

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS
BÁSICAS
ÁREA BIOLOGÍA

TESIS PRESENTADA PARA ACCEDER
A LA MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Opción Biología Celular y Molecular

“Caracterización de células proliferantes en platelmintos parásitos y estudio de un posible marcador molecular”

Umberto Germán Caurla Morales

Departamento de Biología Celular y Molecular
Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República
Departamento de Genética
Facultad de Medicina - Universidad de la República

Director de tesis:
Dr. Jose Tort
Dra. Estela Castillo

Tribunal:
Dra. Adriana Esteves (Presidenta)
Dra. Ileana Corvo (Vocal)
Dra. Leticia Perez (vocal)

Montevideo, Uruguay 2015

Tabla de contenido

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	5
CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PLATELMINTOS.....	6
BIOLOGÍA DE CESTODOS.....	7
BIOLOGÍA DE TREMATODOS	9
ESTUDIO DE NEOBLASTOS EN PLATELMINTOS - PROLIFERACIÓN.....	11
NEOBLASTOS EN CESTODOS	15
NEOBLASTOS E INCORPORACIÓN DE EDU EN TREMATODOS	18
EDU	20
PCNA.....	21
ANTECEDENTES DEL GRUPO DE TRABAJO	24
OBJETIVO GENERAL:	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
CLONADO EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN	28
<i>Minipreparaciones de ADN plasmídico</i>	29
<i>Transformación (Shock térmico) de los productos de ligación</i>	29
EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE	29
<i>Análisis de la solubilidad de la proteína recombinante (mL)</i>	30
<i>Purificación</i>	30
<i>Cuantificación Proteína recombinante</i>	31
ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.....	31
ANÁLISIS INFORMÁTICO	32
OBTENCIÓN DE MATERIAL PARASITARIO.....	32
<i>Cultivo de Mesocostoides corti</i>	32
<i>Obtención de Adultos Fasciola hepática</i>	33
<i>Obtención de huevos, miracidios y esporocistos</i>	33
TRANSCRIPCIÓN <i>IN VITRO</i> DE SONDAS MARCADAS CON DIGOXIGENINA-UTP (DIG-UTP)	33
<i>Integridad y cuantificación de las sondas</i>	34
HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> SOBRE CRIOCORTES Y ORGANISMOS ENTEROS.....	34
<i>Criocortes</i>	34
<i>Hibridación in situ sobre criocortes</i>	34
<i>Hibridación sobre organismos enteros</i>	35
GENERACIÓN ANTICUERPO POLICLONAL ANTI-EGPCNAR.....	36
INMUNOHISTOQUÍMICA	36
<i>Inmunohistoquímica sobre criocortes</i>	36
<i>Inmunohistoquímica sobre organismos enteros</i>	37
WESTERN BLOT.....	37
<i>Western blot sobre extractos proteicos</i>	38
INCORPORACIÓN DE EDU	38
<i>Incorporación de EDU Mesocostoides Corti</i>	38
<i>Incorporación de EDU Fasciola hepática</i>	39
RESULTADOS	40
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS	41
<i>Estructura Génica PCNA</i>	41
<i>Análisis Filogenético</i>	43
<i>Predicción informática de la estructura tridimensional de PCNA para diferentes</i> <i>Parásitos</i>	46
PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA PCNA EN FORMA RECOMBINANTE	48
<i>Expresión de la proteína recombinante</i>	48
<i>Solubilidad PCNA</i>	49

<i>Purificación EgPCNAr FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography).....</i>	<i>50</i>
<i>Confirmación EgPCNAr mediante Western Blot.....</i>	<i>51</i>
<i>Detección de PCNA en extractos proteicos de M. corti y F. hepática.....</i>	<i>52</i>
ENSAYOS DE HIBRIDACIÓN IN SITU.....	53
<i>Expresión espacial del ARN de PCNA en Mesocestoides corti.....</i>	<i>53</i>
<i>Hibridación sobre organismos enteros comenzando el proceso de segmentación.....</i>	<i>55</i>
EXPRESIÓN ESPACIAL DEL ARN DE PCNA EN FASCIOLA HEPÁTICA.....	57
<i>Hibridación sobre cortes histológicos F. hepática.....</i>	<i>57</i>
LOCALIZACIÓN ESPACIAL DE LA PROTEÍNA PCNA MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA CON ANTICUERPOS ANTI-EGPCNA.	59
<i>Inmunolocalización de PCNA en M. corti.....</i>	<i>59</i>
<i>Inmunolocalización de PCNA en Fasciola hepática.....</i>	<i>64</i>
DETECCIÓN DE CÉLULAS EN DIFERENTES ESTADIOS ABORDABLES DE DESARROLLO DE F. HEPÁTICA Y M. CORTI TRAS INCORPORACIÓN DE EDU.....	69
<i>Detección de la incorporación de Edu en F. hepática.....</i>	<i>69</i>
<i>Incorporación de Edu M. corti.....</i>	<i>74</i>
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	75
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
APÉNDICE I.....	86

Resumen

El advenimiento de nuevas técnicas para el estudio de la proliferación celular en neoblastos (células indiferenciadas) grandes avances se han logrado en el entendimiento de los mecanismos de regeneración celular en platelmintos. Muchos de los estudios más relevantes se han llevado a cabo mediante la utilización de marcadores moleculares.

