del desarrollo del PSc. En los brotes tempranos y en los elongados, *Stalker* se expresa de una manera casi ubicua, encontrándose la señal más intensa en la zona meso-apical del cuerpo del mismo, en particular, y en una etapa bien definida (el PSc inmaduro, pautado por la aparición de los ganchos y los primordios de las ventosas) en la zona prospectiva de las ventosas.

En los brotes tempranos, menos diferenciados, existe expresión en la zona más apical, pero luego esta señal desaparece gradualmente.

El primordio peduncular no presenta reacción, pero sí queda un resto de señal en la CG contigua.

4 Expresión de *Eghbx3/Stalker* en diferentes etapas del desarrollo de *E. granulosus* (II)**Fig. 97.** (arriba izq.)

Brote temprano (izq.) acompañado de un anillo o *yema* de proliferación (der.). Reacción de Hibridización *in situ* e *in toto* con la sonda antisentido de *Stalker*. (TR: 5 hrs. Barra de calibración, B ~ 100 μ m)

Fig. 98. (arriba der.)

Brote elongado temprano (TR: 5 hrs., B ~ 100 μ m).

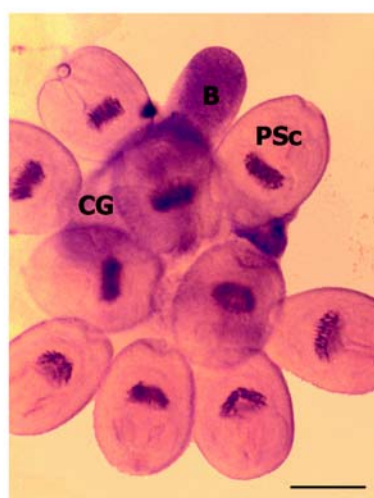
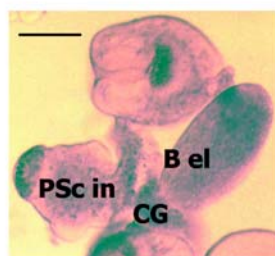
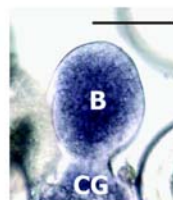
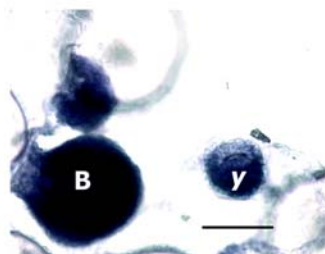
Fig. 99. (abajo izq.)

Brote elongado temprano (arriba) en un racimo de PScs maduros unidos a la CG. (TR: 30 min., B ~ 100 μ m).

Fig. 100. (abajo der.)

Brote elongado (B el., der.) unido a la CG junto a un PSc inmaduro con ganchos formados y ventosas en formación (PSc in., izq.). (TR: 1hr. 30 min., B ~ 100 μ m).

Nótese la concentración de la señal de *Stalker* en la zona meso-apical del brote y en la CG asociada al mismo.

4 Expresión de *Eghbx3/Stalker* en diferentes etapas del desarrollo de *E. granulosus* (II)

4 Expresión de *Eghbx3/Stalker* en diferentes etapas del desarrollo de *E. granulosus* (II)**Fig. 101.** (arr. izq.)

Brote elongado (arriba der.) unido a la CG junto a otro PSc en desarrollo con primordios de ganchos en formación (izq.). (TR: 1hr. 30 min., B ~ 100 μ m).

Fig. 102. (arr. der.)

Brote elongado (der.) acompañado de un PSc inmaduro (arriba centro) con ganchos casi formados. (TR: 1hr. 30 min., B ~ 100 μ m).

Fig. 103. (centro)

Der.: PSc inmaduro con ganchos en formación casi completa y primordios de ventosas (der.) unido a la CG junto a un brote elongado con primordios de ganchos y ventosas. (TR: 5 hr., B ~ 100 μ m).

Izq.: Detalle del preparado anterior.

Nótese la presencia de *Stalker* en la zona del primordio de las ventosas, pero no en la zona apical ni en el pedúnculo cercano al cuerpo del PSc. (B ~ 100 μ m).

Fig. 104. (abajo izq.)

PSc inmaduro con primordios de ganchos unido a la CG junto a una serie de PScs maduros. (TR: 1hr. 30 min., B ~ 100 μ m).

Fig. 105. (abajo der.)

Reacción control con la sonda sentido de *Stalker*.

Se aprecia un racimo unido a la CG con varios estadíos de desarrollo del PSc (*yema*, centro; brote, der. abajo; PSc inmaduro, arriba izq. y tres PScs maduros). (TR: 1hr. 30 min., B ~ 100 μ m).

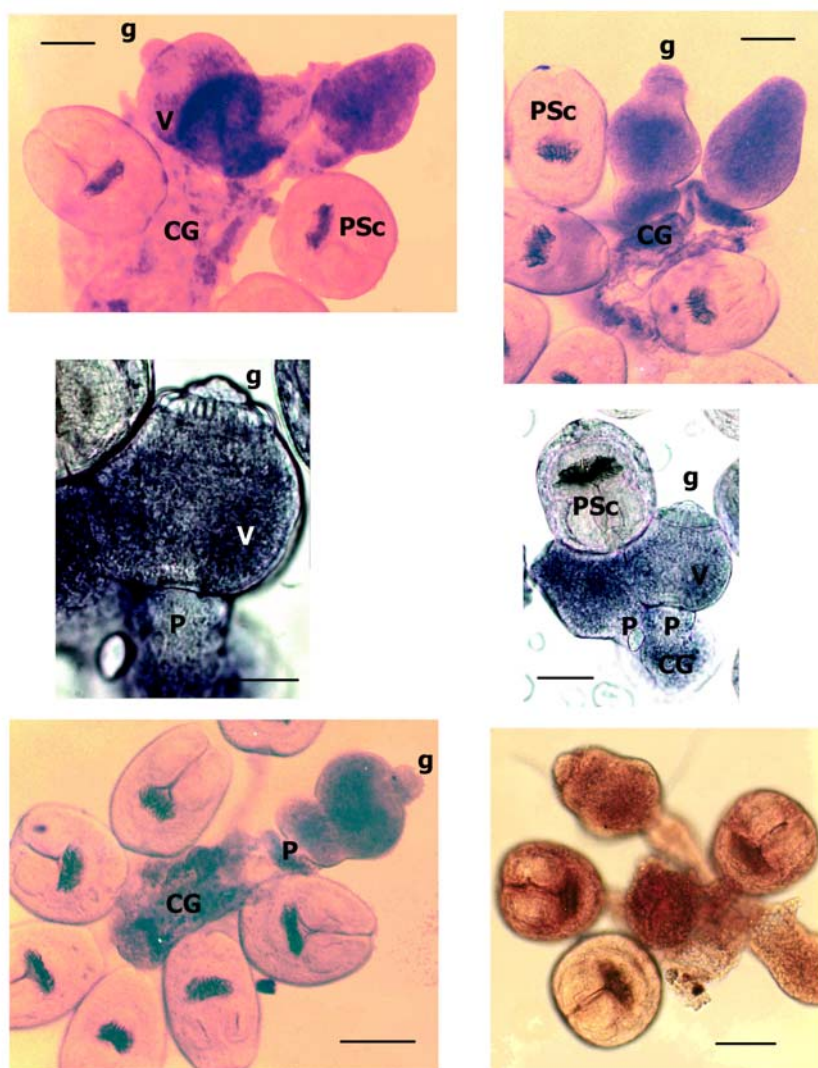
4 Expresión de *Eghbx3/Stalker* en diferentes etapas del desarrollo de *E. granulosus* (II)

Tabla 10.

Integración de la expresión de *Stalker* (St) en los distintos estadios de desarrollo de *Echinococcus granulosus* (filas) con las distintas estructuras morfológicas presentes en cada etapa (columnas). La presencia/ausencia de las estructuras específicas durante las diferentes etapas de desarrollo se destacan con **+/-**. Última columna: el o los ejes de simetría presentes en cada estadio. La intensidad de la expresión de *Stalker* se señala con los distintos tamaños del símbolo "St".

A: *Stalker* en la morfogénesis del Protoescólex (PSc)

Las etapas en la morfogénesis del Psc se ordenan en la primera columna de la izquierda siguiendo el criterio utilizado por el autor en este trabajo. SV: espacio subvesicular, CC: corpúsculos calcáreos.

Etapa	Estructura Morfológica					Expresión de <i>Stalker</i> ^(St)			
	soma	foramen	Pedúnculo	CC	Rostelo Primordial	Rostelo Maduro	Ventosas Primordiales	Ventosas Maduras	Eje(s) de simetría
yema	+ \ St	+	-	-	-	-	-	-	Radial
Brote temprano	+ \ St	+	(+)	-	-	-	-	-	Radial
Brote elongado	+ \ St	+	+	-	+	-	+ \ St	-	Radial – baso-apical
PSc inmaduro (Brote elongado tardío)	+	(+) (vesícula)	+ \ St	-	-	+	+ \ St	-	Tetrarradiado – baso-apical
PSc maduro	+ \ St SV	(+) (vesícula)	+ \ St	+	-	+	-	+	Tetrarradiado – baso-apical

B: *Stalker* en la maduración de la tenia *echinococcus*

Fueron estudiados los estadíos E3 a E6. Las etapas en la maduración del estadío adulto son clasificadas según Smyth & McManus, 1989: E1: Segmentación; E2: Segunda proglótide; E3: Gametogonia temprana (*testis*); E4: Formación del poro genital; E5: Gametogonia tardía (testículos y ovarios maduros); E6: Dilatación del útero; E7: Formación de las oncósferas.

Etapas :: Estructura Morfológica \ Expresión de *Stalker* ^(St)

<i>Estadío</i>	Número de Proglótides	Genitalia	Cigotos	Corpúsculos Calcáreos
E1	1			(+)
E2	2			
E3	2	+ \ St		
E4	3	+ \ St		
E5	3	+ \ St		
E6	3	+ \ St		
E7	3		+	

La diversidad en las formas larvarias de los Cestodos es considerable, y su clasificación problemática (Wardle & McLeod, 1952; Smyth & McManus, 1989; Chervy, 2002). Los Cestodos ocupan una posición filogenética de singular interés, en particular es clave para ayudar a resolver una cuestión mayor de la Biología moderna y planteada en la Introducción de este trabajo: la identidad del ancestro común de todos los bilaterios, el Urbilateria. Los Cestodos, organismos sin boca ni ano, acelomados, sin segmentación verdadera, triploblásticos (pero en los cuales no hay estudios sistemáticos de las capas tisulares), ¿constituyen una clase que involucionó, simplificándose secundariamente, a partir de ancestros más evolucionados, para adaptarse al endoparasitismo?

Como contribución al estudio de *E. granulosus* y la Hidatidosis, nuestro trabajo se ha centrado en el estudio de las bases moleculares del desarrollo de este Cestodo. En este sentido, hemos colaborado en la caracterización de diversos genes y/o proteínas (ver Anexo) en este parásito. En particular, nos hemos centrado en el aislamiento y estudio de genes con homeobox, tema de este trabajo, en el entendido de que su estudio puede ayudar a comprender mejor la biología de este organismo, tan interesante desde el punto de vista filogenético, caracterizando y descifrando cascadas regulatorias durante el desarrollo de la larva metacestode (quiste hidático y protoescolices, PSCs), que pueden conducir eventualmente al control de la enfermedad hidática.

