

Tesina de finalización de carrera de la Licenciatura en Bioquímica

Estudio de la expresión de la ciclina B (*Hm-cycB*) en el cestodo modelo *Hymenolepis microstoma*

Emilia Failache Ramón

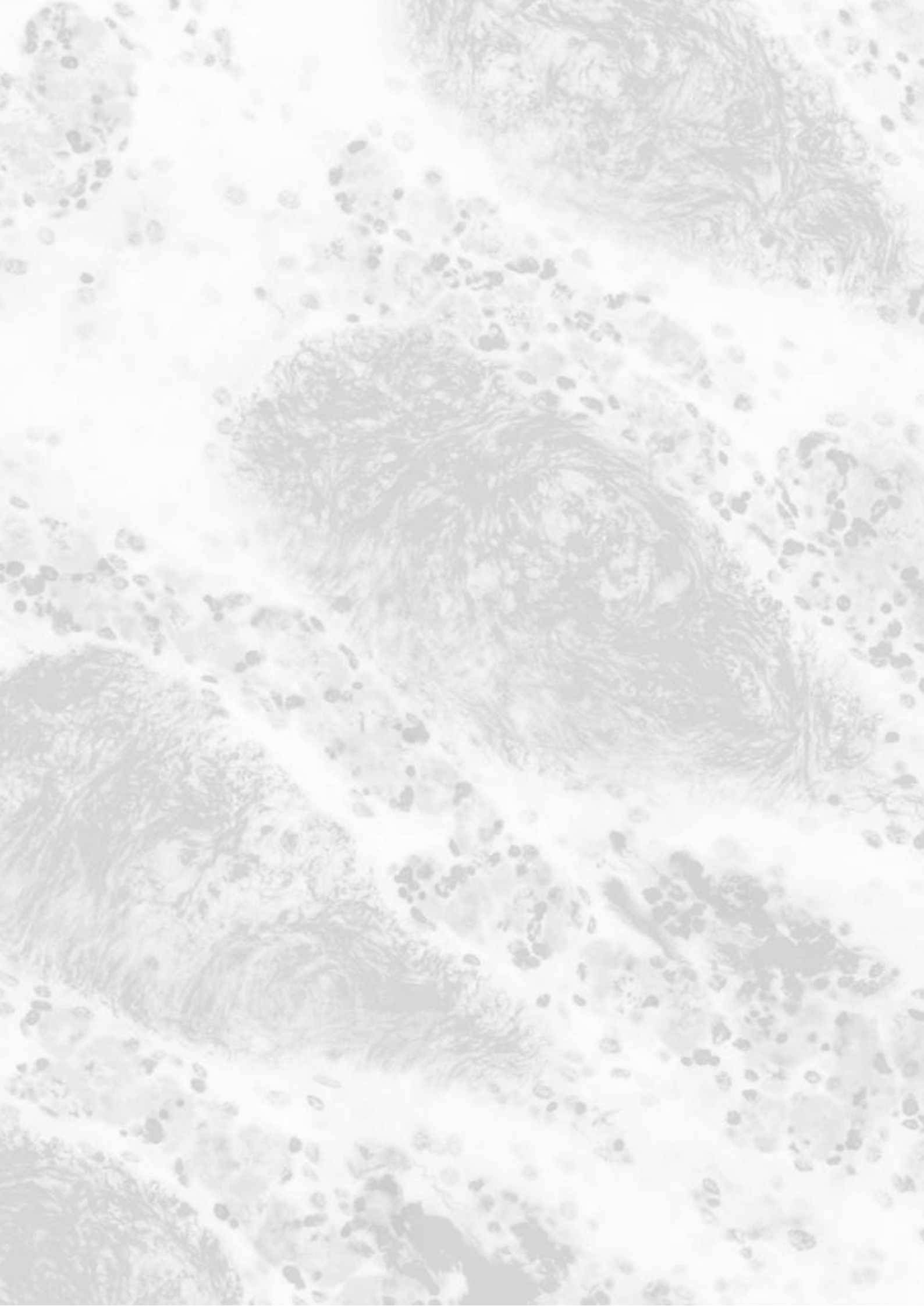
Tutor: Uriel Koziol

Co-Tutora: Inés Guarnaschelli

Sección Biología Celular

Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Agosto, 2023



ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	
2.1. Generalidades de los cestodos	2
2.2. <i>Hymenolepis microstoma</i> como cestodo modelo	3
2.3. Células germinativas	5
2.4. Ciclinas como reguladoras del ciclo celular y el rol de la ciclina B	7
2.5. Ciclinas en platelmintos	9
3. Objetivos	12
4. Metodología	
4.1. Mantenimiento del ciclo de vida de <i>H. microstoma</i>	13
4.2. Fijación de adultos para WMISH	13
4.3. Activación de cisticercoides	13
4.4. Obtención de larvas en metamorfosis	14
4.5. Clonación de <i>Hm-cycB</i>	15
4.5.1. Amplificación por PCR	15
4.5.2. Ligación	15
4.5.3. Transformación	16
4.5.4. PCR de colonia	16
4.5.5. Extracción de ADN plásmido en pequeña escala (Miniprep)	17
4.6. Síntesis de sondas para hibridación <i>in situ</i>	18
4.6.1. Preparación de moldes para la síntesis de sondas de ARN	18
4.6.2. Transcripción <i>in vitro</i> y purificación de las sondas	19
4.6.3. Cuantificación de las sondas por Dot Blot	19
4.7. Hibridación <i>in situ whole-mount</i> (WMISH)	20
4.8. Detección de H3ser10P por Inmunohistofluorescencia (IHF)	20
4.8.1. Recuperación de epítipo inducida por calor (HIER)	21
4.9. Marcado metabólico con EdU	22
4.10. Obtención y procesamiento de imágenes de microscopía	22
5. Resultados y discusión	
5.1. Amplificación de la región codificante para <i>Hm-cycB</i>	23
5.2. Clonación del ADNc de <i>Hm-cycB</i>	23
5.3. Análisis de la calidad de las sondas	24
5.4. Resultados de WMISH: Patrón de expresión de <i>Hm-cycB</i> en el adulto de <i>H. microstoma</i>	25
5.4.1. Expresión de <i>Hm-cycB</i> en el escólex, el cuello y los primeros segmentos	25
5.4.2. Expresión de <i>Hm-cycB</i> en segmentos en desarrollo	27
5.4.3. Patrón de expresión de <i>Hm-cycB</i> a lo largo del ciclo celular de las células germinativas	31
5.4.4. Expresión de <i>Hm-cycB</i> en segmentos maduros: <i>Hm-cycB</i> en el sistema reproductor masculino	36
5.4.5. Expresión de <i>Hm-cycB</i> en segmentos maduros: <i>Hm-cycB</i> en el sistema reproductor femenino	44
5.4.6. Expresión de <i>Hm-cycB</i> en segmentos maduros: <i>Hm-cycB</i> en la glándula vitelina	48
5.5. Resultados de WMISH: expresión de <i>Hm-cycB</i> en larvas en metamorfosis y cisticercoides	49
5.5.1. Análisis de la expresión de <i>Hm-cycB</i> en larvas en metamorfosis y cisticercoides	49
5.5.2. Análisis de células en mitosis en cisticercoides activados	51
6. Conclusiones y perspectivas	53
7. Bibliografía	55
8. Anexo	61

1. RESUMEN

Los cestodos son platelmintos parásitos causantes de numerosas enfermedades que afectan la salud animal y humana. Como todos los platelmintos, se caracterizan por la presencia de una población de células madre pluripotentes, que se conocen como células germinativas.

Las células germinativas son las únicas células con capacidad proliferativa en cestodos, y las grandes promotoras de procesos esenciales a lo largo de todo el ciclo de vida, como la renovación de tejidos, el crecimiento y las metamorfosis larvarias. A pesar de la importancia de estas células en el desarrollo, actualmente se dispone de escasa información acerca de la regulación del ciclo celular en cestodos. Análisis filogenéticos han revelado que los platelmintos parásitos presentan un complemento reducido de homólogos de ciclinas canónicas: en sus genomas se identifican homólogos de ciclinas D y B, pero no homólogos de ciclinas A o E. La ausencia de la mitad del complemento usual de ciclinas canónicas sugiere la existencia de mecanismos atípicos de regulación del ciclo celular, y tal vez específicos dentro de los platelmintos parásitos.

En este trabajo nos propusimos estudiar la expresión del transcripto de la ciclina B canónica (*Hm-cycB*) en *Hymenolepis microstoma*, un cestodo ampliamente utilizado como modelo. Mediante hibridación *in situ* whole-mount (WMISH), en combinación con marcadores de fases del ciclo celular, caracterizamos el patrón espacio-temporal de expresión de *Hm-cycB* en diferentes estadios del ciclo de vida de *H. microstoma*, y analizamos su expresión a lo largo del ciclo celular de las células proliferantes.

En forma general, determinamos que *Hm-cycB* se expresa en células proliferantes (indiferenciadas) y no a nivel de células diferenciadas (post-mitóticas).

Observamos que *Hm-cycB* se expresa, de forma intensa, en las células germinativas de la región del cuello del adulto. Sorprendentemente, en estas últimas, *Hm-cycB* no se detecta únicamente durante la fase G2/M sino también en fase S. En contraste, las células germinativas del escólex y segmentos maduros no expresan *Hm-cycB*, por lo que el transcripto se expresaría diferencialmente en las células germinativas internas y externas al cuello.

En segmentos maduros, se evidencia expresión de *Hm-cycB* únicamente dentro de los sistemas reproductores. En ovogonias y espermatogonias no se observa señal de detección de *Hm-cycB*, pero el ARNm comienza a detectarse en las divisiones meióticas durante la espermatogénesis y ovogénesis. Curiosamente, observamos que en oocitos y cigotos la señal de WMISH para *Hm-cycB* se localiza en focos que se concentran en un polo de la célula, lo que sugiere la disposición del transcripto en gránulos asimétricos en el citoplasma.

El patrón de expresión de *Hm-cycB* resultó ser más complejo de lo esperado en base a los patrones de expresión de la ciclina B en otros animales. Aunque quedan por responder muchas incógnitas sobre el rol de la ciclina B, los resultados de este trabajo aportan al conocimiento sobre los reguladores del ciclo celular en cestodos.

Palabras Clave: cestodos, células germinativas, ciclo celular, ciclina B

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Generalidades de los cestodos

El filo de los platelmintos (perteneciente al superfilo Lophotrochozoa) constituye un grupo diverso de gusanos acelomados y dorsoventralmente aplanados, que comprende tanto organismos de vida libre como parásitos [Collins, 2017]. Dentro de los platelmintos, el clado monofilético Neodermata destaca por ser el más denso en especies, integrando organismos exclusivamente parásitos de los grupos Monogenea, Trematoda y Cestoda [Baguñà & Riutort, 2004; Koziol, 2017]. Se estima que todas las especies de vertebrados pueden ser infectadas por al menos un Neodermata, por lo que se atribuye a estos últimos una de las transiciones más exitosas hacia el parasitismo en todo el reino animal [Collins, 2017].

Los cestodos se encuentran enormemente adaptados a su estilo de vida como parásitos. Se caracterizan por presentar ciclos de vida complejos, con estadios especializados en la infección de cada hospedador. La mayoría de las especies poseen un hospedador definitivo (vertebrado), donde se desarrolla y madura sexualmente el estadio adulto, y uno o más hospedadores intermediarios (vertebrados o invertebrados), que albergan a las formas larvarias [Koziol, 2017].

Desde el punto de vista anatómico, poseen órganos de fijación (como ganchos y ventosas) que les permiten adherirse a los tejidos internos de sus hospedadores, favoreciendo el proceso de infección. Carecen absolutamente de sistema digestivo, y en su lugar, un tegumento sincitial especializado se encarga del intercambio de nutrientes, además de actuar como barrera protectora frente a las condiciones extremas a las que se enfrenta el gusano [Tyler & Tyler, 1997; Koziol, 2017]. Su cuerpo se compone de segmentos repetidos llamados proglótides, que se generan en forma continua a partir de la región del cuello. Cada proglótide contiene un sistema reproductor femenino y uno masculino, capaces de dar lugar a la producción masiva de huevos con una gran capacidad de dispersión, lo que determina el gran éxito reproductivo de estos platelmintos.

Las etapas larvarias de los cestodos son capaces de infectar una gran variedad de especies, incluyendo al humano y animales domésticos [García et al., 2007]. De hecho, se encuentran entre los patógenos humanos más exitosos [Collins, 2017], responsables de enfermedades severas, como la cisticercosis (causada por *Taenia solium*) y las equinocosis (causadas por *Echinococcus spp.*), que afectan principalmente a poblaciones de contextos críticos. Estas enfermedades son difíciles de combatir, y las opciones farmacológicas disponibles para su tratamiento son reducidas [García et al., 2007].

Su relevancia desde el punto de vista sanitario suscita un profundo interés en el estudio del desarrollo de los platelmintos parásitos, particularmente en busca de blancos moleculares que permitan la generación de nuevas terapias antihelmínticas. Sin embargo, el trabajo con especies patógenas se ve limitada por el riesgo que conlleva mantener y manipular el material biológico. Afortunadamente, se han establecido especies modelo que facilitan la investigación de la compleja biología de los cestodos.

2.2. *Hymenolepis microstoma* como cestodo modelo

Hymenolepis microstoma, conocido comúnmente como tenia del conducto biliar del ratón, es un cestodo perteneciente al orden *Cyclophyllidea* [Cunningham & Olson, 2010]. Esta especie se ha establecido como organismo modelo en el estudio de los platelmintos parásitos por presentar múltiples ventajas prácticas; y, aunque no es clínicamente relevante, su proximidad filogenética a organismos de importancia sanitaria determina que sea posible obtener información valiosa, potencialmente generalizable a otros cestodos.

Como principales ventajas destacan la ausencia de riesgo de infección en humanos, y la posibilidad de establecer su ciclo de vida completo en el laboratorio, utilizando a sus dos hospederos naturales: *Mus musculus* (ratón) y *Tribolium confusum* (escarabajo de la harina) [Cunningham y Olson, 2010]. Esto facilita enormemente la manipulación y el acceso a los diferentes estadios de vida, incluyendo al adulto, a las dos formas larvianas (oncósferas y cisticercoides), y fases intermedias del desarrollo (como larvas en proceso de metamorfosis). También existen protocolos para el cultivo *in vitro* de todas las formas de vida [Evans, 1970; Seidel et al., 1975; Berntzen & Voge, 1961; Rycke & Berntzen, 1967], aunque intentos recientes de obtener adultos *in vitro* han fracasado en reproducir el inicio de la estrobilación [Pouchkina-Stantcheva et al., 2013]. Por tanto, no es posible prescindir del uso de animales de laboratorio.

Como consecuencia de su establecimiento como modelo, en los últimos años se han puesto a punto varios ensayos y técnicas (como protocolos de hibridación *in situ*, inmunofluorescencia y marcado metabólico con análogos de timidina) en *H. microstoma*. Adicionalmente, se secuenció su genoma completo [Tsai et al., 2013; Olson et al., 2020], y se obtuvieron datos de transcriptómica de diferentes estadios de su desarrollo [Olson et al., 2018; Preza et al., 2021a], lo que ha impulsado enormemente el uso de técnicas moleculares. Sin embargo, al igual que ocurre con otros platelmintos, no es sencillo hacer ensayos de modificación genética, lo que constituye una de las principales limitaciones que presenta este modelo [Pouchkina-Stantcheva et al., 2013].

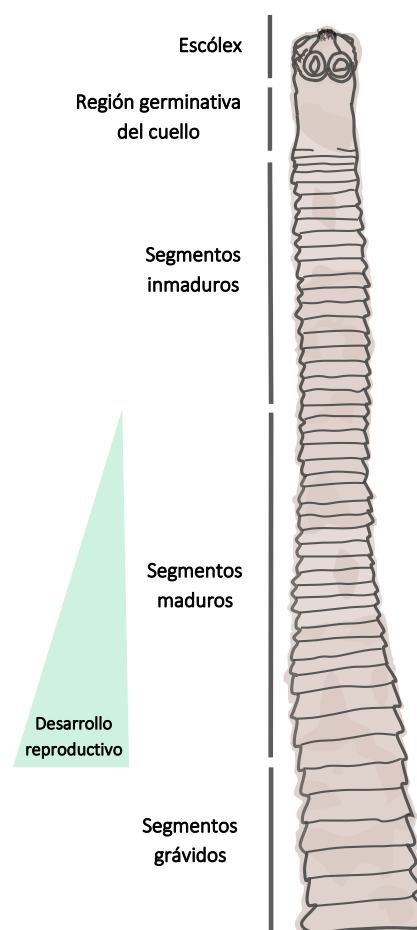


Figura 1: Organización corporal de los cestodos.

El extremo anterior del gusano, conteniendo órganos de fijación, se conoce como escólex. A partir de la región inmediatamente posterior al escólex, denominada región germinativa del cuello, se generan segmentos en forma continua. Los segmentos maduran hacia el extremo posterior de la estróbila, estableciéndose un gradiente anteroposterior de desarrollo reproductivo. Los segmentos maduros desarrollan sistemas reproductores masculinos y femenino completos, que degeneran en los segmentos posteriores (grávidos), para dar paso a la acumulación de huevos.

En suma, *H. microstoma* es un buen modelo para el estudio de la biología de cestodos, y es el modelo principal que utilizamos en nuestro laboratorio actualmente.

El ciclo de vida de *H. microstoma* (Figura 2) implica tres estadios de vida: la oncósfera (primer estadio larvario), el cisticercoide (segundo estadio larvario) y la forma adulta [Cunningham & Olson, 2010].

El adulto reside en los conductos biliares y el duodeno del ratón, que oficia de huésped definitivo. El cuerpo del adulto está compuesto por el escólex (extremo anterior que contiene ventosas y ganchos), el cuello (región no segmentada, a partir de donde se originan segmentos en forma continua) y la estróbila, una cadena compuesta por numerosos segmentos o proglótides [Roberts, 1980; Rozario & Newmark, 2015].

Los segmentos generados a partir del cuello maduran en dirección anteroposterior, dando lugar a un gradiente de desarrollo reproductivo (Figura 1). Los segmentos inmaduros (cercanos al cuello) carecen de estructuras definidas en su interior. Más adelante en el desarrollo se forma el primordio genital en la región central del segmento, que da lugar a los sistemas reproductores masculinos y femeninos en los segmentos maduros. En los segmentos grávidos (más posteriores) los sistemas reproductores degeneran, permitiendo la acumulación de huevos.

Por reproducción sexual en los segmentos maduros se generan cigotos. Cada cigoto atraviesa un desarrollo embrionario temprano muy particular, que implica clivajes asincrónicos y asimétricos, desde las primeras divisiones [Rybicka, 1966; Roberts y Davis, 1989]. Como resultado, se genera la oncósfera, una primera forma larvaria de tamaño reducido, que se libera al medio ambiente dentro de un huevo, que le confiere protección durante la dispersión [Koziol, 2017; Smyth & McManus, 1989].

Al ser liberados al ambiente, los huevos pueden ser ingeridos por el hospedador intermediario: escarabajos, por ejemplo, de la especie *Tribolium confusum* [Cunningham & Olson, 2010].

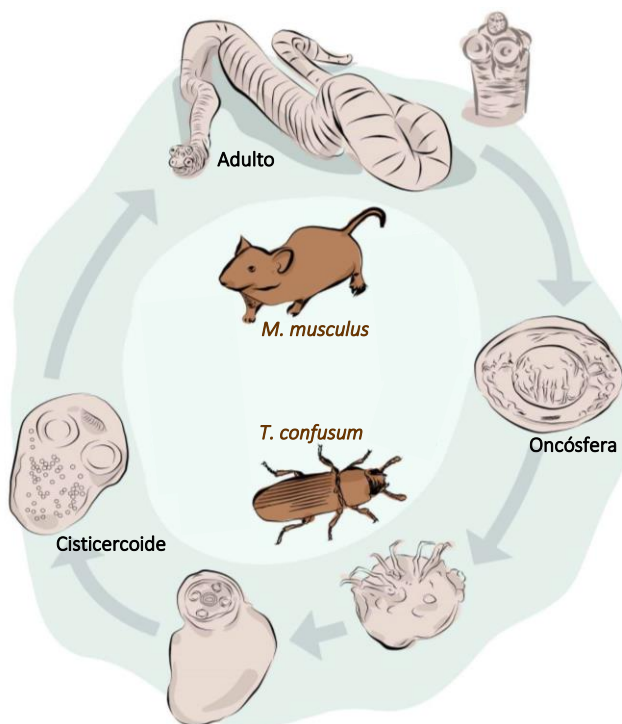


Figura 2: Ciclo de vida de *H. microstoma*.

El cestodo adulto reside en los conductos biliares de ratones. Allí se desarrolla y produce huevos que encapsulan oncósferas infectivas (primera forma larvaria). Los huevos son liberados al ambiente donde pueden ingeridos por escarabajos. Dentro del hemocele de los escarabajos, las oncósferas sufren una metamorfosis para dar lugar a los cisticercoides (segundo estadio larvario). Los ratones se infectan al ingerir escarabajos infectados con cisticercoides, que se desarrollan en adultos, completándose así el ciclo de vida de *H. microstoma*.

Durante la ingestión, las cubiertas protectoras del huevo se rompen y la oncósfera es liberada en el sistema digestivo del insecto, donde la oncósfera se activa. Secreciones proteolíticas y el movimiento de sus tres pares de ganchos, le permiten a la larva atravesar el tubo digestivo del escarabajo para llegar al hemocele. Allí, la oncósfera sufre cambios fisiológicos y morfológicos radicales que derivan en el desarrollo del segundo estadio larvario: el cisticercoide [Vogue, 1964; Koziol, 2017].

El cisticercoide es un organismo similar al adulto. Posee el escólex y la región del cuello, invaginados dentro de una vesícula, pero no presenta proglótides. Eventualmente, esta segunda forma larvaria es ingerida por el huésped definitivo (ratón) en conjunto con el huésped intermediario. Una vez en el sistema digestivo del roedor, la pepsina y el ácido clorhídrico del estómago disuelven las envolturas que rodean a la larva, mientras la tripsina y sales biliares del intestino impulsan su activación [Cunningham y Olson, 2010].

Posteriormente, el cisticercoide migra desde el intestino hasta el ducto biliar, donde se establece para comenzar el proceso de estrobilización (proceso de generación de segmentos a partir de la región del cuello) que dará lugar a la forma adulta. El escólex presente en la larva se mantiene y los tejidos posteriores del adulto son generados por expansión y modificación de los ya existentes [Koziol, 2017]. A medida que el parásito adulto continúa su desarrollo, genera nuevos segmentos, que maduran y luego se vuelven grávidos [de Rycke, 1966]. De esta forma, se completa el ciclo de vida.

Los complejos mecanismos de desarrollo que sustentan el ciclo de vida de *H. microstoma*, y de todos los cestodos, son impulsados por un grupo de células particulares: las células germinativas.

2.3. Células germinativas

En Platelminfos las células diferenciadas son post-mitóticas. La renovación de los tejidos diferenciados y el crecimiento depende de una población aislada de células madre pluripotentes, que constituye la única población de células con capacidad proliferativa en estos organismos. Después de proliferar, parte de estas células abandonan el ciclo celular y migran a los tejidos para dar lugar a distintos tipos celulares diferenciados [Gustafsson, 1976; Koziol et al., 2010]. Esta estrategia difiere de la existente en otros metazoarios, donde células madre residentes y células proliferantes diferenciadas son fuente de nuevas células para la renovación tisular [Peter et al., 2004].

En planarias, las células con capacidad proliferativa, conocidas como neoblastos, han sido ampliamente estudiadas, por lo que se han realizado grandes avances en su caracterización [Rink, 2013].

Morfológicamente los neoblastos se distinguen por ser pequeñas células redondeadas, con un citoplasma rico en ARN y ribosomas, y un gran núcleo con escasa heterocromatina, que contiene a un nucleolo prominente en su interior [Baguña et al., 1989; Peter et al., 2004]. A nivel ultraestructural se observa que presentan una gran cantidad de mitocondrias y ribosomas libres, y carecen de retículo endoplasmático y aparato de Golgi. También presentan gránulos ribonucleoproteicos (RNP) denominados cuerpos cromatoides [Morita et al., 1969; Hay & Coward, 1975; Koziol et al., 2010].

Desde el punto de vista molecular, se han definido por la expresión de Piwi [Reddien et al., 2005], y otros genes que se asocian a la especificación de la línea germinal en animales (como vasa, nanos, pumilio, tudor y bruno) [Wagner et al., 2012]. Genes asociados al ciclo celular, como la ciclina B,

también se han establecido como marcadores de neoblastos, ya que se encuentran específicamente expresados en células proliferantes de planarias [Reddien, 2005; Zhu & Pearson, 2013; Baguña, 2013].

Aunque en un inicio los neoblastos fueron colectivamente definidos como una población homogénea de células pluripotentes [Baguña et al., 1989], posteriormente se evidenció que se trata de una población heterogénea, que incluye células madre pluripotentes [Wagner et al., 2011], así como también progenitores con linajes restringidos (capaces de dar lugar a ciertos tipos celulares), y progenie en vías de diferenciación [Wagner et al., 2011; Zhu & Pearson, 2016; Zeng et al., 2018]. En los últimos años se han caracterizado diferentes subpoblaciones de neoblastos, e incluso se han podido reconstruir vías de especificación de múltiples linajes celulares [Molina & Cebria, 2022], alcanzándose un entendimiento considerable del comportamiento de las células proliferantes de planarias.

A pesar de la importancia en la promoción del ciclo de vida, y su atractivo como blanco de acción de terapias farmacológicas, el estudio de las células con capacidad proliferativa se encuentra mucho menos avanzado en cestodos. Las denominadas células germinativas son funcionalmente equivalentes, y morfológicamente muy similares, a los neoblastos de planarias [Bolla & Roberts, 1971; Koziol et al., 2010; Koziol & Castillo, 2011]. Desde el punto de vista molecular, presentan un perfil de expresión génica único. De hecho, se ha visto que los Neodermata han perdido ortólogos de genes como *piwi*, *vasa* o *tudor*, considerados marcadores conservados de células madre pluripotentes y de la línea germinal [Juliano et al., 2010; Solana, 2013], lo que sugiere que los mecanismos implicados en el mantenimiento de las células madre son diferentes en platelmintos parásitos [Tsai et al., 2013; Koziol et al., 2014]. Más recientemente se determinó que las células germinativas constituyen una población heterogénea a nivel molecular [Koziol et al., 2014; Rozario et al., 2019], al igual que los neoblastos en platelmintos de vida libre. También se encontraron genes que se expresan en forma exclusiva en esta población y son esenciales para el mantenimiento del estado indiferenciado [Rozario et al., 2019].

Las células germinativas se han descrito en todos los estadios de vida, e impulsan el desarrollo a lo largo de todo el ciclo de vida de los cestodos [Koziol & Castillo, 2011]. En los adultos, las células germinativas se concentran en el parénquima medular de la región del cuello, en estrecha proximidad a la capa muscular interna, que se cree provee a las células germinativas de señales que mantienen su estado indiferenciado [Bolla & Roberts, 1971; Koziol et al., 2010]. En el parénquima cortical, donde se localizan el tegumento y músculo sub-tegumentario, las células germinativas se encuentran ausentes o restringidas a las regiones más internas [Bolla & Roberts, 1971; Koziol & Castillo, 2011].

Aunque las células germinativas se concentran en la región generativa del cuello, también se encuentran presentes en otras regiones de la estróbila en una menor proporción [Bolla & Roberts, 1971; Koziol et al., 2010; Rozario et al., 2019]. Sin embargo, el potencial de regeneración se encuentra limitado únicamente a la región del cuello, donde las células germinativas se encuentran bajo la influencia de señales provenientes del escólex [Rozario et al., 2019]. La proliferación y diferenciación de las células germinativas del cuello permiten la renovación de los tejidos diferenciados del adulto y la constante generación de nuevos segmentos corporales durante el proceso de estrobilación.

En las larvas, una reducida cantidad de células germinativas se mantienen quiescentes hasta que ocurre la transición de hospedador, momento en que proliferan e impulsan el proceso de metamorfosis a la siguiente forma de vida [Koziol et al., 2017]. Así, las células germinativas son esenciales durante el desarrollo de los cestodos. Sin embargo, se desconocen aspectos importantes de su biología, como los mecanismos implicados en la regulación de su proliferación.

2.4. Ciclinas como reguladoras del ciclo celular y el rol de la ciclina B

Las ciclinas conforman una amplia y diversa familia de proteínas que comparten un motivo conservado denominado “caja de ciclina” [Quandt et al., 2019]. Un subgrupo específico de estas proteínas, conocidas como ciclinas canónicas, desempeña un papel fundamental en la regulación del ciclo celular al asociarse y provocar la activación de serín-treonín quinasas, las quinasas dependientes de ciclina (CDKs) [Morgan, 1997].

Las ciclinas canónicas se acumulan y degradan periódicamente, determinando una oscilación en la actividad de las CDKs, que fosforilan diversas proteínas efectoras y desencadenan el comienzo de eventos celulares específicos. De este modo, se establece un robusto sistema de control, basado en el ensamblaje secuencial de complejos ciclina-CDK, que impulsa el avance del ciclo celular a través de las diferentes fases en el momento y orden correcto [Morgan, 1997].

Estos complejos reguladores del ciclo celular se encuentran conservados dentro de los eucariotas, aunque el número de ciclinas y CDK se vio incrementado durante la evolución de los eucariotas superiores [Harashima, 2013]. En eucariotas unicelulares, una única quinasa dependiente de ciclina (Cdc28, equivalente a la Cdk1) se asocia con múltiples ciclinas para promover la progresión del ciclo celular [Bloom & Cross, 2007]. En cambio, las células animales poseen múltiples Cdk que coordinan los eventos claves del ciclo, cada una de ellas regulada por ciclinas diferentes [Harashima, 2013].

En base a la similitud de secuencia, clásicamente se han definido cuatro subfamilias de ciclinas canónicas: ciclinas A, B, D y E. Los miembros de cada subfamilia comparten patrones de expresión, y se asocian a CDK afines, por lo que se las asocia a una actividad específica en la regulación del ciclo celular [Morgan, 2007].

Por ejemplo, la ciclina D aumenta su concentración en función del crecimiento celular y la presencia de señales mitogénicas, y en asociación con las quinasas CDK4 y CDK6 promueven el ingreso al ciclo celular.

La ciclina E aumenta en fase G1 tardía y disminuye su concentración tempranamente en fase S. El complejo que forma en asociación con CDK2 impulsa la progresión a través del punto de restricción de ingreso al ciclo celular, y desencadena los eventos iniciales de fase S (estimula la replicación del ADN y la duplicación del centrosoma).

Por su parte, la ciclina de tipo A comienzan a sintetizarse al inicio de la fase S, y se asocian a CDK2 provocando su activación. El complejo ciclina A-CDK2 promueve la progresión a través de la fase S mediante la fosforilación de proteínas involucrados en la duplicación del ADN. Posteriormente, la ciclina A forma un complejo con la CDK1 y estimular el ingreso a mitosis.