Este trabajo plantea como objetivo contribuir al conocimiento de la biología del desarrollo de los platelmintos parásitos *Mesocestoides corti* y *Fasciola hepática* como organismos modelo de Cestodos y Trematodos respectivamente estudiando en particular las células proliferativas, bajo la hipótesis de que PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) es un posible marcador molecular específico de células proliferantes en platelmintos parásitos

PCNA es un cofactor de las ADN polimerasas δ y ϵ (Ayyagari R., et al., 1995; McAlear M. et al., 1994) cuya función es aumentar su procesividad (George-Lucian Moldovan, et al., 2007). Como antecedente (tesina de grado German Caurla) se aisló y caracterizó el gen de PCNA para *Mesocestoides corti*, *Echinococcus granulosus*, y *Fasciola hepática* proyectando en este estudio la producción de una proteína recombinante de *E. granulosus* EgPCNAr (*Echinococcus granulosus* PCNA recombinante) para generar un anticuerpo y así localizar PCNA en ensayos de inmunohistoquímica sobre distintos estadios (abordables) de desarrollo de los parásitos. Así también planteamos realizar una caracterización espacial para determinar si existe expresión diferencial en regiones del organismo mediante ensayos de hibridación con sondas de ARN.

Se probó la incorporación de 5-etil-2'-desoxiuridina (EDU) al ADN, el cual es un método para detectar la síntesis de ADN en células proliferantes. Y se realizó un análisis informático de secuencias génicas y estructuras de proteína para corroborar datos acerca de la historia evolutiva del gen que se sabe se encuentra altamente conservado a lo largo de la historia.

Se logró expresar la proteína recombinante, inmunizar un conejo y obtener un anticuerpo contra PCNA. Los resultados de inmunomarcado con dicho anticuerpo muestran poblaciones celulares positivas para PCNA que presentan una distribución similar ensayos de Hibridación in situ con sondas de ARN e incorporación de EDU tanto en *M. corti* como *F. hepática*. Se genera un gradiente anteroposterior conforme comienza el desarrollo y crecimiento para *M. corti*. la localización se da a nivel del parénquima medular encontrando mayores concentraciones en cuello y escólex. En *F. hepática* la distribución se concentra a nivel de las glándulas vitelógenas no descartando la tinción en aparato reproductor. A su vez los resultados obtenidos se corresponden a lo encontrado en la bibliografía para otros modelos. Las inferencias informáticas demuestran el alto

porcentaje de identidad que existe a nivel de secuencia génica si bien la separación en clados queda bien definida para cada clase. Se visualizo también la alta similitud a nivel de estructura que presenta PCNA en todos los organismos.

Introducción

Características generales de los Platelminetos

Los platelmintos son un filo de animales invertebrados acelomados, protóstomos, triblásticos que comprende unas 20.000 especies. Son organismos aplanados dorso-ventralmente y presentan simetría bilateral. Su cuerpo es macizo y relleno de tejido parenquimático laxo. El espacio entre el ectodermo y el endodermo está lleno de mesénquima en donde se encuentran los órganos internos. No existe cavidad general como en el caso de los nemátodos y las estructuras intraparenquimatosas corresponden a los órganos genitales (Osimani, 1982).

En la mayoría de los casos la organización del sistema genital es hermafrodita con la excepción de algunas especies. El tubo digestivo carece de ano, actuando como cavidad gastrovascular la cual realiza las funciones digestivas y de distribución de los nutrientes, dado que carecen de aparato circulatorio. Muchas formas parásitas carecen de aparato digestivo. Tampoco tienen aparato respiratorio y el oxígeno que necesitan para su metabolismo lo intercambian a través de sus delgados tegumentos. Tienen un sencillo sistema nervioso bilateral que recorre el cuerpo y un aparato excretor rudimentario que está constituido por los protonefridios, que comienzan ciegos en el mesénquima.

Dentro del ciclo biológico de las formas parásitas se pueden presentar uno o más hospederos intermediarios, pudiendo llegando en ocasiones a ser muy complejo.

Según la clasificación tradicional, el filo platelmintos, comprende cuatro clases.