La primera etapa de este trabajo, condujo al aislamiento y caracterización de genes con homeobox en el genoma de *E. granulosus*. En el curso del trabajo de análisis de su expresión, se plantearon diversas preguntas concernientes a aspectos funcionales y morfológicos durante el desarrollo temprano del PSC, las cuales fueron abordadas por distintas metodologías, y que llevaron a la descripción de detalles novedosos en la morfología temprana del PSC, con implicancias funcionales.

El trabajo de aislamiento y caracterización de genes con homeobox en *E. granulosus* (véase también el Anexo), organismo modelo que, a pesar de las dificultades que presenta en su abordaje, se presenta como sumamente interesante desde el punto de vista filogenético, puede ayudar a comprender mejor la evolución del plan corporal de los metazoarios. En este trabajo se presentan nuevos datos acerca de las secuencias de genes ya descritos (*Eghbx3/Stalker*, *Eghbx4* y *Eghbx5/EgLIM*) y de un nuevo gen con homeobox: *Eghbx6*.

Por último, los estudios morfológicos y moleculares confluyeron en el estudio de la expresión de uno de estos genes (*Eghbx3/Stalker*) en distintos estadíos del parásito, encontrando a la luz de nuevos resultados experimentales que puede jugar un rol clave en la morfogénesis temprana del protoescólex, así como en la del gusano adulto.

Discusión

1. a. Genes con homeobox en *E. granulosus*

Hasta el momento se han aislado catorce secuencias con homeoboxes en *E. granulosus*. Este hecho confirmaría trabajos previos en los cuales una hibridización de *Southern blot* a baja rigurosidad sobre ADN genómico del parásito y utilizando como sonda el oligonucleótido HB-1 marcado radiactivamente reveló la presencia de por lo menos 15 bandas (Oliver *et al.*, 1992). Ocho de ellos (*EgHox1*, 2, 3, 4, 5, 9, 10 y *EgHbx9*, genes del tipo *Hox*) fueron aislados a partir de ADN copia proveniente del estadío PSc (Lalanne, 2003; Castillo *et al.*, 2004; ver Anexo). Los otros seis ("no-*Hox*") provienen de rastreos en una biblioteca genómica (ver antes; Oliver *et al.*, 1992).

Los análisis de alineamiento y filogenia (Figs. 1-6) de parte de los HD de los genes con homeobox de *E. granulosus* nos permiten afirmar que los genes tipo *Hox* constituyen un clado y los "no-*Hox*" otro, con un buen soporte de *bootstrap*. El clado "no-*Hox*" presenta un sub-clado constituido por *Eghbx1*, 2 y 3/*Stalker*, todos genes tipo *NK*. De hecho, existe una aparente politomía entre el "grupo *NK*" (*Eghbx1*, 2 y *Stalker*) y el resto (*Eghbx4*, 5 y 6) (Fig. 5). *Eghbx5/EgLIM* aparece como el gen más divergente, seguido de cerca por *Eghbx6*. Es de hacer notar que en este caso no se trabajó con grupo externo, ya que lo que se buscaba era relacionar los genes de *E. granulosus* entre sí.

Si bien consideramos que el número de genes con homeobox en *E. granulosus* debe ser aún mayor, dados los antecedentes en otros organismos (*Caenorhabditis elegans* con 133 entradas en el *GenBank* http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?taxid=6239&query=homeobox&qchr=&advsrch=off&neighb=off, genoma completamente secuenciado; planarias con más de cincuenta, entre las distintas especies), los genes ya aislados nos permiten sacar algunas conclusiones preliminares.

En primer lugar, la existencia de genes tipo *Hox*, expresados en el PSc, permite especular con la posibilidad de que se esté produciendo algún tipo de especificación regional corporal a lo largo del eje ántero-posterior de la forma larvaria. Dado que este eje no está definido aún claramente, los dominios de expresión de estos genes

contribuirán sin dudas a despejar esta interrogante. Si bien existen estudios preliminares de expresión de estos genes en PSCs, los resultados no han sido del todo concluyentes (Lalanne, 2003). Planteamos que con mucha probabilidad la expresión típica (escalonada) de este tipo de genes se dará sobre todo en el estadio de brote temprano y elongado, antes de la formación de las estructuras típicas del PSC.

Por otro lado, la existencia de genes con homeobox no pertenecientes a la clase *Hox*, y que además presentan una importante divergencia a nivel de su secuencia con los correspondientes parálogos, hasta el punto de que no hemos podido definir claras ortologías, reflejaría la especialización del Cestodo *E. granulosus*, aparentemente simple en su morfología pero adaptado al endoparasitismo. En efecto, los endoparásitos suelen presentar una plasticidad adaptativa remarcable (Thomas *et al.*, 2002), y en particular *E. granulosus* parece presentarla, tanto genotípica (Rosenzvit *et al.*, 2001), como fenotípicamente (Thompson & Lymbery, 1995; Britos, com. pers.).

El estudio del potencial neurosensorial de los Cestodos, y sobre todo su percepción real del entorno ha sido un área tradicionalmente poco explotada. La percepción del entorno en los Cestodos puede ser mucho más sofisticada que lo tradicionalmente asumido a partir de estudios descriptivos de un sistema nervioso que aparece, *a priori*, como elemental o al menos simplificado. En adición a las señales provenientes de su entorno inmediato, pueden existir una gran cantidad de señales directas o indirectas que provean una información confiable del entorno externo al propio hospedero. El hallazgo de genes con homeoboxes “no-*Hox*” en *E. granulosus* (*Eghbx4*, 5 y 6), con identidades importantes en su secuencia con genes que se expresan en regiones cefálicas, abren perspectivas de estudio futuro en un organismo que presenta un sistema nervioso simplificado pero capaz de sensor los cambios de su entorno.

1. b. *Eghbx4*

Secuencia Nucleotídica Genómica

La secuencia de *Eghbx4* (X66820, Oliver *et al.*, 1992; Figs. 7 y 8) fue aislada al mismo tiempo que *Eghbx3* y de hecho comparten el mismo clon genómico Egλ2 en un fragmento de 7 kpb sin sitio de corte interno para *Bam*HI, lo que excluiría en principio un artefacto de clonado y sugiriendo que ambos genes forman parte de un agrupamiento genómico. No se logró empalmar la secuencia de *Eghbx4* con la de *Eghbx3*.

Secuencia aminoacídica deducida

El HD de *Eghbx4* es el único aislado en *E. granulosus* en presentar una lisina (K) en la posición 50, crítica en el reconocimiento de la secuencia blanco en el ADN, y característica de los genes tipo *goosecoid* u *orthodenticle*, dentro de la familia de HDs *paired* (*prd*) (Fig. 9, Tabla 2, Fig. 10). Al igual que *Stalker*, *Eghbx4* presenta una serie (18%) de residuos únicos, no encontrados en otras proteínas parálogas, lo que dificulta establecer ortologías claras (Figs. 10-11). Sin embargo, el análisis filogenético permite en principio agrupar a *Eghbx4* dentro del clado *goosecoid* (Figs. 11-14).

El nombre *goosecoid* es una contracción de los nombre *gooseberry* y *bicoid*. Su HD presenta muchas similitudes con las de *gooseberry* pero la K50 es característica de *bicoid*, el morfógeno anterior de *Drosophila*. En los vertebrados los genes ortólogos de *goosecoid* cumplen un rol clave en el tejido organizador de la blástula (en *Xenopus laevis* organizador de Spemann, labio dorsal del blastoporo) y su expresión ectópica induce la aparición de ejes secundarios (Burglin, 1994). *orthodenticle*, un gen típico de la familia *paired*, se caracteriza también por poseer una K50. Su dominio de expresión en *Drosophila* se solapa con el de *goosecoid* en el estomodeo y en el sistema nervioso estomatogástrico (Goriely *et al.*, 1996). En vertebrados, los genes homólogos de *otd* se expresan en el primordio del sistema nervioso central. Así, ambos genes, *gsc* y *otd*, y sus genes ortólogos, son marcadores de las partes más anteriores de los animales (Burglin, 1994).

1.c. *Eghbx5/EgLIM*

LIM

La Región 1 presenta un marco abierto de lectura que codifica conceptualmente para un péptido de 89 residuos aminoacídicos (Figs. 15-16). El análisis del péptido muestra una región de una posible estructura en dedos de Zinc (Zn) tipo LIM.

El motivo LIM es una estructura repetitiva de cerca de 60 aminoácidos y que contiene residuos conservados de cisteína (C) e histidina (H). Fue definido originariamente a partir de dos genes de *C. elegans* (*lin-11* y *mec-3*) y uno de rata: *Isl-1*, de los cuales deriva su nombre acronímico. En general se encuentran dos copias del motivo LIM río arriba del HD (en las proteínas denominadas "LIM-HD"), aunque existen casos en los cuales no se encuentran HDs. El motivo LIM exhibe una pobre conservación de secuencia entre los distintos genes, y entre los dos repetitivos, con la excepción de los residuos C y H característicos (Burglin, 1994). Mediante análisis de alineamientos tipo BLAST y filogenéticos, podemos afirmar que el dominio LIM de EgLIM es el segundo, o sea el más cercano al HD.

El dominio LIM es reconocido por una serie de co-factores, lo que, desde una perspectiva evolutiva, habría dotado a las proteínas LIM-HD de un potencial único para interactuar combinatoriamente con otros factores de transcripción de manera hetero u homo dimérica (Hobert & Westphal, 2000).

La región del HD de los genes LIM sí es más conservada y característica y, de hecho, fue lo que posibilitó originalmente la clasificación del gen *Eghbx5/EgLIM* (Oliver *et al.*, 1992). El HD LIM de *Eghbx5* se encuentra en la Región 2 y en parte de la 1 (Figs. 15-16). En un principio (ver Oliver *et al.*, 1992) se recuperó sólo la tercera hélice del HD, la cual es interrumpida a nivel de V47 por un intrón sumamente extenso. El trabajo presentado aquí extiende significativamente la secuencia analizada y ha permitido recuperar, con un alto grado de probabilidad, la totalidad del HD de *Eghbx5/EgLIM*.

Intrón

En efecto, el análisis del intrón (Fig. 17) permite el solapamiento de las secuencias y la reconstrucción del HD de EgLIM. Otro hecho que refuerza nuestra

aseveración (en el sentido que hemos recuperado la totalidad del HD de EgLIM) es que al realizar un análisis tipo BLAST de la secuencia completa, el alineamiento con las secuencias de mayor identidad se da a ambos lados de la zona del intrón (Fig. 20). La posición de este intrón (47 del HD) es bastante frecuente en los HDs (Burglin, 1994).

El homeodominio

El HD de EgLIM presenta una serie de residuos característicos de la familia LIM (Fig. 19), pero también, y al igual que *Eghbx3*, 4 y 6, una serie de residuos poco comunes (Figs. 19, 21). Asimismo, y para lograr un buen alineamiento con otros HDs emparentados es necesario introducir una serie de inserciones y/o deleciones aminoacídicas. Este hecho no es inusual en los homeodominios (Burglin, 1994).