La última ciclina canónica, la ciclina B, es de nuestro particular interés en el contexto de este trabajo. Esta ciclina desempeña un papel esencial en el control del ciclo celular durante la mitosis y la meiosis. En todos los eucariotas estudiados hasta la fecha, la ciclina B, en complejo con CDK1, controla la transición G2/M y desencadena eventos esenciales para la división celular, como la condensación cromosómica, el desensamblaje de la lámina nuclear y el establecimiento del huso mitótico/meiótico [Murray & Hunt, 1993; Nurse, 1990].

Los niveles de proteína de la ciclina B aumenta gradualmente desde la fase S tardía, a lo largo de la fase G2, hasta llegar a un máximo en metafase [Pines y Hunter, 1989]. A medida que se concentra en el citoplasma, la ciclina se asocia a la quinasa CDK1. Sin embargo, el complejo Ciclina B-CDK1 formado se mantiene inactivo, hasta que las fosfatasa Cdc25 eliminan fosforilaciones inhibitorias de los residuos Thr14 y Tyr15 (introducidas previamente por Myt1 y Wee1) [Porter & Donoghue, 2003]. Recién como resultado de la alteración del patrón de fosforilación el complejo se activa, y al ubicarse en el compartimento subcelular adecuado, accede a sus blancos de fosforilación siendo capaz de desencadenar los eventos de la mitosis. Hacia el final de la metafase, el complejo promotor de la anafase (APC/C) reconoce un motivo conservado llamado caja de destrucción en la región N-terminal de la ciclina, y cataliza su ubiquitinación, destinándola a la degradación proteasomal (Figura 3). En consecuencia, la actividad de la CDK1 disminuye, permitiendo la transición de la metafase a anafase y la salida de la mitosis [Clute & Pines, 1999; Murray et al., 1989].

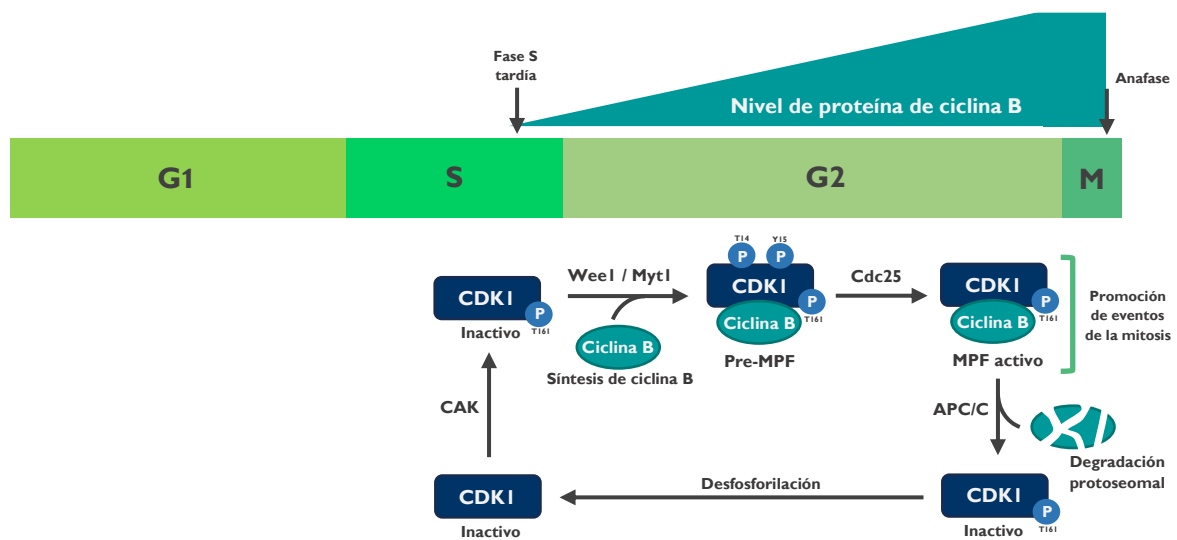


Figura 3: Regulación de la actividad del complejo CDK1-ciclina B. La expresión de la ciclina B comienza en fase S tardía y aumenta gradualmente a lo largo de la fase G2 hasta alcanzar un máximo en fase M. Al acumularse, la ciclina B forma un complejo con CDK1, que presenta la fosforilación activadora en T161. Este complejo pre-MPF se mantiene inactivo hasta que Cdc25 elimina las fosforilaciones inhibitorias en T14 y Y15 (introducidas previamente por Wee1 y Myt1). Tras activarse, el complejo CDK1-ciclina B (MPF activo) fosforila sus blancos moleculares promoviendo los eventos de la mitosis. Al final de la metafase, la ciclina B es ubiquitinada por APC/C, siendo destinada a la degradación proteasomal. En consecuencia, CDK1 se inactiva, permitiendo el ingreso a anafase y la finalización de la fase M.

En vertebrados se conocen 5 tipos de ciclinas B (B1-B5), siendo las ciclinas B1 y B2 las más ampliamente expresadas y caracterizadas en cuanto a su función y patrón de expresión [Porter & Donoghue, 2003]. La ciclina B1 se acumula en el citoplasma durante la interfase, co-localizando con los microtúbulos, y con el inicio de la mitosis pasa a ubicarse predominantemente en el núcleo, accediendo a sus blancos moleculares. Por su parte, la ciclina B2 co-localiza con el aparato de Golgi, y durante la mitosis se distribuye uniformemente en todo el citoplasma. En forma concordante con su ubicación, la ciclina B1, en asociación con CDK1, promueve la condensación cromosómica, el desensamblaje de la lámina nuclear y el establecimiento del huso mitótico [Gavet & Pines, 2010], mientras la ciclina B2 induce la fragmentación del aparato de Golgi [Jackman et al., 1995]. En invertebrados, se propone que una única ciclina B canónica podría cumplir las funciones mitóticas de las ciclinas B1 y B2 de vertebrados [Han et al., 2012].

Durante la meiosis, el rol de la ciclina B ha sido predominantemente estudiado durante la maduración de los ovocitos [Hirai et al., 1992; Chapman & Wolgemuth, 1992; Kotani et al., 2001; Li et al., 2019; Bouftas & Wassmann, 2019].

En forma análoga a lo que ocurre en mitosis, el complejo CDK1-ciclina B estimula el ingreso a la meiosis. En el caso particular de la ovogénesis, la actividad del complejo desencadena los acontecimientos estructurales del proceso de maduración del ovocito, como la ruptura de la envoltura nuclear (conocida como vesícula germinal), la condensación de la cromatina y la formación del huso de microtúbulos, permitiendo el escape del arresto en profase I y la progresión de la primera división meiótica [Vaur et al., 2004]. En anafase I, los niveles de ciclina B disminuyen, permitiendo la salida de la meiosis I.

Posteriormente, los niveles de la ciclina aumentan y el complejo ciclina B-CDK1 induce la progresión hacia la metafase de la segunda división meiótica [Murray et al., 1989]. También se propone que la actividad del complejo podría ser importante para inhibir la fase S entre las dos meiosis [Picard, 1996].

2.5. Ciclinas en platelmintos

Actualmente se dispone de escasa información acerca de los mecanismos implicados en la regulación del ciclo celular en platelmintos. Como antecedente a este trabajo, fue realizado un análisis filogenético con el objetivo de conocer los homólogos de ciclinas que se encuentran codificados en el genoma de estos animales. Los resultados indican que los platelmintos, y particularmente los platelmintos parásitos, presentan un complemento reducido de ciclinas canónicas. En estos parásitos (y en especial en cestodos) se han perdido muchos genes reguladores en general [Tsai et al., 2013], por lo que las ciclinas se sumarían a la lista de componentes moleculares, implicados en la regulación de múltiples procesos, que se han perdido a lo largo de su evolución.

En planarias (platelmintos de vida libre) se identifican homólogos de ciclinas D, B, y E, pero no homólogos de ciclinas de tipo A (Figura 4 y Tabla 1). Por su parte, los platelmintos parásitos presentan homólogos para sólo dos de las cuatro ciclinas canónicas que participan en la regulación del ciclo celular en otros animales: tanto en cestodos (*H. microstoma*, *E. multilocularis*) como trematodos (*S. mansoni*) se observa la presencia de homólogos para ciclinas D y B, y la ausencia de homólogos de ciclinas de tipo A y E (Tabla 1).

Tabla 1: Homólogos de las diferentes clases de ciclina canónicas en *H. sapiens*, *D. melanogaster* y platelmintos de vida libre (*S. mediterranea*) y parásitos (*H. microstoma*, *E. multilocularis* y *S. mansoni*). Los homólogos fueron identificados mediante búsqueda de similitud de secuencia, seguida por un análisis filogenético. Análisis realizado por Uriel Koziol (datos no publicados).

Clase de ciclina	<i>H. sapiens</i>	<i>D. melanogaster</i>	Platelminto de vida libre	Platelmintos parásitos		
			<i>S. mediterranea</i>	<i>H. microstoma</i>	<i>E. multilocularis</i>	<i>S. mansoni</i>
G1 (cyc D)	CCND1, CCND2, CCND3	CCND	SMESG000054290	HmN_000504900	EmuJ_000456500	Smp_047620
G1/S (cyc E)	CCNE1, CCNE2	CCNE	SMESG000052655	Ausente	Ausente	Ausente
S (cyc A)	CCNA1, CCNA2	CCNA	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
G2/M (cyc B)	CCNB1, CCNB2, CCNB3	CCNB, CCNB3	SMESG000077303, SMESG000030455, SMESG000077612	HmN_000462300	EmuJ_001070150	Smp_082490

Adicionalmente, en platelmintos en general, destaca la existencia de ciclinas divergentes, que agrupan en un clado aislado en el árbol filogenético (en verde en la Figura 4). En particular, en *H. microstoma* se identifican seis ciclinas divergentes, una de las cuáles (*HmN_0000398100*) incluso fue excluida del alineamiento utilizado para la construcción del árbol filogenético. Todas estas ciclinas divergentes son específicas de adulto, y se expresan predominantemente en la región medial del cuerpo (en los segmentos maduros) en *H. microstoma* [Preza et al., 2021a; Olson et al., 2018].

La ausencia de la mitad del complemento de ciclinas canónicas sugiere la existencia de mecanismos atípicos de regulación del ciclo celular, y tal vez específicos dentro de los platelmintos parásitos.

Hasta donde sabemos, se trataría de los primeros animales que carecen de las dos ciclinas que clásicamente interactúan con la quinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2), lo que invita a indagar en posibles modificaciones de los mecanismos conservados del control del ciclo celular en cestodos. Sería posible que la ciclina B interactúe con CDK2 (presente en el genoma de los cestodos), provocando su activación, o que el complejo ciclina B-CDK1 participe promoviendo la fase S, como se ha reportado previamente para otros metazoos [Santamaría et al., 2007; Sherr et al., 2004; Pacek et al., 2004; Moore et al., 2003]. También podría ocurrir que algunas ciclinas divergentes presentes en estos organismos estén implicadas en la regulación del ciclo celular, relevando las funciones de las ciclinas canónicas ausentes.

Considerando este panorama complejo, resulta de interés determinar si la ciclina B (*HmN_000462300*) de *H. microstoma* (una de dos clases de ciclinas canónicas identificadas en el genoma de los cestodos) se expresa únicamente en fase G2/M del ciclo celular, así como analizar el patrón de expresión del transcrito codificante para la ciclina B (*Hm-cycB*) en diferentes estadios del desarrollo de *H. microstoma*. En este trabajo nos propusimos abordar estos dos puntos, utilizando hibridación *in situ whole-mount* (WMISH), en combinación con marcaje metabólico con un análogo de timidina e inmunohistofluorescencia (IHF) para una marca específica de mitosis.

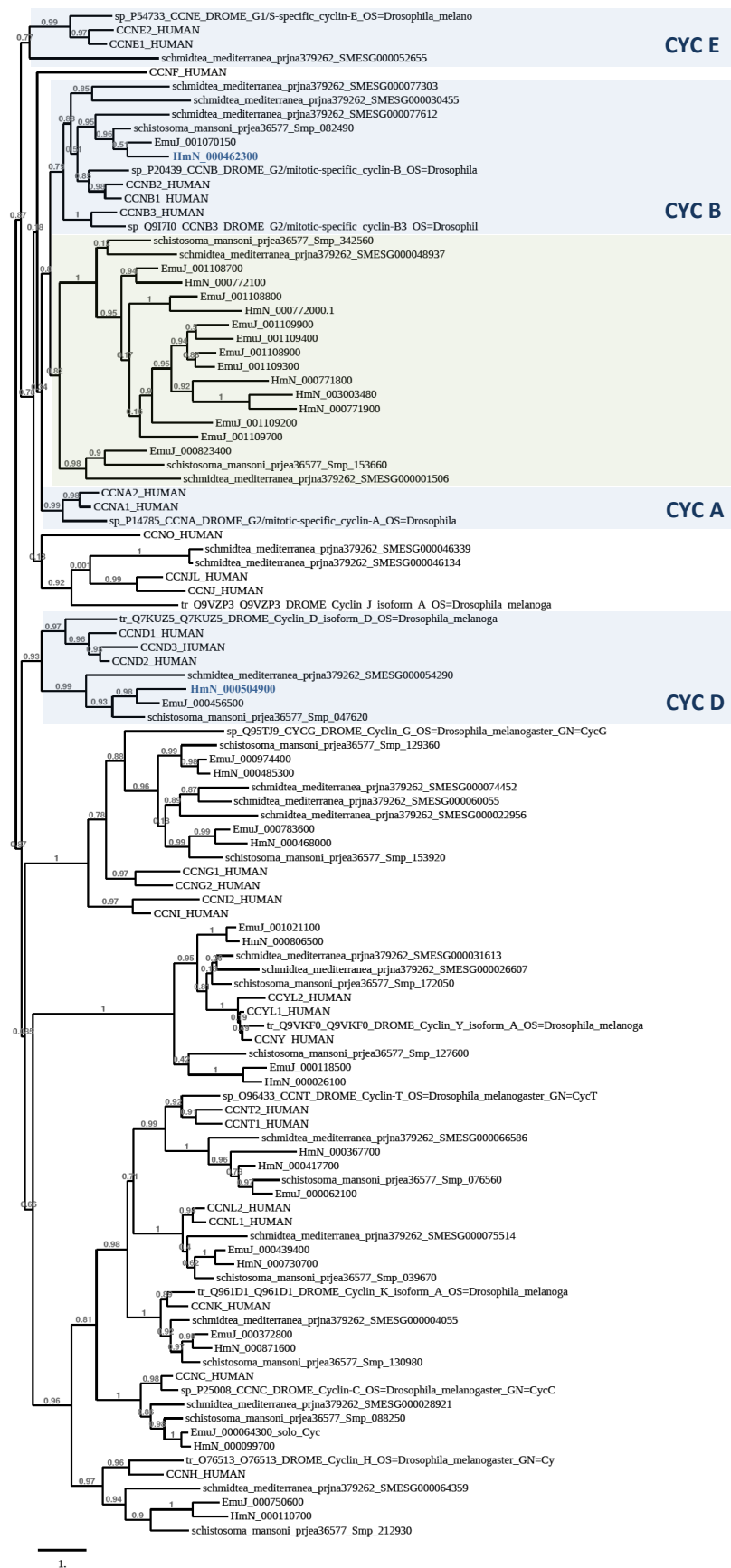


Figura 4: Relaciones filogenéticas de ciclinas. El árbol se obtuvo mediante el método de máxima verosimilitud aplicando el modelo de sustitución de aminoácidos WAG, tras el alineamiento de la secuencia aminoacídica de las ciclinas de *H. sapiens*, *D. melanogaster*, *S. mediterranea* (Planaria), *S. mansoni* (Trematodo), *E. multilocularis* y *H. microstoma* (Cestodos). Se indica el apoyo estadístico de cada nodo mediante el valor de Bootstrap. En celeste se resaltan las ramas correspondientes a las ciclinas canónicas, y en verde el clado de ciclinas divergentes de platelmintos. Análisis realizado por Uriel Koziol (resultados no publicados).

3. OBJETIVOS

Objetivos generales:

- Caracterizar la expresión de *Hm-cycB* en diferentes estadios del ciclo de vida de *H. microstoma*.
- Determinar si *Hm-cycB* se expresa únicamente en fase G2/M del ciclo celular.

Objetivos específicos:

- Clonar el ADN copia (ADNc) de *Hm-cycB*.
- Realizar hibridaciones *in situ whole-mount* para evidenciar el patrón de expresión de *Hm-cycB* en diferentes estadios del ciclo de vida de *H. microstoma*.
- Analizar la co-localización de la expresión de *Hm-cycB* con marcadores de ciclo celular.

4. METODOLOGÍA

4.1. Mantenimiento del ciclo de vida de *H. microstoma*

El ciclo de vida de *H. microstoma* es mantenido completamente en el laboratorio, en conjunto con el Laboratorio de Experimentación Animal (LEA) de Facultad de Química.

En el bioterio del LEA se infectan ratones (*Mus musculus*) C57BL/6 mediante la administración oral de 10 cisticercoides en 100 μ L de PBS. Esta segunda forma larvaria se desarrolla en los ductos biliares del roedor. Aproximadamente un mes después de la infección, los ratones son sacrificados y se realiza una necropsia para extraer a los cestodos adultos de los ductos biliares y el duodeno (protocolo CHEA número 10190000025215).

Posteriormente, en la Sección Biología Celular de Facultad de Ciencias, los segmentos grávidos de los adultos, conteniendo huevos con oncósferas infectivas, se utilizan para la infección de escarabajos de la especie *T. confusum*. Los mismos se colocan en ayuno por una semana, de modo que cuando son expuestos a un macerado de los segmentos, ingieren los huevos y se infectan con la primera forma larvaria. En el hemocele de los escarabajos, la oncósfera sufre una metamorfosis para dar lugar a la segunda forma larvaria. Tras 7-8 días post-infección, los cisticercoides completamente desarrollados se pueden obtener del hemocele de los escarabajos infectados. Estas larvas son utilizadas para la infección de nuevos ratones.

4.2. Fijación de adultos para WMISH

Adultos enteros de *H. microstoma* fueron anestesiados por incubación en hielo durante 5 minutos y después fijados rápidamente utilizando PFA 4% (Sigma) libre de RNAsas precalentado a 84°C (de este modo se evita la contracción de los gusanos, que dificulta observar los resultados de WMISH en los tejidos internos). La fijación se extendió durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se retiró el PFA y se sustituyó por metanol 100%. Los gusanos fijados se guardaron a -20°C hasta su uso.

4.3. Activación de cisticercoides

Los cisticercoides que se obtienen del hemocele de escarabajos *T. confusum* permanecen en forma infectiva, rodeados por envolturas, hasta que tiene lugar su activación. *In vivo* esto ocurre cuando ingresa al sistema digestivo del ratón. *In vitro*, para activar a los cisticercoides, se los expone a condiciones análogas a las que experimentarían al ingresar al sistema digestivo del hospedero definitivo, utilizando pH ácido (HCl), enzimas digestivas (Pepsina y Tripsina) y sales biliares (Taurocolato de Sodio). La combinación de la Pepsina y el ácido simulan las condiciones del estómago y disuelven las membranas de la larva, mientras que la Tripsina y el Taurocolato, a lo que los cisticercoides normalmente se expondrían al ingresar al intestino, la activan [Cunningham & Olson, 2010].

En este trabajo, se recolectaron cisticercoides a partir de escarabajos infectados (3 meses post-infección), por disección bajo lupa. Tras lavarlos tres veces en PBS, se colocaron en una placa de Petri conteniendo Solución A (PBS + 0.17% HCl + 1% Pepsina) y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron dos veces con PBS y se colocaron en Solución B (RPMI + 0.1% Taurocolato de Sodio + 0.5% Tripsina) precalentada a 37°C.

En un principio, las larvas se incubaron en solución B durante 30 minutos en estufa a 37°C. Al observarse una baja eficiencia de activación, posteriormente se incubaron por aproximadamente 20 minutos más, siguiendo el proceso bajo lupa. En este tiempo se fueron recolectando, y colocando en PBS, a aquellos cisticercoides activados que se liberaban de su cápsula y comenzaban a moverse. Cabe destacar que el período de recolección de larvas comprendió más de 20 minutos, por lo que finalmente se obtuvieron cisticercoides de un tiempo post-activación variable. Al finalizar, los cisticercoides (condición 0 h post-activación) se fijaron en PFA 4% y se preservaron en metanol a -20°C hasta su uso.

Por otro lado, para obtener cisticercoides 6 h post-activación, se juntaron larvas del mismo modo, pero previo a ser fijadas, se cultivaron durante 6 horas en medio bifásico RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), 30% de suero fetal bovino (Capricorn FBS-11A), 1% antibiótico-antimicótico (Thermo, 15240-062), Hemina 0.15 µm (Sigma-Aldrich), 0.1% Taurocolato de sodio (Sigma-Aldrich) con base de Agar Triptona + 5% Sangre Ovina (Biokey) (paso realizado por Inés Guarnaschelli). Este medio de cultivo fue optimizado por Matías Preza durante su tesis de doctorado, quién comprobó que los cisticercoides prosiguen su desarrollo durante el cultivo. Por tanto, de este modo es posible estudiar fenómenos que tienen lugar durante las primeras horas del desarrollo post-activación (etapa que naturalmente ocurre dentro del ratón).

4.4. Obtención de larvas en metamorfosis

En un período de 4 a 5 días post-infección (dpi), las oncósferas comienzan el proceso de metamorfosis a cisticercoides en los tejidos parenterales del hospedero intermediario, pero no llegan a completarlo (la metamorfosis completa requiere de aproximadamente 7-8 días [Cunningham & Olson, 2010]). Por tanto, mediante una infección de 4-5 dpi pueden obtenerse larvas que se encuentran transitando el proceso de metamorfosis.

Se infectaron escarabajos *T. confusum* (en ayuno) con huevos que fueron extraídos de segmentos grávidos de *H. microstoma* adultos y posteriormente almacenados a 6-8°C durante 1 día (este paso aumenta la eficiencia de la infección [Preza et al., 2021b]). Tras 4-5 dpi, se disecaron los escarabajos bajo lupa, extrayéndose las larvas del hemocele. Las mismas se recuperaron, fijaron en PFA 4% y reservaron en metanol a -20°C (en condiciones libres de RNAsas) hasta su uso.

4.5. Clonación de *Hm-cycB*

4.5.1. Amplificación por PCR

Se realizó una PCR utilizando cebadores específicos (Tabla 2) diseñados para amplificar la secuencia codificante parcial de 888 pb del gen de la ciclina B canónica de *H. microstoma* (*HmN_000462300*). Como molde se utilizó el ADNc generado por retrotranscripción de ARN total de *H. microstoma* adulto utilizando Oligo dT.

Tabla 2: Secuencias de los primers utilizados en la PCR para la amplificación de la secuencia codificante para la ciclina B (*HmN_000462300*) de *H. microstoma*.

Primer <i>Hm-cycB</i>	Secuencia
Sentido (s)	TCGAGATCAAGAGTACCTTTGGTCC
Anti-sentido (as)	TATCCTATCGTCCCAAACCTCTGTCC

Tras obtener la mezcla de la reacción [0.25 µl de HighTaq pol (5 u/µl, Bioron), 5 µl de buffer 10x, 2 µl de molde (ADNc), 2 µl de primer s (10 µM), 2 µl primer as (10 µM), 1 µl de dNTPs (10 mM, Fermentas), 37.75 µl de H₂O] se llevó a cabo la amplificación utilizando el programa de ciclado que se describe en la Tabla 3, considerando la T_m de los primers utilizados (T_m= 55°C).

Tabla 3: Programa de PCR utilizado para la amplificación de la secuencia codificante para la ciclina B (*HmN_000462300*) de *H. microstoma*.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	
Desnaturalización inicial	94	2 min	
Desnaturalización	94	10 seg	35 ciclos
Hibridación	55	20 seg	
Extensión	72	2 min	
Extensión final	72	2 min	

Finalmente, se comprobó el resultado mediante una electroforesis en gel de agarosa 1% (Sigma), en buffer TAE (Tris Acetato EDTA), utilizando SYBR Safe (Invitrogen) para la visualización del ADN, y el marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

4.5.2. Ligación

Los amplicones obtenidos se insertaron en un plásmido mediante ligación, utilizando el kit TA Cloning Kit Dual Promoter (pCRII) de Invitrogen. Este kit utiliza el plásmido pCRII (mapa adjunto en el Anexo), un vector T que permite la ligación directa de los productos de PCR con extremos cohesivos (con una adenina desapareada en cada extremo 3' del amplicón) que son sintetizados por la Taq polimerasa.

Este plásmido cuenta con un gen de resistencia a Ampicilina, y con el gen lacZ α que codifica para el fragmento α de la enzima β -galactosidasa (lo que permite hacer el screening blanco-azul para la selección de las bacterias transformadas).

Además, contiene los promotores T7 y SP6, cada uno a un lado del inserto, facilitando la transcripción del inserto para obtener productos sentido y anti-sentido.

Para la reacción de ligación se siguió el protocolo sugerido por los fabricantes del kit y se utilizó la siguiente mezcla de ligación: 1 μ l de Express Link T4 ligasa, 2 μ l de Buffer (10x) de la enzima, 2 μ l del vector pCRII, 0.5 μ l de producto de PCR y 4 μ l de H₂O libre de nucleasas. La mezcla se incubó a 22°C por 1 hora.

4.5.3. Transformación

La mezcla de ligación se utilizó para la transformación de bacterias quimiocompetentes mediante el método de shock térmico.

Se utilizaron *Escherichia coli* de la cepa DH5 α , que permite la replicación de plásmidos con un alto número de copias y la selección de bacterias recombinantes por screening blanco-azul (al incorporarse el plásmido ocurre la α -complementación del fragmento ω de la β -galactosidasa, que cataliza la hidrólisis de 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactopiranosido (X-gal), generándose luego un derivado oxidado de color azul).

Se emplearon 5 μ l de mezcla de ligación, conteniendo el plásmido de interés, para transformar 50 μ l de bacterias competentes. Tras incubar la mezcla en hielo por 20 minutos, se realizó el shock térmico por 90 s a 42°C y se devolvió al hielo por 90 s.

Posteriormente, se agregó medio de cultivo LB (Tripton 1%, NaCl 0.5%, Extracto de levadura 0.5%, pH 7.0) y se incubó con agitación a 37°C durante 40 minutos para permitir la recuperación de las bacterias. Por último, las mismas se sembraron en placas de LB-Agar con Ampicilina (100 μ g/ml, Duchefa) y X-gal (20 μ g/mL), que se incubaron a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se corroboró la presencia de colonias y se reservaron las placas a 4°C (incubar las placas a esta temperatura provoca un aumento de la precipitación del derivado de X-gal y facilita la diferenciación entre colonias azules y blancas).

4.5.4. PCR de colonia

Una vez crecidas las bacterias, para la identificación de células recombinantes se llevaron a cabo PCR de colonia. Se seleccionaron cinco colonias aisladas de color blanco (que deberían contener inserto, dado que la secuencia de la subunidad alfa de la β -galactosidasa se encuentra interrumpida por el inserto y no es posible el desarrollo de color azul), que se picaron y resuspendieron en 10 μ L de agua estéril. Como control negativo, se picaron también colonias azules (que no deberían contener el inserto).

Se utilizó 1 μ L de suspensión bacteriana como molde para la amplificación por PCR, utilizando primers complementarios a las secuencias SP6 (5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG-3') y T7 (5'-TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG G-3') del plásmido pCRII, para verificar la presencia del inserto de interés.

Para ello, se realizó la siguiente mezcla de reacción: 0.1 μl de HighTaq pol (5 u/ μl , Bioron), 2 μl de buffer 10x, 1 μl de molde (suspensión bacteriana), 0.8 μl de primer T7 (10 μM), 0.8 μl primer SP6 (10 μM), 0.4 μl de dNTPs (10 mM, Fermentas) y 14.9 μl de H_2O . Posteriormente, la PCR se llevó a cabo utilizando el programa de ciclado que se establece en la Tabla 4.

Tabla 4: Programa de PCR utilizado para el *screening* de colonias bacterianas seleccionadas y aisladas.

Etapa	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo	
Desnaturalización inicial	94	2 min	
Desnaturalización	94	10 seg	35 ciclos
Hibridación	50	20 seg	
Extensión	72	2 min	
Extensión final	72	2 min	

Para evaluar el resultado de la amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TAE, utilizando SYBR Safe (Invitrogen) como colorante de ácidos nucleicos, y GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific) como marcador de peso molecular. En el caso de los clones en que se observó un producto de amplificación de tamaño adecuado, se sembraron los 9 μL restantes de suspensión de bacterias en placas de LB-agar con Ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Duchefa).

4.5.5. Extracción de ADN plásmido en pequeña escala (Miniprep)

Luego de confirmar la presencia de un inserto del tamaño esperado, se realizó una purificación del ADN plasmídico partiendo de los cultivos bacterianos, utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep Kit de Qiagen y siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante.

Se picaron colonias aisladas de las placas previamente sembradas con las bacterias que presuntamente contenían el plásmido recombinante y resuspendieron en 3 ml de medio LB con Ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Duchefa). Tras una noche de incubación a 37 $^{\circ}\text{C}$ con agitación (200 RPM) se centrifugó el cultivo durante 1 minuto a 14.000 RPM, obteniendo un pellet de bacterias a partir de las cuales se purificaron los plásmidos.

Al finalizar, se estimó la concentración de ADN por medición de la absorbancia a 260 nm en un equipo Nanodrop, y se envió a secuenciar por el método de Sanger a MacroGen (Corea) con los cebadores T7 y SP6. Una vez obtenida la secuencia, se corroboró la identidad del inserto y se dedujo su orientación dentro del plásmido mediante BLAST contra la base de datos disponible en WormBase Parasite.

4.6. Síntesis de sondas para hibridación *in situ*

Con el fin de evidenciar el patrón espacial de expresión del transcrito de la ciclina B (*HmN_000462300*) en *H. microstoma*, se utilizó la técnica de hibridación *in situ whole-mount* (WMISH). Este método se basa en el uso de una sonda marcada que hibrida específicamente con un ARNm de secuencia complementaria en tejidos fijados y permeabilizados. Posteriormente, la sonda puede ser detectada mediante el uso de anticuerpos específicos conjugados a enzimas que catalizan una reacción de desarrollo de un producto coloreado o fluorescente.

Para poder realizar la hibridación *in situ*, en primer lugar, fue necesario sintetizar una sonda con secuencia complementaria al ARNm de interés, marcada con digoxigenina, así como también una sonda control (con igual secuencia al ARN).