- *Turbelarios*: platelmintos de vida libre que ocupan el medio marino, lacustre o dulceacuícola.
- *Trematodos*: platelmintos parásitos internos y externos tanto de vertebrados como invertebrados.
- *Cestodo*: platelmintos endoparásitos. En su extremidad anterior está situado el denominado *escólex*, donde encontramos órganos de fijación para adherirse a su hospedero, el resto del cuerpo posee un número variable de segmentos llamados *proglotis*.
- *Monogéneos*: platelmintos parásitas principalmente de peces y anfibios. Considerados durante largo tiempo como un orden de la clase Trematoda, fueron separados de ellos, entre otros motivos, por presentar un ciclo biológico con un solo hospedero.

Biología de Cestodos

Los cestodos son hermafroditas y en general tienen ciclos que implican más de un hospedero. La forma adulta vive en la mayoría de los casos en el tubo digestivo de mamíferos y se encuentra especializada para la sobrevivencia en ese entorno. Los adultos tienen una pequeña cabeza o escólex, con órganos especializados de fijación (ventosas y/o ganchos), seguido por un corto cuello o zona de brotación (proliferación) que genera los segmentos del cuerpo o estróbila, que consiste de hasta 1000 proglótides. Constantemente, se están formando nuevas proglótides por brotamiento transversal en el cuello, y a medida que crece y se aleja del escólex cada proglótide madura dando lugar a los órganos reproductores masculinos y femeninos, los que por autofecundación o fecundación cruzada dan lugar a miles de huevos. Estos permanecen al interior del proglótide maduro, y eventualmente los proglótides terminales grávidos son liberados. Cuando son ingeridos por los hospederos intermediarios, liberan formas larvarias que se enquistan en los tejidos del hospedero intermediario; en algunos casos estos quistes dan lugar a múltiples formas larvarias por gemación al interior del quiste (como es típico en especies del género *Echinococcus*) (Figura 1). La generación de protoescólex a partir de la capa germinativa del quiste hidático es un claro ejemplo de la existencia de células indiferenciadas con una alta capacidad proliferativa y de diferenciación.

En varios laboratorios el Cestodo *Mesocestoides corti* está siendo incorporado como modelo alternativo para el estudio de cestodos (Markoski et al. '03; Espinoza et al. '2005). *M. corti* posee un ciclo de vida complejo, con al menos tres hospedadores. El adulto es un típico cestodo segmentado, vive en el intestino de animales homeotermos carnívoros varios, y produce huevos con oncósferas (embriones), que infectan a un primer hospedador intermediario; este es probablemente un artrópodo pero la identidad del mismo se desconoce. Este primer hospedador intermediario sería entonces ingerido por el segundo hospedador intermediario; en este caso, una amplia gama de animales son capaces de alojarlo, como por ejemplo lagartijas, serpientes, ratones y cánidos (Britos et al. '2000). En la cavidad peritoneal de estos hospedadores, se desarrollan como tetratiridios, un estado larval propio del género, que es similar al adulto en cuanto a que posee un escólex con cuatro ventosas, pero no se encuentra aún segmentado ni posee rudimentos del aparato reproductor. Los tetratiridios proliferan asexualmente mediante fisión longitudinal en estos hospedadores. Los tetratiridios de *M. corti* pueden mantenerse en el laboratorio por infección de ratas y ratones, rindiendo grandes cantidades de larvas en poco tiempo. El cultivo in vitro de

tetratiridios según las condiciones puede inducir la proliferación asexual de las larvas, o llevar a la segmentación y la formación de las gónadas (Thompson et al. '82; Markoski et al. '03). Estos procedimientos han sido puestos a punto en nuestro laboratorio (Britos et al. '00; Lalanne et al. '04).