De todas maneras, el análisis bioinformático de parte de la secuencia del HD de EgLIM nos permiten clasificar tentativamente a EgLIM dentro de la subfamilia I, que incluye a *lin-11* (*C. elegans*, donde se han identificado siete genes que codifican para LIM-HDs), y que por eso también es llamado grupo LIN-11. El análisis filogenético del HD de las proteínas LIM-HD permite subdividirlos en seis subgrupos. En general, en los invertebrados se encuentra un único representante de cada grupo, mientras que en vertebrados se encuentran dos (Hobert & Westphal, 2000).

LIM + HD = EgLIM

El análisis de toda la secuencia aminoacídica putativa de *Eghbx5*/EgLIM muestra una serie de HPAA y sitios putativos de fosforilación (Fig. 25 y Tabla 4). Al analizar la totalidad de la secuencia de EgLIM mediante BLAST P la similitud se extiende al dominio LIM y el HD juntos, recuperándose muchas de las mismas secuencias que al alinear sólo el HD (Fig. 26). Sin embargo, al realizar los análisis filogenéticos (Fig. 27 y siguientes) los alineamientos y árboles obtenidos no son consistentes, reafirmando lo dicho antes, en el sentido que la homología de secuencias entre los genes LIM es significativa sólo a nivel del HD.

Todos los genes LIM-HD estudiados funcionalmente presentan dominios de expresión a nivel del sistema nervioso, confiriendo características de diferenciación terminal, tales como el patrón de proyecciones axonales. La mayoría de los genes LIM-HD estudiados se activan en un período corto y específico del desarrollo del sistema nervioso, cuando las células abandonan el ciclo celular y empiezan a expresar marcadores que confieren identidades específicas. Los estudios de pérdida de función

en diversos sistemas modelo, sugieren que el gen LIM-HD ancestral de todos los animales modernos jugaba un papel central determinando las identidades neurales, el direccionamiento axonal o el posicionamiento celular correcto durante el desarrollo del sistema nervioso (Hobert & Westphal, 2000).

II.d. *Eghbx6*

El homeodominio y secuencias adyacentes

El HD de *Eghbx6* es muy divergente, presentando una alta proporción (50%) de residuos atípicos en las posiciones que ocupan. Por análisis de alineamiento tipo BLAST, puede ser clasificado provisoriamente como perteneciente a la familia *prd* (*paired*), subfamilia *aristaless*, ya que presenta las mayores identidades (60%) con genes de dicha familia (ver sección 1.d.3, en Resultados). La treonina T54 es llamativa, ya que el residuo característico *prd* es alanina (A). Los residuos de parte de la tercera hélice (de reconocimiento) del HD son idénticos a los de NK-6 (VWFQNRRTKWR). En el HD se encuentra un HPAA (LLLLNL, Fig. 33 y Tabla 5), idéntico al encontrado en los HDs de *unc-4* (*C. elegans*), TLX3 (*H. sapiens*), *Ods site* (*D. melanogaster*), pero no en *aristaless* (*D. melanogaster*). Los análisis filogenéticos no fueron concluyentes, no permitiéndonos agrupar con un soporte significativo de *bootstrap* a *Eghbx6* dentro de ningún clado determinado (Tabla 6 y Figs. 35-37). Sin embargo, todos los genes que presentan mayor identidad de secuencia con *Eghbx6* presentan un aspecto común: su expresión en las regiones más anteriores del cuerpo (Burglin, 1994), en particular en regiones cefálicas. El gen *aristaless* de *Drosophila* se expresa en las regiones más distales de algunos apéndices adultos (Burglin, 1994), así como en diversas regiones de la cabeza.

1.a. *Eghbx3/Stalker*

Secuencia Nucleotídica Genómica

El análisis de *Stalker* mediante el ensayo de *Southern blot* en condiciones de alta rigurosidad (Fig. 43), nos permite concluir que *Stalker* es un gen de copia única en el genoma de *E. granulosus* y que, trabajando en condiciones similares (ver Materiales y Métodos) se puede analizar específicamente la localización témporo-espacial de su mRNA mediante técnicas de hibridización *in situ*.

La secuencia nucleotídica (Figs. 38-39) presenta además una secuencia consenso de poliadenilación (AATAAA) en dirección 3' con respecto a la secuencia codificante y la secuencia complementaria a la secuencia CTTCTC, encontrada en regiones regulatorias de por lo menos tres genes de *E. granulosus* (*Eghbx1*, Esperón *et al.*, 2000; *EgFABP2*, Esteves *et al.*, 2001; y *EgGST*, Fernández, 2001). Queda por ser explorada la posible relevancia funcional de estos hallazgos.

Aún más importante para la funcionalidad del gen *Stalker*, puede resultar el hallazgo de seis secuencias de reconocimiento para proteínas con HD NK-2 (Fig. 42).

Secuencia aminoacídica deducida

La secuencia nucleotídica codifica para una proteína con homeodominio (HD). La proteína conceptualmente traducida podría ser la completa, a pesar de su pequeño tamaño (207 aminoácidos, Peso Molecular deducido 24500 Da). El primer residuo de Metionina encontrado (M25) se encuentra codificado por un codón ATG que está inserto en una secuencia con alta identidad (6/7 nucleótidos, Nts.) con la del contexto de Kozak (Kozak, 1991). Asimismo se encuentra presenta una secuencia consenso tipo TATA (TATAA, pos 449, a 71 Nts. de distancia del ATG codificante para la M25). Por otra parte, en la zona 5' con respecto al marco abierto de lectura (Nts. 368 a 509), se encuentran una serie (6) de sitios de pegado de factores de transcripción con HD tipo NK-2 (Fig. 42), lo que abre la posibilidad de que este gen se encuentre autorregulado. Este hecho es característico de este tipo de genes (revisado en Thomsen *et al.*, 2004), cuyos productos proteicos están involucrados en circuitos autorregulatorios, que estabilizan y potencian su propia expresión. Adicionalmente, en esta misma zona se encuentran tres sitios de pegado para factores de transcripción a dedos de Zinc tipo GATA (secuencia consenso: WGATAR), los cuales se ha demostrado en otros sistemas que interaccionan con los HDs NK-2, formando parte de los mismos circuitos

regulatorios autorregulatorios, ya sea mediante interacciones proteína-proteína o por activación transcripcional cruzada, durante el desarrollo y diferenciación de estructuras mesodérmicas (Chen & Schwartz, 1995; Skerjanc *et al.*, 2001). El posible significado biológico de estos hallazgos en la secuencia de *Stalker* ameritará rigurosos estudios posteriores.

Intrón

El análisis de los sitios putativos de corte y empalme muestra con una muy alta probabilidad de que los sitios mostrados en la Fig. 40 son correctos. Es de hacer notar además que los intrones en esta posición del HD (44/45) son muy frecuentes, habiendo sido encontrados en una alta proporción de genes con homeobox (30% de los genes que presentan intrones, Burglin, 1994). En particular el gen *Dth-2*, de *Dugesia (Girardia) tigrina* (planaria, platelminto turbelario), y cuyo HD presenta una alta similitud en secuencia con el de *Stalker* (70%, ver Tabla 7), presenta un intrón en la misma posición.

El homeodominio

A partir de los análisis de similitudes de secuencias por alineamientos BLAST, búsqueda de residuos característicos y análisis filogenéticos, el HD de *Stalker* puede ser clasificado tentativamente dentro de la superfamilia *Antennapedia*, familia *NK*, clase NK-2, subclase NK-2.2 (Tabla 7, Figs. 44, 49-53, ver además Holland *et al.*, 2003). Presenta los dos residuos más característicos de las proteínas parálogas de la clase NK-2 (L7 e Y54).

Las proteínas con HD de la clase NK-2 se caracterizan además por poseer del lado N-terminal (con respecto al HD) un dominio conservado evolutivamente *eh-1* (llamado también dominio *tinman* o TND) y, a veces, un dominio ácido. Del lado C-terminal (siempre con respecto al HD), y separado del HD por unos pocos (8 – 31) aminoácidos, se encuentra un dominio específico NK-2 (NK-2 SD, también denominado CP, por *conserved peptide*). El significado funcional de estos dominios ha sido estudiado en varios sistemas modelos *in vivo* e *in vitro*, y se ha demostrado que *eh-1* es fundamental para mediar la represión transcripcional de *Engrailed*; y el NK-2 SD funciona como un inhibidor intramolecular de un dominio activador transcripcional que se encuentra aún más hacia el extremo C-terminal de la proteína.

Un sitio consenso de fosforilación por la enzima quinasa de caseína CKII (TAQE, secuencia consenso: (S/T)XX(D/E), donde X es cualquier aminoácido), se encuentra en

la pos. 28 – 30 del HD. Esta secuencia está presente en la misma zona en todos las proteínas de la clase NK-2 y participa de forma indirecta (la secuencia aminoacídica involucrada no interacciona directamente con el ADN) en la regulación de la interacción del HD con la secuencia blanco en el ADN (Kasahara & Izumo, 1999).

Por otra parte, *Stalker* presenta todos (14) los residuos adicionales característicos de la clase NK-2 (Banerjee-Basu & Baxevani, 2001). La presencia de L7 e Y54, que participan del reconocimiento del ADN por el HD, hacen presumir que la secuencia *core* reconocida por este HD será similar a las reconocidas por otros HDs NK-2 (Tsao *et al.*, 1994; Koizumi *et al.*, 2003, Fig. 44), diferente a la secuencia consenso 5' TAAT 3' reconocida por la mayoría de los HDs.

Sin embargo, presenta una serie de aminoácidos diferentes a todas las secuencias NK-2 (doce, Fig. 44), en particular algunos de los cuales participarían en el contacto con el esqueleto azúcar-fosfato del ADN, y que hace que la máxima similitud encontrada con otros HDs sea de sólo 73% (Tabla 7), y que no se logre un buen soporte de *bootstrap* por los método de análisis filogenéticos empleados (Figs. 50-53). Adicionalmente, este hecho no nos permite definir ortologías claras entre *Stalker* y otros genes dentro la clase NK-2 (aún así, lo clasificamos tentativamente como perteneciente a la sub-clase NK-2.2), a pesar de una clara paralogía con los de la clase NK-2.

El HD comienza con un sitio de localización nuclear (NLS) parcial (QSKRR). El sitio NLS se caracteriza por la inclusión de residuos de Arg y Lys, y usualmente incluye Pro (Alberts *et al.*, 1994). En el caso de *Stalker*, se encuentran tres (KRR) de los cinco residuos caracterizados funcionalmente en otros genes de la clase NK-2 (*Csx/mNKX2.5*, *TTF-1/NKx2.1*), y en *mOct-6* (Kasahara & Izumo, 1999).

La modelización de la estructura tridimensional del HD de *Stalker* muestra una estructura clásica de tres hélices alfa, separadas por zonas cortas sin estructura definida. En particular la estructura hélice-vuelta-hélice (hélices 2 y 3 del HD) está bien conservada (Figs. 45-48). La modelización 3D se realizó mediante un paso preliminar de alineamiento con las secuencias con mayor similitud y cuya estructura hubiera sido resuelta experimentalmente con anterioridad. El alto porcentaje de similitud (63%, Fig. 45) permitió un paso posterior de refinamiento de la estructura hasta llegar a la mostrada en la Fig. 48.