4.6.1. Preparación de moldes para la síntesis de sondas de ARN

Luego de confirmar la identidad y orientación de los insertos, se amplificaron moldes para la generación de las sondas, partiendo de los plásmidos purificados. Para ello, se realizaron reacciones de PCR con los primers T7 (5'-TGTAATACGACTCACTATAGGG-3') y SP6 (5'-ATTTAGGTGACTATAG-3') utilizando la siguiente mezcla de reacción: 2 µl de HighTaq pol (5 u/µl, Bioron), 10 µl de buffer 10x, 1 µl de ADN molde (dilución 1/20 del plásmido), 2 µl de primer T7 (10 µM), 2 µl primer SP6 (10 µM), 2 µl de dNTPs (10 mM, Fermentas) y 81 µl de H₂O. Se utilizó el programa de ciclado que se establece en la Tabla 5.

Tabla 5: Programa de ciclado utilizado para la amplificación de la secuencia codificante para la ciclina B (*HmN_000462300*) de *H. microstoma*.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	
Desnaturalización inicial	94	2 min	
Desnaturalización	94	10 seg	35 ciclos
Hibridación	50	20 seg	
Extensión	72	2 min	
Extensión final	72	2 min	

Para evidenciar el resultado de la PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% (Sigma), en buffer TAE (Tris Acetato EDTA), utilizando SYBR Safe (Invitrogen) para la visualización del ADN, y GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific) como marcador de peso molecular.

Tras comprobar la amplificación, se realizó la purificación de los productos de PCR utilizando el kit GeneJET (Thermo Scientific). Finalmente, se midió la concentración del ADN purificado por absorbancia 260 nm en un equipo NanoDrop obteniéndose un valor de concentración de 328 ng/µl. Este dato permitió determinar la cantidad de ADN molde a utilizar en el ensayo de transcripción *in vitro* que se llevó a cabo a continuación para obtener la sonda de ARN marcada.

4.6.2. Transcripción *in vitro* y purificación de las sondas

Utilizando los moldes amplificados, se realizó una transcripción *in vitro* en presencia de DIG-11-UTP, con el fin de sintetizar sondas de ARN sentido (con igual secuencia que el transcripto de ciclina B, utilizada como control negativo) y anti-sentido (complementaria al ARNm de ciclina B, usada para la detección por WMISH) marcadas con digoxigenina (DIG).

Se utilizaron las polimerasas T7 y SP6 (ThermoFisher), que emplean como promotor a las secuencias del vector que flanquean al producto de PCR clonado en pCRII. Considerando la orientación deducida a partir de la secuenciación, la sonda anti-sentido se sintetizó utilizando la enzima T7 y la sonda sentido utilizando la enzima SP6.

Se realizó la siguiente mezcla de reacción: 4 µl Buffer 5x, 4 µl del producto de PCR (1 µg/µl), 2 µl de una mezcla de NTPs (10 mM de ATP, GTP, CTP, y 6.5 mM UTP, BioLabs), 2 µl de digoxigenina-UTP (3.5 mM, Merck), 0.5 µl de RNase Out (Invitrogen), 1.5 µl de ARN polimerasa SP6 o T7 (ThermoFisher) (para sintetizar la sonda sentido o anti-sentido) y 6 µl de agua libre de RNAasas.

En la mezcla de nucleótidos, se utiliza uridina trifosfato (UTP) en menor concentración y se complementa la concentración mediante la adición de UTP asociado a digoxigenina, que marca las sondas. Por el impedimento estérico que impone la digoxigenina, las ARN polimerasas incorporan el nucleótido marcado con baja eficiencia, por lo que no es posible utilizar únicamente DIG-UTP en la reacción.

La mezcla se incubó a 37°C durante 2 horas. Luego se adicionó 1 µl de DNasa I (Thermo) para degradar el ADN molde, y se incubó 15 minutos más a 37°C. A continuación, se purificó la sonda utilizando el kit RNA Clean and Concentrator (Zymo), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante del kit, y analizó la calidad de la sonda obtenida. Por un lado, se corrió una electroforesis en gel de agarosa 1% en condiciones libres de RNAsas, para verificar la integridad de las sondas sintetizadas. Por otro lado, se llevó a cabo un ensayo de Dot Blot para cuantificar la concentración de las mismas.

Al final del protocolo, se obtuvieron 20 µl de cada sonda (*Hm-cycB* sentido y *Hm-cycB* anti-sentido), con una concentración estimada de 10 ng/µl. Las sondas fueron guardadas a -80°C hasta su uso en ensayos de WMISH.

Las secuencias de las sondas se encuentran adjuntas en el Anexo. Las sondas sentido y anti-sentido poseen un largo total de 1053 pb y 1055 pb respectivamente.

4.6.3. Cuantificación de las sondas por Dot Blot

Una vez obtenidas las sondas, se procedió a cuantificar su concentración mediante Dot Blot. Para ello, se realizaron diluciones seriadas (1, 1/10, 1/100 y 1/1000) de las sondas de *Hm-cycB* sentido y anti-sentido. Lo mismo se realizó con una sonda comercial marcada (DIG DNA Labeling and Detection Kit, Roche) de concentración conocida (10 ng/µl), que se utilizó como estándar para estimar la concentración de las sondas de interés.

Se sembró 1 µl de cada dilución en una membrana de nylon cargada positivamente. Después de secarla en estufa a 65°C por 30 minutos, se expuso a luz UV durante 1 minuto, para promover el entrecruzamiento del ácido nucleico a la membrana.

A continuación, la membrana se lavó por 5 minutos con Buffer 1 (Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5), se bloqueó con Buffer 2 (Buffer 1 + 0.5% Reactivo de bloqueo (Roche)) durante 10 minutos y se incubó con anticuerpo Anti-DIG conjugado a fosfatasa alcalina (Merck), diluido 1:2000 en Buffer 2, durante 20 minutos.

Se realizaron 2 lavados de 10 minutos en Buffer 1 y un tercer lavado corto con Buffer 3 (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM, pH 9.5) con agitación. Por último, se procedió al revelado utilizando 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP, Sigma) y nitro-azul de tetrazolio (NBT, Sigma), que participan en una reacción catalizada por la fosfatasa alcalina que genera un precipitado coloreado. Este paso se realiza incubando la membrana durante 5 minutos con una dilución de BCIP y NBT en Buffer 3 (20 µl/ml), en oscuridad, sin agitación (la agitación dispersa el precipitado, afectando la cuantificación). La reacción transcurrió durante 5 minutos, y luego se interrumpió con lavados con agua.

Al finalizar, se comparó la intensidad de la coloración de los precipitados (proporcional a la concentración de sonda) entre las diluciones de las sondas de *Hm-cycB* y la estándar. Estimamos que la concentración de las sondas sentido y anti-sentido de *Hm-cycB* es aproximadamente de 10 ng/µl. Por tanto, realizamos una dilución 1:50 de la sonda, para utilizarla a una concentración final de 0.2 ng/µl en los ensayos de WMISH.

4.7. Hibridación *in situ* whole-mount (WMISH)

Se llevaron a cabo hibridaciones *in situ* whole-mount para *Hm-cycB* en gusanos adultos enteros (n= 4) (conteniendo embriones tempranos, y oncósferas en sus segmentos grávidos), cisticercoides 0 (n= ~70) y 6 horas post-activación (n= ~70) y larvas en metamorfosis 4-5 dpi (n= ~90), con el fin de ver los patrones de expresión de *Hm-cycB* en cada uno de los estadios mencionados.

En todos los casos, se siguió el protocolo descrito por Koziol et al., 2014 (desarrollado en el Anexo), utilizando las sondas para *Hm-cycB* marcadas con digoxigenina en una concentración final de 0.2 ng/µl.

Tras la permeabilización de los tejidos, se llevó a cabo la hibridación de las sondas a una temperatura de 58°C. Estas sondas se unen con alta especificidad a los ARNm complementarios presentes en los tejidos.

Posteriormente, la sonda se detectó utilizando un anticuerpo anti-Digoxigenina conjugado a peroxidasa (Merck), y tiramida conjugada a FITC como sustrato (previamente sintetizada en el laboratorio según Hopman et al., 1998). La peroxidasa oxida a la tiramida permitiendo que el conjugado fluorescente se una covalentemente a las proteínas que se encuentran próximas al anticuerpo de detección. De esta forma, es posible evidenciar los sitios de expresión del gen de interés mediante una señal fluorescente.

4.8. Detección de H3ser10P por Inmunohistofluorescencia (IHF)

Se utilizó la fosforilación en la serina 10 de la histona H3 (H3ser10P) como marcador de células en mitosis y meiosis (para el caso de las células de línea germinal). Los anticuerpos anti-H3ser10P son altamente selectivos, proporcionando uno de los mejores métodos de detección de células mitóticas disponibles [Hendzel et al., 1997]. También pueden utilizarse para detectar células en meiosis en forma eficiente [Hendzel et al., 1997; Prigent & Dimitrov, 2003; Komar and Juszczynski, 2020].

Esta marca se evidenció mediante inmunohistofluorescencia (IHF), siguiendo el protocolo descrito en Koziol et al., 2014 (protocolo completo desarrollado en el Anexo), utilizando un anticuerpo primario anti-H3ser10P producido en conejo (policlonal, Invitrogen, PA5-17869) en una concentración 1/200. Para la detección se utilizó un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado al fluoróforo Alexa Fluor 546 (Invitrogen, A11010).

Como control negativo, se incluyó una condición sin incorporar el anticuerpo primario. Este control permite comprobar que la señal observada en la detección no es producto de interacciones inespecíficas del anticuerpo secundario, ni de fenómenos de autofluorescencia o *bleedthrough* desde el canal de WMISH.

La inmunofluorescencia se llevó a cabo en fragmentos de aproximadamente 3 segmentos de distintas regiones de la estróbila de gusanos adultos (n= 2) (escólex, región germinativa del cuello, primeros segmentos, y segmentos maduros de distinto grado de desarrollo) en los que previamente ya se había hecho la hibridación *in situ* para *Hm-cycB*. De este modo fue posible analizar la co-localización entre las dos marcas, siendo particularmente relevante el análisis a nivel de las células germinativas del cuello y a nivel de los sistemas reproductivos femeninos y masculinos.

Además de realizar la IHF en fragmentos pequeños, para asegurar que los anticuerpos penetraran en los tejidos internos, los pasos de incubación con los anticuerpos se extendieron durante tres días.

También se incluyó un paso de recuperación de epítipo inducida por calor [Ramos-Vara, 2005; Koziol et al., 2014], como sugiere el fabricante del anticuerpo, probando diferentes protocolos como se detalla en la siguiente sección.

4.8.1. Recuperación de epítipo inducida por calor (HIER)

El proceso de fijación con paraformaldehído (PFA) permite la conservación de la morfología y la arquitectura tisular, pero genera entrecruzamientos que involucran a las proteínas del tejido, lo que puede bloquear epítopes y, en consecuencia, dificultar la unión del anticuerpo.

Para exponer el epítipo se llevó a cabo un proceso de recuperación de epítipo inducida por calor (Heat Induced Epitope Retrieval, HIER), que implica la incubación de las muestras en buffers específicos a alta temperatura, para recuperar la reactividad del antígeno.

Con el fin de determinar la mejor condición para hacerlo, se pusieron a prueba dos buffers: buffer citrato 10 mM (pH=6) y buffer Tris 50 mM - EDTA 2 mM (pH=9), calentando a 99°C durante 20 minutos en ThermoBlock.

Como resultado, se observó una señal más intensa para el caso del uso de Buffer citrato. Cabe destacar, que a pesar de que se obtuvo una mejor señal para el caso en que se realizó el HIER, se logró obtener señal sin hacer el procedimiento. Sin embargo, consideramos que esto podría conllevar a una subestimación de las células que se encontraban en mitosis, dado que tal vez el anticuerpo no estaba accediendo a todas las regiones de tejido del corte y no todas las células que exponían la histona H3 fosforilada. Por este motivo, a continuación, realizamos el HIER para las inmunohistofluorescencias utilizando buffer citrato 10 mM (pH=6).

Esta puesta a punto también permitió corroborar que es posible llevar a cabo la inmunofluorescencia, incluyendo un paso de HIER, sobre gusanos en los que previamente se realizó WMISH, sin perder la marca de la sonda.

4.9. Marcado metabólico con EdU

Para determinar si *Hm-cycB* se expresa en fase S, se realizaron ensayos de marcado metabólico con el análogo de timidina EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina). El EdU es incorporado al ADN durante la fase de síntesis del ciclo celular. Posteriormente puede ser detectado, permitiendo evidenciar aquellas células que atraviesan fase S durante el tiempo de incubación.

La detección se realiza mediante una reacción bio-ortogonal de desarrollo de fluorescencia. Se utiliza un compuesto azida fluorescente, que forma un enlace covalente con el grupo alquino del EdU incorporado al ADN, en una reacción catalizada por cobre. No es requerida la desnaturalización del ADN, por lo que el marcado con EdU es compatible con otros procesos, como hibridación *in situ*. Esto nos permitió analizar la co-localización entre la expresión de *Hm-cycB* y las células que atravesaron un evento de síntesis de ADN en los 30 minutos en que se realizó la incubación.

Los gusanos adultos vivos (n= 6) se incubaron en estufa durante 30 minutos en medio RPMI 1640 + 10% suero a 37°C para su aclimatación. Luego, se adicionó EdU al medio de cultivo en una concentración de 10 µM, probando distintos tiempos de incubación (30, 60 y 120 minutos, n= 2 por cada condición) para determinar el menor tiempo de incubación que es posible utilizar en la detección, obteniéndose una buena señal. Nos interesaba reducir el tiempo de marcado para evitar que las células que incorporaran el análogo progresaran en el ciclo celular, ya que nuestro objetivo era probar si *Hm-cycB* se expresa en fase S.

Incubando a los adultos por 30 minutos obtuvimos una marca fuerte de EdU, por lo que utilizamos gusanos de este tiempo para el realizar la hibridación *in situ*. Una vez transcurrido el tiempo de marcado los gusanos se dejaron fijando en PFA 4% en PBS-DEPC (libre de RNasas) durante toda la noche. Al día siguiente se colocaron en metanol libre de RNasas y reservaron a -20°C para su posterior uso en hibridación *in situ* con la sonda para *Hm-cycB*.

El revelado de EdU se realizó utilizando el kit comercial Click-iT Plus EdU Alexa Fluor 555 Imaging Kit (ThermoFisher), una vez finalizado el protocolo de WMISH, para obtener gusanos co-marcados. Se siguieron los pasos establecidos en el protocolo de detección de este kit.

4.10. Obtención y procesamiento de imágenes de microscopía

Las imágenes de microscopía confocal fueron obtenidas mediante el uso del microscopio de barrido láser confocal Zeiss LSM800 del Instituto Pasteur y posteriormente analizadas utilizando el software FIJI [Schindelin et al., 2012].

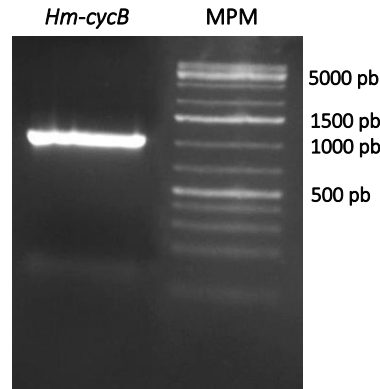
Para las imágenes de experimentos de co-marcado (WMISH para *Hm-cycB* y EdU o IHF para H3ser10P) se cuantificaron las células que presentaban ambas marcas utilizando la herramienta Cell Counter de FIJI. También se utilizó esta herramienta para determinar el número de núcleos que formaban parte de cada roseta en los testes, mediante cuantificación en los diferentes planos del Z-stack.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Amplificación de la región codificante para *Hm-cycB*

Mediante electroforesis fue posible corroborar la amplificación específica de la región codificante para *Hm-cycB* por RT-PCR (Figura 5). Se obtuvo un único producto del tamaño esperado (888 pb), en una alta concentración.

Figura 5: Resultado de la amplificación de la región codificante para *Hm-cycB*. Electroforesis en gel de agarosa 1%. En el primer carril se sembró el producto de PCR. Se obtuvo una banda del tamaño esperado. En el segundo carril se sembró el marcador de peso molecular (MPM) GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder.

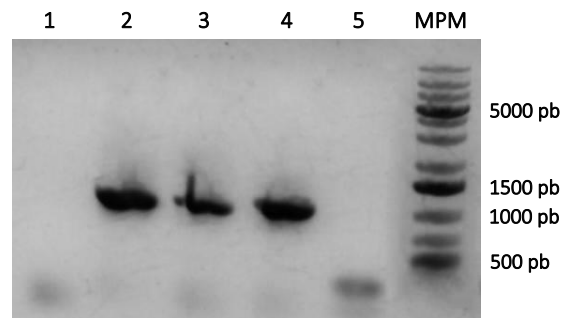


Este producto de PCR fue utilizado posteriormente para el ensayo de ligación. No fue necesario purificarlo desde el gel, dado que no se obtuvo ningún producto inespecífico y se observó una baja concentración de dímeros de primers.

5.2. Clonación del ADNc de *Hm-cycB*

Como resultado de la PCR colonia, obtuvimos productos del tamaño esperado para el inserto en 3 de las 5 colonias transformadas. Identificamos a los clones que nombramos 2, 3 y 4 como posibles clones recombinantes (Figura 6). De estos, se enviaron a secuenciar únicamente los clones 2 y 4.

Figura 6: Resultado de PCR colonia para identificar clones recombinantes. Electroforesis en gel de agarosa 1%. En los carriles 1-5 se sembraron PCR colonia de 5 clones. Para las colonias 2,3 y 4 se obtuvieron bandas del tamaño esperado (888 pb). En el último carril se sembró el marcador de peso molecular (MPM) GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder.



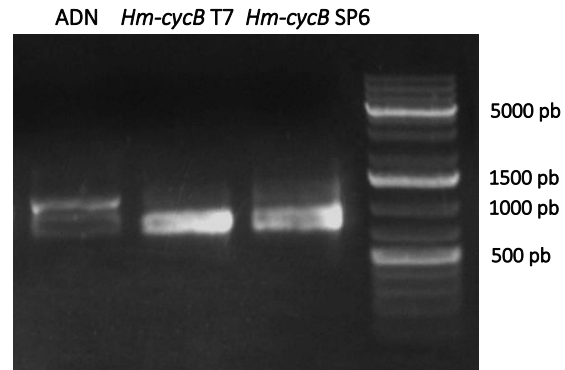
Una vez obtenidas las secuencias, mediante BlastN contra el genoma de *H. microstoma*, confirmamos que el clon 4 contenía el inserto de interés, al obtenerse un porcentaje de identidad de 99.8% con el gen *HmN_000462300*, codificante para la ciclina B canónica de *H. microstoma*. Por tanto, continuamos trabajando con dicho clon.

A partir de este análisis también fue posible conocer la orientación del inserto en el plásmido, respecto a los promotores SP6 y T7. La secuencia obtenida utilizando el primer SP6 alineó contra la hebra codificante (+) del gen *HmN_000462300*, mientras que la secuencia obtenida utilizando el primer T7 alineó con la hebra molde (-). Por tanto, la transcripción a partir del promotor T7 permitió obtener la sonda de detección (anti-sentido), con secuencia complementaria *Hm-cycB*. Por su parte, la sonda sentido (con igual secuencia que el ARNm de interés) que se utiliza como control negativo en los experimentos de hibridación *in situ*, pudo obtenerse a partir del promotor SP6.

5.3. Análisis de la calidad de las sondas

Tras obtener las sondas sentido y anti-sentido para detectar *Hm-cycB* por transcripción *in vitro* y posterior purificación, se corroboró su integridad mediante electroforesis. Tanto para la sonda sentido como anti-sentido se observó ausencia de degradación (Figura 7). Además, la intensidad de las bandas nos permitió estimar que ambas sondas se obtuvieron en una adecuada concentración.

Figura 7: Análisis de integridad de las sondas. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Como referencia, en el primer carril se sembró el ADN utilizado como molde durante la síntesis de las sondas. En el segundo carril se sembró la sonda sentido (*Hm-cycB* T7) y en el tercero la sonda anti-sentido (*Hm-cycB* SP6). No se observó degradación de las sondas. En el último carril se sembró el marcador de peso molecular (MPM) GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder.



Por otro lado, se evaluó la concentración de la marca por Dot Blot, comparando la intensidad de la reacción de revelado (proporcional a la concentración de digoxigenina) de cada sonda con la de la sonda estándar de concentración 10 ng/μL. Estimamos que las dos sondas tenían una concentración inicial de 10 ng/μL, al igual que la sonda estándar (Figura 8).

En base a esto, definimos que para los experimentos de hibridación *in situ* debía utilizarse una dilución de 1/50 de las sondas, de modo de obtener una concentración final de 0.2 ng/μL.

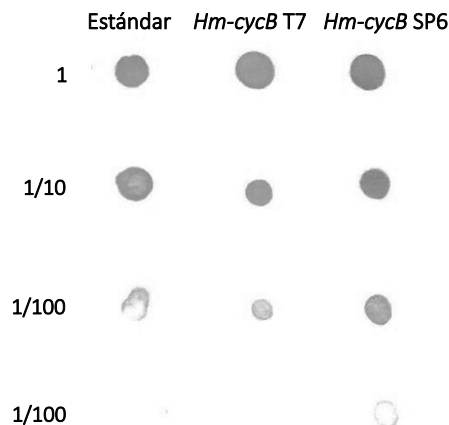


Figura 8: Estimación de la concentración de la marca de las sondas por Dot Blot. Se sembró 1 μL de las diluciones 1, 1/10, 1/100 y 1/1000 de la sonda estándar, y las sondas sentido (*Hm-cycB* T7) y anti-sentido (*Hm-cycB* SP6) de ciclina B.

5.4. Resultados de WMISH: Patrón de expresión de *Hm-cycB* en el adulto de *H. microstoma*

Mediante el uso de la técnica de hibridación *in situ whole-mount* (WMISH) y posterior adquisición de imágenes de microscopía confocal, se analizó el patrón de expresión de *Hm-cycB* en distintas regiones del cuerpo del adulto de *H. microstoma*. La detección de *Hm-cycB* también se combinó con marcado metabólico con un análogo de timidina (EdU) o con inmunohistofluorescencia para la histona H3 fosforilada en la serina 10 (H3ser10P). En las siguientes secciones se describirán y discutirán los resultados obtenidos, primero para las regiones más anteriores (escólex, cuello y primeros segmentos) y luego para las posteriores (segmentos en desarrollo y maduros).

5.4.1. Expresión de *Hm-cycB* en el escólex, el cuello y los primeros segmentos

Comenzamos analizando el resultado de WMISH en la región anterior del cuerpo del adulto. En células de la región germinativa del cuello (Figura 9A, B) observamos una señal citoplasmática fuerte (Figura 9E) que indica una alta expresión de *Hm-cycB*. Examinando más detalladamente, es posible identificar que *Hm-cycB* se localiza en el parénquima medular delimitado por la capa de musculatura longitudinal interna (Figura 9B, C), sitio donde se concentran las células germinativas [Bolla y Roberts, 1971; Koziol, 2017; Rozario et al., 2019]. En el parénquima cortical, que incluye al tegumento y músculo subtegumentario, *Hm-cycB* no se detecta (Figura 9D). Este patrón sugiere que la expresión de *Hm-cycB* ocurre únicamente en células proliferantes (indiferenciadas).

En los primeros segmentos la señal de la hibridación se mantiene fuerte (Figura 9A, C), y luego, hacia segmentos más posteriores, hay un gradiente decreciente de expresión de *Hm-cycB* en la región medular del parénquima.

En el escólex no evidenciamos expresión de *Hm-cycB* (Figura 9A). Aunque en esta región hay células germinativas, las mismas se encuentran en una baja proporción (Figura 25 en el Anexo) [Rozario et al., 2019], lo que podría determinar que la señal de ciclina B correspondiente a estas células sea indistinguible. También es posible que estas células germinativas externas al cuello no expresen *Hm-cycB* (al igual que ocurre con las células germinativas ubicadas en el parénquima de los segmentos maduros, como se describirá más adelante).

La concentración del transcripto en el parénquima medular del cuello era esperable, en tanto las células germinativas se encuentran proliferando activamente en esa región, y *Hm-cycB* es una de las dos ciclinas canónicas identificadas en el genoma de *H. microstoma* como candidatas a participar en la regulación de su ciclo celular (Tabla 1). Además, datos de transcriptómica indican que *Hm-cycB* se expresa en muestras de escólex y cuello (en conjunto) de *H. microstoma* (Tabla 6, datos extraídos de Olson et al., 2018).

En otros platelmintos parásitos, los homólogos de ciclina B parecen expresarse exclusivamente en células germinativas. En el cestodo *Mesocestoides corti*, un homólogo de ciclina B (MCU_012332), ha sido identificado por transcriptómica como un marcador de células proliferantes, presentando un enriquecimiento significativo en esta población celular (resultado de la tesis de doctorado de Alicia Costáble, 2019). En forma concordante, la expresión del ortólogo de *Echinococcus multilocularis* (*EmuJ_001070150*) disminuye si se induce el arresto de las células proliferantes con hidroxiaurea o con el inhibidor de Plk-1, Bi2536 [datos obtenidos por Uriel Koziol, no publicados].

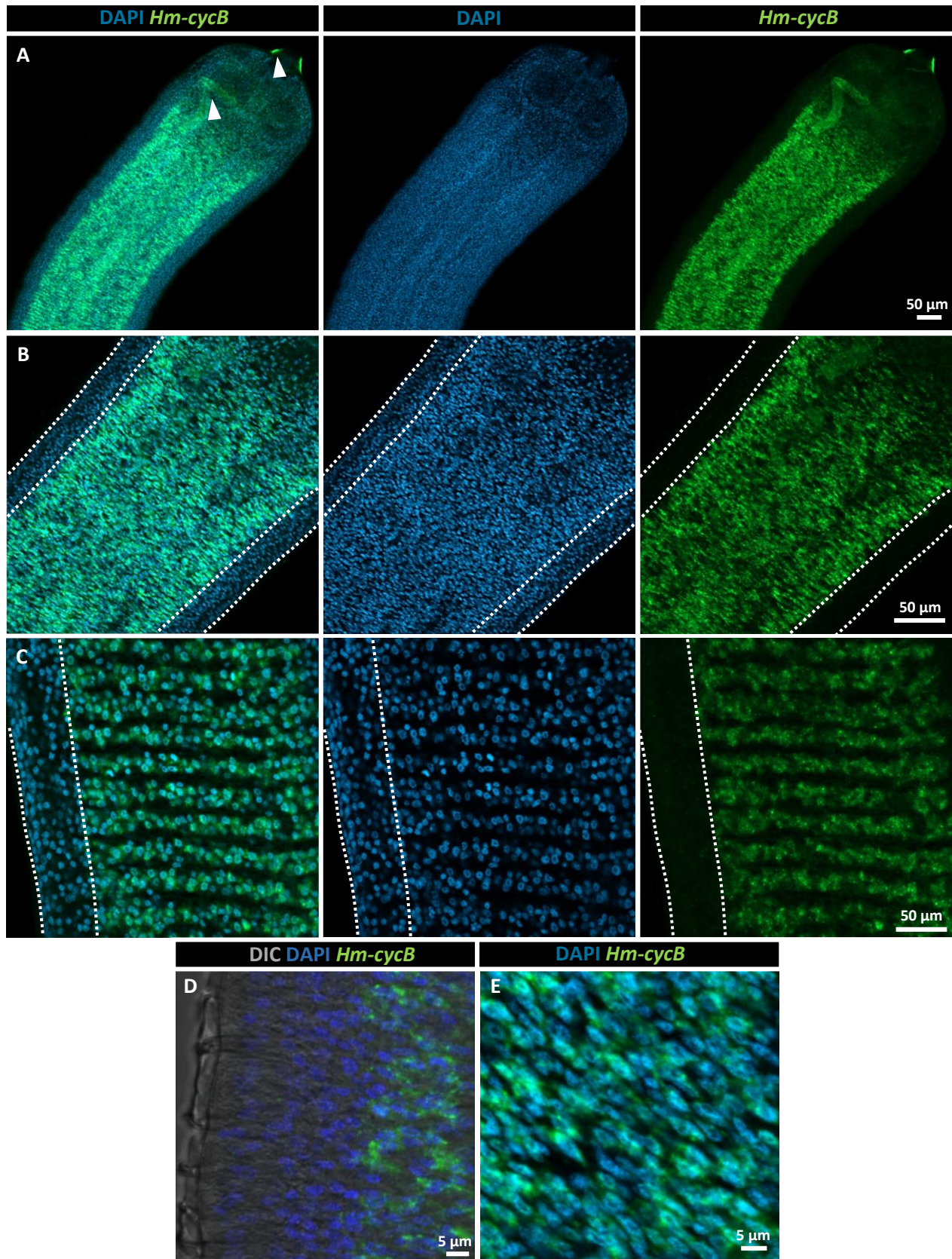


Figura 9: Expresión de *Hm-cycB* en el escólex, región germinativa del cuello y primeros segmentos de *H. microstoma*. **A.** Patrón general de expresión de *Hm-cycB*. La señal en el extremo del roseto, y en uno de los conductos excretores (señalada con cabezas de flechas) es un artefacto recurrente que surge como consecuencia de la acumulación de la sonda en dichos sitios, sin establecimiento de interacciones específicas. **B.** Detalle de la expresión en el cuello. **C.** Detalle de expresión en los primeros segmentos. **D.** Ausencia de expresión de la ciclina B en los tejidos periféricos. **E.** Detalle de expresión de *Hm-cycB* en el parénquima medular de la región del cuello. Se observa la detección del transcrito de la ciclina B por WMISH en verde y los núcleos marcados con DAPI en celeste.

En adultos de *Schistosoma mansoni* (trematodo), el tratamiento con radiación o con ARNi contra *fgfrA* o histona H2B (dos genes requeridos para el mantenimiento de los neoblastos) provocan la depleción de las células germinativas con la concomitantemente reducción de la expresión del ortólogo de *HmN_000462300* (*Smp_082490*) [Collins et al., 2013]. Por tanto, nuestros resultados son consistentes con lo reportado para otras especies de platelmintos parásitos.

5.4.2. Expresión de *Hm-cycB* en segmentos en desarrollo

En la región central de cada segmento en desarrollo se observa la formación del primordio genital, un conjunto de células con capacidad proliferativa que da lugar a los sistemas reproductores [Koziol et al., 2010; Koziol, 2017].

En aquellos segmentos donde se empieza a desarrollar el primordio genital (Figura 10A), la señal de hibridación *in situ* para *Hm-cycB* disminuye significativamente a nivel del parénquima medular en comparación con la región del cuello, aunque aún se distingue una señal reducida. Por su parte, las células que componen el primordio temprano presentan una señal intensa de *Hm-cycB* (Figura 10A).

En segmentos un poco más maduros, donde es posible visualizar los primordios de los testículos, la expresión de *Hm-cycB* desaparece del parénquima, y es reducida a nivel del primordio, el ducto genital, y los testes nacientes (Figura 10B). Más adelante en el desarrollo, *Hm-cycB* desaparece completamente, y no es detectado a nivel del parénquima, en los testículos tempranos, ni en el ducto genital (Figura 10C).