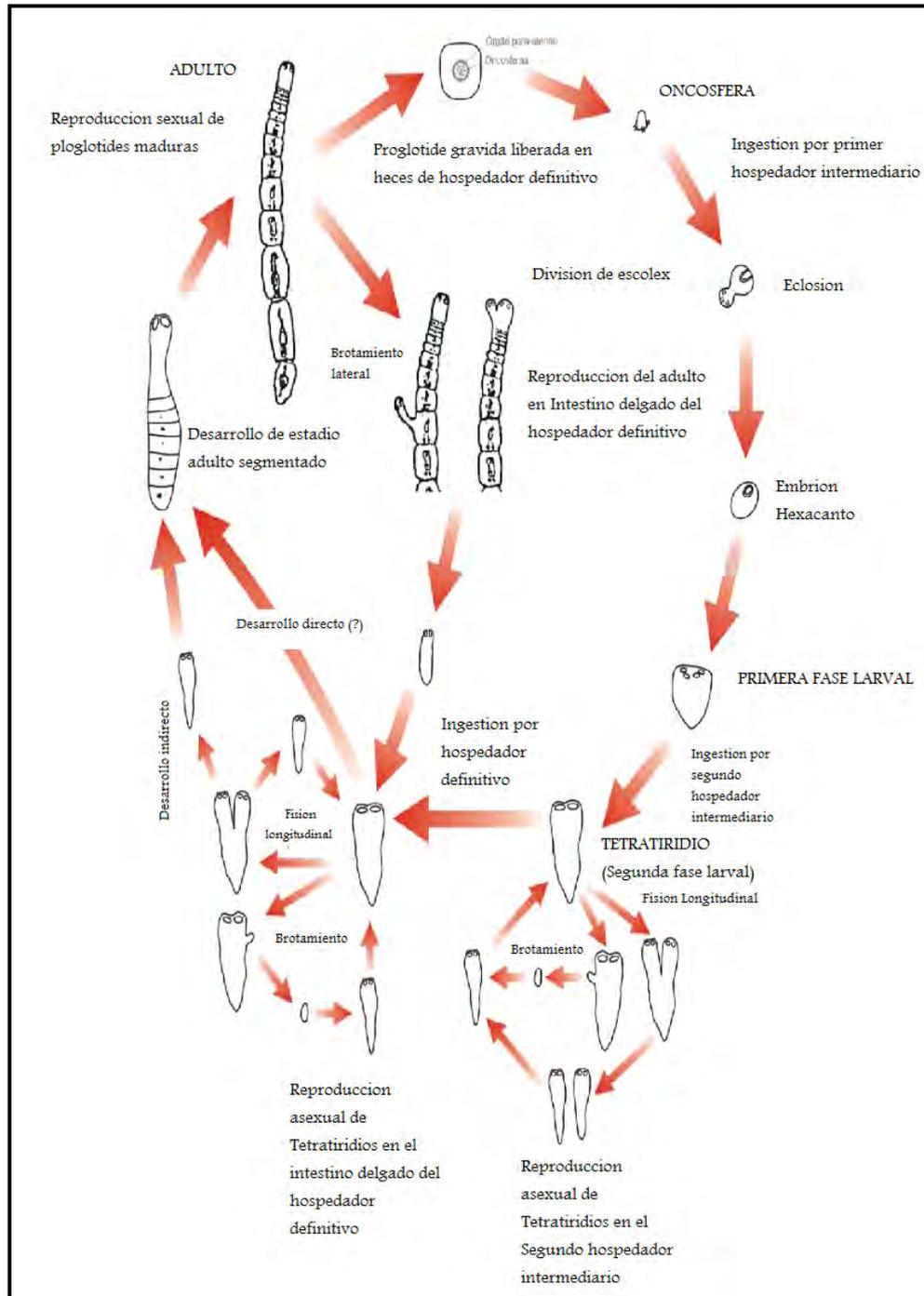


Figura (1) - Ciclo de vida de *Mesocestoides Corti*. En la figura se muestran las diferentes etapas del desarrollo que es posible encontrar en este parásito. Modificada de <http://www.ufrgs.br/depbiot/206a/Ciclo.htm>

Biología de Trematodos

En tremátodos los ciclos biológicos son complejos implicando generalmente un molusco como hospedero intermediario y un vertebrado como hospedero definitivo, pudiendo existir más hospederos intermediarios entre éstos (Figura 2a). Salvo los Schistosomas que son dioicos, todos los tremátodos son hermafroditas, y se reproducen sexualmente en su fase adulta. Los huevos (Figura 2b) producidos generan larvas que infectan al hospedero intermediario, pero en éste ocurre un proceso de amplificación asexual, de modo que a partir de un miracidio (Figura 2c) que infecta un caracol pueden emerger varios cientos de cercarias. Se conoce desde hace más de un siglo que el desarrollo asexual en el hospedero intermediario depende de masas germinales de células. Los miracidios que eclosionan de los huevos, invaden el caracol que les sirve de hospedero intermediario, y se transforman en una estructura hueca, el esporocisto, que contiene en su interior algunas células germinales. Estas se dividen y desarrollan dando lugar a las formas larvarias siguientes, las redias. Estas emergen del esporocisto, y migran alimentándose de los tejidos del hospedero. En su interior persisten células indiferenciadas que proliferan nuevamente dando lugar a nuevas masas germinales. Estas a su vez se diferencian en redias hijas o en cercarias dependiendo de las condiciones ambientales y nutricionales del hospedero.

Las cercarias son esencialmente una forma inmadura que luego de invadir al hospedero definitivo culmina el proceso de crecimiento, diferenciación y maduración. Si bien no han sido identificados, verdaderos precursores germinales deben estar presentes en las cercarias, para dar lugar a las gónadas presentes en los adultos. Estas dos o tres rondas de reproducción asexual en el caracol significan una amplificación biológica, donde a partir de un único miracidio se pueden obtener varios cientos de metacercarias (Wilson & Draskau '76; Andrews '99; Keiser '10).