Otras zonas de la proteína Stalker

La proteína Stalker presenta tramos aminoacídicos homopoliméricos (HPAA, ver Tabla 8). Los tramos poli-Gln fueron encontrados originalmente en *Antp* (*Antennapedia*), *Dfd* (*Deformed*), *en* (*Engrailed*), *bcd* (*bicoid*), todos productos de genes vinculados al desarrollo de *D. melanogaster*. En Stalker encontramos tres de estos tramos: QMQVQQ, PPPSLAPYP, PPFQPP, uno de ellos rico en glutaminas (Q, ver Fig. 54). Se ha postulado que los tramos HPAA participarían en la transactivación transcripcional de las proteínas con HD, o serían simplemente regiones de unión entre otros dominios funcionales. Es de hacer notar que una característica de estos tramos es su bajo nivel de conservación, aún entre genes ortólogos. En Stalker, dos de estos tramos se encuentran flanqueando el dominio *eh-1* (ver más adelante), y el tercero (PPFQPP) presenta similitud de secuencia con el dominio encontrado al final de los productos de los genes tipo *bap* (*bagpipe*), justo al final del péptido (PYFYF).

Hacia el extremo N-terminal (N-t) la similitud entre Stalker y otras proteínas pertenecientes a la familia NK-2 es mucho menor. Stalker presenta un dominio TN/*eh-1* parcial (5 identidades en 23, Fig. 55), en particular está conservada la F (6ª posición desde el inicio), que es invariable en este tipo de dominio (Smith & Jaynes, 1996), característico del extremo N-t en la mayoría de las proteínas de la clase NK-2 (ver Tabla Intro_NK2). Por otro lado, el péptido parcial de Stalker no presenta dominio ácido hacia el extremo N-t, también presente en algunas proteínas NK-2. Tampoco presenta el hexapéptido característico de muchos otros HDs (Burglin, 1994). Es de destacar que el no encontrar estos dominios característicos puede deberse a que no contamos con la proteína completa.

Hacia la zona C-t, con respecto al HD, Stalker presenta parcialmente el NK-2 SD ("dominio específico de NK2", encontrado sólo en proteínas con HD NK-2), corto dominio encontrado contiguo al HD e involucrado en la transactivación negativa del HD NK-2 (Watada et al., 2000). El dominio encontrado en Stalker presenta una similitud de 4 en 12 aminoácidos, 6 si tomamos en cuenta sustituciones conservativas (A por V, S por P, Fig. 56). La presencia de la Pro final es llamativa, ya que se postula que está involucrada en la prevención de la formación de una hélice α . La predicción estructural en la zona de Stalker correspondiente (comenzando cinco aminoácidos más allá del final del HD) aparentemente excluye la posibilidad de formación de hélices α . El dominio NK-2 SD no se encuentra presente en *tin* (*tinman*, *D. melanogaster*) ni en *ceh-24* (*C. elegans*).

2. Expresión de *Eghbx3/Stalker* en diferentes etapas del desarrollo de *E. granulosus* (I).

2.a. *Stalker* en el Protoescólex

La expresión de *Stalker* en el PSc maduro es muy evidente, fue la primera en ser comunicada (Martínez *et al.*, 1997) y pone en evidencia una estructura característica: el Pedúnculo (Figs. 59-63). Éste es escaso en células (típicamente 10 – 15, según nuestras observaciones) y luego es reabsorbido, desapareciendo luego de la maduración del PSc. La morfología de la zona de inserción del Pedúnculo en la zona más basal del soma del PSc hace recordar al Cercómero retraído de las larvas Procercoides de los Cestodos. Es de hacer notar que la zona de inserción del Cercómero coincide morfológicamente con la zona de confluencia de los canales excretores del sistema de regulación osmótica (Wardle & McLeod, 1995; Smyth & McManus, 1989).

Curiosamente, un gen parálogo de *Stalker*, *CnNK-2* participa en el control de la diferenciación del pie (extremo basal, que consiste en un pedúnculo y un disco) del Cnidario *Hydra vulgaris*, regulando positivamente la expresión del oligopéptido *pedibina* y autorregulando, mediante un mecanismo de retroalimentación positiva, su propia expresión (Thomsen *et al.*, 2004). La *pedibina* regula positivamente, a su vez, a la expresión de *CnNK-2*, y la zona de expresión de ambos péptidos (músculo endodérmico) se atenúa en forma de gradiente baso-apical, con el máximo de expresión en el pedúnculo basal. Hemos encontrado dentro de la secuencia de ADN presentada en la Fig. 38 una serie de secuencias que presentan identidad con los sitios de pegado para proteínas NK-2 (ver Fig. 42), lo cual abre la posibilidad de que *Stalker* esté sujeto al mismo tipo de circuito autorregulatorio que otras proteínas NK-2 (revisado en Thomsen *et al.*, 2004).

Según los modelos de reacción- difusión, los procesos morfogenéticos podrían depender de la producción de inhibidores laterales de amplio rango (con capacidad de difundir a cierta distancia), los cuales serían regulados por un antagonista localizado, un activador autorregulatorio (Meinhardt & Gierer, 2000; Thomsen *et al.*, 2004). *CnNK-2* es un gran candidato para constituir tal activador durante el desarrollo del pie de la hidra. Creemos que el patrón de expresión de *CnNK-2* en la hidra, filogenéticamente

ubicada en una posición más basal que los Cestodos, puede ser significativo para comprender el rol de *Stalker* en *Echinococcus*.

Otras zonas de expresión de *Stalker*, aunque en menor grado, las constituyen: la zona parenquimática subvesicular (la vesícula o vejiga constituiría los restos del foramen) -visible en tiempos más prolongados de reacción de revelado, en ejemplares donde no hay reacción fuerte en el pedúnculo. No existe señal de *Stalker* en otras estructuras características del PSc: ventosas, ganchos, ni corpúsculos calcáreos.

2.b. *Stalker* en la Tenia adulta

La señal en el escólex es difusa y más tenue que en la genitalia de las proglótides y podría corresponder al Neuropilo del sistema nervioso. Esto debería confirmarse en ensayos posteriores, preferentemente con un anticuerpo anti-*Stalker*. Es de hacer notar que NKx2-2, (proteína vertebrada con la cual *Stalker* guarda las mayores identidades de secuencia) se expresa en el sistema nervioso. De hecho muchas de las proteínas NK-2 presentan ese dominio de expresión (revisado en Holland *et al.*, 2003; ver Tabla Intro_NK2). Alternativamente, *Stalker* podría estar expresándose en la musculatura de la zona debajo de las Ventosas. Este patrón de expresión sería más coherente con el encontrado en los brotes y apuntaría a una homología funcional con otros sistemas, donde los genes NK-2 participan en la especificación del mesodermo.

La señal en la genitalia parece, en principio, sorprendente. Sin embargo, creemos interesante especular que la expresión de *Stalker* en esta zona particular podría explicarse debido a la morfología particular de los Cestodos. En otros sistemas, los genes NK-2 se expresan en regiones cefálicas primordiales y endodermo (ver Tabla Intro_NK-2). La expresión de *Dth-1* (gen emparentado de *D. tigrina*, planaria) se localiza en el intestino (endodermo) y células parenquimatosas no identificadas, así como en la región cefálica (García-Fernández *et al.*, 1993). Asimismo, *AmphiNk2-tin*, otro gen con importante identidad de secuencia con *Stalker*, se expresa en el endodermo del sistema digestivo anterior (*foregut*) del anfibio (Holland *et al.*, 2003). En la hidra, el gen antemencionado *CnNK-2* se expresa asimismo en la gastrodermis (Grens *et al.*, 1996), compuesta por células epitelio-musculares. Más aún, en *C. elegans* (nematodo de vida libre), *ceh-22* se expresa en los músculos de la faringe.

Desde una perspectiva evolutiva general, la expresión de los genes NK-2 en el endodermo podría constituir una característica antigua y conservada de todos los animales. El mesodermo podría haber evolucionado a partir de la gastrodermis, durante la transición filogenética desde el ancestro diploblástico (supuestamente con una morfología parecida a la de la hidra actual) al bilaterio primitivo. El mesodermo primitivo presumiblemente incluía una capa de células musculares que se diferenciaban bajo la influencia de los genes NK-2. Más tarde en la evolución, algunas de estas células musculares digestivas pueden haber adquirido la capacidad de transformarse en vasos musculares contráctiles (hasta confluir en el corazón de los animales superiores), los cuales continúan siendo especificados por la expresión de los genes NK-2.

El hecho de encontrar la expresión de *Stalker* en regiones definidas (y que no parecen guardar relaciones funcionales entre sí), en dos etapas diferentes del ciclo vital de *E. granulosus*, puede reflejar un hecho característico y conservado a lo largo de la evolución entre los genes con homeobox: su patrón de expresión multimodal (De Robertis, 1994), es decir en distintas regiones corporales, durante diferentes etapas del desarrollo.

3. Estudios Morfológicos

Desarrollo temprano de la forma larvaria de *E. granulosus*

Uno de los objetivos de este trabajo es el realizar una contribución a la comprensión de la plasticidad y las limitaciones características de los módulos génicos que regulan el desarrollo y la evolución de los seres vivos. En este sentido, consideramos imprescindible el integrar aproximaciones moleculares con estudios morfológicos.

Los resultados presentados, acerca de algunos aspectos morfológicos durante el desarrollo de la forma larvaria de *E. granulosus*, apoyan y extienden reportes previos (Galindo *et al.*, 2002; Galindo *et al.*, 2003; Martínez *et al.*, 2004).

3.a. Morfología de la *yema*

La etapa inicial durante el desarrollo del PSc es un conspicuo agrupamiento de células en zonas específicas de la capa germinativa (CG), y a la que denominamos *yema*. En una vesícula prolígera (VP), las observaciones sugieren que este agrupamiento se produce en el exterior de la CG (Figs. 74-75). Esta observación coincide con otras anteriores acerca del desarrollo temprano del PSc (Wardle & McLeod, 1952, p.84) y plantearía un interesante problema de polaridad, ya que el PSc madura luego hacia adentro de la VP, aunque se han descrito casos en los que la maduración del PSc ocurre en el exterior de la VP (Rogan & Richards, 1987; y referencias citadas en este trabajo). La VP presenta PScs en diferentes estadios de desarrollo, dado que la aparición de PScs es asincrónica.

La *yema*, vista desde ciertos planos, aparece como una estructura hueca (Fig. 76) y rodeada por un "anillo" o "aro" de células. Este hueco, o *foramen*, constituye una estructura definida del PSc en formación.

A nuestro juicio, el *foramen* descrito en este trabajo no debería ser confundido con otra estructura, la llamada *lacuna primitiva* (Wardle & McLeod, 1952), que constituye un carácter taxonómico clave en la clasificación de las larvas de los cestodos (Chervy, 2002). En efecto, la presencia de dos caracteres morfológicos primarios: la presencia de *lacuna primitiva* y la invaginación del escólex, constituyen las sinapomorfias de las larvas Cisticercos, una de los seis tipos en las clasificaciones modernas de las larvas de los Cestodos, y que incluye a las larvas de los Teníidos, entre los que se encuentra *Echinococcus*. El estadio metacestode de *Echinococcus* sería una larva Cisticerco modificada, cuya complejidad reflejaría a su vez la posición filogenética extrema de los ciclofilídeos dentro de los cestodos (Hoberg, 1999).

La *lacuna primitiva* es descrita como una estructura de la larva plenamente desarrollada, mientras que el *foramen* es visible desde los estadios más tempranos del desarrollo de la larva metacestode de *E. granulosus*. Esta *lacuna* aparece morfológicamente como una cavitación vesicular en muchos grupos de ciclofilídeos, y muchas veces su presencia se infiere a partir de un supuesto carácter secundario derivado, la vejiga o vesícula (*bladder*) (Chervy, 2002).