Sin embargo, sabemos que hay células proliferantes a nivel del parénquima medular de los segmentos en desarrollo y maduros [Koziol et al., 2010; Koziol, 2017; Rozario et al., 2019], como puede evidenciarse por la marca de EdU y de H3ser10P (Figura 11). Estas células germinativas no expresarían *Hm-cycB* (o podrían expresarlo en mucho menor medida que las células germinativas del cuello, siendo el transcripto indetectable por WMISH).

Hasta donde sabemos, *Hm-cycB* (*HmN_000462300*) sería el primer transcripto que se expresa diferencialmente entre estas dos poblaciones de células germinativas en cestodos. Previamente se ha reportado la existencia de genes marcadores de células germinativas, que son esenciales para el mantenimiento de la capacidad proliferativa, pero los mismos se expresan en células germinativas, independientemente de su ubicación (es decir, no se expresan específicamente en la población de células madre indiferenciadas del cuello) [Rozario et al., 2019].

Proponemos que las células germinativas del parénquima medular de segmentos maduros deben estar expresando una ciclina alternativa, probablemente alguna de las ciclinas divergentes que se identifican en el genoma de *H. microstoma*, que son específicas de adultos y presentan una expresión mayoritaria en la región media (segmentos maduros) del cuerpo del cestodo adulto (Tabla 6 y Tabla 7).

En resumen, nuestros resultados indican que *Hm-cycB* no se expresa en células somáticas diferenciadas (que carecen de capacidad proliferativa). En cambio, se expresa en células germinativas de la región del cuello y los primeros segmentos, pero no en células germinativas ubicadas fuera de esta región (escólex y segmentos maduros).

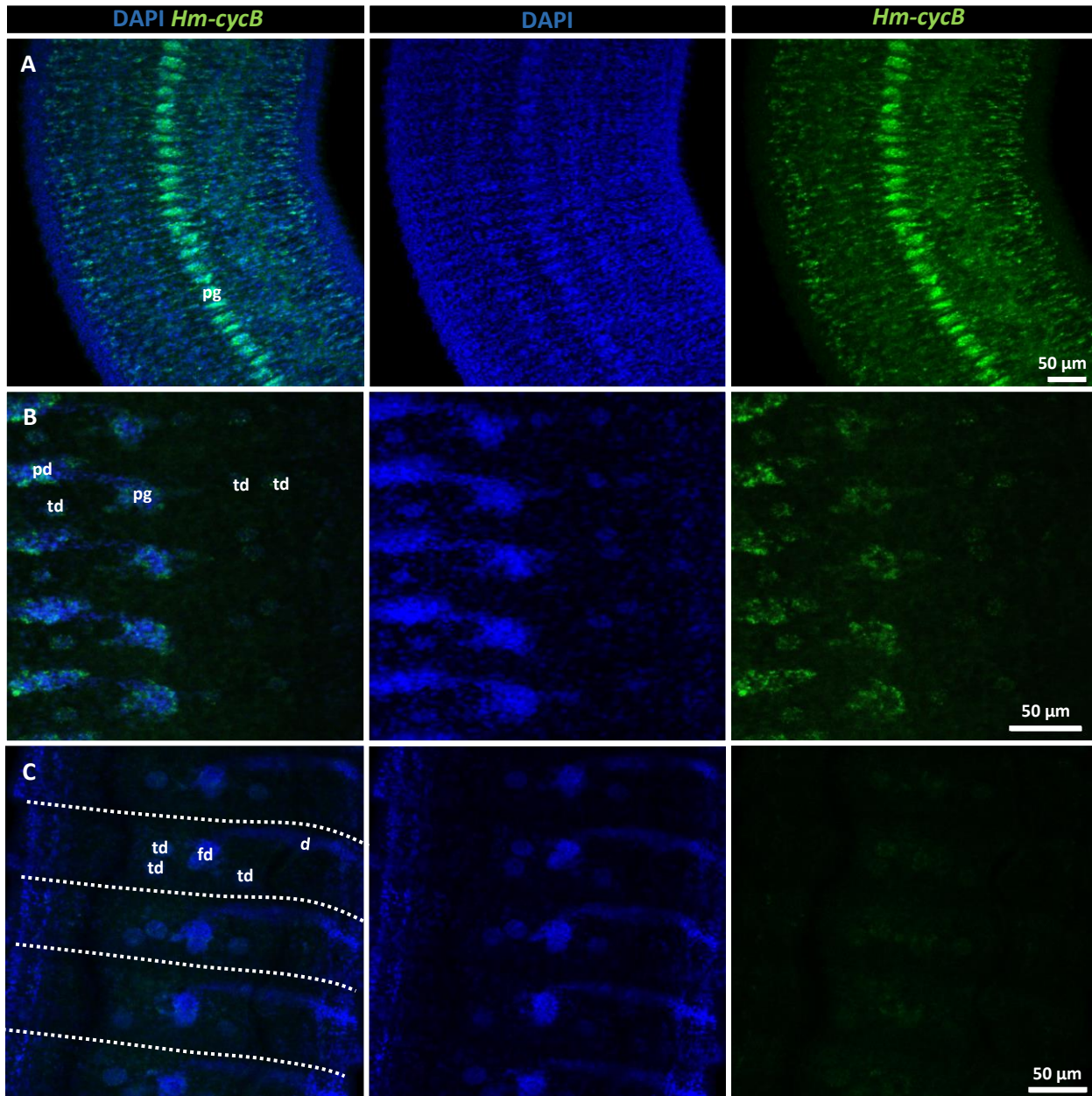


Figura 10: Expresión de *Hm-cycB* en segmentos en desarrollo. **A.** Primordio genital en desarrollo. **B.** Inicio de la diferenciación de los ductos y los testes. **C.** Ductos desarrollados y testes en crecimiento. Se observan los núcleos marcados con DAPI en azul y el transcrito de la ciclina B en verde. pg: primordio genital / td: testes en desarrollo / pd: primordio del ducto genital / d:ducto genital / fd: sistema reproductor femenino en desarrollo

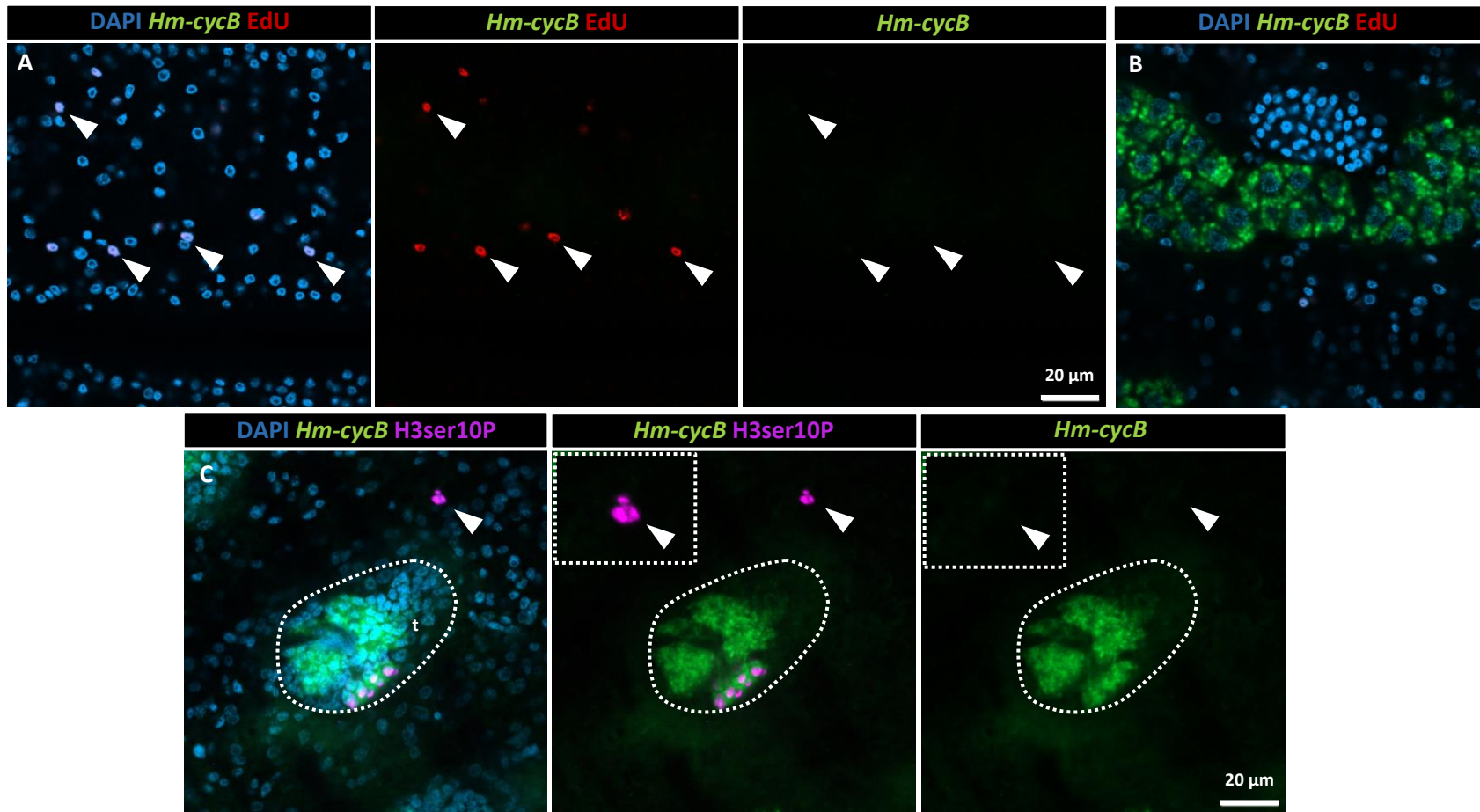


Figura 11: En el parénquima de los segmentos maduros hay células germinativas que no expresan *Hm-cycB*. A. Se observan células proliferantes (EdU^+) que no presentan marca de *Hm-cycB* (señaladas con cabezas de flecha). B. En otro plano focal de la imagen anterior se evidencia una fuerte señal de *Hm-cycB* a nivel del útero, que actúa como control positivo y permite confirmar la ausencia de señal de *Hm-cycB* en las células proliferantes. Se muestra el EdU en rojo, la señal de detección de *Hm-cycB* en verde y el DAPI, marcando los núcleos, en celeste. C. Se observa el ejemplo de una célula germinativa en mitosis (H3ser10P^+) que no presenta señal de *Hm-cycB* (señalada con una cabeza de flecha). En esta misma imagen se puede ver un teste (t) con rosetas expresando *Hm-cycB*.

Tabla 6: Datos de transcriptómica de expresión de ciclinas de *H. microstoma*. Se detalla el promedio del valor de recuentos de lectura mapeados normalizados (FPKM) obtenido para dos réplicas técnicas de cada una de las tres replicas biológicas, de larvas en metamorfosis de 5 días post-infección (dpi), gusanos adultos grávidos enteros, y diferentes regiones del cuerpo del adulto. El código de colores refleja el nivel de expresión (el naranja indica menor y el verde mayor nivel de expresión). Datos extraídos de Olson et al., 2018.

Ciclina de <i>H. microstoma</i>	Código del gen	Larvas Met 5 dpi			Adulto, gusano grávido entero			Adulto, escólex y cuello			Adulto, región medial (Seg. Maduros)			Adulto, posterior (Seg. Grávidos)		
		LV 1	LV 2	LV 3	A 1	A 2	A 3	E-C 1	E-C 2	E-C 3	M 1	M 2	M 3	P 1	P 2	P 3
Ciclina B canónica (analizada en este trabajo)	HmN_000462300	118.87	123.16	122.15	194.40	166.23	213.95	77.60	87.60	95.08	356.02	441.65	377.11	93.18	61.42	13.46
Ciclinas divergentes específicas de adulto (incluidas en el árbol filogenético)	HmN_000771800	0.08	0.16	0.11	139.50	127.57	176.64	0.46	2.59	1.13	230.54	238.24	275.43	62.82	44.20	6.97
	HmN_000771900	0.00	0.00	0.07	283.65	247.14	335.33	0.69	3.56	3.70	512.48	461.35	603.03	129.23	96.05	12.77
	HmN_003003480	No hay datos														
Ciclina muy divergente (excluida del árbol)	HmN_000398100	40.70	46.72	46.26	51.33	42.81	55.27	10.90	13.30	12.96	109.80	138.38	78.42	32.96	11.76	7.62

Tabla 7: Datos de transcriptómica de expresión de ciclinas de *H. microstoma*. Se detalla el promedio del valor de transcritos por millón (TPM) obtenido para cuatro replicas biológicas de cada estadio analizado (gusanos adultos, cisticercoides y oncósferas). El código de colores refleja el nivel de expresión (el naranja indica menor y el verde mayor nivel de expresión). Datos extraídos de Preza et al., 2021a.

Ciclina de <i>H. microstoma</i>	Código del gen	Adultos	Cisticercoides	Oncósferas
Ciclina B canónica (analizada en este trabajo)	HmN_000462300	139.20	54.00	17.20
Ciclinas divergentes específicas de adulto (incluidas en el árbol filogenético)	HmN_000771800	148.10	0.00	0.70
	HmN_000771900	274.70	0.00	0.00
	HmN_003003480	72.50	0.00	0.40
Ciclina muy divergente (excluida del árbol)	HmN_000398100	29.30	2.80	2.30

5.4.3. Patrón de expresión de *Hm-cycB* a lo largo del ciclo celular de las células germinativas

A continuación, analizamos la expresión de *Hm-cycB* en relación a las distintas fases del ciclo celular en las células germinativas. Clásicamente la ciclina B comienza a transcribirse en etapas tardías de fase S, y el ARNm aumenta concomitantemente con la progresión de la fase G2, para alcanzar un máximo de expresión en fase M [Pines & Hunter, 1989; Domínguez et al., 2016; Saldivar et al., 2018]. Si en *H. microstoma* la ciclina B cumpliera sus funciones canónicas conservadas, interactuando con la kinasa dependiente de ciclina 1 (Cdk1) para mediar al ingreso a fase M, se esperaría observar el patrón descrito en otros organismos, con una expresión prácticamente exclusiva en G2/M. Sin embargo, la ausencia de otras ciclinas canónicas plantea la posibilidad de que la ciclina B no se exprese únicamente en dicha fase del ciclo celular en *H. microstoma*. Para poner esto a prueba, comenzamos realizando una inmunohistofluorescencia (IHF) con anticuerpos específicos para H3ser10P, una marca específica de mitosis [Hendzel et al., 1997; Prigent & Dimitrov, 2003], en gusanos sobre los cuales previamente se había llevado a cabo una WMISH para *Hm-cycB*.

Como resultado, observamos que las células positivas para la modificación de la histona H3 expresan *Hm-cycB* (Figura 12). Se cuantificaron al azar 100 células que presentaban señal de IHF, a nivel de la región germinativa y los primeros segmentos, y se evidenció que todas las células con marca de mitosis se encontraban expresando el transcripto para la ciclina (Figura 12B, C). En la parte C de la Figura 12 se observa el detalle de una célula en mitosis que presenta una intensa señal de *Hm-cycB*, y una célula en anafase, que presenta ambas marcas, pero la señal de *Hm-cycB* es reducida. En base a estos resultados, es posible concluir que *Hm-cycB* se expresa en fase G2/M, y que el ARNm estaría siendo degradado al final de la metafase, como típicamente ocurre durante la progresión del ciclo mitótico en otros animales.

No obstante, si se tiene en cuenta la duración estimada de las diferentes fases del ciclo celular se ve que hay más células *Hm-cycB*⁺/H3S10P⁺ de las esperadas. La duración aproximada del ciclo celular en las células de la región germinativa de *H. diminuta* (cestodo cercano a *H. microstoma*) se estima en 8.5 hs, de las cuáles 3.2 hs (38 % de la duración total del ciclo) se corresponderían al transcurso de la fase G2/M [Bolla & Roberts, 1971]. Por tanto, se esperaría que cerca del 38% de las células germinativas del cuello presenten expresión de ciclina B. Aunque no realizamos la cuantificación de la totalidad de las células que presentan señal para *Hm-cycB*, es evidente que un porcentaje mucho mayor de células presentó marca de *Hm-cycB* (Figura 12), lo que nos permitió conjeturar que probablemente la ciclina B no era específica de G2/M y podía expresarse también durante la fase S.

Por ello, a continuación, se incubaron parásitos con EdU, un análogo de timidina que es incorporado al ADN de las células en etapa de síntesis, para posteriormente llevar a cabo la detección de *Hm-cycB* y analizar la existencia de células co-marcadas que permitieran investigar la expresión del transcripto durante la fase S.

En un inicio buscamos minimizar el tiempo de incubación con EdU, para asegurar que las células que incorporaron el análogo no progresaran más allá de fase S en el ciclo. Previamente, en el laboratorio se utilizaba un tiempo de marca de 2 hs, y decidimos probar incubaciones de 60 y 30 min. Con la condición de menor tiempo (30 min) obtuvimos buena señal (Figura 25 en el Anexo), por lo que utilizamos gusanos de esta condición en la hibridación *in situ* para *Hm-cycB*.

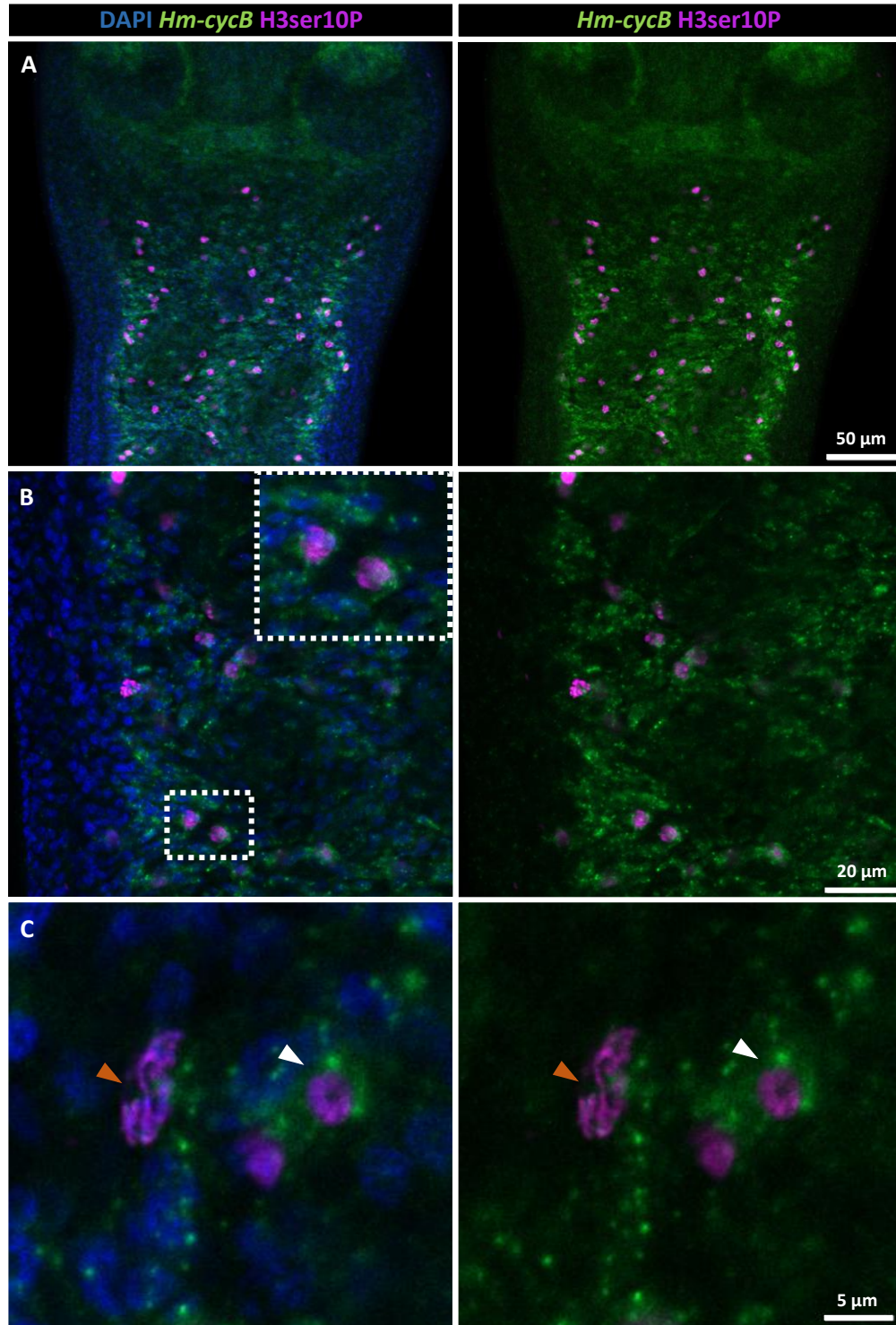


Figura 12: Co-marcado con H3ser10P y *Hm-cycB* en la región del cuello de *H. microstoma* adulto. **A.** Patrón general de co-marcado en la región del cuello. **B y C.** Detalle de células H3ser10P⁺ y *Hm-cycB*⁺ de la región germinativa del cuello. En C la cabeza de flecha blanca señala una célula que presenta ambas marcas, y la naranja una célula en anafase H3ser10P⁺ con reducida señal de *Hm-cycB*. En verde se muestra la señal de WMISH para *Hm-cycB* y en magenta la señal de IHF para H3ser10P.

Encontramos que células que expresan *Hm-cycB* presentaban incorporación de EdU (Figura 14B). Siguiendo la misma aproximación que para la marca de mitosis, se seleccionaron 100 células EdU⁺ al azar y se analizó si presentaban señal de WMISH. Del total de las células analizadas, 98 presentaban una marca clara de *Hm-cycB*, y dos tenían una marca más leve.

Si se presume que *Hm-cycB* se expresa únicamente en G2/M, tras una incubación con EdU de tan sólo 30 min, se esperaría una reducida co-localización con *Hm-cycB*, correspondiente con aquellas células que incorporan el análogo de nucleósido en los últimos 30 min de la fase S, y expresan *Hm-cycB* al ingresar a G2. En *H. diminuta* la fase S tiene una duración de 2.3 horas (138 minutos) [Bolla & Roberts, 1971]. Por tanto, si la duración de la fase S en *H. microstoma* es igual o similar a la de la especie cercana, se esperaría expresión de *Hm-cycB* en aproximadamente el 19% de las células EdU positivas, en base a la relación del tiempo de marca (30 min) y el tiempo de duración de la fase de síntesis (Figura 13). En contraste, observamos que prácticamente la totalidad de las células que presentaron incorporación de EdU también exhiben señal de *Hm-cycB*, por lo que es posible concluir que *Hm-cycB* se expresa a lo largo de la fase S, y no únicamente durante la fase G2/M, en las células germinativas del cuello de *H. microstoma*.

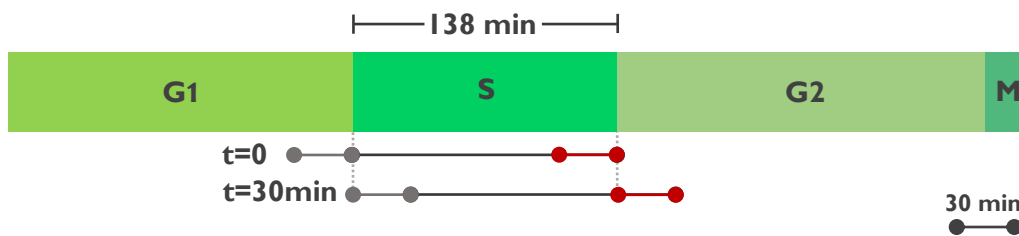


Figura 13: Esquema del marcado con EdU. El análogo de timidina es incorporado por la población de células que se encontraban inicialmente en fase S y las células que ingresan a fase S desde G1 (marcadas en gris claro) durante el período de incubación. Aquellas células que se encontraban en los últimos 30 min de la fase S (representadas en rojo), ingresan a G2, y son las células para las que se esperaría co-localización entre EdU y *Hm-cycB* si el transcripto fuera específico de G2/M (19% del total de las células marcadas = $[138+30\text{min}] \times 100\%/30\text{min}$).

Analizando la bibliografía, encontramos que en planarias se ha descrito la expresión de un homólogo de ciclina B (*smedcyclinB*) en el 96% de las células que integran una población de neoblastos identificada por FACS [Reddien et al., 2005], lo que indica que la expresión tendría lugar durante todas las fases del ciclo celular, incluida fase S. Por similitud de secuencia (BLAST) observamos que *smedcyclinB* (*SMESG000060055*) presenta homología con ciclinas B, pero en base a nuestros análisis filogenéticos observamos que no agrupa con ciclinas B de bilaterales ni de platelmintos parásitos (Figura 4), por lo que no sería el ortólogo del gen de ciclina B de *H. microstoma*. Sin embargo, esto es un indicio de que la expresión de ciclinas M en fase S podría ser un mecanismo conservado en platelmintos ante la falta de ciclinas G1/S y S.

Dada la ausencia de homólogos de ciclina A y E, interactores canónicos de la quinasa CDK2, la expresión de *Hm-cycB* (*HmN_000462300*) durante fase S resulta particularmente intrigante, y plantea la posibilidad de que esta ciclina este cumpliendo una función en dicha fase del ciclo celular en las células germinativa del cuello.

La ciclina B podría estar interactuando con CDK2, sustituyendo a las ciclinas ausentes, para formar un complejo activo capaz de promover la fase de síntesis. También sería posible que CDK2 no actúe a nivel del ciclo celular mitótico, y que CDK1 releve su función en las células proliferantes de la región germinativa del adulto de *H. microstoma*.

En otros organismos, CDK2 parecería ser prescindible para el ciclo celular [Hochegger et al., 2008]. Por ejemplo, ratones knock out para esta enzima son viables y no presentaban alteraciones visibles (aunque tanto machos como hembras resultan estériles como consecuencia de defectos meióticos) [Ortega et al., 2003].

En planarias existe un homólogo de CDK2, pero el mismo se expresa en forma muy reducida, lo que sugiere que puede ser prescindible como reguladora del ciclo celular [Zhu et al., 2013].

En forma concordante, en *H. microstoma* un homólogo de quinasa dependiente de ciclina (*HmN_000704800*), que por homología de secuencia (BLAST) parecería corresponderse con una CDK2, se expresa en forma reducida en el adulto del cestodo y particularmente a nivel de la región del escólex y cuello [Olson et al., 2018], donde se concentran las células mitóticas.

Por otro lado, múltiples estudios previos plantean que CDK1 es capaz de promover el ingreso a fase S cuando CDK2 se encuentra ausente [Santamaría et al., 2007; Sherr et al., 2004; Aleem et al., 2005]. En *Xenopus* se propone que CDK1 es capaz de regular el ingreso a fase S en tejidos que naturalmente no expresan ciclina A y son depletados en CDK2 [Pacek et al., 2004]. En embriones de ratón que carecen de quinasas interfásicas, la quinasa CDK1 es capaz de formar complejos bioquímicamente activos con todas las ciclinas [Santamaría et al., 2007], lo que indica que, al menos en mamíferos, CDK1 es la única quinasa dependiente de ciclina esencial, capaz de ejecutar todos los eventos necesarios para impulsar la división celular.

Adicionalmente, existe evidencia de que CDK1, mediante la interacción específica con la ciclina B, su activador clásico, podría participar de la regulación de la fase S [Pacek et al., 2004, Moore et al., 2003]. Por ejemplo, se ha demostrado que el complejo ciclina B1-CDK1 posee la capacidad de inducir el ingreso a la fase S, si se promueve su importación al núcleo y se estimula su actividad [Moore et al., 2003]. Esto propondría que el complejo tiene la capacidad intrínseca de regular la fase de síntesis, y que en caso de que el complejo ciclina B-CDK1 pudiera estar cumpliendo la función de promoción de la síntesis de ADN y el ingreso en fase M, la regulación de las dos funciones se regule en base a la concentración de la ciclina B y su localización [Moore et al. 2003].

Esto permite pensar que, en las células germinativas de cestodos, el complejo ciclina B-CDK1 pueda estar regulando la transición G1/S, y la progresión de la fase S, en adición a sus funciones canónicas durante la mitosis. La posible expansión de las funciones de la CDK1 en la regulación del ciclo celular podría hacer a los platelmintos parásitos especialmente vulnerables a compuestos inhibidores de esta quinasa.

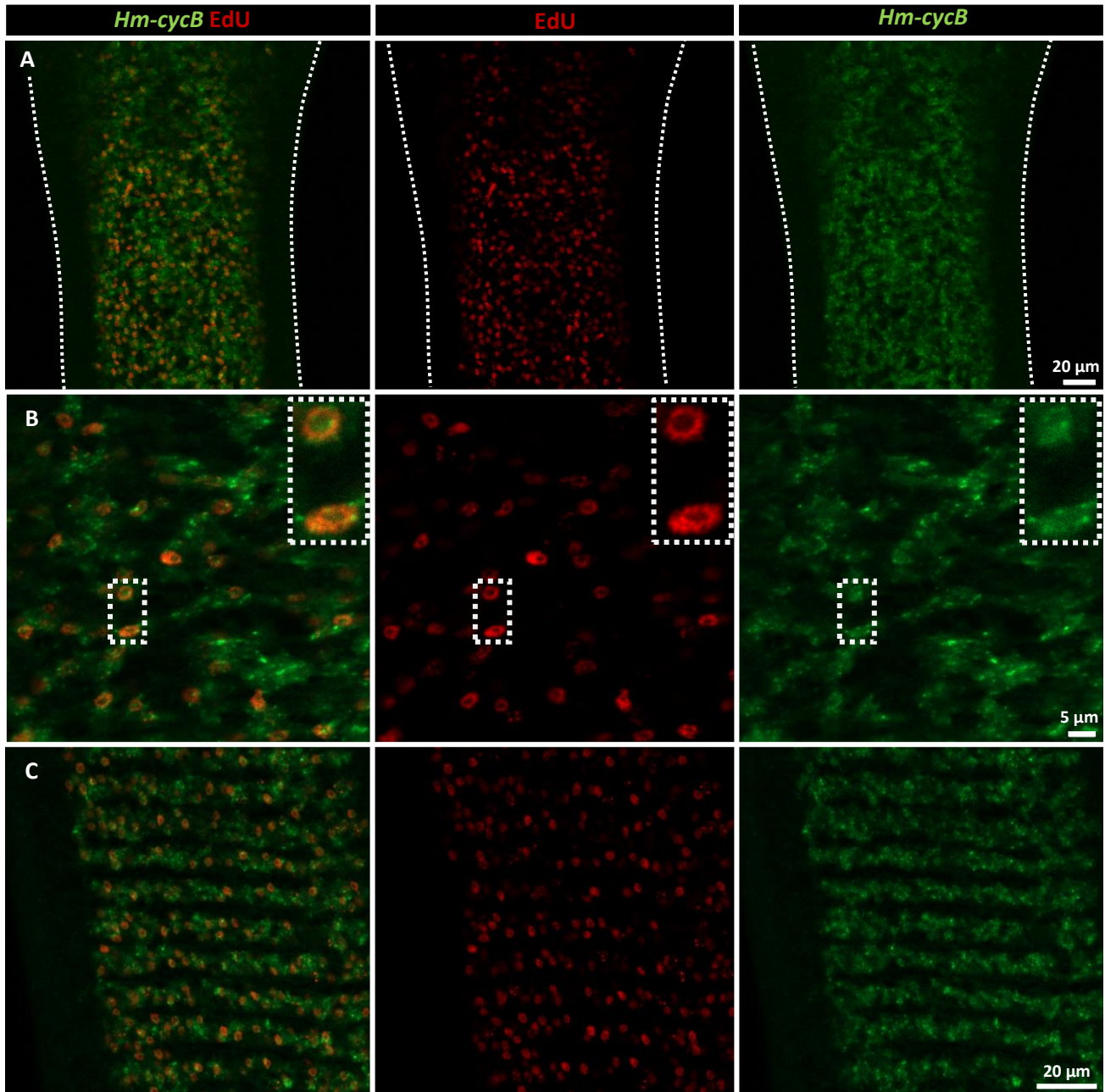


Figura 14: Co-marcado con EdU y *Hm-cycB* en la región del cuello y primeros segmentos de *H. microstoma* adulto. Los gusanos adultos fueron incubados con EdU (en rojo) 30 minutos y tras ser fijados *Hm-cycB* se detectó por WMISH (en verde). **A.** Patrón general de co-marcado en la región germinativa del cuello. **B.** Detalle de células germinativas del cuello co-marcadas con EdU y el transcripto de ciclina B. **C.** Patrón general de co-marcado en los primeros segmentos.