En nuestro país la prevalencia de infección con *F. hepática* en ovinos y bovinos supera el 50%. La infección se adquiere por ingesta de vegetación (berro en el caso típico humano) contaminada con metacercarias, las que se activan al pasar por el estómago y se desenquistan en el duodeno. Los juveniles recientemente desenquistados (JRD) atraviesan la pared intestinal, migran por la cavidad peritoneal y erosionan el parénquima hepático en su trayecto hasta su destino final en los canalículos biliares. En este entorno inmunológicamente seguro, maduran sexualmente, produciendo miles de huevos diarios que son liberados con las heces del hospedero. Los miracidios generados infectan caracoles del género *Lymnea*, donde se dan dos o tres ciclos de amplificación asexual como

se describió anteriormente, liberando finalmente una forma de vida libre (cercaria) que se enquistan en la vegetación transformándose en metacercaria y cerrando el ciclo (Andrews '99.)

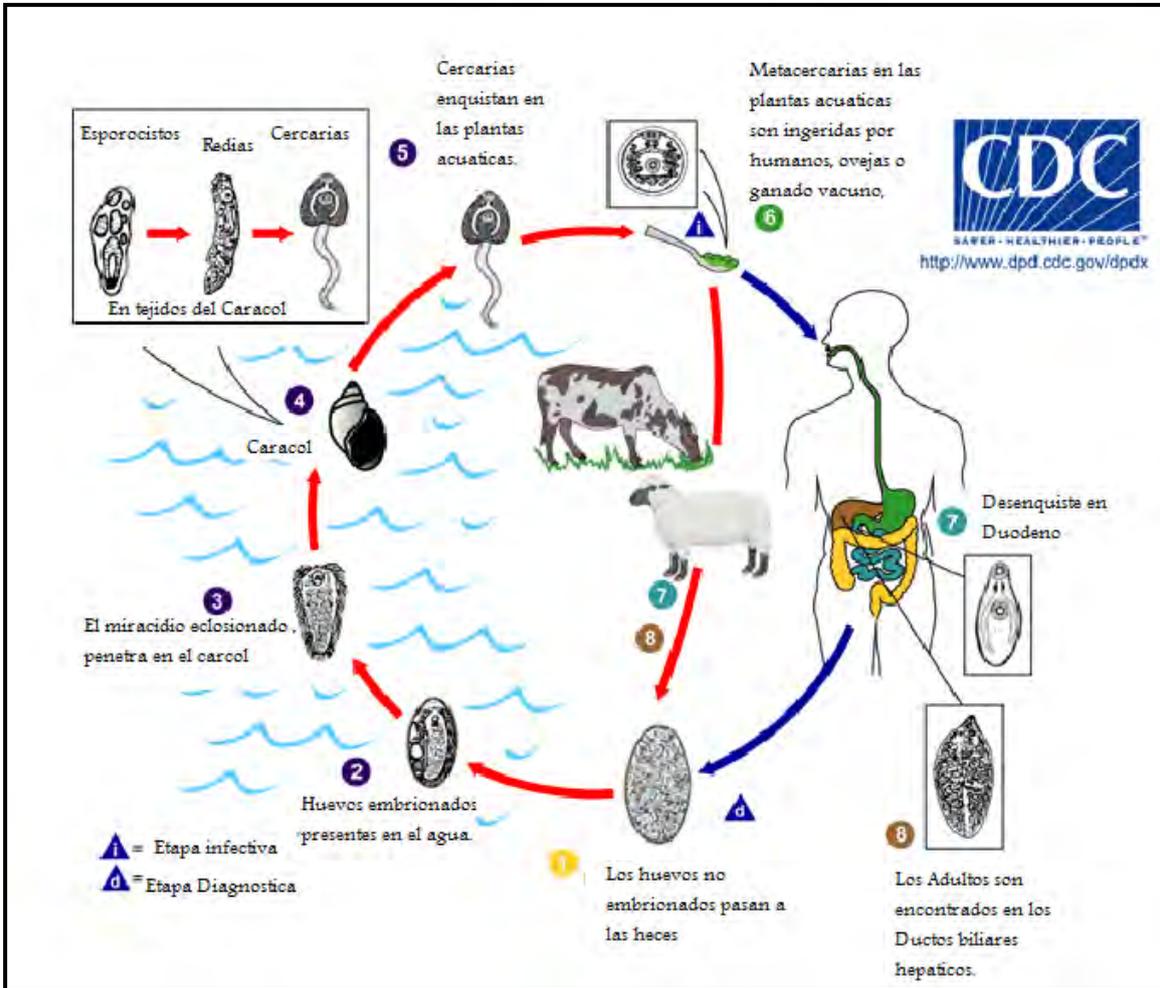


Figura 2a - Ciclo de vida de *F. hepática*. En la figura se muestran las diferentes etapas del ciclo con sus hospedadores. Modificado de página Centers for Disease Control and Prevention <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>