3.b,c. Morfología del brote

La *yema* evoluciona luego hacia el brote (temprano, semiesférico y luego elongado), que constituye la siguiente etapa en el desarrollo del PSc. Se caracteriza por poseer un eje baso-apical muy evidente y por no poseer aún ninguna de las estructuras características del PSc maduro.

La siguiente etapa, la de brote elongado tardío, señala la aparición incipiente de las estructuras características del PSc. Los ganchos, primeras estructuras características visibles del PSc, ya están casi formados, y los primordios de las ventosas aparecen como proyecciones laterales del cuerpo del PSc en formación. En esta etapa son visibles dos tipos de *septos*: el que separa la zona central (territorio de los ganchos) de la zona más apical; y los que separan los primordios de las ventosas del cuerpo del PSc (Fig. 78). Es de hacer notar que hasta esta etapa, no son visibles los corpúsculos calcáreos, que constituirán un componente importante del cuerpo del PSc maduro, llegando a representar hasta el 14.3% del peso seco del mismo (Thompson & Lymbery, 1995).

El *foramen* constituye el espacio que será llenado por el escólex en la invaginación final dentro del soma del PSc, que marca su madurez. Este espacio continúa siendo visible en el PSc maduro como una delgada línea que separa la base del soma del PSc del escólex invaginado. Este relicto del *foramen* constituiría la llamada "vejiga" o "vesícula" (*bladder*) y que está asociada tradicionalmente al desarrollo del sistema de regulación osmótica del cestodo (Chervy, 2002).

3.d. Diferenciación y Proliferación

Tinción y Conteo de Núcleos en brotes tempranos, brotes elongados y PScs maduros

La tinción del ADN con Ioduro de Propidio seguida de microscopía confocal nos permitió visualizar (y reconstruir en tres dimensiones) la distribución nuclear de *E. granulosus*, en dos fases del desarrollo del PSc: el brote elongado y el PSc maduro. En ambos estadíos, la distribución nuclear no es uniforme. En los brotes elongados (ver Sección 3.d.1-2 de Resultados) delinea el *foramen* de manera muy clara y los territorios prospectivos de las ventosas y el rostelo. En el PSc maduro (Sección 3.d.3.), la distribución nuclear delinea las estructuras características del mismo: ventosas, almohadilla rostelar. Adicionalmente, los núcleos se encuentran en la pared del PSc, donde algunos de ellos se encuentran asociados a los corpúsculos calcáreos.

Los resultados del conteo nuclear en estos dos estadíos (cinco PScs maduros y dos brotes elongados), sumado al realizado en un brote temprano (en colaboración con el grupo del Dr. Galanti, Chile, y asumiendo una geometría esferoide para el mismo, ver Martínez *et al.*, 2004, Tabla 9), nos permite afirmar que no existe proliferación significativa durante el desarrollo del PSc desde el estadio de brote temprano hasta la maduración final del mismo, pauta por la aparición de las estructuras características y la invaginación final del escólex dentro del soma.

Los estudios morfológicos del desarrollo del PSc han sido descritos en una serie de estudios desde 1922 (Rogan & Richards, 1987; y referencias citadas en este trabajo). Nuestra contribución, con la ayuda de tinciones, es una caracterización detallada del desarrollo temprano del PSc en infecciones naturales.

La observación de pasos secuenciales en el desarrollo del PSc, sumado al hecho de haber encontrado la expresión de un gen con homeobox tipo NK-2 (*Eghbx3/Stalker*, discutido más adelante) en varias de estas etapas (desde la formación de la *yema* inicial hasta el PSc maduro final), sugiere la ocurrencia de procesos inductivos de señalización intercelular que involucrarían a factores de crecimiento tales como los TGFs (*transforming growth factors*), BMPs (*bone morphogenetic factors*) y FGFs (*fibroblast growth factors*), y tal como se ha descrito en otros sistemas modelo (Hogan, 1996). En este sentido, vale la pena destacar el hecho de que BMP 2/4 fue encontrado en un rastreo global de genotecas de ADNc construidas a partir de ARN mensajero del estadio PSc de *E. granulosus* (Cluster ID EGC00109, <http://nema.cap.ed.ac.uk/Lopho/LophDB.php>; Fernández *et al*, 2002). Asimismo, en *E. multilocularis*, especie estrechamente emparentada, se ha aislado la proteína interactuante con el receptor de TGF- β (*TGF-beta receptor-interacting protein*, EMC00137), y la proteína asociada a la resistencia a TGF- β (*TGF-beta resistance-associated protein* TRAG, EMC00457).

Durante el desarrollo embrionario, se establecen límites definidos espacialmente que especifican compartimientos celulares o territorios. Dichos límites (*septos*, en este trabajo) pueden constituir una fuente de morfógenos (Lawrence & Struhl, 1996). Resulta interesante proponer que, tal como ocurre en otros sistemas (Larsen *et al*, 2003), la formación de los septos puede involucrar la acción de factores de transcripción específicos, en particular a aquellos del tipo *Engrailed*, y posteriormente vías de señalización del tipo *Hh* (Hedgehog)/*Wnt*, tal como se ha descrito en una serie de procesos morfogénicos en otros sistemas modelo (Slack, 1994, Loomis *et al*, 1998, Sarkar *et al*, 2000). En este sentido, vale la pena mencionar que un gen con alta identidad de secuencia con *Engrailed* fue encontrado en el rastreo antemencionado (EGC01008). Por último, no escapa a nuestra atención el hecho de que deben ocurrir importantes rearrreglos de la matriz extracelular durante los procesos de diferenciación y desarrollo de PSc descritos en este trabajo. Tal clase de rearrreglos

durante la ontogenia ya han sido descritos en otros sistemas (Morris, 1993; Martins-Green & Bissell, 1995).

Como conclusión de esta parte del trabajo, podemos afirmar que la morfogénesis del PSc se presenta como un proceso altamente dinámico, involucrando una serie de pasos definidos. Nuestro trabajo sugiere fuertemente que no hay un aumento significativo del número de núcleos durante la formación de las estructuras específicas del PSc. En este sentido, ensayos de TUNEL han mostrado que no existe una alta actividad apoptótica durante el desarrollo del PSc (Chalar com. pers.; Ehrlich, com. pers.) salvo en estructuras muy definidas (corpúsculos calcáreos). Asimismo, los ensayos de incorporación de [3H]-T en PScs tampoco muestran una alta actividad citoproliferativa (Galindo *et al.*, 2003). Sin embargo, creemos que cabe resaltar que hablamos de núcleos y no de células, ya que en *E. granulosus* se han descrito estructuras sinciciales, por Ej. en el tegumento y la capa germinativa (ver Thompson & Lymbery, 1995), y por lo tanto no podemos asegurar que cada núcleo observado corresponda efectivamente a una célula. Resulta tentador especular que lo que estamos observando es un proceso de diferenciación sin citoproliferación importante, pero hace falta realizar estudios más detallados como para poder afirmarlo.

Por último, creemos que nuestro trabajo puede constituir un aporte a la localización de marcadores moleculares durante el desarrollo de la larva metacestode de *E. granulosus*.

4. Expresión de *Eghbx3*/*Stalker* en diferentes etapas del desarrollo de *E. granulosus* (II)

La señal de *Stalker* en los estadíos más tempranos del desarrollo del protoescólex, localizada en zonas específicas de la CG, es consistente con un modelo en el cual la expresión de *Stalker* difunde circularmente a partir de un foco inicial de expresión, tomando la forma de un aro o anillo.

4.a, b. *Stalker* en la yema

Tal como se aprecia en las Figs. 90-94, existe una señal de *Stalker* en las yemas de la Capa Germinativa (CG), primera etapa en la formación de un PSc. La señal no es tan conspicua como en estadíos posteriores, pero al realizar una contra-tinción de núcleos con Ioduro de Propidio (IP) sobre los preparados marcados por *Stalker* (Figs. 95-97), se aprecia que la máxima señal de *Stalker* aparece en zonas que rodean a otra con alta concentración nuclear, coincidente aparentemente con la descrita por Galindo *et al.* (2002), y que marca la proliferación celular inicial que llevará finalmente a la aparición del PSc. Estas zonas, que toman la forma de una yema rodeada por un anillo, parecen ensancharse hasta que en su interior, en el punto medio aparece un brote esferoide que luego se elongará en dirección baso-apical. La morfología de esta zona, sumado al hecho de que constituya el territorio de expresión de un gen con homeobox, hace recordar a las primeras etapas de organogénesis en otros sistemas, dependientes de interacciones epitelio-mesénquima (Gilbert *et al.*, 1996).

Los controles efectuados (contra-marcado con IP sobre reacciones de HIS con la ribosonda sentido, Fig. 97; contra-marcado con IP de reacción de HIS con la ribosonda antisentido de *Eghbx4*, no mostrado) confirman que la señal de *Stalker* es específica.

Stalker se constituye así en un marcador molecular temprano del desarrollo del PSc, en una zona de proliferación celular localizada.

4.c. *Stalker* en el brote

En estas etapas del desarrollo del PSc, *Stalker* aparece asociado al rearreglo espacial de las células del brote, y en particular parece vinculado a la aparición de las ventosas, en una etapa bien definida del desarrollo, pero no a la de los ganchos.

La expresión de *Stalker* encontrada en el PSc maduro (ver antes) presenta solución de continuidad con la hallada en etapas más tempranas del desarrollo. *Stalker*, ubicuo en el soma del brote temprano, se concentra primero en la zona de las ventosas (después de la formación total de los ganchos), desciende hacia la zona parenquimática sub-vesicular y por último continúa descendiendo hacia la zona del pedúnculo, donde se concentra fuertemente y permanece, una vez desaparecido el mismo, en la zona más basal del PSc, como relicto de expresión.

El estudio de la expresión de *Stalker* mediante el ensayo de *Northern blot*, que pone de manifiesto un único transcrito de aproximadamente 1750 nucleótidos, puede reflejar su presencia en todos los estadíos de desarrollo del PSc, desde la *yema* proliferativa de la CG, hasta el PSc maduro, ya que la muestra de parásitos (a partir de la cual se obtuvo el ARN) es necesariamente heterogénea, conteniendo muestras de todos los estadíos, debido a la asincronía manifiesta en la aparición de PSc en las infecciones naturales.

Por último, la expresión de *Stalker* en *E. granulosus* puede estar reflejando las homologías existentes en los módulos genéticos vinculados al desarrollo en todos los animales y/o las posibilidades de co-opciones o reasignaciones de dichos módulos durante el proceso de adaptación y desarrollo de la tenia endoparásito *Echinococcus*.

Conclusiones Finales y Perspectivas

“El misterio es la cosa más bonita que podemos experimentar.
Es la fuente de toda arte y ciencia verdaderas”.
Albert Einstein

Este trabajo significa la culminación de muchos años de arduo trabajo y aprendizaje, con resultados muchas veces negativos, que por obvias razones no han sido presentados aquí.

Sin embargo, creemos que constituye un aporte a la comprensión de la biología de *Echinococcus granulosus*. Este organismo, ubicado filogenéticamente en una posición interesante para comprender la evolución del plan corporal de los metazoarios, es además un endoparásito, y como tal sometido a presiones selectivas muy particulares, lo que podría llegar a explicar su plasticidad, tanto genotípica, como fenotípica.