5.4.4. Expresión de *Hm-cycB* en segmentos maduros: *Hm-cycB* en el sistema reproductor masculino

En segmentos maduros, comenzamos analizando la expresión de *Hm-cycB* en el sistema reproductor masculino, que se desarrolla tempranamente a partir del primordio genital. En cada segmento se generan tres testes (Figura 15), dentro de los cuáles tiene lugar el proceso de espermatogénesis.

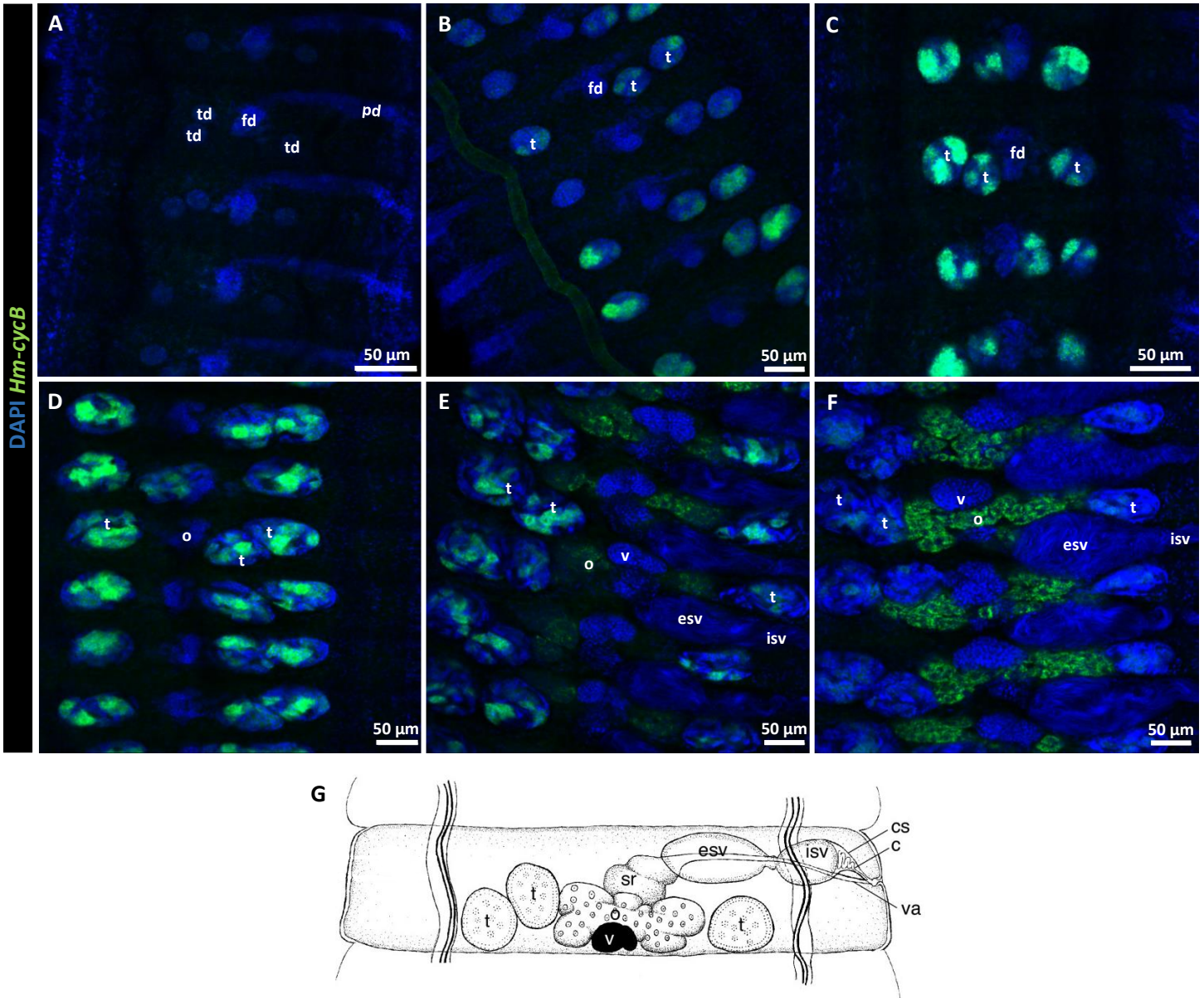


Figura 15: Expresión de *Hm-cycB* en segmentos maduros del adulto de *H. microstoma*. Se observan imágenes de segmentos conteniendo a sistemas reproductores femenino y masculino de diferente grado de maduración. **A.** Testes en desarrollo **B.** Testes pequeños, con primeras rosetas meióticas. **C.** Comienzo de la formación del sistema reproductor femenino. **D.** Testes grandes, crecimiento del ovario. **E y F.** Oocitos en el ovario, espermatozoides diferenciados en las vesículas seminales. Se marcan los núcleos con DAPI en azul y el transcrito de la ciclina B en verde. **G.** Esquema de la anatomía interna de un segmento maduro de *H. microstoma* (extraído y modificado de Cunningham & Olson, 2010). td: testis en desarrollo / pg: primordio genital / pd: primordio del ducto genital / t: testis / fd: sistema reproductor femenino en desarrollo / o: ovario / esv: vesícula seminal externa / isv: vesícula seminal interna / v: glándula vitelina / sr: receptáculo seminal / va: vagina / c: cirro / cs: saco de cirro

Durante la etapa inicial del proceso de formación de gametos masculinos, las espermatogonias se dividen por mitosis manteniendo una conexión citoplasmática, generándose estructuras sincitiales conocidas como rosetas. Como consecuencia de tres divisiones mitóticas sucesivas, se forman rosetas con 8 espermatogonias. Estas espermatogonias sufren una última división mitótica para dar lugar a 16 espermatocitos primarios, que ingresan a meiosis I tras atravesar la fase de síntesis de ADN pre-meiótica. Esta primera división meiótica da lugar a 32 espermatocitos secundarios, que luego se dividen dando origen a 64 espermátidas. Finalmente, las espermátidas se diferencian a espermatozoides (Figura 18) [Miquel et al., 2009; Robison et al., 1978], que se almacenan en las vesículas seminales hasta el momento de la fecundación.

Para determinar el patrón de expresión de *Hm-cycB* a lo largo de todo este proceso, realizamos WMISH con la sonda específica para *Hm-cycB*, en combinación con marcado con EdU o IHF para H3ser10P.

El análogo de timidina (EdU) se incorpora en las fases de síntesis durante la proliferación de las espermatogonias y en la fase S pre-meiótica de los espermatocitos primarios. Por su parte, la modificación de la histona H3 tiene lugar durante la mitosis y la meiosis [Prigent & Dimitrov, 2003] por lo que, durante la espermatogénesis, se observa marca de IHF para esta modificación a nivel de espermatogonias (en mitosis) y espermatocitos (en meiosis). Estas dos marcas nos facilitaron enormemente la determinación de las fases de la espermatogénesis en que existe expresión de *Hm-cycB*.

Como resultado evidenciamos que las espermatogonias no expresan *Hm-cycB* (Figura 16). Esto se ve claramente al analizar resultados de co-marcado, donde no se observa co-localización entre EdU y *Hm-cycB*, ni entre H3ser10P y *Hm-cycB*, en rosetas de 2, 4 y 8 espermatogonias (Figura 16 y Figura 17). A nivel de espermatocitos primarios, que ingresan a meiosis I, *Hm-cycB* presenta una alta expresión (Figura 17). Detectamos señal de WMISH para *Hm-cycB* en rosetas de 16 núcleos únicamente co-localizando con H3ser10P, y no con EdU, lo que indica que la ciclina B comienza a expresarse cuando los espermatocitos I ingresan en meiosis, y no se expresa en la fase S pre-meiótica. En espermatocitos secundarios (rosetas de 32 núcleos) la expresión del transcripto se mantiene. No observamos rosetas de 16 o 32 núcleos que presenten marca de H3ser10 sin expresar *Hm-cycB*, lo que sugiere que la transcripción se mantiene en forma continua a lo largo de las divisiones meióticas.

A nivel de espermátidas redondas, una vez que ya ocurrió la salida de meiosis II (reconocible por que la serina 10 de la histona H3 ya no se encuentra fosforilada) se observan rosetas *Hm-cycB*⁺. Por tanto, la ciclina B se expresaría principalmente durante las divisiones meióticas (meiosis I y II), pero no exclusivamente, ya que en espermátidas *Hm-cycB* también se detecta. En espermátidas elongadas y espermatozoides diferenciados ya no se expresa el transcripto (Figura 17).

El patrón de expresión de *Hm-cycB* durante el proceso de espermatogénesis se resume en el esquema de la Figura 18.

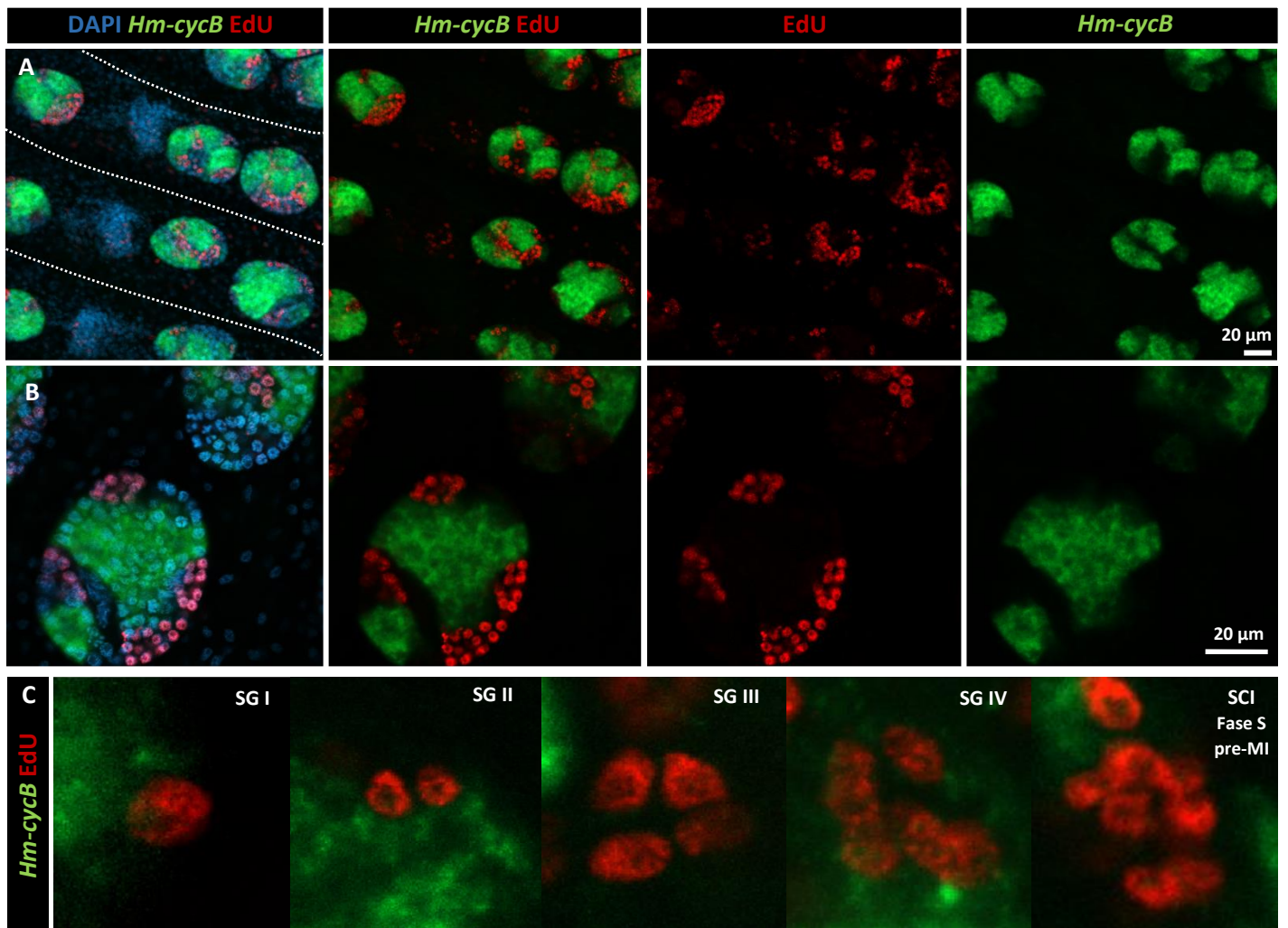


Figura 16: Co-marcado de *Hm-cycB* y EdU en testes de *H. microstoma*. En rojo se marca la incorporación de EdU y en verde el transcripto de ciclina B detectado por WMISH. Se observa ausencia de co-localización entre ambas marcas. **A.** Patrón general de las marcas en testes maduros. **B.** Detalle de patrón observado en un teste. Se evidencia claramente la ausencia de co-localización entre *Hm-cycB* y EdU. **C.** Imágenes representativas de espermatogonias (SG) y espermatocitos I (SC I) que incorporan EdU, y no presentan marca para *Hm-cycB*.

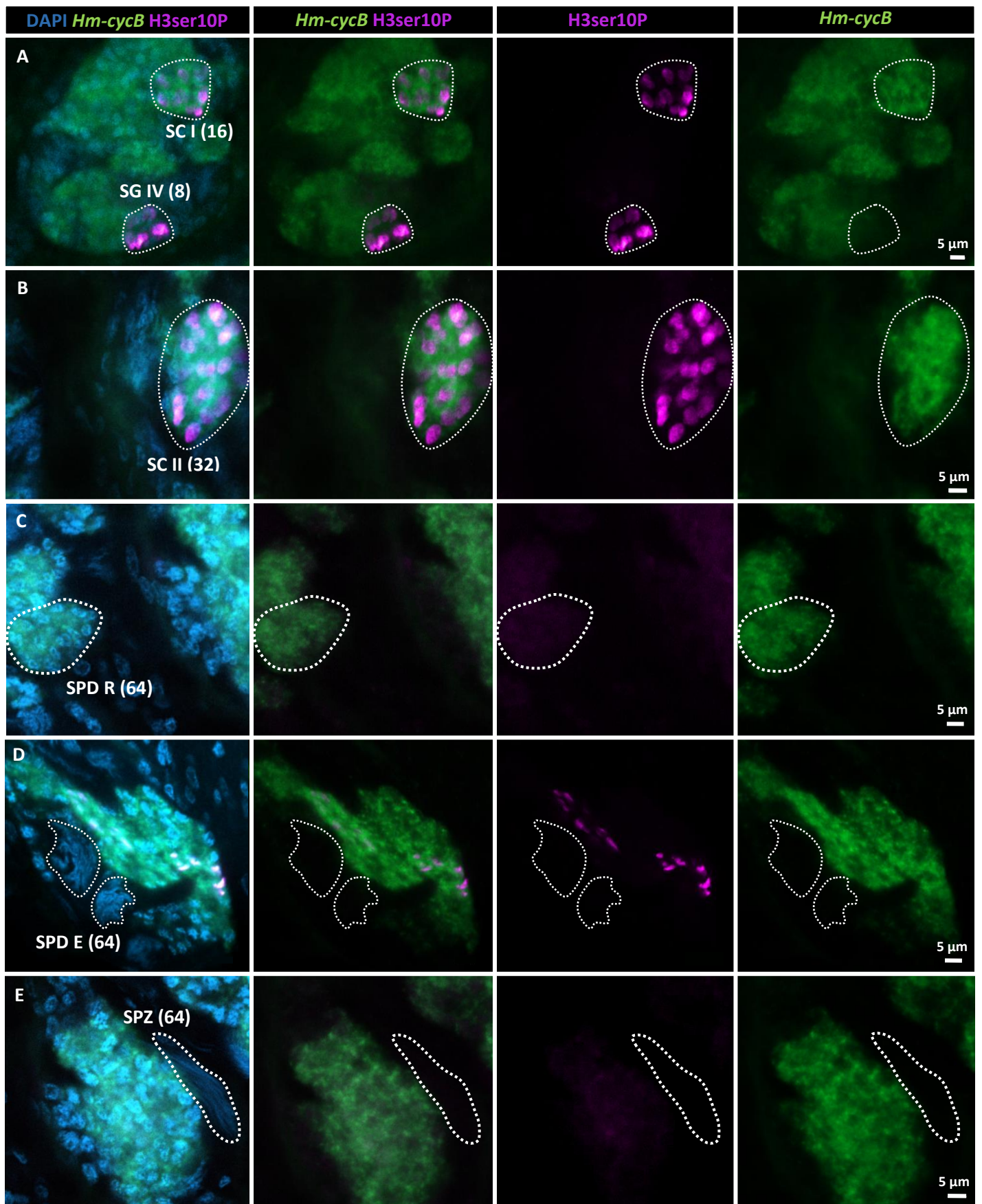


Figura 17: Co-marcado de *Hm-cycB* y H3ser10P en testes de *H. microstoma*. En magenta se observa la marca de la histona modificada y en verde el transcrito de *Hm-cycB* detectado por WMISH. En rosetas de 8 espermatogonias (SG IV) no se observa marca de *Hm-cycB* (A). Los espermatocitos I y II (SC I y II) presentan marca de *Hm-cycB* (A y B), que se mantiene en rosetas de 64 espermatidas redondeadas (SPD R) (C). A nivel de espermatidas elongadas (SPD E) y espermatozoides diferenciados (SPZ) ya no se detecta señal de *Hm-cycB* (D y E).

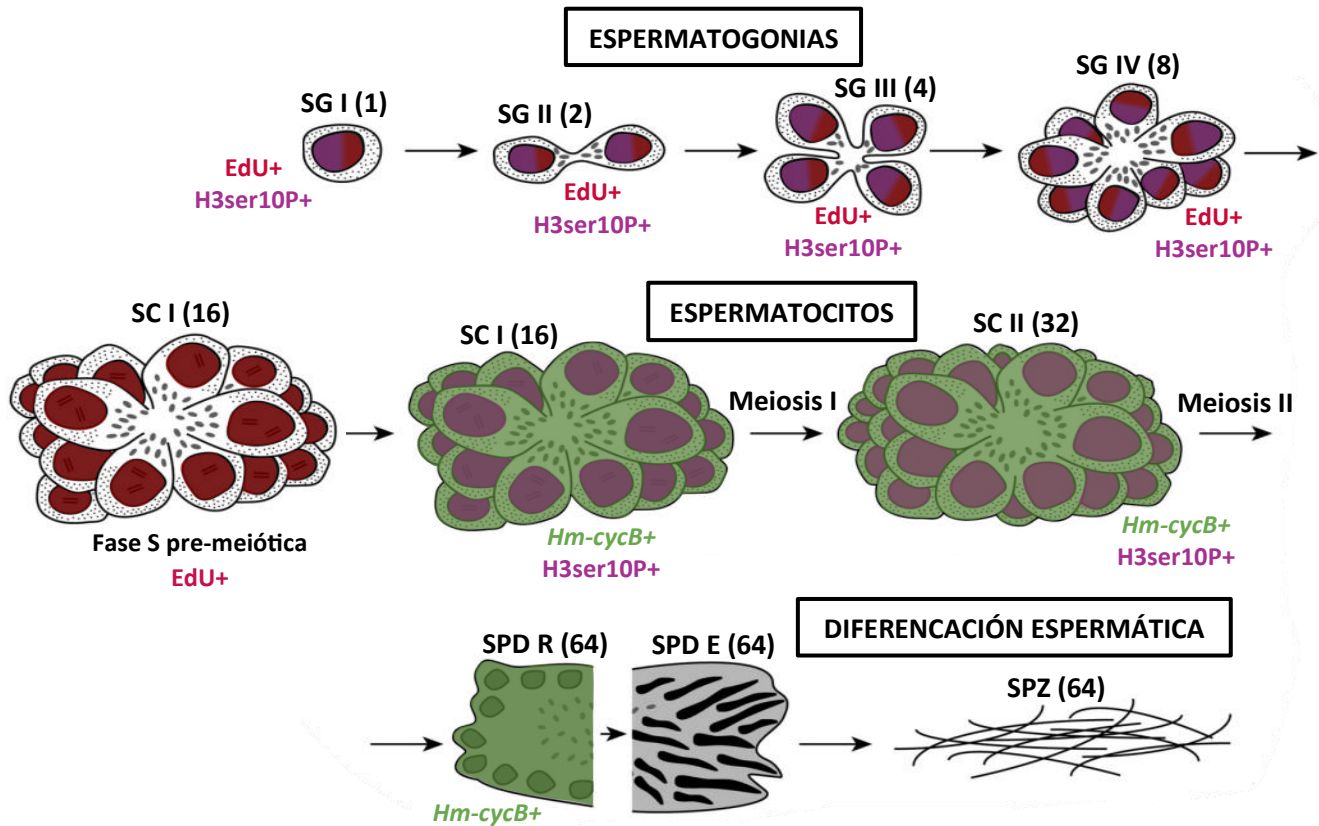


Figura 18: Esquema del proceso de espermatogénesis en *H. microstoma*, donde se indica el patrón de marcas de *Hm-cycB*, H3ser10P y EdU. En verde se marca la señal de *Hm-cycB*, en magenta la modificación de la histona y en rojo el EdU. Las espermatogonias (SG) se dividen mitóticamente, y presentan tanto marca de EdU (en fase S) como de IHF para H3ser10P (en mitosis). Los espermatocitos primarios (SC I) atraviesan una fase S pre-meiótica en la que incorporan EdU. Posteriormente los SC I ingresan a meiosis, y ya no se observa marca de EdU, pero hay expresión de *Hm-cycB* y marca H3ser10P. En espermatocitos secundarios (SC II) se mantiene la expresión de *Hm-cycB* y la marca de H3ser10P. A nivel de espermatidas redondas (SPD R) aún hay señal de *Hm-cycB*, que desaparece recién en rosetas de espermatidas elongadas (SPD E). En espermatozoides diferenciados (SPZ) no se observa expresión de ciclina. Esquema modificado de Miquel et al., 2009.

Con el fin de interpretar nuestros resultados en comparación con lo que ocurre en otros animales, realizamos una búsqueda bibliográfica sobre el patrón de expresión de los transcritos de ciclinas B durante el proceso de espermatogénesis en diferentes especies de vertebrados e invertebrados. Nos centramos en las ciclinas canónicas B1 y B2 (ciclina B en invertebrados), ya que son las más estudiadas en una amplia variedad de organismos. En la Tabla 8 se resume la información recabada.

En ratón, los transcritos de las ciclinas B1 y B2 (*cycB1* y *cycB2*) no son detectados por hibridación *in situ* en espermatogonias. La expresión de *cycB1* aparece en espermatocitos I (en paquiteno), y aumenta hasta alcanzar un máximo en espermatidas redondas (post-meióticas). Por su parte, *cycB2* se expresa mayormente en espermatocitos I (en paquiteno y diploteno) pero también se detecta en espermatocitos II, y en espermatidas redondas (en baja concentración) [Chapman & Wolgemuth, 1993].

A nivel de la proteína, CYCB1 se detecta en espermatogonias (a pesar de que no se observa expresión del transcrito codificante) y espermatocitos (excepto en anafase I y II). La proteína CYCB2 también se expresa en espermatocitos, pero no en espermatogonias. En espermátidas, ninguna de las dos proteínas es detectada (aunque existe expresión de ambos transcritos, e incluso el ARNm de ciclina B1 presenta una expresión máxima en esta etapa) [Brandeis et al., 1998].

En cuanto a la función de estas proteínas durante la espermatogénesis de ratón, la depleción de CYCB2 no afecta la fertilidad de los machos, y la depleción condicional de ciclina B1 a nivel de los testes, muestra que CYCB1 es necesaria para proliferación de las espermatogonias, pero no para la meiosis o la diferenciación de los espermatozoides [Tang et al 2017]. Posiblemente esto se deba a redundancia funcional parcial con la ciclina B2 [Brandeis & Hunt, 1996].

En Medaka (*Oryzias latipes*), *cycB1* y *cycB2* se expresan en todas las etapas de la espermatogénesis, a excepción de los espermatozoides diferenciados. A nivel de proteína, CYCB1 se detecta sólo en espermatogonias y espermatocitos en profase y metafase, con una desaparición transitoria en anafase, mientras CYCB2 se expresa continuamente a lo largo de la espermatogénesis (en espermatogonias, espermatocitos e incluso en espermátidas y espermatozoides post-meióticos). La diferencia en sus patrones de expresión sugiere que las ciclinas B1 y B2 tienen funciones distintas en la espermatogénesis (probablemente, la ciclina B1 participe principalmente en la meiosis, mientras que la B2 esté implicada además en otros procesos durante la espermatogénesis) [Mita et al., 2000].

Como se puede observar, en vertebrados las ciclinas B se co-expresan en varias etapas de la espermatogénesis, y parecen presentar cierta redundancia funcional. En invertebrados, existe una ciclina B canónica que podría cumplir el rol de ambas ciclinas (ciclinas B1 y B2) de vertebrados [Han et al., 2012].

En *Drosophila melanogaster*, se detecta el transcrito de la ciclina B durante la proliferación mitótica de las espermatogonias, pero en una concentración mucho menor que en espermatocitos primarios [White-Cooper et al., 1998]. En estos espermatocitos, la ciclina se transcribe y el ARNm se acumula en un estado traduccionalmente inactivo, hasta que ocurre el ingreso a meiosis, cuando la proteína comienza a sintetizarse [White-Cooper et al., 1998; Baker et al., 2015]. En células post-meióticas (espermátidas redondeadas, elongadas y espermatozoides), la ciclina B no se expresa [White-Cooper et al., 1998]. En *Scylla paramamosain* (cangrejo de barro verde), otro representante de los invertebrados, el ARNm de la ciclina B se expresa en espermatocitos y espermátidas, pero no en espermatogonias.

Como se puede observar, parecería que existe un patrón bastante conservado de la expresión de las ciclinas B durante el proceso de diferenciación de los espermatozoides en animales (Tabla 8).

La mayor diferencia se presenta en la expresión a nivel de espermatogonias, donde en algunos organismos la ciclina B no se expresa mientras en otros sí lo hace, aunque en forma reducida, particularmente en comparación con el estadio siguiente de la espermatogénesis (espermatozoides I). Es posible que en las espermatogonias la expresión sea baja y que, dependiendo de la sensibilidad del método de detección utilizado, el transcrito pueda, o no, ser detectado. Esta idea es respaldada por la presencia de la proteína a nivel de espermatogonias, y la evidencia de la participación de la ciclina B en la proliferación de estas células, en especies en que el transcrito correspondiente no se detecta [Wolgemuth, 2008].

Invariablemente se reporta la expresión de transcritos de ciclina B durante las etapas de espermatocitos I y II (aunque presentando una variación en el nivel de expresión a lo largo de las diferentes etapas de la meiosis), lo que resulta concordante con la participación de estas ciclinas durante las divisiones meióticas. En espermátidas redondas (post-meióticas), la ciclina B se expresa en algunos organismos, pero no en otros. En ratón la expresión del ARNm de la ciclina B1 incluso llega a ser máxima en este punto [Chapman et al., 1993].

Considerando lo descrito para otros animales, la ausencia de señal de *Hm-cycB* en espermatogonias podría indicar que la ciclina no se expresa en dicha etapa (lo que implicaría la expresión de una ciclina sustituta que promueva los eventos de las divisiones mitóticas de la línea germinal), pero también es posible que la expresión de *Hm-cycB* sea reducida y que la sensibilidad del método de detección no permita detectar una concentración tan baja de transcritos.

A nivel de espermatocitos primarios y secundarios, *Hm-cycB* presenta una alta expresión (Figura 17). Esto coincide con lo que se evidencia en otros animales, y sugiere la participación de *Hm-cycB* durante las divisiones meióticas de los espermatocitos.

Hm-cycB también se detecta en espermátidas redondas. Esto sugiere un posible rol de la ciclina en el proceso de diferenciación de las células germinales, aunque también es posible que la proteína no se exprese a nivel de espermátidas, aunque el ARNm se encuentre presente (como ocurre en ratón). En dicho caso, el transcritos podría mantenerse a nivel de espermátidas, pero sin traducirse, y la ciclina B no cumpliría una función en la diferenciación de las espermátidas. Todo el análisis realizado se basa en lo que observamos a nivel de ARNm, y desconocemos lo que ocurre a nivel de la proteína de la ciclina B en *H. microstoma*.

Tabla 8: Expresión de transcritos de ciclinas B durante la espermatogénesis de diferentes organismos. ✓: presencia del transcrito. X: ausencia del transcrito. ?: patrón de expresión desconocido.

Especie	Ciclina	Etapas de la espermatogénesis					Referencias
		Espermatogonia	Espermatocitos I	Espermatocitos II	Espermátidas redondas	Espermátidas elongadas	
<i>Hymenolepis microstoma</i>	B	X	✓	✓	✓	X	Nuestros resultados (Figuras 16 y 17)
<i>Oryzias latipes</i>	B1, B2	✓ (reducida)	✓	✓	✓	X	Mita et al., 2000. doi: 10.2108/jsz.17.365
<i>Drosophila melanogaster</i>	B	✓ (<< espermatocitos)	✓	✓	X	X	White-Cooper et al., 1998. doi: 10.1242/dev.125.1.125
<i>Mus musculus</i>	B1	X	✓	✓	✓ (máx)	X	Chapman et al., 1993. doi: 10.1242/dev.118.1.229
	B2	X	✓ (máx, en paquiteno y diploteno)	✓	✓ (reducida)	X	
<i>Rattus norvegicus</i>	B1	X	✓	✓	✓	X	Gromoll et al., 1997. doi: 10.1095/biolreprod57.6.1312
<i>Caenorhabditis elegans</i>	B1	✓ (< espermatocitos)	✓	✓	X	X	Yoon et al., 2017. doi: 10.1242/jcs.204578
<i>Scylla paramamosain</i>	B	X	✓	✓	✓	X	Han et al., 2012. doi: 10.1016/j.cbpb.2012.07.001
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	B1, B2	X	✓	✓	✓	?	Qiu et al., 2008. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.03.005

5.4.5. Expresión de *Hm-cycB* en segmentos maduros: *Hm-cycB* en el sistema reproductor femenino

El sistema reproductor femenino, compuesto por el ovario y la glándula vitelina (Figura 15, 19), se desarrolla posteriormente al masculino, a partir de células ventrales del primordio genital [Douglas, 1961].