Figura 2b - Huevo de *Fasciola hepática*. Huevo operculado, Forma elipsoidal y de pared fina aunque altamente impermeable. Tamaño: 130-150 x 60-90 μm . Imagen adaptada de Curso practicas de microbiología para farmacéuticos - Universidad de Granada



Figura 2c - Imagen Miracidio adaptada de - Area de Biología. Lab. de Microfauna (M.V.Z Santos Vázquez Cervantes)

Los helmintos parásitos son responsables de infecciones en una gran cantidad especies de animales. Debido al impacto sanitario y económico han sido estudiados buscando dilucidar aspectos básicos referidos a su biología, inmunología, y epidemiología. Sin embargo, a pesar del conocimiento acumulado, ninguna de las estrategias diseñadas para erradicarlos han funcionado por lo que es imprescindible profundizar en el conocimiento de su biología.

Estudio de neoblastos en Platelmintos - Proliferación

Las Planarias son gusanos planos, de cuerpo blando, y sin segmentación visible. Muchas especies de este tipo son conocidas, entre las que se incluyen especies de agua dulce, agua salada, e incluso hay terrestres. "Planaria" es un término coloquial que hace referencia a los miembros de vida libre del orden Tricladida, dentro de la Clase Turbellaria. Estos gusanos han atraído la atención de diversos biólogos debido a su asombrosa capacidad regenerativa (un pequeño fragmento del cuerpo se puede regenerar en el lapso de 1 semana) (Rink, 2013;) La regeneración celular en Planarias está basada en un tipo celular pluripotente denominados neoblastos. Éstos están distribuidos en el parénquima de los organismos y conforman aproximadamente el 25 - 30 % del total de células (Baguñá et al., 1989). Los neoblastos en Planarias se caracterizan por su morfología, su gran capacidad proliferativa, y por la expresión de marcadores moleculares característicos de este tipo celular (Peter et al., 2004; Reddien, 2013; Reuter y Kreshchenko, 2004). La historia del descubrimiento de los neoblastos ha sido recientemente revisada (Baguñá, 2012). El término "neoblasto" se usó en un primer momento para describir a las células pequeñas y redondas que se encontraban en el mesénquima de las Planarias, a excepción de la zona frente a los fotorreceptores y a la faringe (únicas áreas incapaces de regenerarse) (Reddien y Alvarado, 2004). Mediante el microscopio electrónico de transmisión (TEM) se pudieron caracterizar morfológicamente como células con un diámetro de 5 a 10 micras, con un citoplasma delgado, gran cantidad de ribosomas libres, cuerpos cromatoides prominentes, y un núcleo grande con poca heterocromatina (Baguñá y Romero, 1981; Betchaku, 1967; Brøndsted, 1969; Coward, 1974; Hey y Coward, 1975; Hori, 1982; Pedersen, 1959). Un indicio de que estas células juegan un rol preponderante en la regeneración surgió al observar mediante diversos experimentos que todas las divisiones celulares en planarias ocurrían exclusivamente en células que concordaban con la descripción morfológica detallada anteriormente, lo cual culminó con la afirmación de que "en planarias, los neoblastos son las únicas células que se dividen". En consecuencia, los marcadores de división celular genéricos tales como fosfo-histona H3, incorporación de BrdU, o

la expresión de componentes de la maquinaria de la división celular, tales como PCNA son comúnmente utilizados como marcadores de neoblastos (Morita y Best, 1984; Newmark y Sánchez Alvarado, 2000; Orii et al., 2005; Salvetti et al., 2000). Los avances en técnicas moleculares y celulares han revelado los mecanismos que rigen la función de los neoblastos y la regeneración celular. Como respuesta a una amputación o a una lesión en el tejido del organismo, las Planarias son capaces de cicatrizar la herida mediante la migración de células epiteliales adyacentes, seguido por una rápida migración y proliferación de neoblastos (Baguña, 1976; Eisenhoffer et al., 2008; Saló y Baguña, 1984; Sasidharan et al., 2013; Wenemoser y Reddien, 2010;). El inicio de la regeneración implica una pérdida selectiva de células viejas cerca de la región herida mediante el proceso de apoptosis, seguida de una remodelación de tejidos viejos y nuevos. El resultado es la restauración completa de la morfología normal del animal (Lobo et al., 2012).

Un experimento esencial para validar el papel de los neoblastos realizado por Wagner y sus colegas en 2011 consistió en trasplantar un neoblasto a un gusano letalmente irradiado (depletado de células madre) se logró como resultado un gusano totalmente sano y del genotipo del gusano donante del neoblasto (Wagner et al., 2011). Existen experimentos que ponen en evidencia este mecanismo a través de la técnica de marcaje con BrdU y posterior irradiación del organismo, por ejemplo en *Macrostomum lignano* (Pfister et al., 2007, Nodono et al., 2012).