El hallazgo en *E. granulosus* de los genes con homeobox *Eghbx4*, 5 y 6, cuyos genes parálogos cumplen funciones claves en el desarrollo del sistema nervioso de muchos organismos, sumado al hecho de la divergencia de secuencia que presentan estos genes (*Stalker* incluido), podría estar reflejando la plasticidad mencionada anteriormente. Además puede constituir una especie de *hilo de Ariadna*, que permita comenzar a recorrer el laberinto del estudio de la funcionalidad de la percepción en estos organismos.

Explorar el potencial de generar plasticidad fenotípica en los Cestodos, clase que ha ensayado evolutivamente estrategias de desarrollo larvario muy variadas, a la vez que estudiar los mecanismos utilizados por estos endoparásitos para obtener información del entorno, puede constituir una aproximación novedosa para generar nuevas estrategias de control del ciclo parasitario y de tratamientos médicos destinados a combatir la enfermedad hidática.

Por otro lado, la expresión de *Stalker* en una zona clave del desarrollo de la forma larvaria, el pedúnculo del protoescólex, puede constituir otra herramienta para estudiar e intentar controlar el ciclo parasitario a través de estrategias terapéuticas novedosas tales como el uso de ARNs antisentido de interferencia.

Los datos presentados en este trabajo, permiten inferir que *Stalker* estaría vinculado a fenómenos de inducción en la capa germinativa del quiste hidático, que comienzan en un foco localizado, desde donde la señal de *Stalker* difunde

propagándose lateralmente (en el plano de la CG) hasta formar un aro o anillo que circunda una zona de proliferación. La CG adopta luego un cambio de polaridad, en un plano perpendicular al anterior, y donde la expresión del gen *Stalker* estaría asociada a eventos tempranos de proliferación y posteriores de diferenciación, los que seguramente involucran importantes rearrreglos en la matriz extracelular. En conclusión, a partir de un único evento de proliferación en un plano, se desencadena un desplazamiento perpendicular en la proliferación celular, que conlleva un cambio en el número de eventos de diferenciación, con la aparición final de las estructuras características del protoescólex.

Hasta el momento, *E. granulosus* parece más adecuado para estimular nuevos proyectos que para proveer respuestas definitivas. Quedan muchas cuestiones abiertas en este trabajo, que esperamos ameriten la continuación del estudio de los genes vinculados al desarrollo en este parásito. En particular cabría completar la secuencia de los genes estudiados, completar la caracterización de sus dominios de expresión por métodos de hibridización *in situ* e inmunohistoquímicos, determinar si existen agrupamientos genómicos de genes con homeobox, completar la búsqueda de todos los genes con homeobox, e intentar comprender sus funciones a través del uso de sistemas heterólogos y/o el cultivo *in vitro* del parásito.

Sería deseable el estudio de otras moléculas que casi seguramente estarán involucradas en la morfogénesis temprana del protoescólex y posiblemente de la tenia adulta: proteínas de señalización tales como los *FGFs*, *BMPs* y *TGFs* y factores de transcripción como *Hedgehog*. El estudio de la expresión y posible función de estas moléculas en *E. granulosus*, sumado al de los genes con homeobox, puede ayudarnos a responder preguntas claves tales como hasta dónde *Echinococcus* es un ejemplo de *bricolage* evolutivo, determinando si sus particulares fenotipo y genotipo constituyen casos de homologías y/o de co-opciones en la utilización de los módulos genéticos vinculados al desarrollo.

Por último, el estudio de aspectos morfológicos del desarrollo de *E. granulosus*, y que constituyen una parte importante del presente trabajo, puede ayudar a localizar mejor a los marcadores moleculares que ya están aislados y parcialmente caracterizados, y los que en el futuro se irán sumando a los ya existentes.

La tenia *echinococcus* habita el intestino de los perros.

Se contagian al comer tripas, achuras, hígados crudos de ovejas.

La tenia vive en el centro del perro.

Al acariciar a un perro infectado, la caricia cosecha esporas de tenia, huevos de tenia, piedritas de la enfermedad parásita.

El hombre acaricia al perro, y luego, en algún momento, sin lavarse, se lleva la mano a la boca.

[...]

En los órganos, en los pulmones, en el hígado del hombre se desarrolla el quiste hidático. La enfermedad mortal. Todo por acariciar al perro. El hombre muere por amor al perro. El hombre muere de amor sin saberlo.

[...]

Por amar al perro. El perro no lo sabe.

La tenia es una flor en la mierda tibia de can, su largo tallo de platelminto en el tubo digestivo. Los perros como pájaros ineptos terrestres transportan de un lado otro el polen de la hidatidosis. Trasmiten la semilla del mal al hombre y lo matan al lamerlo. Los perros son asesinos pasionales, locos de amor, contaminados de muerte.

Lamen y dañan. Besan y aman. Matan sin saberlo.

Rafael Courtoisie. *Vida de Perro*, XV (1997).
(Modificado con permiso del autor.)

Bibliografía citada

- Adoutte A, Balavoine G, Lartillot N & De Rosa R: "Animal evolution: the end of intermediate taxa?". *TIG* **15**:104-108 (1999).
- Aguinaldo AMA, Turberville JM, Linford LS, Rivera MC, Garey JR, Raff RA & Lake JA: "Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals." *Nature* **387**: 489-493 (1997).
- Akam M, Auerof M, Castelli-Gair J, Dawes R, Falciani F & Ferrier D: "The evolving role of Hox genes in arthropods". *Development* (Suppl.): 209-215 (1994).
- Akam M: "Hox and HOM: homologous gene clusters in insects and vertebrates". *Cell*, **57**: 347-349 (1989).
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K & Watson JD: "Molecular Biology of the Cell". 3rd ed. Garland Publishing Inc., New York, N.Y. (1994).
- Altschul, SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ: "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs" *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402 (1997).
- Baguña J, Ruiz-Trillo I, Paps J, Lokouta M, Ribera J, Jondelius U & Riutort M: "The first bilaterian organisms: simple or complex?. New molecular evidence". Short Report. *Int. J. Dev. Biol.* **45** (S1): S133-S134 (2001).
- Bairoch A: "PROSITE: a dictionary of protein sites and patterns". In EMBL Biocomputing Technical Document 4, EMBL, Heidelberg, Germany (1990).
- Balavoine G, de Rosa R & Adoutte A: "Hox clusters and bilaterian phylogeny" *Molecular Phylogenetics and Evolution* **24**:366-373 (2002)
- Balavoine G: "The early emergence of platyhelminths is contradicted by the agreement between 18S rRNA and Hox genes data". *C. R. Acad. Sci. III.* **320**: 83-94 (1997).
- Banerjee-Basu S & Baxevari AD: "Molecular evolution of the homeodomain family of transcription factors " *Nucleic Acids Research* **29**(15) 3258-3269 (2001).
- Bilofsky HS & Burks C: "The GenBank genetic sequence databank". *Nuc Acids Res.* **14**: 1-9 (1988).
- Britten RJ, Davidson EH: "Repetitive and non-repetitive DNA sequences and a speculation on the origins of evolutionary novelty." *Q Rev Biol.* **46**(2):111-38 (1971).
- Burglin T: "A comprehensive classification of Homeobox Genes". En "Guidebook to the homeobox genes". pp. 27-71 (1994).
- Busturia A & Morata G: "Ectopic expression of homeotic genes caused by the elimination of the *Polycomb* gene in *Drosophila* imaginal epidermis". *Development*, **104**: 713-720 (1988).
- Cabrera PA, Irabedra P, Orlando D, Rista L, Harán G, Viñals G, Blanco MT, Alvarez M, Elola S, Morosoli D, Moraña A, Bondad M, Sambrán Y, Heinzen T, Chans L, Piñeyro L, Pérez D & Pereyra I: "National prevalence of larval *Echinococcus* in sheep slaughtering plants. *Ovis ares* as an indicator in control programmes in Uruguay". *Acta Tropica* **85**: 281-285 (2003).
- Castillo E; Lalanne AI; Chalar C; Martinez C & Ehrlich R: "*Hox* genes in the larval stage of parasitic Platyhelminthes", aceptado para publicación con modificaciones (en curso) en *Molecular and Phylogenetic Evolution* (2004).
- Chemale G, van Rossum AJ, Jefferies JR, Barrett J, Brophy PM, Ferreira HB & Zaha A: "Proteomic analysis of the larval stage of the parasite *Echinococcus granulosus*: Causative agent of cystic hydatid disease". *Proteomics* **3**: 1633-1636 (2003).
- Chen CY & Schwartz RJ: "Identification of Novel DNA Binding Targets and Regulatory Domains of a Murine *Tinman* Homeodomain Factor, *nkx-2.5*", *J. Biol. Chem.*, **270**(26): 15628 – 15633 (1995).
- Chen JY, Bottjer DJ, Oliveri P, Dornbos SQ, Gao F, Rufians S, Chi H, Li CW & Davidson EH: "Small Bilaterian Fossils from 40 to 55 Million Years Before the Cambrian". *Science*, **305**: 218-222 (2004).

- Chervy, L: "The terminology of larval cestodes or metacestodes". *Systematic Parasitology* **52**: 1–33 (2002).
- Chomzinsky P & Sacchi N. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159 (1987).
- Damante G, Fabbro D, Pellizzari L, Civitareale D, Guazzi S, Polycarpou-Schwartz M, Cauci S, Quadrifoglio F, Formisano S & Di Lauro R: "Sequence-specific DNA recognition by the thyroid transcription factor-1 homeodomain". *Nucleic Acids Res.* **22(15)**:3075-83 (1994).
- Davidson EH: "Evolutionary biology. Insights from the echinoderms". *Nature* **389**(6652):679-80 (1997).
- Dayoff MO, Schwartz RM & Orcutt BC: "A model of evolutionary change in proteins". In Atlas of Protein Sequence and Structure, Dayoff MO, ed., National Biomedical Research Foundation, Washington D.C. (1979).
- De Robertis EM & Sasai Y: "A common plan for dorsoventral patterning in bilateria". *Nature* **380**: 37-40 (1996).
- De Robertis EM, Morita EA & Cho KW: "Gradient fields and homeobox genes". *Development* **112**(3):669-78 (1991).
- De Robertis EM: "The ancestry of segmentation" *Nature* **387**: 25-26 (1997).
- De Robertis EM: "The Homeobox in Cell Differentiation and Evolution" En "Guidebook to the homeobox genes". pp 13-23 (1994).
- Duboule D & Dolle P: "The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of *Drosophila* homeotic genes". *EMBO J.*, **8**: 1497-1505 (1989).
- Duboule D & Wilkins AS: "The evolution of 'bricolage'". *TIG* **14**(2):54-9 (1998).
- Duboule D: "Guidebook to the homeobox genes." Oxford University Press, Oxford; New York (1994).
- Eckert J & Desplazes P: "Biological, Epidemiological, and Clinical Aspects of Echinococcosis, a Zoonosis of Increasing Concern" *Clin. Microbiol. Rev.* **17**(1): 107-135 (2004).
- Eckert J, Schantz PM, Gasser RB, Torgerson PR, Bessonov AS, Movses-sian SO, Thakur A, Grimm F, & Nikogossian MA: "Geographic distribution and prevalence", pp. 100–142. In Eckert J, Gemmell MA, Meslin FX & Pawlowski ZS (eds.), WHO/OIE "Manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern". World Organisation for Animal Health, Paris, France. (2001)
- Ehrlich R, Chalar C, Dallagiovanna B, Esteves A, Gorfinkel N, Mailhos A, Martínez C, Oliver G & Vispo M. In: *Echinococcus granulosus* development: transcription factors and developmental markers, Biology of Parasitism (Ehrlich R & Nieto A, eds.), pp 217-231. Ed. Trilce, Montevideo, Uruguay (1994).
- Eisenberg D, Weiss RM & Terwilliger TC: "The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity". *PNAS* **81**: 140-144 (1984).
- Erwin DH & Davidson EH: "The last common bilaterian ancestor". REVIEW ARTICLE. *Development* **129**: 3021-3032 (2002)
- Esperón P, Gorfinkel N, Garat B & Ehrlich R: "Characterisation of the proximal regulatory domain of the *Echinococcus granulosus* homeodomain-containing gene *EgHbx1*". *Int. J. Parasitol.* **30**: 45-49 (2000).
- Esteves A, Portillo V & Ehrlich R: "Genomic structure and expression of a gene coding for a new fatty acid binding protein from *Echinococcus granulosus*". *Biochim. et Biophys. Acta* **1631**: 26-34 (2003).
- Esteves A, Señorale M & Ehrlich R: "A tropomyosin gene is differentially expressed in the larval stage of *Echinococcus granulosus*". *Parasitol. Res.* **89**(6): 501-502 (2003).
- Fernández C, Gregory WF, P'ng Loke R & Maizels, M: "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 (2002).
- Fernández V, Chalar C, Martínez C, Musto H, Zaha A & Fernández C: "*Echinococcus granulosus*: Molecular Cloning and Phylogenetic Analysis of a Transcriptionally Inducible Glutathione S-Transferase". *Experimental Parasitology* **96**: 190-194 (2000).