Dentro de los ovarios comienza el proceso de generación de gametos femeninos (ovogénesis). Tempranamente las oogonias proliferan y dan lugar a oocitos I. En el ovario los oocitos I entran en profase I, recombinan el ADN y crecen. Luego son ovulados, fecundados e ingresan al útero (en cestodos, ambas divisiones meióticas transcurren después que la fecundación, a nivel del útero) [Kozioł, 2017]. Como ocurre en forma conservada en metazoarios, los oocitos se mantienen detenidos en profase I hasta que ocurre el proceso de maduración, cuando se retoma la primera división meiótica que da origen a oocitos II [Masui, 2001]. Tienen lugar las dos divisiones meióticas, durante las cuáles se liberan dos cuerpos polares, estableciéndose el pronúcleo femenino, que se fusiona con el masculino [Rybicka, 1966; Swiderski et al., 2004, 2016; Kozioł, 2017]. Finalmente, el cigoto ingresa en mitosis, comenzando el proceso de clivaje embrionario.

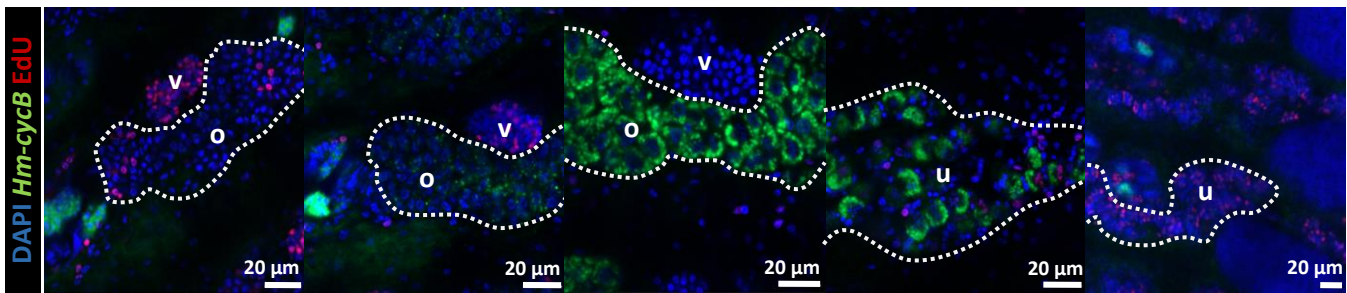


Figura 19: Expresión de *Hm-cycB* en el sistema reproductor femenino. Se incluyen imágenes de microscopía confocal representativas de diferentes grados de madurez del sistema reproductor femenino (mayor madurez hacia la derecha). En azul se observan los núcleos teñidos con DAPI, en rojo la incorporación de EdU y en verde la señal de WMISH para *Hm-cycB*. v: glándula vitelina / o: ovario / u: útero

Analizamos la expresión de *Hm-cycB* a lo largo del proceso de ovogénesis mediante WMISH (Figura 19). Encontramos que, a nivel de oogonias, que se dividen mitóticamente, no se detecta expresión del transcritto (Figura 20). Recién en oocitos I (células grandes, con núcleo prominente, que aún no emitieron un cuerpo polar) comienza a observarse una señal granular que se concentra en un polo de la célula (Figura 20). Esta señal se mantiene presente al continuar la maduración. Los oocitos II (que se distinguen por la liberación de un cuerpo polar) y los cigotos (después de la segunda división meiótica) presentan la misma señal asimétrica de *Hm-cycB*. Al momento en que ocurre la mitosis del cigoto ya no se evidencia la señal granular en un polo de la célula. En cambio, se distingue una señal citoplasmática uniforme.

No logramos analizar lo que ocurre en las etapas inmediatamente posteriores del desarrollo embrionario, dado que es difícil la disección de los embriones tempranos a partir de los tejidos adultos. A nivel de embriones más desarrollados (más de 25 células) se observa la señal de *Hm-cycB* (Figura 20C), hasta un punto en que desaparece. Es posible que en las etapas más tardías de la embriogénesis la ausencia de señal se deba a la imposibilidad de acceder a los embriones con la sonda debido a la formación de envolturas altamente impermeables en los huevos.

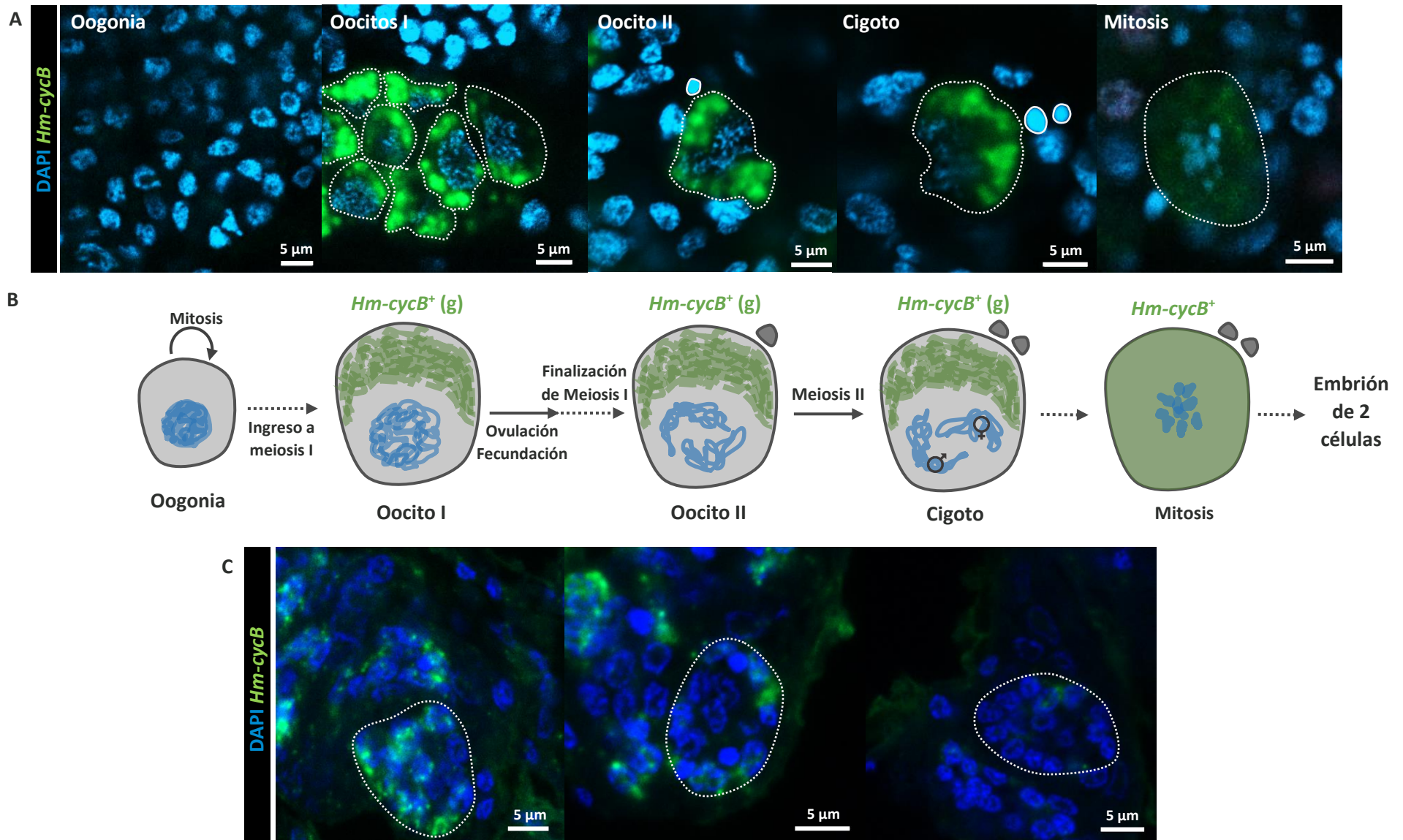


Figura 20: Expresión de *Hm-cycB* durante la ovogénesis y el desarrollo embrionario. A y B. En oogonias no se detecta *Hm-cycB*. A nivel de oocitos I y II se observa la presencia del transcrito de ciclina dispuesto en gránulos (g) que se concentran en un polo de la célula. En el cigoto, aún después de las dos divisiones meióticas, estos gránulos se mantienen. Al momento en que ocurre la primera división del cigoto los gránulos parecen desensamblarse y se distingue una señal citoplasmática uniforme. No sabemos que ocurre en las siguientes etapas de embriones tempranos. **C.** A nivel de embriones más desarrollados se mantiene la señal de *Hm-cycB*, hasta un punto en que desaparece (ya sea porque el ARNm deja de estar presente o porque ya no es posible su detección). En las imágenes de microscopía confocal, se marcan los núcleos con DAPI en azul y la señal de WMISH para *Hm-cycB* en verde.

A partir de los resultados, interpretamos que en oocitos *Hm-cycB* se encuentra formando parte de gránulos citoplasmáticos, que probablemente se originan en la fase de crecimiento y acumulación de productos maternos, durante la detención del oocito en profase I. Previamente, *Hm-cycB* no se detecta en oogonias, aunque el ARNm podría expresarse en baja concentración en dicha etapa, siendo detectable recién cuando se acumula en mayores concentraciones en los gránulos.

Los gránulos se mantienen dispuestos en un polo del citoplasma, a través de ambas meiosis, hasta que tiene lugar la primera división mitótica del embrión. En todos los oocitos y cigotos analizados, los gránulos parecerían concentrarse en la región en la que se localizan los cuerpos polares, lo que se corresponde con el polo animal [Martindale, 2005]. Al momento en que ocurre la mitosis del cigoto, los gránulos se desensamblarían y *Hm-cycB* sería liberado al citoplasma.

La presencia de gránulos de ciclina B en oocitos ha sido evidenciada previamente en múltiples especies, tanto de vertebrados como invertebrados. En *D. melanogaster*, el ARNm de la ciclina B se encuentra formando gránulos en asociación con Nanos y Pumilio [Trcek et al., 2015], dos represores traduccionales conservados [Parisi & Lin, 2000; Kong & Lasko, 2012].

En oocitos de ratón y pez cebra arrestados en profase I, se ha reportado la existencia de gránulos de ciclina B1, que se distribuyen en forma asimétrica en el citoplasma (en pez cebra particularmente en el polo animal del oocito desarrollado [Horie & Kotani, 2016]). En estos gránulos, la traducción del transcripto se encuentra reprimida por asociación con Pumilio 1. Al ocurrir la maduración ovocitaria, los gránulos se desensamblan, el ARNm pasa a estar libre en el citoplasma y la ciclina B comienza a traducirse [Kondo et al., 2001; Kotani et al., 2013].

La activación traduccional del ARNm dormante de la ciclina B, es un requisito para la promoción de la maduración del oocito en muchos animales. Por tanto, la formación de gránulos constituye un mecanismo que regula temporalmente la progresión de la meiosis I de los oocitos [Kotani et al., 2013; Sato et al., 2022].

Por ejemplo, tanto en peces y anfibios (excepto *Xenopus*), la ciclina B se encuentra ausente en oocitos inmaduros [Ihara et al., 1998; Kondo et al., 1997]. En estos organismos la traducción del transcripto de ciclina B almacenado permite la formación del factor promotor de la maduración (MPF), que desencadena la reanudación meiótica al inducir la ruptura de la vesícula germinal (un evento característico de la maduración ovocitaria), la condensación cromosómica y el ensamblaje del huso meiótico [Schmitt & Nebreda, 2002].

En ovocitos de *Xenopus* y ratón, la traducción de ciclina B no es necesaria para los eventos iniciales de la maduración, dada la existencia de una reserva de la proteína que forma un pre-complejo con CDK1, pero la síntesis *de novo* ciclina B es necesaria durante la transición entre las dos divisiones meióticas y para la activación de MPF en la segunda meiosis [Hocheegger et al., 2001; Ledan et al., 2001].

Considerando todo lo anterior, lo que evidenciamos en *H. microstoma* parecería similar a lo reportado para pez cebra o ratón [Kotani et al., 2013], pero en el cestodo los gránulos se desensamblan recién durante la primera división mitótica del embrión, y no en el momento de la maduración de los oocitos I (Tabla 9).

En consecuencia, si *Hm-cycB* se encuentra interactuando con Pumilio y Nanos, almacenado en un estado dormante hasta el desensamblaje de los gránulos (momento en que ocurriría la activación de la traducción), la síntesis de la proteína de ciclina B no sería requerida para las divisiones meióticas ni para la regulación de la maduración ovocitaria en *Hymenolepis*. Esto implicaría la participación de otra ciclina en estos procesos, o la existencia de una reserva de proteína de ciclina B (tal como en *Xenopus* o ratón) que promueve ambas divisiones meióticas. De acuerdo el momento en que los gránulos se desensamblan, la ciclina B sintetizada a partir de los transcritos *Hm-cycB* almacenados podría estar participando a nivel del clivaje embrionario temprano. Sin embargo, no es posible afirmar que los gránulos de *Hm-cycB* sean traducionalmente inactivos y que la proteína de ciclina B no esté siendo sintetizada a nivel de oocitos.

Tabla 9: Patrón de expresión de transcritos de ciclina B durante la ovogénesis de diferentes organismos. ✓: presencia del transcrito. ✗: ausencia del transcrito. ? : patrón de expresión desconocido.

Organismo	Ciclina	Etapa de la ovogénesis				Referencias
		Oogonia	Oocito I	Oocito II	Cigoto	
<i>Hymenolepis microstoma</i>	B	✗	✓ (gránulos asimétricos en el polo animal)	✓ (gránulos asimétricos)	✓ (gránulos hasta división mitótica)	Nuestros resultados (Figura 20)
<i>Mus musculus</i>	B1	?	✓ (ARN dormante en gránulos asimétricos)	✓ (los gránulos se desensamblan)	✓ (< oocitos II)	Kotani et al., 2013. doi: 10.1083/jcb.201302139
<i>Danio rerio</i>	B1	✓ (distribución uniforme en citoplasma)	✓ (ARN dormante en gránulos asimétricos, en polo animal)	✓ (los gránulos se desensamblan)	✓ (<< oocitos II, distribución uniforme en citoplasma)	Kondo et al., 2001. doi: 10.1006/dbio.2000.9990 Kotani et al., 2013. doi: 10.1083/jcb.201302139

5.4.6. Expresión de *Hm-cycB* en segmentos maduros: *Hm-cycB* en la glándula vitelina

La glándula vitelina contiene vitelocitos, células especializadas en la síntesis de vitelo, que sirve como fuente de nutrientes, y componentes de las membranas protectoras que envuelven al embrión [Ubelaker, 1980; Davis & Roberts, 1983]. Tras la fertilización y antes de llegar al útero, el oocito de *H. microstoma* se asocia con un único vitelocito que participa en el proceso de desarrollo del huevo [Swiderski et al., 1968, 1970, Smyth & Mc Manus, 2007].

Aunque se observa incorporación de EdU (Figura 21) en los vitelocitos, indicando que estas células poseen capacidad proliferativa, *Hm-cycB* no se expresa en ninguna etapa del desarrollo de la glándula vitelina (Figura 15). Esto implica que debe haber otra ciclina que participe en la regulación de la proliferación de estas células.

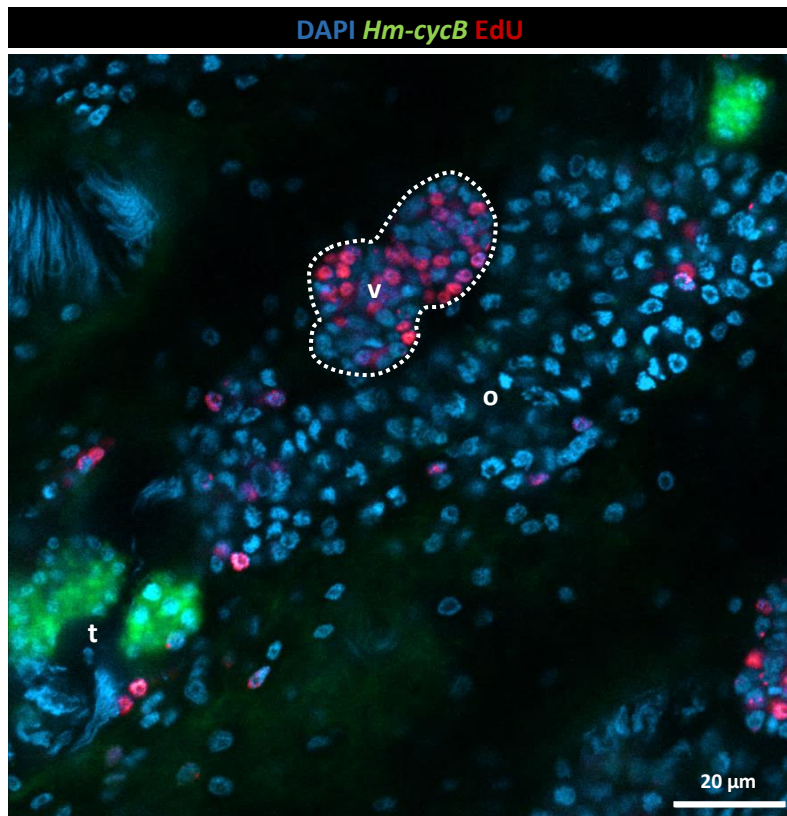


Figura 21: Los vitelocitos proliferan y no presentan expresión de *Hm-cycB*. En verde se observa la señal de WMISH para *Hm-cycB* y en rojo la incorporación de EdU tras una incubación de 30 min. t: teste / o: ovario / v: glándula vitelina

En base al análisis filogenético, proponemos que una de las ciclinas divergentes de *H. microstoma* puede estar expresándose en vitelocitos, regulando su proliferación. Estas ciclinas divergentes son específicas de adulto (Tabla 7), y se expresan predominantemente en la región medial (segmentos maduros) del adulto de *H. microstoma* (Tabla 6). Por tanto, el patrón de expresión es concordante con la expresión a nivel de glándulas vitelinas. Además, una ciclina homóloga de *S. mansoni* (*Smp_342560*) que agrupa en la misma rama de ciclinas divergentes (Figura 4), se expresa en vitelocitos tempranos y tardíos [Wendt et al., 2020], lo que respalda la posibilidad de que una de las ciclinas divergentes de *H. microstoma* se exprese a nivel de la glándula vitelina.

5.5. Resultados de WMISH: expresión de *Hm-cycB* en larvas en metamorfosis y cisticercoides de *H. microstoma*

Se analizó la expresión de *Hm-cycB* en larvas en metamorfosis de 4-5 días post-infección y en cisticercoides activados (0 y 6 hs post-activación). Las condiciones elegidas permiten tener un panorama bastante completo sobre el patrón de expresión de *Hm-cycB* a lo largo del desarrollo de la segunda forma larvaria, ya que analizamos la expresión mientras el cisticercoide aún se encuentra en desarrollo (larvas en metamorfosis), inmediatamente después de la activación (cuando las células germinativas saldrían de un estado de quiescencia), y 6 horas después de la activación (punto en que creemos las células germinativas deberían encontrarse en G2/M, como se explicará más adelante).

Con todas las larvas se llevó a cabo una hibridación *in situ* para *Hm-cycB*. Como control positivo utilizamos la sonda de detección para el transcripto de un transportador de glucosa de la familia SLC5 (*Hm-SLC5*), que se expresa en el tegumento de los cisticercoides (resultado de la tesina de grado de Inés Guarnaschelli). Además, en los cisticercoides activados se realizó IHF para H3ser10P, con el fin de evidenciar células en mitosis.

5.5.1. Análisis de la expresión de *Hm-cycB* en larvas en metamorfosis y cisticercoides

Como resultado de la WMISH para *Hm-cycB*, observamos únicamente una señal de fondo, tenue y uniforme en todas las larvas. Al comparar con el control positivo *Hm-SLC5* es claro que ni en cisticercoides (Figura 23B, C) ni en larvas en metamorfosis (Figura 22) se detecta expresión de *Hm-cycB*. La ausencia del transcripto estaría indicando que no hay expresión en estos estadios, lo que implicaría la expresión de otra ciclina. No obstante, resultados de RNA-Seq indican que *Hm-cycB* (*HmN_000462300*) se expresa en larvas en metamorfosis de 5 dpi [Olson et al., 2018], y que en cisticercoides lo hace en un nivel similar a en adultos [Preza et al., 2021a] (Tabla 6 y 7).

También podría ocurrir que no haya células en G2/M, y que la ciclina sea específica de esta fase del ciclo celular en el caso de los estadios larvarios. Sin embargo, en larvas en metamorfosis de 4 dpi sabemos que hay células en mitosis (resultado de la tesis de doctorado de Jimena Montagne, Figura 26 en el Anexo), y en cisticercoides de 6 hs post-activación esperaríamos que las haya. Ensayos de marcado con EdU indican que, tras la activación, las células germinativas de los cisticercoides ingresan rápidamente en fase S, lo que sugiere que las mismas se encuentran detenidas en G0 (resultados del proyecto de doctorado de Matías Preza). Por otro lado, estimamos, en base a investigaciones previas [Bolla y Roberts, 1971], que la fase S tiene una duración aproximada de 2.3 hs y la fase G1 de 3 hs. Por tanto, 6 horas sería tiempo suficiente para que las células germinativas en G0 retomen el ciclo celular abandonando G1, atraviesen fase S y lleguen a G2/M. Teniendo esto en cuenta, nos propusimos comprobar la presencia de células en mitosis en cisticercoides activados.

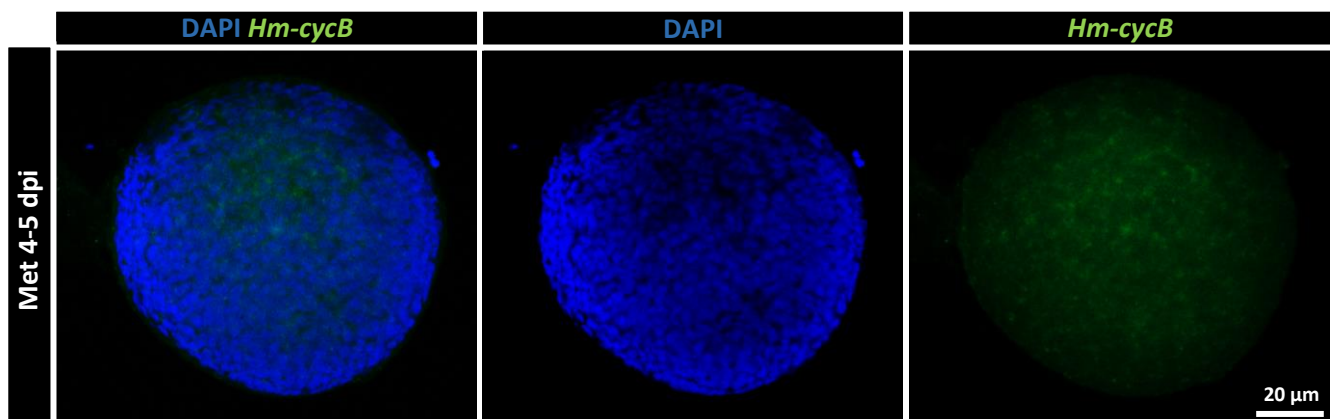


Figura 22: Expresión de *Hm-cycB* en larvas en metamorfosis de 4-5 días post-infección (dpi). Se evidencia la ausencia de señal de WMISH para *Hm-cycB* en estas larvas. En azul se marcan los núcleos teñidos con DAPI y en verde la señal de WMISH para *Hm-cycB*.

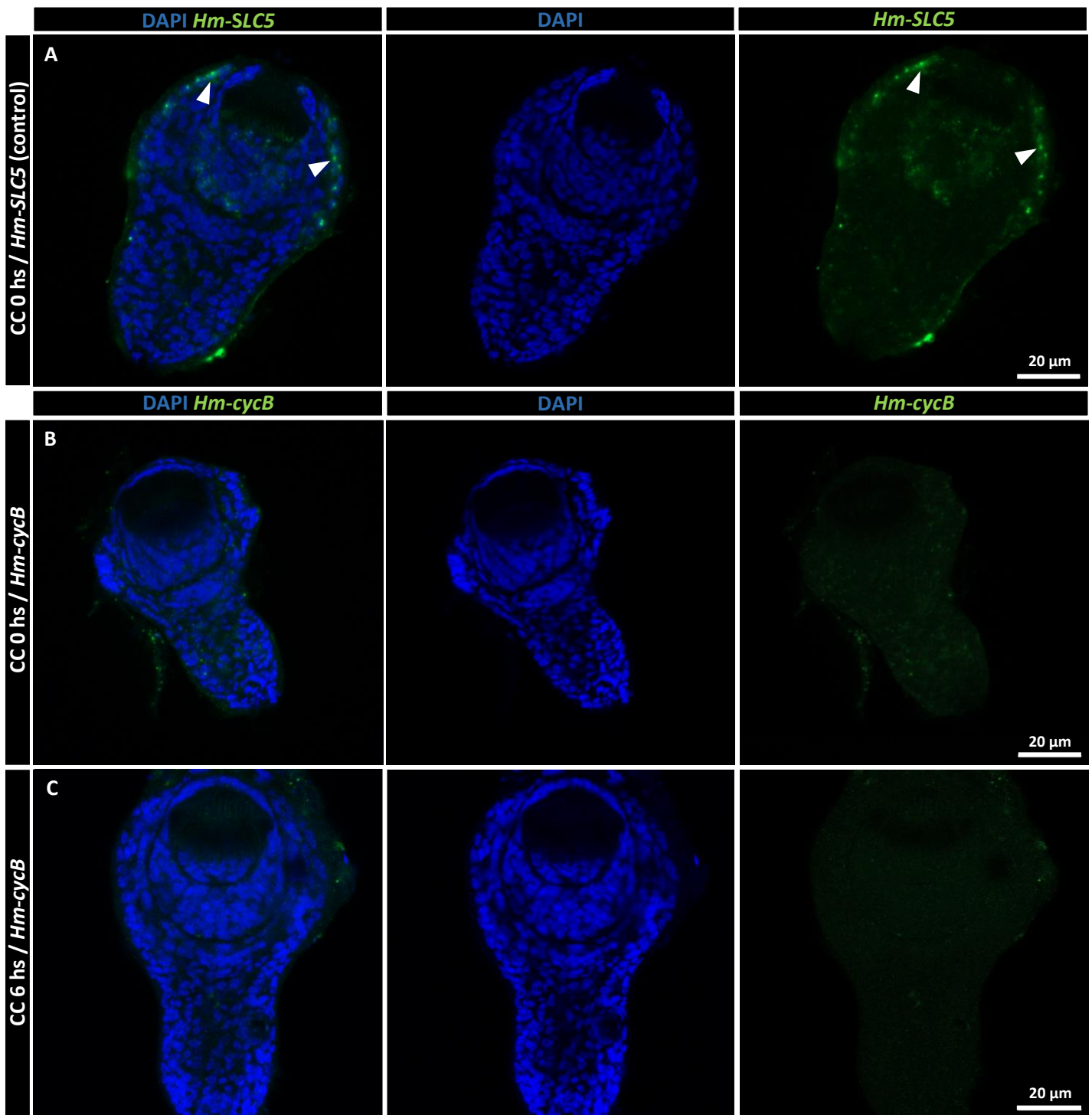


Figura 23: Expresión de la *Hm-cycB* en cisticercoides activados. **A.** WMISH con sonda control (sonda as para el transportador de glucosa *SLC5*, de expresión tegumentaria) en CC 0 hs. Las cabezas de flechas indican puntos de señal positiva de *Hm-SLC5*. **B.** WMISH con sonda as para *Hm-cycB* en CC 0 hs. **C.** WMISH con sonda as para *Hm-cycB* en CC 6 hs. Se evidencia la ausencia de señal de detección de *Hm-cycB* en cisticercoides de ambas condiciones. En azul se marcan los núcleos teñidos con DAPI y en verde la señal de WMISH para cada una de las sondas.

5.5.2. Análisis de células en mitosis en cisticercoides activados

Con el fin de investigar la presencia de células en mitosis en cisticercoides de 0 y 6 hs post-activación, realizamos una inmunohistoquímica (IHF) utilizando un anticuerpo específico para la detección de la histona H3 fosforilada en la serina 10 (H3ser10P).

Este análisis nos permitió evidenciar a las células en mitosis en cisticercoides activados, pero también obtener información acerca de la quiescencia de las células germinativas en este estadio. Si en los cisticercoides las células germinativas se encontraran quiescentes en G₀, como hipotetizamos, no sería esperable observar células con marca de IHF para H3ser10P inmediatamente después de la activación (CC 0 hs post-activación), ya que el tiempo no es suficiente para que las mismas lleguen a mitosis saliendo de G₀. En cambio, en cisticercoides de 6 hs post-activación, esperaríamos que sí haya células germinativas en mitosis, como se explicó anteriormente.

En forma concordante con la hipótesis, en cisticercoides de 0 hs post-activación (Figura 24 A, B) no observamos células claramente positivas para la modificación de la histona. Únicamente en una de las larvas analizadas vimos una señal suave que co-localiza con núcleos (Figura 24B) y podría corresponderse con células ingresando en mitosis. En cambio, en cisticercoides de 6 hs post-activación (CC 6 hs) detectamos varias células en mitosis (claramente H3ser10P⁺) (Figura 24C y D).

El número de células H3ser10P⁺ en CC 6 hs resultó ser bastante variable entre las distintas réplicas biológicas (4, 6 y 12 células H3ser10P⁺), pero llama la atención que en todos los casos parecería haber pares de células que se mantienen juntas y que ingresan a fase M en forma coordinada (Figura 24C y D). Analizamos pocas larvas (n=3), por lo que deberíamos ampliar el análisis para obtener datos cuantitativos representativos y determinar si lo observado para los pares de células es un patrón real.

Dada la presencia de células en fase M en los cisticercoides en tiempo 6 hs post-activación, sería esperable ver células expresando *Hm-cycB* en este estadio. Teniendo en cuenta este resultado y considerando los datos de transcriptómica previamente mencionados, consideramos que es muy posible que la hibridación *in situ* haya fallado con la sonda de ciclina B, pero no podemos asegurarlo por no haber incluido un control positivo específico para esta sonda.

A futuro, planeamos obtener nuevos cisticercoides activados y larvas en metamorfosis para repetir los ensayos de hibridación *in situ* incluyendo un fragmento de la región anterior del adulto, donde sabemos que hay una intensa expresión de *Hm-cycB*, para verificar si realmente el transcripto de interés no se detecta en cisticercoides o si tuvimos problemas durante el desarrollo del ensayo en el primer intento.