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

Tabla 1 - Genes de Planaria involucrados en la Biología de células proliferativas. Obtenido de Disease Models and Mechanisms 2011 4: 12-19; doi: 10.1242/dmm.006692

Planarian gene	Homologous human protein (accession no.)	Expression pattern	RNAi phenotype (regeneration)	Proposed function in planarian stem cells	References
Argonaute/Piwi family					
<i>Djpiwi-1</i>	HIWI (Q96J94)	Dorsal midline	N.D.	Unknown	Rossi et al., 2006
<i>Smedwi1</i>	HIWI (Q96J94)	Parenchyma	No phenotype	Unknown	Reddien et al., 2005
<i>Smedwi2</i>	HIWI (Q96J94)	Parenchyma	Blastema formation, then regression; death in 2-3 weeks	piRNA expression; stem cell differentiation	Reddien et al., 2005; Palakodeti et al., 2008
<i>Smedwi3</i>	HILI (Q8TC59)	Parenchyma	Reduced blastema formation, then regression; death in 3 weeks (after three rounds of RNAi and amputation)	piRNA expression; stem cell differentiation	Palakodeti et al., 2008
Other RNA-binding proteins					
<i>DjVlgA</i>	DDX3X (O00571)	Germ cells, parenchyma, blastema	N.D.	Post-transcriptional regulation	Shibata et al., 1999
<i>DjPum</i>	PUM2 (Q8TB72)	Parenchyma (strongly expressed in the posterior dorsal stripe), brain	Reduced blastema formation; death in 3-4 weeks (after two rounds of RNAi and amputation)	Post-transcriptional regulation	Salveti et al., 2005
<i>Smed-Bruli</i>	TNRC4 (Q9BTF3)	Parenchyma, brain	Reduced blastema formation, then regression; death in 3 weeks	Stem cell self-renewal	Guo et al., 2006
<i>Smednos/Djnos</i>	NANOS1 (Q8WY41)	Primordial germ cells, spermatogonia, oogonia, eye precursor cells	No regeneration of gonads and copulatory apparatus	Zinc-finger-containing RNA-binding protein; germline specification	Sato et al., 2006; Handberg-Thorsager and Salo, 2007; Wang et al., 2007
<i>Spoltud-1</i>	TDRD gene family	Ovaries, testes, CNS, parenchyma	Regeneration defects; loss of stem cells (after 4 rounds of RNAi and amputation)	Chromatoid body component; stem cell long-term self-renewal	Solana et al., 2009
<i>Djcbc-1</i>	RCK (D17532)	Parenchyma, brain, germline stem cells	No phenotype	Chromatoid body component	Yoshida-Kashikawa et al., 2007
<i>Smed-SmB</i>	SMB (P14678)	Parenchyma, brain	No blastema formation; loss of stem cells; death in 2 weeks	Chromatoid body component; stem cell self-renewal	Fernandez-Taboada et al., 2010
DNA replication					
<i>Djmcm2</i>	MCM2 (P49736)	Parenchyma (strongly expressed in the dorsal midline)	N.D.	DNA replication	Salveti et al., 2000
<i>DjPCNA</i>	DDBJ (M15796)	Parenchyma (strongly expressed in the dorsal midline and in the bilateral lines)	N.D.	DNA replication	Orii et al., 2005
Chromatin remodelling					
<i>Smed-CHD4</i>	CHD4 (Q14839)	Parenchyma, CNS	Reduced proliferation response; decreased number of neoblasts progeny cells; death in 3-4 weeks	ATP-dependent helicase; stem cell differentiation	Scimone et al., 2010
<i>DjRbAp48</i>	RBBP4 (Q09028)	Parenchyma, blastema	Reduced blastema formation; ventral curling; reduced motility; death in 6 weeks	Histone-binding protein; nucleosome remodelling	Bonuccelli et al., 2010
Other functions					
<i>Smedinx-11</i>	Not present	Parenchyma, pharynx, region surrounding the brain and region anterior to photoreceptors	No blastema formation; reversal of the neoblast gradient; death in 5 weeks	Gap junction protein (innexin)	Oviedo and Levin, 2007
Category 2 and Category 3 genes	Various	Early blastema, outer parenchyma of intact animals	N.D.	Early stem cell progeny differentiation	Eisenhoffer et al., 2008
<i>Smed-p53</i>	TP53 (P04637)	Parenchyma, stem cell progeny	Decreased number of neoblast progeny cells	Early stem cell progeny differentiation	Pearson and Sanchez Alvarado, 2010
<i>Djmot</i>	HSPA9 (Q8N1C8)	Parenchyma (strongly expressed in the dorsal midline), blastema	Reduced blastema of neoblast reduced regeneration; death in 5-7 weeks	Chaperone, sequestration of p53	Conte et al., 2009

N.D., not determined; piRNA, Piwi-interacting RNA.