- Fernandez V: "Tesis Doctoral", PEDECIBA-Facultad de Química, Montevideo, Uruguay (2001).
- Finnerty JR, Pang K, Burton P, Paulson D & Martindale MQ: "Origins of Bilateral Symmetry: *Hox* and *Dpp* Expression in a Sea Anemone" *Science* (/ www.sciencexpress.org / Page 1/ 10.1126/science.1091946). (2004).
- Finnerty JR: "The origins of axial patterning in the metazoa: how old is bilateral symmetry?" *Int. J. Dev. Biol.* **47**: 523-529 (2003).
- Gajewski K, Kim Y, Lee YM, Olson EN & Schulz RA: "D-*mef2* is a target for *Tinman* activation during *Drosophila* heart development" *EMBO J.* **16**(3): 515-522 (1997).
- Galindo M, Gonzalez MJ & Galanti N: "Echinococcus granulosus protoscolex formation in natural infections". *Biol. Res.* **35**:365-371 (2002).
- Galindo M, Paredes R, Marchant C, Miño V Galanti N: "Regionalization of DNA and protein synthesis in developing stages of the parasitic platyhelminth *Echinococcus granulosus*". *J Cell Biochem* **90**:294-303 (2003).
- Galliot B, de Vargas C & Miller D: "Evolution of homeobox genes: Q50 Paired-like genes founded the Paired class". *Dev Genes Evol* (1999) 209:186-197 (1999).
- Garcia-Fernandez J, Baguna J & Salo E: "Genomic organization and expression of the planarian homeobox genes Dth-1 and Dth-2". *Development* **118** (1): 241-253 (1993).
- Garcia-Fernandez J, Baguña J, Salo E: Planarian homeobox genes: cloning, sequence analysis, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**(16):7338-42 (1991).
- Gehring WJ: "A History of the Homeobox" En "Guidebook to the homeobox genes". pp 3-10 (1994).
- Gilbert S F: <http://www.devbio.com/about.php>. (2003).
- Gilbert SF, Opitz JM & Raff RA: "Resynthesizing evolutionary and developmental biology" *Dev Biol* **173**(2):357-72 (1996).
- Gorfinkiel N: "Estudio de la estructura y expresión de los genes *Eghbx1* y *Eghbx2* de *Echinococcus granulosus*". Tesis de Maestría de PEDECIBA. (1993).
- Goriely A, Stella M, Coffinier C, Kessler D, Mailhos C, Dessain S & Desplan C: "A functional homologue of goosecoid in *Drosophila*". *Development* **122**: 1641-1650 (1996).
- Gould SJ: "Ontogeny and Phylogeny", Harvard University Press (1977).
- Graham A, Papalopulu N & Krumlauf R: "The murine and *Drosophila* homeobox genes complexes have common features of organization and expression". *Cell*, **57**:367-378 (1989).
- Graham N, Luke GN, Filipe L, Castro C, McLay K, Bird C, Coulson A & Holland PWH: "Dispersal of *NK* homeobox gene clusters in amphioxus and humans" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**(9): 5292-5295 (2003).
- Grens A, Gee L, Fisher DA & Bode HR : « *CnNK-2*, an *NK-2* homeobox gene, has a role in patterning the basal end of the axis in hydra ». *Dev. Biol.* **180**: 473-488 (1996).
- Guex N & Peitsch M C: "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling". *Electrophoresis* **18**: 2714-2723 (1997).
- Harvey RP: "NK-2 homeobox genes and heart development". *Dev. Biol.* **178**: 203-216 (1996).
- Hoberg EP, Gardner SL & Campbell RA: "Systematics of the Eucestoda: advances toward a new phylogenetic paradigm, and observations on the early diversification of tapeworms and vertebrates" *Systematic Parasitology* **42**: 1-12 (1999).

- Hoberg EP, Jones A & Bray RA: "Phylogenetic analysis among the families of the Cyclophyllidea (Eucestoda) based on comparative morphology, with new hypotheses for co-evolution in vertebrates". *Syst. Parasitol.* **42**: 51-73 (1999).
- Hoberg EP, Jones A & Bray RA: "Phylogenetic analysis among the families of the Cyclophyllidea (Eucestoda) based on comparative morphology, with new hypotheses for co-evolution in vertebrates". *Systematic Parasitology* **42**: 51-73 (1999).
- Hobert O, Westphal H: "Functions of LIM-homeobox genes". *TIG* **16**(2): 75-83 (2000).
- Hodin J: "Plasticity and constraints in development and evolution". *J Exp Zool.* **288**(1):1-20 (2000).
- Hogan BLM: "Bone morphogenetic proteins: Multifunctional regulators of vertebrate development". *Genes Dev.* **10**: 1580-1594 (1996).
- Holland DN, Venkatesh KT, Holland ZL, Jacobs KD & Bodmer R. "AmphiNk2-tin, an amphioxus homeobox gene expressed in the myocardial progenitors: insights into the evolution of the vertebrate heart" *Dev. Biol.* **255**: 128-137 (2003).
- Holland LZ: "Body-plan evolution in the Bilateria: early antero-posterior patterning and the deuterostome-protostome dichotomy". *Curr Opin Genet Dev.* **10**(4):434-42 (2000).
- Holland, PWH: "The Ups and Downs of a Sea Anemone" *Science* **304**: 1255-6 (2004).
- Hyman LH: "The Invertebrates; Protozoa through Ctenophora" McGraw Hill, New York (1940).
- Jacob, F: "Evolution and Tinkering" *Science* **196**, 4295: 1161-1166 (1977).
- Jagla K, Bellard M & Frasch M: "A cluster of *Drosophila* homeobox genes involved in mesoderm differentiation programs" *BioEssays* **23**:125-133 (2001)
- Jagla K, Stanceva I, Dretzen G, Bellard F & Bellard M: "A distinct class of homeodomain proteins is encoded by two sequentially expressed *Drosophila* genes from the 93D/E cluster" *Nucleic Acids Research* **22**(7) 1202-1207 (1994)
- Jamali M, Rogerson PJ, Wilton S, & Skerjanc IS: "Nkx2-5 Activity Is Essential for Cardiomyogenesis". *J. Biol. Chem.*, **276**(45): 42252 - 42258 (2001).
- Kasahara H & Izumo S: "Identification of the in vivo casein kinase II phosphorylation site within the homeodomain of the cardiac tissue-specifying homeobox gene product Csx/Nkx2.5". *Mol Cell Biol.* **19**(1):526-36 (1999).
- Kim Y & Nirenberg M: "Drosophila NK-homeobox genes" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 7716-7720 (1989).
- Kimmel CB: "Was Urbilateria segmented?. *TIG* **12**: 329-331 (1996).
- Kimura M: "Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences". *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(1): 454-458 (1981).
- Kissinger CR, Liu B, Martin-Blanco E, Kornberg TB & Pabo CO: "Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions". *Cell*, **63**: 579-590 (1990).
- Koizumi K, Lintas C, Nirenberg M, Maeng J, Mack JW, Gruschus JM, Odenwald WF & Ferretti JA: "Mutations that affect the ability of the vnd/NK-2 homeoprotein to regulate gene expression: Transgenic alterations and tertiary structure". *PNAS* **100**(6): 3119-3124 (2003).
- Kondo T & Duboule D: "Breaking colinearity in the mouse HoxD complex". *Cell*. **97**(3):407-17 (1999).
- Kozak M: "A short leader sequence impairs the fidelity of initiation by eukaryotic ribosomes". *Gene Expr.* **1**:111-115 (1991).
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB & Nei M: "MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software". *Bioinformatics* **17**(12):1244-5 (2001).
- Lalanne AI: Tesis Maestría PEDECIBA (2003).

- Larsen CW, Hirst E, Alexandre C & Vincent JP: "Segment boundary formation in *Drosophila* embryos". *Development* **130**: 5625-5635 (2003).
- Loomis CA, Harris E, Michaud J, Wurst W, Hanks M & Joyner AL: "The mouse Engrailed-1 gene and ventral limb patterning". *Nature* **382**:360-363 (1996).
- Lawrence PA & Struhl G : « Morphogens, compartments, and pattern: lessons from *Drosophila*?". *Cell* **85**: 951-961 (1996).
- Lints TJ, Parsons LM, Hartley L, Lyons I & Harvey RP: "*Nkx-2.5*: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants." *Development*, **119**, 2: 419-431 (1993).
- Loomis CA, Harris E, Michaud J, Wurst W, Hanks M and Joyner AL. 1996. The mouse
Luke GN, Castro LFC, McLay K, Bird C, Coulson A & Holland PWH: "Dispersal of *NK* homeobox gene clusters in amphioxus and humans" *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(9): 5292–5295 (2003).
- Martínez C, Chalar C, González J & Ehrlich R: "The homeobox-containing gene *EgHbx3* is expressed in the stalks of protoscoleces of *Echinococcus granulosus*". *International Journal for Parasitology* **27**(11): 1379-1381 (1997).
- Martinez C, Paredes R, Stock RP, Saralegui A, Andreu M, Cabezón C, Ehrlich R & Galanti N: "Cellular Organization and Appearance of Differentiated Structures in Developing Stages of the Parasitis Platyhelminth *Echinococcus granulosus*". Aceptado para publicación (en prensa, JCB-04-0233.R1) *Journal of Cellular Biochemistry* (2004).
- Martins-Green M & Bissell MJ: "Cell-ECM interactions in development". *Semin. Dev. Biol.* **6**: 149-159 (1995).
- McGuffin LJ, Bryson K & Jones DT: "The PSIPRED protein structure prediction server". *Bioinformatics*. **16**: 404-405 (2000).(<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).
- McManus DP, Knight M & Simpson AJG: "Isolation and characterization of nucleic acids from the hydatid organisms *Echinococcus* spp (Cestoda)". *Mol. Biochem. Parasitol.* **16**: 251-266 (1985).
- Meinhardt H & Gierer A: "Pattern formation by local self-activation and lateral inhibition". *BioEssays* **22**:753-760 (2000).
- Morris PJ: "The developmental role of the extracellular matrix suggests a monophyletic origin of the kingdom Animalia". *Evolution* **47**: 152-165 (1993).
- Nicholas, KB & Nicholas, HB Jr: "GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author, <http://www.psc.edu/biomed/genedoc> (1997).
- Oliver G, Vispo M, Mailhos A, Martínez C, Fielitz W, Sosa B & Ehrlich R: "Homeoboxes in Flatworms". *Gene* **121**: 337-342 (1992).
- Patel NH, Prince VE: "Beyond the Hox complex". Minireview *Genome Biology* **1**(5):reviews1027.1–1027.4 (2000)
- Pearson M, Le TH, Zhang LH, Blair D, Dai THN & McManus DP: "Molecular taxonomy and strain analysis in *Echinococcus*", pp. 205–219. In P. Craig & Z. Pawlowski (ed.), *Cestode zoonoses: echinococcosis and cysticercosis, an emergent and global problem*. IOS Press, Amsterdam, The Netherlands. (2002).
- Peitsch MC: "Protein modeling by E-mail" *Bio/Technology* **13**: 658-660 (1995).
- Peterson KJ & Davidson EH: "Regulatory evolution and the origin of the bilaterians" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**(9): 4430-4433 (2000).
- Pigliucci M: "Modelling phenotypic plasticity. II. Do genetic correlations matter?". *Heredity* **77** :453-60 (1996).
- Pollard SL & Holland PWH: "Evidence for 14 homeobox gene clusters in human genome ancestry". *Current Biology* **10**: 1059-1062 (2000).