En esta oportunidad, sería interesante analizar la co-localización con EdU para verificar si en cisticercoides la expresión de *Hm-cycB* ocurre sólo en células germinativas en G₂/M o también en fase S, al igual que ocurre en el cuello del adulto. Si el transcripto se expresara únicamente en G₂/M esperaríamos ver el mismo patrón que para la marca de células en mitosis (es decir, empezaríamos a observar señal de *Hm-cycB* 6 hs después de la activación de las larvas).

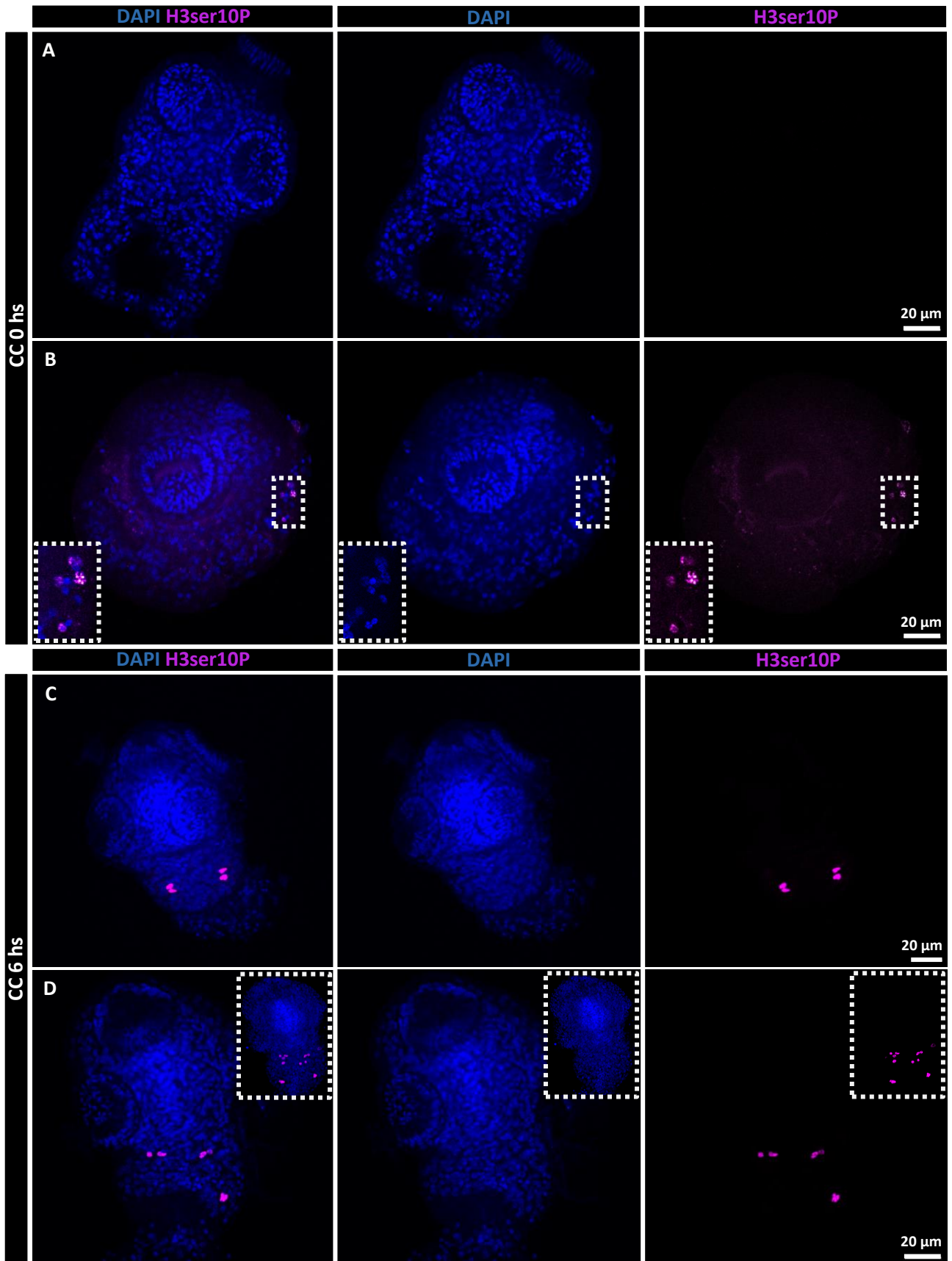


Figura 24: Células en mitosis en cisticercoides activados. **A y B.** IHF para H3ser10P en CC 0 hs. El recuadro en B muestra posibles células positivas para H3ser10P. **C y D.** IHF para H3ser10P en CC 6 hs. El recuadro en D muestra una proyección Z-stack de máxima intensidad donde es posible apreciar la totalidad de las células en mitosis y su distribución en el cuerpo de la larva. En magenta se marca la H3ser10P y en azul los núcleos teñidos con DAPI.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo, caracterizamos el patrón de expresión del transcrito de la ciclina B canónica de *H. microstoma* (*Hm-cycB*), en diferentes regiones del cuerpo del cestodo adulto.

En forma general, determinamos que *Hm-cycB* se expresa en células proliferantes (indiferenciadas) y no a nivel de células diferenciadas (post-mitóticas), como se espera para un regulador del ciclo celular. Observamos que *Hm-cycB* se transcribe intensamente en el cuello, región donde se concentran las células germinativas. A nivel de los primeros segmentos la expresión se mantiene intensa, y luego, hacia segmentos más posteriores (maduros), se evidencia un gradiente decreciente de expresión de *Hm-cycB* en la región medular del parénquima.

En las células germinativas de la región del cuello, *Hm-cycB* no se expresa únicamente en fase G2/M del ciclo celular, sino también en fase S. Este patrón es atípico, pero proponemos que podría ser un fenómeno extendido en platelmintos, consecuencia del reducido complemento de ciclinas que presentan estos animales. La expresión de ciclinas M en fase S plantea la posibilidad de que la ciclina B sustituya a las ciclinas G1/S y S del ciclo celular, ausentes en platelmintos parásitos. En dicho contexto, el complejo ciclina B-CDK1 se presenta como un buen candidato a regular la transición G1/S, y la progresión de la fase S en cestodos. La posible expansión de las funciones de la CDK1 en la regulación del ciclo celular resulta interesante, ya que podría hacer a los platelmintos parásitos especialmente vulnerables a compuestos inhibidores de la quinasa.

En células germinativas externas al cuello, localizadas en el parénquima medular de segmentos maduros y en la región del escólex, *Hm-cycB* no se detecta. Hasta donde sabemos, este sería el primer reporte de un ARNm que podría expresarse en forma diferencial en las células germinativas internas y externas al cuello.

Estas últimas no son las únicas células proliferantes que no expresan *Hm-cycB*. En los segmentos maduros, observamos que los vitelocitos proliferan y no presentan señal de detección del transcrito. De igual modo, en espermatogonias y ovogonias no se detecta *Hm-cycB*, por lo que durante la mitosis de las células de la línea germinal *Hm-cycB* podría no expresarse (o podría expresarse en una muy baja proporción). Por tanto, se esperaría la participación de otra ciclina, posiblemente una ciclina divergente, que por datos de transcriptómica sabemos que son específicas de adulto y que se expresan principalmente en los segmentos maduros. A futuro, en nuestro laboratorio se analizará el patrón de expresión de algunas de estas ciclinas divergentes.

A nivel de los segmentos maduros, *Hm-cycB* se transcribe únicamente dentro de los sistemas reproductores (tanto femenino como masculino) una vez que las células de la línea germinal ingresan a meiosis.

Particularmente, durante la espermatogénesis, observamos un patrón de expresión de la ciclina B que parece ser conservado en animales. El ARNm de *Hm-cycB* comienza a detectarse en espermátocitos, y se mantiene hasta el estadio de espermátidas redondas. Luego, en espermatozoides diferenciados la expresión de *Hm-cycB* desaparece.

Por su parte, durante el proceso de ovogénesis, observamos que *Hm-cycB* comienza a expresarse en oocitos I, y se dispone en forma asimétrica en el citoplasma formando gránulos. Estos gránulos se mantienen en las siguientes etapas del proceso de ovogénesis, a través de ambas divisiones meióticas, hasta que ocurre la primera mitosis embrionaria, cuando los gránulos parecen desensamblarse y *Hm-cycB* se detecta en todo el citoplasma. Aunque no fue posible determinar el patrón de expresión de *Hm-cycB* en las etapas inmediatamente posteriores del desarrollo embrionario, observamos que, en embriones aún tempranos (de aproximadamente 25 células), se mantiene la señal citoplasmática de *Hm-cycB*. En un futuro, pretendemos ampliar el análisis en embriones tempranos disecados, para describir en detalle el patrón de expresión de *Hm-cycB* durante la embriogénesis temprana.

En cisticercoides, segundo estadio larvario de *H. microstoma*, determinamos la ausencia de células en mitosis inmediatamente después de la activación y la presencia de células en mitosis a las 6 horas post-activación, lo que sugiere que las células germinativas se encuentran detenidas en fase G0 en la larva antes de su activación. A pesar de la presencia de células en fase G2/M en la segunda condición, no detectamos expresión de *Hm-cycB*, aunque creemos que esto se debe a una falla en el método de detección del ARNm. Por tanto, planeamos repetir el análisis en cisticercoides, y en larvas en metamorfosis, con el fin de corroborar los resultados aquí descritos. Además, para ampliar el análisis del patrón de expresión de *Hm-cycB* a todo el ciclo de vida de *H. microstoma*, buscaremos analizar su expresión en oncósferas infectivas eclosionadas *in vitro*.

El patrón de expresión de *Hm-cycB* resultó ser más complejo de lo esperado en base a los patrones de expresión de la ciclina B en otros animales. Aunque quedan por responder muchas incógnitas sobre el rol de la ciclina B, los resultados de este trabajo aportan al conocimiento (actualmente reducido) sobre los reguladores del ciclo celular en cestodos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aleem, E., Kiyokawa, H., & Kaldis, P. (2005). *Cdc2–cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition*. *Nature Cell Biology*, 7(8), 831–836. doi:10.1038/ncb1284
- Baguñà, J. (2012). *The planarian neoblast: the rambling history of its origin and some current black boxes*. *The International Journal of Developmental Biology*, 56(1-2-3), 19–37. doi:10.1387/ijdb.113463jb
- Baguñà, J., & Riutort, M. (2004). *Molecular phylogeny of the Platyhelminthes*. *Canadian Journal of Zoology*, 82(2), 168–193. doi:10.1139/z03-214
- Baguñà, J., & Slack, J. M. W. (1981). *Planarian neoblasts*. *Nature*, 290(5801), 14–15. doi:10.1038/290014b0
- Baguñà, J., Saló, E., & Auladell, C. (1989). *Regeneration and pattern formation in planarians: III. Evidence that neoblasts are totipotent stem cells and the source of blastema cells*. *Development*, 107(1), 77-86.
- Baker, C. C., Gim, B. S., & Fuller, M. T. (2015). *Cell type-specific translational repression of Cyclin B during meiosis in males*. *Development*, 142(19), 3394–3402. doi:10.1242/dev.122341
- Berntzen, A. K., & Voge, M. (1965). *In vitro Hatching of Oncospheres of Four Hymenolepidid Cestodes*. *The Journal of Parasitology*, 51(2), 235. doi:10.2307/3276089
- Bloom, J., & Cross, F. R. (2007). *Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(2), 149–160. doi:10.1038/nrm2105
- Bolla, R. I., & Roberts, L. S. (1971). *Developmental Physiology of Cestodes. IX. Cytological Characteristics of the Germinative Region of Hymenolepis diminuta*. *The Journal of Parasitology*, 57(2), 267. doi:10.2307/3278024
- Bouftas, N., & Wassmann, K. (2019). *Cycling through mammalian meiosis: B-type cyclins in oocytes*. *Cell Cycle*, 1–12. doi:10.1080/15384101.2019.1632139
- Chapman, D. L., & Wolgemuth, D. J. (1992). *Identification of a mouse B-type cyclin which exhibits developmentally regulated expression in the germ line*. *Molecular Reproduction and Development*, 33(3), 259–269. doi:10.1002/mrd.1080330305
- Collins, J. J. (2017). *Platyhelminthes*. *Current Biology*, 27(7), R252–R256. doi:10.1016/j.cub.2017.02.016
- Collins, J. J., Wang, B., Lambrus, B. G., Tharp, M. E., Iyer, H., & Newmark, P. A. (2013). *Adult somatic stem cells in the human parasite Schistosoma mansoni*. *Nature*, 494(7438), 476–479. doi:10.1038/nature11924
- Cunningham, L.J. & Olson, P.D. (2010). *Description of Hymenolepis microstoma (Nottingham strain): a classical tapeworm model for research in the genomic era*. *Parasites Vectors* 3, 123 doi:10.1186/1756-3305-3-123
- De Rycke, P. H., & Berntzen, A. K. (1967). *Maintenance and Growth of Hymenolepis microstoma (Cestoda: Cyclophyllidea) In vitro*. *The Journal of Parasitology*, 53(2), 352. doi:10.2307/3276588
- Dominguez, D., Tsai, Y.-H., Gomez, N., Jha, D. K., Davis, I., & Wang, Z. (2016). *A high-resolution transcriptome map of cell cycle reveals novel connections between periodic genes and cancer*. *Cell Research*, 26(8), 946–962. doi:10.1038/cr.2016.84
- Douglas, L. T. (1961). *The Development of Organ Systems in Nematotaeniid Cestodes. I. Early Histogenesis and Formation of Reproductive Structures in Baerietta diana (Helfer, 1948)*. *The Journal of Parasitology*, 47(4), 669–680. doi:10.2307/3275085
- Evans, W.S. (1970). *The in vitro cultivation of Hymenolepis microstoma from cysticeroid to egg-producing adult*. *Can J Zool*, 48:1135-1137.

- Garcia, H. H., Moro, P. L., & Schantz, P. M. (2007). *Zoonotic helminth infections of humans: echinococcosis, cysticercosis and fascioliasis*. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 20(5), 489–494. doi:10.1097/qco.0b013e3282a95e39
- Gavet, O., & Pines, J. (2010). *Activation of cyclin B1–Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis*. *The Journal of Cell Biology*, 189(2), 247–259. doi:10.1083/jcb.200909144
- Gustafsson, M.K. (1976). *Studies on cytodifferentiation in the neck region of Diphyllbothrium dendriticum Nitzsch, 1824 (Cestoda, Pseudophyllidea)*. *Z Parasitenkd* 50, 323–329.
- Han, K., Dai, Y., Zou, Z., Fu, M., Wang, Y., & Zhang, Z. (2012). *Molecular characterization and expression profiles of cdc2 and cyclin B during oogenesis and spermatogenesis in green mud crab (Scylla paramamosain)*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 163(3-4), 292–302. doi:10.1016/j.cbpb.2012.07.001
- Harashima, H., Dissmeyer, N., & Schnittger, A. (2013). *Cell cycle control across the eukaryotic kingdom*. *Trends in Cell Biology*, 23(7), 345–356. doi:10.1016/j.tcb.2013.03.002
- Hay, E. D., & Coward, S. J. (1975). *Fine structure studies on the planarian, Dugesia*. *Journal of Ultrastructure Research*, 50(1), 1–21. doi:10.1016/s0022-5320(75)90003-9
- Hendzel, M. J., Wei, Y., Mancini, M. A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B. R., ... Allis, C. D. (1997). *Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation*. *Chromosoma*, 106(6), 348–360. doi:10.1007/s004120050256
- Hirai, T., Yamashita, M., Yoshikuni, M., Lou, Y.-H., & Nagahama, Y. (1992). *Cyclin B in fish oocytes: Its cDNA and amino acid sequences, appearance during maturation, and induction of p34cdc2 activation*. *Molecular Reproduction and Development*, 33(2), 131–140. doi:10.1002/mrd.1080330204
- Hochegger, H., Klotzbücher, A., Kirk, J., Howell, M., le Guellec, K., Fletcher, K., Duncan, T., Sohail, M., & Hunt, T. (2001). *New B-type cyclin synthesis is required between meiosis I and II during Xenopus oocyte maturation*. *Development*, 128(19), 3795–3807. doi:10.1242/dev.128.19.3795
- Hochegger, H., Takeda, S., & Hunt, T. (2008). *Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?* *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(11), 910–916. doi:10.1038/nrm2510
- Hopman, A. H. N., Ramaekers, F. C. S., & Speel, E. J. M. (1998). *Rapid Synthesis of Biotin-, Digoxigenin-, Trinitrophenyl-, and Fluorochrome-labeled Tyramides and Their Application for In Situ Hybridization Using CARD Amplification*. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 46(6), 771–777. doi:10.1177/002215549804600611
- Horie, M., & Kotani, T. (2016). *Formation of mos RNA granules in the zebrafish oocyte that differ from cyclin B1 RNA granules in distribution, density and regulation*. *European Journal of Cell Biology*, 95(12), 563–573. doi:10.1016/j.ejcb.2016.10.001
- Ihara, J., Yoshida, N., Tanaka, T., Mita, K., & Yamashita, M. (1998). *Either cyclin B1 or B2 is necessary and sufficient for inducing germinal vesicle breakdown during frog (Rana japonica) oocyte maturation*. *Molecular Reproduction and Development*, 50(4), 499–509. doi:10.1002/(sici)1098-2795(199808)50:4<499::aid-mrd14>3.0.co;2-y
- Jackman, M., Firth, M., & Pines, J. (1995). *Human cyclins B1 and B2 are localized to strikingly different structures: B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus*. *The EMBO Journal*, 14(8), 1646–1654. doi:10.1002/j.1460-2075.1995.tb07153.x
- Juliano, C. E., Swartz, S. Z., & Wessel, G. M. (2010). *A conserved germline multipotency program*. *Development*, 137(24), 4113–4126. doi:10.1242/dev.047969
- Kondo, T., Yanagawa, T., Yoshida, N., & Yamashita, M. (1997). *Introduction of Cyclin B Induces Activation of the Maturation-Promoting Factor and Breakdown of Germinal Vesicle in Growing Zebrafish Oocytes Unresponsive to the Maturation-Inducing Hormone*. *Developmental Biology*, 190(1), 142–152. doi:10.1006/dbio.1997.8673

- Kong, J., & Lasko, P. (2012). *Translational control in cellular and developmental processes*. *Nature Reviews Genetics*, 13(6), 383–394. doi:10.1038/nrg3184
- Kotani, T., Yasuda, K., Ota, R., & Yamashita, M. (2013). *Cyclin B1 mRNA translation is temporally controlled through formation and disassembly of RNA granules*. *The Journal of Cell Biology*, 202(7), 1041–1055. doi:10.1083/jcb.201302139
- Kotani, T., Yoshida, N., Mita, K., & Yamashita, M. (2001). *Requirement of cyclin B2, but not cyclin B1, for bipolar spindle formation in frog (Rana japonica) oocytes*. *Molecular Reproduction and Development*, 59(2), 199–208. doi:10.1002/mrd.1023
- Koziol, U. & Castillo, E. (2011). *Cell proliferation and differentiation in cestodes*. *Research in Helminths*, 121–138.
- Koziol, U. (2017). *Evolutionary developmental biology (evo-devo) of cestodes*. *Experimental Parasitology*, 180, 84–100. doi:10.1016/j.exppara.2016.12.004
- Koziol, U., Domínguez, M. F., Marín, M., Kun, A., & Castillo, E. (2010). *Stem cell proliferation during in vitro development of the model cestode Mesocostoides corti from larva to adult worm*. *Frontiers in Zoology*, 7(1), 22. doi:10.1186/1742-9994-7-22
- Koziol, U., Rauschendorfer, T., Zanon Rodríguez, L., Krohne, G., & Brehm, K. (2014). *The unique stem cell system of the immortal larva of the human parasite Echinococcus multilocularis*. *EvoDevo*, 5(1), 10. doi:10.1186/2041-9139-5-10
- Ledan, E., Polanski, Z., Terret, M.-E., & Maro, B. (2001). *Meiotic Maturation of the Mouse Oocyte Requires an Equilibrium between Cyclin B Synthesis and Degradation*. *Developmental Biology*, 232(2), 400–413. doi:10.1006/dbio.2001.0188
- Li, J., Qian, W.-P., & Sun, Q.-Y. (2019). *Cyclins regulating oocyte meiotic cell cycle progression*. *Biology of Reproduction*. doi:10.1093/biolre/iioz143
- Martindale, M. Q. (2005). *The evolution of metazoan axial properties*. *Nature Reviews Genetics*, 6(12), 917–927. doi:10.1038/nrg1725
- Masui, Y. (2001). *From oocyte maturation to the in vitro cell cycle: the history of discoveries of Maturation-Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF)*. *Differentiation*, 69(1), 1–17. doi:10.1046/j.1432-0436.2001.690101.x
- Miquel, J., Świdorski, Z., Foronda, P., Torres, J., & Feliu, C. (2009). *Ultrastructure of spermatogenesis of Taenia taeniaeformis (Batsch, 1786) (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae) and comparison of spermatological characters in the family Taeniidae Ludwig, 1886*. *Acta Parasitologica*, 54(3). doi:10.2478/s11686-009-0040-4
- Molina, M. D., & Cebrià, F. (2021). *Decoding Stem Cells: An Overview on Planarian Stem Cell Heterogeneity and Lineage Progression*. *Biomolecules*, 11(10), 1532. doi:10.3390/biom11101532
- Moore, J. D. (2003). *Unmasking the S-Phase-Promoting Potential of Cyclin B1*. *Science*, 300(5621), 987–990. doi:10.1126/science.1081418
- Morgan, D. O. (1997). *Cyclin-dependent kinases: Engines, Clocks, and Microprocessors*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13(1), 261–291. doi:10.1146/annurev.cellbio.13.1.261
- Morgan, D. O. (2007). *The Cell Cycle*. Corby, Northants: Oxford University Press.
- Morita, M., Best, J. B., & Noel, J. (1969). *Electron microscopic studies of planarian regeneration*. *Journal of Ultrastructure Research*, 27(1-2), 7–23. doi:10.1016/s0022-5320(69)90017-3
- Murray, A. W., Solomon, M. J., & Kirschner, M. W. (1989). *The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity*. *Nature*, 339(6222), 280–286. doi:10.1038/339280a0
- Nurse, P. (1990). *Universal control mechanism regulating onset of M-phase*. *Nature*, 344(6266), 503–508. doi:10.1038/344503a0

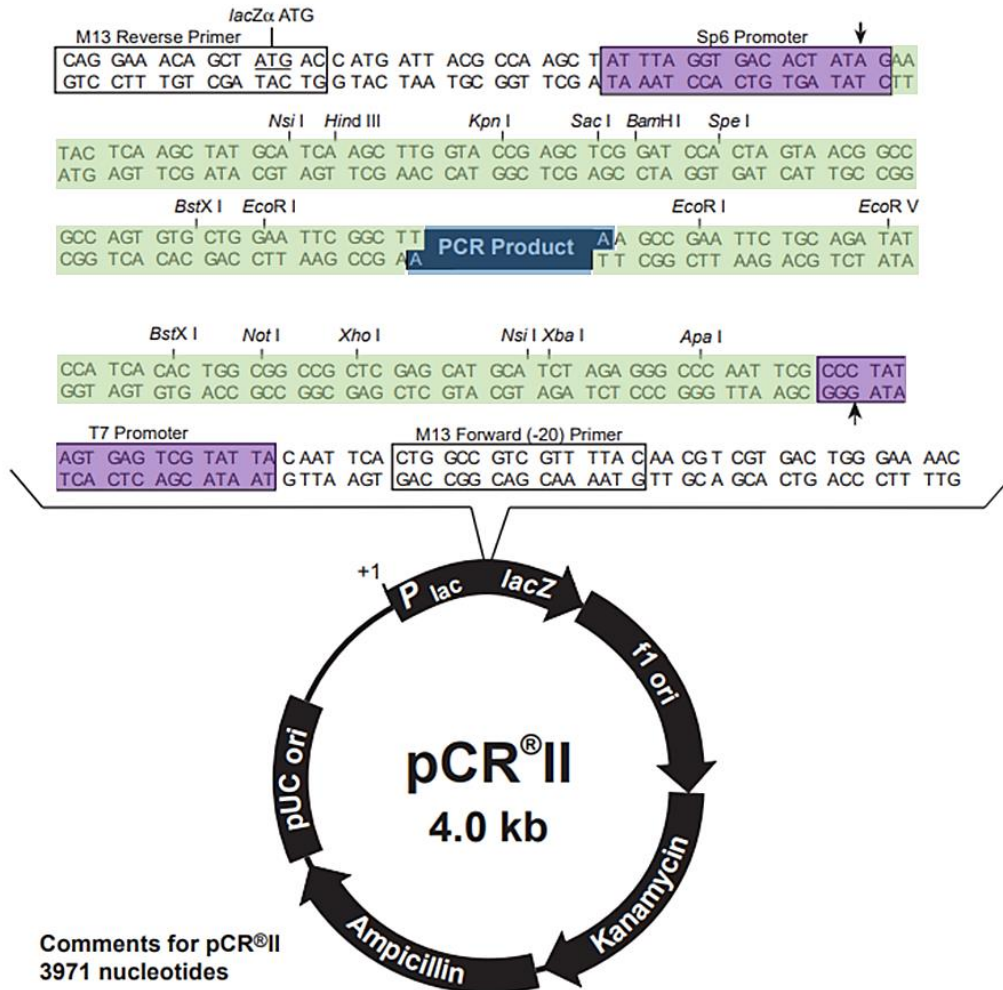
- Olson, P. D., Tracey, A., Baillie, A., James, K., Doyle, S. R., Buddenborg, S. K., ... Berriman, M. (2020). *Complete representation of a tapeworm genome reveals chromosomes capped by centromeres, necessitating a dual role in segregation and protection*. BMC Biology, 18(1). doi:10.1186/s12915-020-00899-w
- Olson, P. D., Zarowiecki, M., James, K., Baillie, A., Bartl, G., Burchell, P., ... Berriman, M. (2018). *Genome-wide transcriptome profiling and spatial expression analyses identify signals and switches of development in tapeworms*. EvoDevo, 9(1). doi:10.1186/s13227-018-01110-5
- Ortega, S., Prieto, I., Odajima, J., Martín, A., Dubus, P., Sotillo, R., ... Barbacid, M. (2003). *Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice*. Nature Genetics, 35(1), 25–31. doi:10.1038/ng1232
- Pacek, M., Prokhorova, T. A., & Walter, J. C. (2004). *Cdk1: Unsung Hero of S Phase?* Cell Cycle, 3(4), 399–401. doi:10.4161/cc.3.4.776
- Parisi, M., & Lin, H. (2000). *Translational repression: A duet of Nanos and Pumilio*. Current Biology, 10(2), R81–R83. doi:10.1016/s0960-9822(00)00283-9
- Peter, R., Gschwentner, R., Schürmann, W., Rieger, R.M. & Ladurner, P. (2004). *The significance of stem cells in free-living flatworms: one common source for all cells in the adult*. J. Appl. Biomed. 2, 21–35.
- Pines, J., & Clute, P. (1999) *Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase*. Nature Cell Biology, 1(2), 82–87. doi:10.1038/10049
- Pines, J., & Hunter, T. (1989). *Isolation of a human cyclin cDNA: Evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2*. Cell, 58(5), 833–846. doi:10.1016/0092-8674(89)90936-7
- Porter, L. A., & Donoghue, D. J. (2003). *Cyclin B1 and CDK1: nuclear localization and upstream regulators*. Progress in cell cycle research, 5, 335–347.
- Pouchkina-Stantcheva, N. N., Cunningham, L. J., Hřčkova, G., & Olson, P. D. (2013). *RNA-mediated gene suppression and in vitro culture in Hymenolepis microstoma*. International Journal for Parasitology, 43(8), 641–646. doi:10.1016/j.ijpara.2013.03.004
- Preza, M., Calvelo, J., Langleib, M., Hoffmann, F., Castillo, E., Koziol, U., & Iriarte, A. (2021a). *Stage-specific transcriptomic analysis of the model cestode Hymenolepis microstoma*. Genomics, 113(2), 620–632. doi:10.1016/j.ygeno.2021.01.005
- Preza, M., Guarnaschelli, I., Castillo, E., Koziol, U. (2021b). *Inhibitors of protein kinases A and C impair the motility of oncospheres of the model tapeworm Hymenolepis microstoma*. Mol Biochem Parasitol. 246:111423. doi: 10.1016/j.molbiopara.2021.111423.
- Prigent, C. (2003). *Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for?* Journal of Cell Science, 116(18), 3677–3685. doi:10.1242/jcs.00735
- Quandt, E., Ribeiro, M. P. C., & Clotet, J. (2019). *Atypical cyclins: the extended family portrait*. Cellular and Molecular Life Sciences, 77(2), 231–242. doi:10.1007/s00018-019-03262-7
- Ramos-Vara, J. A. (2005). *Technical Aspects of Immunohistochemistry*. Veterinary Pathology, 42(4), 405–426. doi:10.1354/vp.42-4-405
- Reddien, P. W. (2005). *SMEDWI-2 Is a PIWI-Like Protein That Regulates Planarian Stem Cells*. Science, 310(5752), 1327–1330. doi:10.1126/science.1116110
- Reddien, P. W., Bermange, A. L., Murfitt, K. J., Jennings, J. R., & Sánchez Alvarado, A. (2005). *Identification of Genes Needed for Regeneration, Stem Cell Function, and Tissue Homeostasis by Systematic Gene Perturbation in Planaria*. Developmental Cell, 8(5), 635–649. doi:10.1016/j.devcel.2005.02.014
- Rink, J. C. (2012). *Stem cell systems and regeneration in planaria*. Development Genes and Evolution, 223(1-2), 67–84. doi:10.1007/s00427-012-0426-4

- Roberts, L. S. (1980). *Development of Hymenolepis diminuta in its definitive host*. In *biology of the tapeworm Hymenolepis diminuta* (ed. A.P. Arai), Academic Press, 357-423.
- Robinson, J. M., & Bogitsh, B. J. (1978). *A morphological and cytochemical study of sperm development in Hymenolepis diminuta*. *Zeitschrift For Parasitenkunde Parasitology Research*, 56(1), 81–92. doi:10.1007/bf00925941
- Rozario, T. & Newmark, P. A. (2015). *A confocal microscopy-based atlas of tissue architecture in the tapeworm Hymenolepis diminuta*. *Experimental Parasitology*, 158, 31–41. doi:10.1016/j.exppara.2015.05.015
- Rozario, T., Quinn, E. B., Wang, J., Davis, R. E., & Newmark, P. A. (2019). *Region-specific regulation of stem cell-driven regeneration in tapeworms*. *eLife*, 8, e48958. <https://doi.org/10.7554/eLife.48958>. doi: 10.7554/eLife.48958
- Rybicka, K. (1966). *Embryogenesis in Hymenolepis diminuta. I. Morphogenesis*. *Experimental Parasitology*, 19(3), 366–379. doi:10.1016/0014-4894(66)90088-9
- Rycke, P., & Grembergen, G. (1966). *Development of the cestode Hymenolepis microstoma in Mus musculus*. *Zeitschrift For Parasitenkunde*, 27(4). doi:10.1007/bf00260033
- Saldivar, J. C., Hamperl, S., Bocek, M. J., Chung, M., Bass, T. E., Cisneros-Soberanis, F., ... Cimprich, K. A. (2018). *An intrinsic S/G2checkpoint enforced by ATR*. *Science*, 361(6404), 806–810. doi:10.1126/science.aap9346
- Santamaría, D., Barrière, C., Cerqueira, A., Hunt, S., Tardy, C., Newton, K., ... Barbacid, M. (2007). *Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle*. *Nature*, 448(7155), 811–815. doi:10.1038/nature06046
- Sato, K., Sakai, M., Ishii, A., Maehata, K., Takada, Y., Yasuda, K., & Kotani, T. (2022). *Identification of embryonic RNA granules that act as sites of mRNA translation after changing their physical properties*. *iScience*, 25(6), 104344. doi: 10.1016/j.isci.2022.104344
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. doi:10.1038/nmeth.2019
- Schmitt, A., & Nebreda, A. R. (2002). *Signalling pathways in oocyte meiotic maturation*. *Journal of cell science*, 115(Pt 12), 2457–2459. doi: 10.1242/jcs.115.12.2457
- Seidel, J. S. (1975). *The Life Cycle In vitro of Hymenolepis microstoma (Cestoda)*. *The Journal of Parasitology*, 61(4), 677. doi:10.2307/3279462
- Sherr, C. J. (2004). *Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases*. *Genes & Development*, 18(22), 2699–2711. doi:10.1101/gad.1256504
- Smyth, J. D., & McManus, D. P. (1989). *The physiology and biochemistry of cestodes*. doi:10.1017/cbo9780511525841
- Solana, J. (2013). *Closing the circle of germline and stem cells: the Primordial Stem Cell hypothesis*. *EvoDevo*, 4(1), 2. doi:10.1186/2041-9139-4-2
- Świdorski, Z., Conn, D. B., Miquel, J., & Młocicki, D. (2004). *Fertilization in the cestode Gallegoides arfaai (Mobedi et Ghadirian, 1977) Tenora et Mas-Coma, 1978 (Cyclophyllidea, Anoplocephalidae)*. *Acta Parasitol*, 49, 108-115.
- Takei, N., Takada, Y., Kawamura, S., Sato, K., Saitoh, A., Bormann, J., ... Kotani, T. (2020). *Changes in subcellular structures and states of Pumilio1 regulate the translation of target Mad2 and Cyclin B1 mRNAs*. *Journal of Cell Science*, jcs.249128. doi:10.1242/jcs.249128
- Trcek, T., Grosch, M., York, A., Shroff, H., Lionnet, T., & Lehmann, R. (2015). *Drosophila germ granules are structured and contain homotypic mRNA clusters*. *Nature Communications*, 6(1). doi:10.1038/ncomms8962

- Tsai, I. J., Zarowiecki, M., Holroyd, N., Garcarrubio, A., Sanchez-Flores, A., ... Fragoso, G. (2013). *The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism*. *Nature*, 496(7443), 57–63. doi:10.1038/nature12031
- Tyler, S. (1997). *Origin of the epidermis in parasitic platyhelminths*. *International Journal for Parasitology*, 27(6), 715–738. doi:10.1016/s0020-7519(97)00013-1
- Voge, M. (1964). *Development of Hymenolepis microstoma (Cestoda: Cyclophyllidea) in the Intermediate Host Tribolium confusum*. *The Journal of Parasitology*, 50(1), 77. doi:10.2307/3276032
- Wagner, D. E., Wang, I. E., & Reddien, P. W. (2011). *Clonogenic neoblasts are pluripotent adult stem cells that underlie planarian regeneration*. *Science*, 332(6031), 811–816. doi:10.1126/science.1203983
- Wendt, G., Zhao, L., Chen, R., Liu, C., O'Donoghue, A. J., Caffrey, C. R., ... Collins, J. J. (2020). *A single-cell RNA-seq atlas of Schistosoma mansoni identifies a key regulator of blood feeding*. *Science*, 369(6511), 1644–1649. doi:10.1126/science.abb7709
- White-Cooper, H., Schäfer, M. A., Alphey, L. S., & Fuller, M. T. (1998). *Transcriptional and post-transcriptional control mechanisms coordinate the onset of spermatid differentiation with meiosis I in Drosophila*. *Development*, 125(1), 125–134. doi: 10.1242/dev.125.1.125
- Wolgemuth, D. J. (2008). *Function of cyclins in regulating the mitotic and meiotic cell cycles in male germ cells*. *Cell Cycle*, 7(22), 3509–3513. doi:10.4161/cc.7.22.6978
- Zeng, A., Li, H., Guo, L., Gao, X., McKinney, S., Wang, Y., ... Sánchez Alvarado, A. (2018). *Prospectively Isolated Tetraspanin⁺ Neoblasts Are Adult Pluripotent Stem Cells Underlying Planaria Regeneration*. *Cell*, 173(7), 1593–1608.e20. doi:10.1016/j.cell.2018.05.006
- Zhu, S. J., & Pearson, B. J. (2013). *The Retinoblastoma pathway regulates stem cell proliferation in freshwater planarians*. *Developmental Biology*, 373(2), 442–452. doi:10.1016/j.ydbio.2012.10.025
- Zhu, S. J., & Pearson, B. J. (2016). *(Neo)blast from the past: new insights into planarian stem cell lineages*. *Current Opinion in Genetics & Development*, 40, 74–80. doi:10.1016/j.gde.2016.06.007

8. ANEXO

- Mapa de vector pCRII utilizado para la clonación del ADN copia (ADNc) de *Hm-cycB*:



Comments for pCR[®]II
3971 nucleotides

LacZα gene: bases 1-587
M13 Reverse priming site: bases 205-221
Sp6 promoter: bases 239-256
T7 promoter: bases 404-423
M13 (-20) Forward priming site: bases 431-446
f1 origin: bases 588-1025
Kanamycin resistance ORF: bases 1359-2153
Ampicillin resistance ORF: bases 2171-3031
pUC origin: bases 3176-3849

Secuencia de los promotores T7/SP6
Secuencias de pCRII que flanquean al inserto
Secuencia de inserto (ADNc de *Hm-cycB*)

- Secuencia del producto de PCR utilizado como molde para la síntesis de sondas *Hm-cycB*

5' -

TAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTG
CAGAATTCGGCTTTATCCTATCGTCCCAAACCTCTGTCCAAAATGGGCTGGTTGATGGCGATCGCTCTAGCCAAAC
AGACCGCCATTGCGGCAAGACAATTCCGGGCCATAATGAACGATATTATACTCCTGATAACCAACTTCTAAAAAGT
ACTTAGCCATATTTTGGCTCAAAGAATTAGCTCTAAGTGAAGCAGCAACCGCCGAAGAAACAAGTATGGTGTG
GAATGACCATGTCAAATCAAGTTTGTAAAGAATAAGAATTCACAGTCTAGAATCTGGGATGAAGAAAAAGCAC
CTTCGGTGATATTGCGAACTGATGCACATCAGGTGAAACATCTCCTCGTATTTTCGCGGCAATATAGAGCGTCG
TAATGCTACTAATTGCAATGTACTTTTGGTGACAATATCGGAGCTTTCTGTAGAACTGGTCCAGCAATCCAA
TCGCCAAATACAGAGTATCAGTAAGAAGACGAAAACCTAGAGTGAACCTGGACCATCCAATCGACAAGAATATAAC
GCATACGGGGATTCAATCCAACACAATGTTTCATGAAATATGCTCAAGACGAAAGGCTAAAACCGATTTTCATCT
GCAAATAGTCGAAAGAGCATTAGCTATATGATTATCTATCTTATGAACATGTCCAAAATCCTTGTCAAGTTCCA
GAAAAACGGTTCGGATTTTTTGGCATACTTACCCTAATCGCGTACCGTTGTTTGA AAAATCCAATAGCAATGG
ACCGTACGGCAGAGGAAAACCTGACGAAGTTCAGCAGAAAATAGGGCTTTTCCGACACACGATTGATGCCGTTTAC
AATCCTTTTTCGGTCTTGTTCGGCTCTTTGATATGGGATTAGTATCAATTGGGACCAAAGGTACTCTTGATCTCG
AAGCCGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAG
TATTCTATAGTGTACCTAAAT-3'

- Secuencia de la sonda de detección (anti-sentido) de *Hm-cycB* (sintetizada con la ARN polimerasa T7)

5' -

GGGCGAATTCGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGGCTTTATC
CTATCGTCCCAAACCTCTGTCCAAAATGGGCTGGTTGATGGCGATCGCTCTAGCCAAACAGACCGCCATTGCGGCCA
AGACAATTCGGGCCATAATGAACGATATTATACTCCTGATAACCAACTTCTAAAAAGTACTTAGCCATATTTTGC
GTCAAAGAATTAGCTAAGTGAAGCAGCAACCGCCGAAGAAACAAGTATGGTGTGGAATGACCATGTCAA AAA
TCAAGTTTGTAAAGAATAAGAATTCACAGTCTAGAATCTGGGATGAAGAAAAAGCACCTTCGGTGATATTGCGA
AACTGATGCACATCAGGTGGAACATCTCCTCGTATTTTCGCGGCAATATAGAGCGTCTGTAATGCCTACTAATTGC
AATGTACTTTTTGGTGACAATATCGCGAGCTTTCTGTAGAACTGGTCCAGCAATCCAATCGCCAAATACAGAGTA
TCAGTAAGAAGACGAAAACCTAGAGTGAACCTGGACCATCCAATCGACAAGAAATAAACGCATACGGGGATTCAAT
CCAACACAATGTTTCATGAAATATGCTCAAGACGAAAAGGCTAAAACCGATTTTCATCTGCAAATAGTCGAAAGAG
CATTAGCTATATGATTATCTATCTTATGAACATGTCCAAAATCCTTGTCAAGTTCAGAAAACGGTTCGGATTT
TTTGCCATACTTACCCTAATCGCGTACCGTTGTTTGA AAAATCCAATAGCAATGGACCGTACGGCAGAGGAA
AACTGACGAAGTTCAGCAGAAAATAGGGCTTTTCCGACACACGATTGATGCCGTTTACAATCCTTTTTCGGTCTT
GTCGGCCTCTTTGATATGGGATTAGTATCAATTGGGACCAAAGGTACTCTTGATCTCGAAGCCGAATTCAGCAC
ACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCC
TAAAT-3'

- Secuencia de la sonda control (sentido) de *Hm-cycB* (sintetizada con la ARN polimerasa SP6)

5' -

AGAATACTCAAGCTATGCATCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGGCCGCCAGTGTGCTGGAATT
CGGCTTGATCAAGAGTACCTTTGGTCCCAATGATACTAATCCCATATCAAAGAGGGCCGACAAGAACCGAAAAGG
ATTGTAAACGGCATCAATCGTGTGTCGGA AAAAGCCCTATTTTCTGCTGAACTTCGTCAGTTTTCTCTGCCGTAC
GGTCCATTGCTATTGGATTTTTCAAACAACGGTACGCGATTAGGGTGAAGTGTATGGCAAAAATCCGACCGTTT
TTCTGGAACCTTGACAAGGATTTTGGACATGTTCATAAGATAGATAATCATATAGCTGAATGCTCTTTGACTATT
TGCAGATGAAATCGGTTTTAGCCTTTCTGCTTGGACATAATTTTCATGAAACATTTGTGTTGGATTGAATCCCCGTA
TGCCTTATATTCTTGTGCGATTGGATGGTCCAAGTTCAGTCTAGTTTTCTGCTTCTTACTGATACTCTGTATTTGG
CGATTGGATTGCTGGACAGTTTCTACAGAAAAGCTCGCGATATTGTCACCAAAAAGTACATTGCAATTAGTAGGCA
TTACGACGCTCTATATTGCCGCGAAAATACGAGGAGATGTTCCACCTGATGTGCATCAGTTTCGCAATATCACCG
AAGGTGCTTTTTCTTCATCCAGATTCTAGACTGTGAAATTTCTTATTTCTTAACTTGAATTTTGGATTTGACATGGTCA
TTCCAACACCACTTGTCTTTCGGCGGTTGCTGCTTGCCTTAGAGCTAATTTCTTTGACGCAAAAATATGGCTA
AGTACTTTTTAGAAAGTTGGTTATCAGGAGTATAATATCGTTTCATTTATGGCCCCGAATTTGCTTTCGGCAATGGCGG
TCTGTTTGGCTAGAGCGATCGCCATCAACCAGCCATTTTGGACAGAGTTTGGGACGATAGGATAAAGCCGAATTT
CTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGTGATCGTA
TTA-3'

Secuencia de los promotores T7/SP6
Secuencias de pCRII que flanquean al inserto

Secuencia codificante/molde para *Hm-cycB* - Secuencia de primers específicos de *Hm-cycB*

- **Protocolo completo de WMISH en gusanos adultos**

Una vez obtenidos los gusanos los mismos deben ser fijados para comenzar el protocolo de WMISH.

Fijación

1. Colocar a los gusanos en PBS-DEPC e incubar en hielo durante 5 minutos.
2. Retirar el PBS y agregar PFA 4% (en PBS-DEPC) precalentado a 80°C. El PFA debe colocarse caliente y en forma rápida para evitar la contracción muscular de los gusanos.
3. Incubar a 4°C ON (Over Night) o 4 hs a RT (Room Temperature).
4. Pasar los gusanos fijados a 100% metanol (para ARN) y colocarlos en agitación por 10 minutos.
5. Cambiar el metanol y guardar a -20°C a largo plazo, hasta su uso.

En caso de querer usar los gusanos en los días siguientes, es posible colocar los gusanos fijados en PBS en lugar de metanol y preservarlos en heladera a 4°C hasta su uso.

Desde este primer paso de fijación, y hasta la etapa de revelado, debe trabajarse bajo condiciones libres de RNasas.

Día 1

Rehidratación

En caso de utilizar gusanos fijados y posteriormente almacenados en metanol, se deben hacer lavados para gradualmente cambiar el metanol por PBS + 0.1% Tween-20 (PBS-T).

1. Lavar con etanol 100% durante 5 minutos.
2. Lavar con etanol 75% en agua (DEPC) por 10 minutos.
3. Lavar con etanol 50% en PBS-T por 10 minutos.
4. Realizar tres lavados con PBS-T, cada uno de 5 minutos.
Todos los lavados deben hacerse con agitación a 600 RPM.

Si los gusanos se encontraban en PBS, la rehidratación no es necesaria y puede comenzarse el proceso realizando tres lavados de 5 minutos con PBS-T.

Permeabilización con Proteinasa K y refijación

5. Añadir 1.5 µl de Proteinasa K (20 mg/ml) en 2 ml de PBS-T e incubar a RT durante 20 minutos (sin agitación).
6. Lavar 2 veces con Trietanolamina (TEA) 0.1 M, pH 7.8 por 5 minutos, invirtiendo lentamente el tubo cada tanto.
7. En el segundo lavado, agregar 2.5 µl de Anhídrido acético por cada ml de TEA e invertir el tubo lentamente cada tanto.
8. Tras 5 minutos, agregar la misma cantidad de Anhídrido acético e incubar 5 minutos, invirtiendo de vez en cuando los tubos.

9. Lavar 2 veces por 5 minutos con PBS-T, invirtiendo de vez en cuando los tubos.
10. Refijar a los gusanos con PFA 4% en PBS-T, durante 20 minutos en agitación.
11. Lavar 5 veces con PBS-T durante 5 minutos en agitación para eliminar el PFA.

Equilibrar las muestras y Pre-Hibridación

12. Agregar 250 μ l de solución de hibridación (50% formamida, 5x SSC, 1 mg/ml ARN Tortula, 100 μ g/ml Heparina, 1x Denhardt's, 0.1% Tween-20, 0.1% CHAPS) a 1 ml de PBS-T y permitir que se equilibre durante unos 3 minutos.
13. Remover el líquido y reemplazar con 500 μ l de buffer de hibridación. Incubar a 60°C durante 10 minutos agitando en Thermomixer a 600 RPM.
14. Reemplazar al buffer de hibridación con 500 μ l nuevos de este mismo buffer, y dejar a 60°C en agitación por al menos 6 horas (puede dejarse ON).

Día 2

Hibridación de la sonda

Si la sonda será utilizada por primera vez:

1. Desnaturalizar la sonda a 80°C durante 3 minutos.
2. Centrifugar brevemente y colocar en hielo.
3. Agregar la sonda a buffer de hibridación precalentado a 58°C.
4. Remover la solución de pre-hibridación de las muestras y agregar la sonda recientemente diluida (con una concentración final de aproximadamente 0.2 ng/ μ l).

Si la sonda se reutilizará:

1. Incubar la sonda, ya disuelta en buffer de hibridación, a 80°C durante 3 minutos.
2. Colocar en Thermomixer a 58°C por 5 minutos.
3. Remover el buffer de pre-hibridación de las muestras y agregar la sonda.

Dejar hibridando ON en Thermomixer, con agitación a 600 RPM, a 53-54°C (para sondas de hasta 250 pb) o 57-58°C (para sondas de más de 250 pb).

Día 3

Recuperación de la sonda y lavados

1. Recuperar la sonda y guardarla en un nuevo tubo para su almacenamiento. Mantenerla en hielo hasta el momento de guardarla a -80°C, donde se mantienen hasta su próximo uso (las sondas pueden ser reutilizadas hasta 5 veces obteniéndose buenos resultados).
2. Realizar 2 lavados de 10 min, con 500 μ l de buffer de hibridación precalentado a la temperatura de hibridación (53-54°C o 57-58°C, dependiendo del largo de la sonda), en agitación (600 RPM).
3. Realizar 3 lavados de 30 min cada uno, con solución 2x de SSC (3 M NaCl + 0.3 M citrato de trisodio) + 0.1% Tween-20 (precalentada a 53-54°C o 57-58°C), en agitación (600 RPM).

4. Realizar 3 lavados de 30 min cada uno, con solución 0.2x de SSC + 0.1% Tween-20 (precalentada a 53-54°C o 57-58°C), en agitación (600 RPM).
5. Lavar 2 veces con MAB + 0.1% Tween-20 (MAB-T) a RT, cada lavado de 15 min con agitación.

Incubación con anticuerpo

6. Bloquear durante 2 horas en 0.5 ml de MAB-T + 1% "Blocking reagent" + 5% de suero de oveja, a RT en agitación.
La solución de bloqueo debe ser calentada a 60°C durante 30 minutos para inactivar el suero, y posteriormente enfriada en hielo antes de agregársela a las muestras.
7. Reemplazar la solución de bloqueo con la dilución de 1/50 de anticuerpo anti-DIG conjugado a peroxidasa (POD) en MAB-T + 1% "Blocking reagent". Incubar ON a 4°C con agitación.

Día 4

Lavados

1. Remover el anticuerpo y lavar 3 veces por 5 min con MAB-T a RT con agitación.
2. Lavar 3 veces por 1 hora con MAB-T a RT con agitación.
3. Realizar un lavado de 3 minutos con PBS + 0.1 M Imidazol (pH 7.6) a RT con agitación.
4. Realizar un lavado de 10 minutos con PBS + 0.1 M Imidazol (pH 7.6) a RT con agitación.

Revelado: reacción con Tiramida para coloración fluorescente

5. Preparar la solución de la reacción fluorescente mezclando PBS + 0.1 M Imidazol (pH 7.6) con 1/100 de Tiramida Fluorescente y 0.001% de H₂O₂ (para obtener la dilución 0.001% hacer primero una dilución 1/300 de H₂O₂ 30% y luego una dilución 1/100).
6. Agregar la solución de la reacción fluorescente y mezclar por inversión de 5 a 10 veces.
7. Incubar en oscuridad, sin agitación, durante 5 minutos.
8. Lavar rápido con PBS-T, para quitar el exceso de solución de reacción fluorescente.

A partir de este punto ya no es necesario trabajar bajo condiciones libre de RNAsas.

9. Lavar 4 veces con PBS-T en oscuridad.
10. En este punto es posible realizar la detección de EdU (si se realizó una etapa de marcado con este análogo previo a la fijación) y/o la tinción de ADN con DAPI (1 µg/ml en PBS-T, incubación ON).
11. Montar con glicerol 80% con 50 mM de Tris pH 7.0, o medio de montaje comercial, y sellar los bordes con esmalte de uñas transparente.

- WMISH en formas larvarias

Para las hibridaciones *in situ* en cisticercoides activados y oncósferas en proceso de metamorfosis, se siguió el procedimiento descrito anteriormente para adultos, con leves modificaciones.

Dado el reducido tamaño de las larvas, previo a cada paso es necesario centrifugar a 2000 g por 1 minuto o 10 segundos a máxima velocidad, de modo que las mismas permanezcan en el fondo del tubo mientras se cambian las soluciones.

Por otro lado, la permeabilización con Proteinasa K se realiza por un tiempo más reducido (10 minutos en lugar de 20), ya que las larvas son más delicadas que los adultos, y los tejidos se ven dañados durante un tratamiento tan prolongado.

- Protocolo de Inmunohistofluorescencia (IHF)

Día 1

Partiendo de gusanos adultos vivos:

1. Fijar los gusanos con PFA 4% en PBS, ON en la heladera o 4 hs a RT, con agitación.
2. Lavar 3 veces con PBS + 0.3% Tritón (PBS-Tx) a RT, cada lavado de 10 minutos y en agitación.
3. Permeabilizar con PBS-Tx + 0.5% SDS + 2 µg/ml PK a RT, durante 5 minutos sin agitación.
4. Lavar en forma rápida con PBS-Tx.
5. Re-fijar con 4% PFA en PBS a RT, con agitación.
6. Lavar 3 veces con PBS-Tx a RT, 10 minutos cada lavado, con agitación.
7. Bloquear con PBS-Tx + 3% BSA + 5% Suero de Oveja inactivado (se inactiva por calentamiento a 60°C por 30 minutos) a RT, durante 2 hs con agitación.
8. Incubar con anticuerpo primario a la concentración adecuada en PBS-Tx + 3% BSA, a 4°C, por 2 días, con agitación. Para la incubación se puede adicionar azida de sodio 0.02% para evitar el crecimiento de bacterias.

Si se hace la inmunohistofluorescencia en gusanos sobre los que ya se hizo hibridación *in situ* y posteriormente fueron reservados en glicerol:

1. Lavar 3 veces con PBS + 0.3% Tritón (PBS-Tx) a RT, cada lavado de 10 minutos y en agitación, para eliminar el glicerol.

En este caso no es necesario hacer un paso de permeabilización dado que previamente se hizo durante la WMISH.

2. En este punto es recomendado realizar el proceso de **Heat Induced Epitope Retrieval (HIER)**, colocando los gusanos en buffer citrato 10 mM (pH=6) y calentando a 99 °C durante 20 min.
3. Lavar 3 veces con PBS-Tx a RT, 5 minutos cada lavado, con agitación.
4. Bloquear con PBS-Tx + 3% BSA + 5% Suero de Oveja inactivado (se inactiva por calentamiento a 60°C por 30 minutos) a RT, durante 2 hs con agitación.

5. Incubar con anticuerpo primario a la concentración adecuada en PBS-Tx + 3% BSA, a 4°C, por 3 días, con agitación. Para la incubación se puede adicionar azida de sodio 0.02% para evitar el crecimiento de bacterias.

Día 3

1. Lavar 5 veces con PBS-Tx a RT, 30 minutos cada lavado, con agitación.
2. Incubar con anticuerpo secundario conjugado a fluorosforo a la concentración adecuada en PBS-Tx + 3% BSA, a 4°C, por 3 días, con agitación en oscuridad. En este paso puede incluirse DAPI para marcar los núcleos durante la incubación. También se recomienda adicionar azida de sodio 0.02% para evitar el crecimiento de bacterias.

Día 5

1. Lavar 5 veces con PBS-Tx a RT, durante 30 minutos cada lavado, con agitación.
2. Montar con 80% glicerol 50 mM de Tris pH 7.0, o medio de montaje comercial, y sellar con esmalte de uñas transparente.

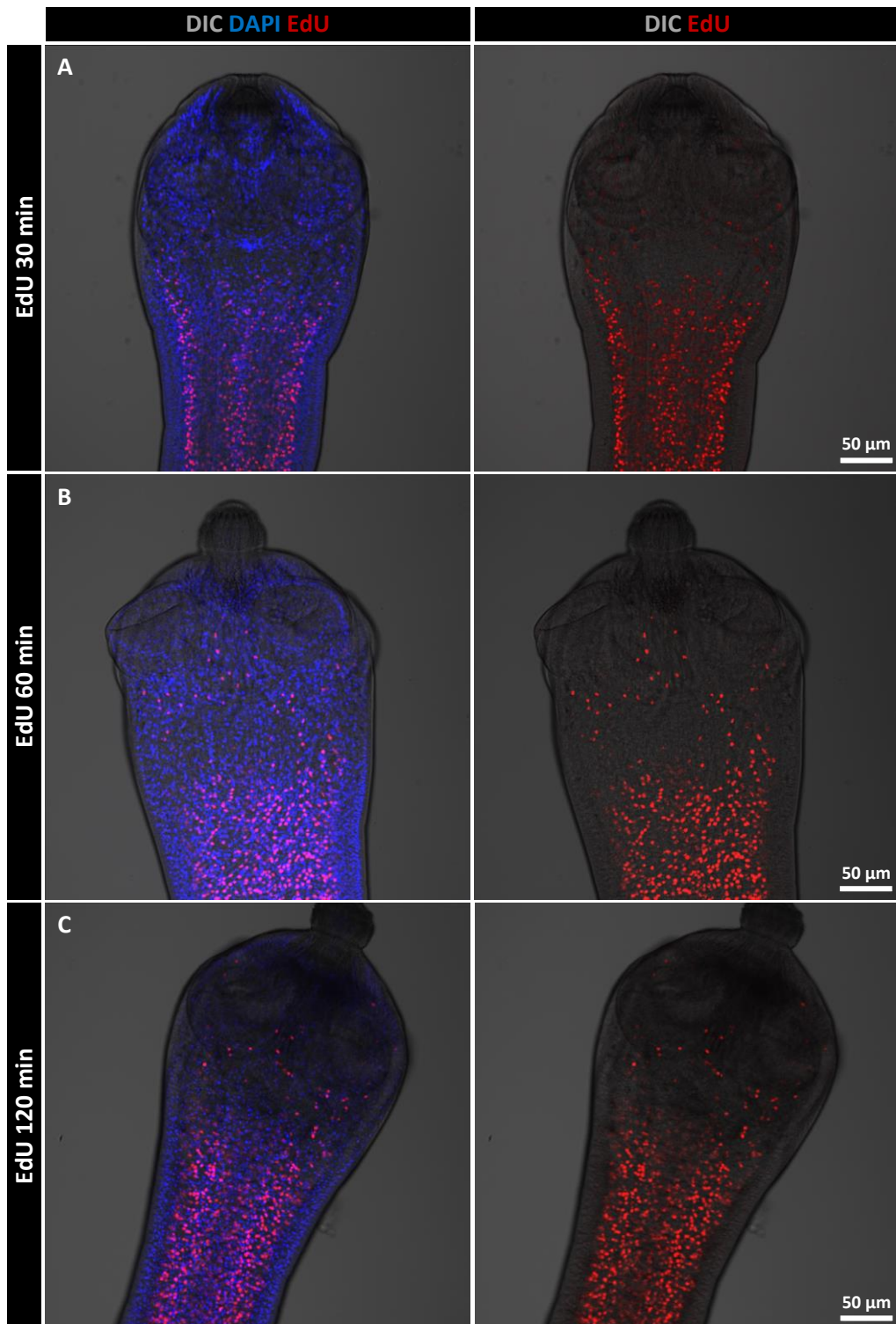


Figura 25: Incorporación de EdU en células proliferantes del escólex y el cuello del adulto de *H. microstoma*, como resultado de la incubación durante distintos tiempos. **A.** Gusano incubado por 30min. **B.** Gusano incubado por 60 min. **C.** Gusano incubado por 120 min. En rojo se observa la marca de EdU, en azul los núcleos teñidos con DAPI y en gris el DIC (contraste de interferencia diferencial). Se observa incorporación de EdU en las células germinativas del cuello. También se ve una población reducida de células EdU⁺ en el escólex. Mediante una incubación con el tiempo mínimo empleado (30 min) se obtiene una buena marca con el análogo de timidina.

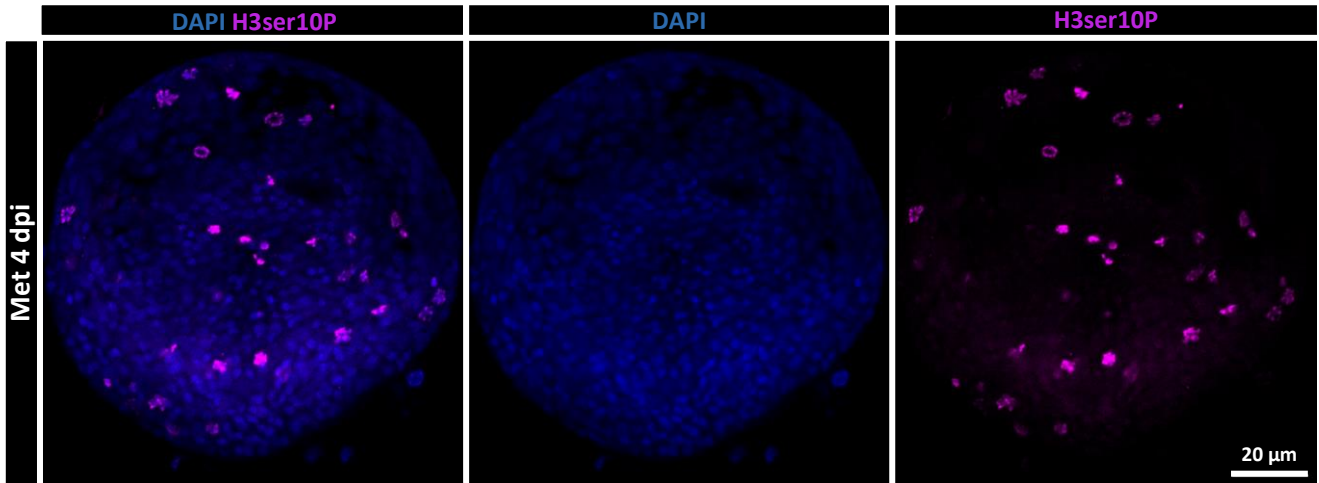


Figura 26: Larva en metamorfosis de 4 días post-infección (dpi) marcada con inmunohistofluorescencia para la H3ser10P. Se evidencia la presencia de células mitóticas. En azul se marcan los núcleos con DAPI y en magenta la marca de IHF. Imagen de Jimena Montagne (resultado de su tesis de doctorado, no publicado).