- Ranganayakulu G, Elliott DA, Harvey RP & Olson EN: "Divergent roles for NK-2 class homeobox genes in cardiogenesis in flies and mice". *Development* **125**(16):3037-48 (1998).
- Reese MG, Eeckman FH, Kulp D & Haussler D: "Improved Splice Site Detection in Genie". *J Comp Biol* **4**(3): 311-23. 1997
- Revilla-I-Domingo R & Davidson EH: "Developmental gene network analysis". *Int J Dev Biol* **47**(7-8):695-703 (2003).
- Rogan MT & Richards S: "*Echinococcus granulosus*: changes in the surface ultrastructure during protoscolex formation". *Parasitol* **94**: 359-367 (1987).
- Rosenzvit MC, Canova SG, Kamenetzky L & Guarnera EA: "*Echinococcus granulosus*: intraspecific genetic variation assessed by a DNA repetitive element". *Parasitology* **123**(Pt 4):381-8 (2001).
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T: "Molecular Cloning. A Laboratory Manual". Cold Spring Harbour Laboratory Press, Plainview, N.Y., USA (1989).
- Sarkar L, Cobourne M, Naylor S, Smalley M, Dale T & Sharpe PT: "Wnt/Shh interactions regulate ectodermal boundary formation during mammalian tooth development". *P.N.A.S.* **97**(9): 4520-4524 (2000).
- Schuler G D, Altschul S F & Lipman D J: "A workbench for multiple alignment construction and analysis". *Proteins Struct. Func. Genetic.* **9**: 180-190. (1991).
- Schwede T, Kopp J, Guex N & Peitsch MC: "SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server". *Nucleic Acids Research* **31**: 3381-3385 (2003).
- Siles-Lucas M & Gottstein B: "Molecular tools for the diagnosis of cystic and alveolar echinococcosis" *Tropical Medicine and International Health* **6**: 463-475 (2001).
- Siles-Lucas M & Hemphill A: "Cestode Parasites: Application of *In Vivo* and *In Vitro* Models for Studies on the Host-Parasite Relationship" *Adv. Parasitol.* **51**:133-230 (2002).
- Skerjanc IS, Petropoulos H, Ridgeway AG & Wilton S: "Myocyte Enhancer Factor 2C and *Nkx2-5* Up-regulate Each Other's Expression and Initiate Cardiomyogenesis in P19 Cells" *J. Biol. Chem.*, **273**(52): 34904 – 34910 (1998).
- Slack JMW; Holland PWH & Graham CF: "The zootype and the phylotypic stage". *Nature* **361**: 547-549. (1993).
- Slack JZW: "Inducing factors in *Xenopus* early embryos". *Curr. Biol.* **4**:116-126. (1994)
- Sly BJ, Snoke MS & Raff RA: "Who came first - larvae or adults? Origins of bilaterian metazoan larvae". *Int. J. Dev. Biol.* **47**: 623-632 (2003).
- Smith KK: "Time's arrow: heterochrony and the evolution of development". *Int. J. Dev. Biol.* **47**: 613-621 (2003).
- Smith ST & Jaynes JB: "A conserved region of engrailed, shared among all *en*-, *gsc*-, *Nk1*-, *Nk2*- and *msh*-class homeoproteins, mediates active transcriptional repression in vivo". *Development.* **122**(10):3141-50 (1996).
- Smith T F & Waterman M S: "Identification of common molecular subsequences". *J. Mol. Bio.* **147**:195-197 (1981).
- Smyth, JD & McManus, D: "The Physiology and Biochemistry of Cestodes". Cambridge University Press, Cambridge, G.B. (1989).
- Struhl G: "Role of *esc* product in ensuring the selective expression of segment-specific genes in *Drosophila*". *J.Embryol. Exp. Morphol.*, **76**: 297-331 (1983).
- Technau U & Scholz CB: "Origin and evolution of endoderm and mesoderm". *Int. J. Dev. Biol.* **47**: 531-539 (2003).
- Technau U: "Brachyury, the blastopore and the evolution of the mesoderm". *BioEssays* **23**: 788-794 (2001).

- Thomas F, Brown SP, Sukhdeo M & Renaud F: "Understanding parasite strategies: a state-dependent approach?". *TRENDS in Parasitology* **18(9)**: 387-390 (2002).
- Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ: "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice". *Nucleic Acids Research*. **22**: 4673- 4680 (1994).
- Thompson RCA: "Biology and Systematics of *Echinococcus* ". pp1-50, in "*Echinococcus* and Hydatid Disease". Thompson RCA & Lymbery AJ (Eds.). CAB International Wallingford, U.K.. (1995).
- Thomsen S, Till A, Wittlieb J, Beetz C, Khalturin K & Bosch TC: "Control of foot differentiation in *Hydra*: in vitro evidence that the NK-2 homeobox factor *CnNK-2* autoregulates its own expression and uses pedibin as target gene". *Mech Dev*. **121(2)**:195-204 (2004).
- Tsao DH, Gruschus JM, Wang LH, Nirenberg M & Ferretti JA: "Elongation of helix III of the NK-2 homeodomain upon binding to DNA: a secondary structure study by NMR". *Biochemistry* **33(50)**:15053-60 (1994).
- Urrea-Paris MA, Moreno MJ, Casado N & Rodriguez-Caabeiro F:"Relationship between the efficacy of praziquantel treatment and the cystic differentiation in vivo of *Echinococcus granulosus* metacestode". *Parasitol Res* **88**: 26–31 (2002).
- van Herwerden L, Gasser RB & Blair D: "ITS-1 ribosomal DNA sequence variants are maintained in different species & strains of *Echinococcus*". *Int. J. Parasitol*. **30**:157–169 (2000).
- Vispo M: "Contribución al estudio de la expresión del gen con homeobox *Eghbx2* de *Echinococcus granulosus*". Tesis de Maestría de PEDECIBA.(1995).
- Wardle RA & McLeod JA: "The Zoology of Tapeworms". University of Minnesota Press, USA (1952).
- Watada H, Mirmira RG, Kalamaras J & German MS: "Intramolecular control of transcriptional activity by the NK2-specific domain in NK-2 homeodomain proteins". *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97(17)**:9443-8 (2000).
- Webster PJ & Mansour TE: "Conserved classes of homeodomains in *Schistosoma mansoni*, an early bilateral metazoan. *Mech Dev*. **38(1)**:25-32 (1992).
- Willmer P: «Invertebrate relationships: patterns in animal evolution.» Cambridge University Press, Cambridge; New York (1990).

Lista de artículos publicados por el autor:

- 1_ Ehrlich R, Castillo E, Chalar C, Esteves A, Fielitz W, Garat B, Marín M, Martínez C, Oliver G, Pereira Z, Picón M & Señorale M: "*Echinococcus granulosus*: Towards the understanding of parasitic adaptation". In Basic Research in Helminthiases. Edited by Ehrlich R, Nieto A & Yarzabal L. Copyright 1990, Ediciones Logos, Montevideo, Uruguay (1991).
- 2_ Oliver G, Vispo M, Mailhos A, Martínez C, Fielitz W, Sosa B & Ehrlich R: "Homeoboxes in Flatworms". *Gene* **121**: 337-342 (1992).
- 3_ Ehrlich R, Chalar C, Dallagiovanna B, Esteves A, Gorfinkiel N, Mailhos A, Martínez C, Oliver G, Vispo M. In: *Echinococcus granulosus* development: transcription factors and developmental markers, Biology of Parasitism (Ehrlich R & Nieto A, eds.), pp 217-231. Ed. Trilce, Montevideo, Uruguay (1994).
- 4_ Martínez C, Chalar C, González J & Ehrlich R: "The homeobox-containing gene *EgHbx3* is expressed in the stalks of protoscoleces of *Echinococcus granulosus*". *International Journal for Parasitology* **27**(11): 1379-1381 (1997).
- 5_ Garat B, Esperón P, Martínez C, Robello C & Ehrlich R: "Presence of a conserved domain of GATA-transcription factors in *Echinococcus granulosus*". *Journal of Helminthology*, **71**: 335-338 (1997).
- 6_ Chalar C, Martínez C, Agorio A, Salinas G, Soto J & Ehrlich R: "Molecular Cloning and Characterization of a Thioredoxin gene from *Echinococcus granulosus*". *Biochemical and Biophysical Research Communications* **262**(1): 302-307 (1999).
- 7_ Fu Y, Martínez C, Chalar C, Craig PS, Ehrlich R, Petavy F & Bosquet G: "A new potent antigen from *Echinococcus granulosus* associated with muscles and tegument". *Molecular and Biochemical Parasitology*, **102**(1): 43-52 (1999).
- 8_ Fernández V, Chalar C, Martínez C, Musto H, Zaha A & Fernández C: "*Echinococcus granulosus*: Molecular Cloning and Phylogenetic Analysis of a Transcriptionally Inducible Glutathione S-Transferase". *Experimental Parasitology* **96**: 190-194 (2000).
- 9_ Martínez C, Paredes R, Stock RP, Saralegui A, Andreu M, Cabezón C, Ehrlich R & Galanti N: "Cellular Organization and Appearance of Differentiated Structures in Developing Stages of the Parasitic Platyhelminth *Echinococcus granulosus*". Aceptado para publicación (en prensa, JCB-04-0233.R1) en *Journal of Cellular Biochemistry* (2004).
- 10_ Castillo E, Lalanne AI, Chalar C, Martínez C & Ehrlich R: "*Hox* genes in the larval stage of parasitic Platyhelminthes", aceptado para publicación con modificaciones (en curso) en *Molecular and Phylogenetic Evolution* (2004).