Ha habido un gran desarrollo de técnicas para el estudio de la proliferación celular en neoblastos y los mecanismos de regeneración en platelmintos. Algunos de los avances más espectaculares se han logrado mediante la utilización de marcadores moleculares para los neoblastos y su progenie mediante hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, el uso de citometría de flujo (Domínguez et al., 2014; Higuchi et al., 2007), la existencia de proyectos genoma y de expressed sequence tags (ESTs) que permiten el aislamiento sencillo de genes y la construcción de microarrays (Robb et al., 2008; Rossi et al., 2007; Sanchez Alvarado et al., 2002; Zayas et al., 2005), y el desarrollo de técnicas para el knock-down mediante interferencia de ARN de los genes involucrados (Newmark et al., 2003; Nimeth et al., 2004; Reddien et al., 2005; Sanchez Alvarado et al., 2002; Sanchez Alvarado y Newmark, 1999).

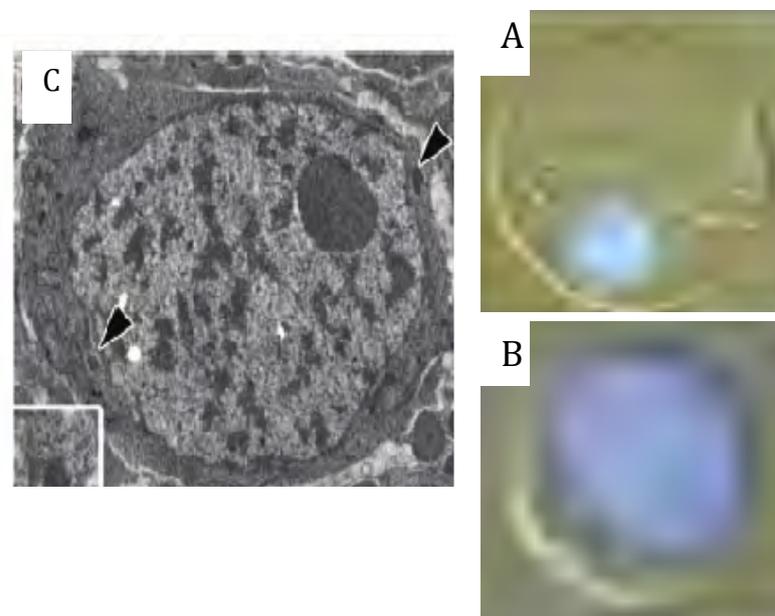


Figura 3. Características Células indiferenciadas en Planarias. A: Célula indiferenciada. B: Neoblasto. Alta relación núcleo / citoplasma, Nucleolo prominente, Alta basofilia debido a la cantidad de ribosomas libres, Escaso retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi, Presencia de cuerpos cromatoides. Obtenido de Shibata, N. 2010

Mediante el uso de las técnicas mencionadas, se han podido identificar algunos marcadores moleculares entre los cuales se encuentran genes efectores que participan directamente en los procesos de replicación del ADN (Tabla 1) como la proteína PCNA (Orii et al., 2005), y el gen MCM2 (Salvetti et al., 2000), y factores que podrían participar en la regulación de estos procesos (como ser el regulador post-transcripcional Pumilio (Rossi et al., 2008; Salvetti et al., 2005). Existen evidencias de que el mecanismo de renovación celular en los platelmintos parásitos neodermados es similar al de platelmintos de vida libre (Koziol et al., 2014; Sanchez Alvarado et al., 2003; Nimeth et al., 2004), especialmente en el caso

de cestodos, si bien existen algunos estudios en digeneos (Reuter y Kreshchenko, 2004).

Neoblastos en Cestodos

Algunos autores, Galindo et al., (2003) han descrito la existencia de parches de células proliferativas en la capa germinal del quiste hidático (fase larvaria) de *Echinococcus granulosus*, a partir de los cuales se desarrollarían los protoescólices (fase infectiva para el perro); la proliferación celular disminuiría una vez que comienza la diferenciación de los mismos. En cestodos adultos, por otra parte, se encuentra establecido para algunas especies que la proliferación celular existe principalmente en el parénquima de la región del cuello, donde se van generando los proglótidos (segmentos) de la estróbila (Merchant et al., 1997).

Estudios en *Dipyllobothrium dendriticum* (Figura 4 a,b,c) han demostrado que los neoblastos se localizan en el parénquima medular y adyacentes a la musculatura interna. Además, se analizó la distribución durante el desarrollo del primordio genital, que surge como una acumulación en el centro de cada proglótido que con el tiempo aumenta de tamaño existiendo proliferación en la parte más externa del primordio (Gustafsson, 1976b). En *Cylindrotenia* (Figura 5), se analizó también e desarrollo del primordio genital, a lo largo de los proglotides con distintos estados del desarrollo del aparato reproductor.

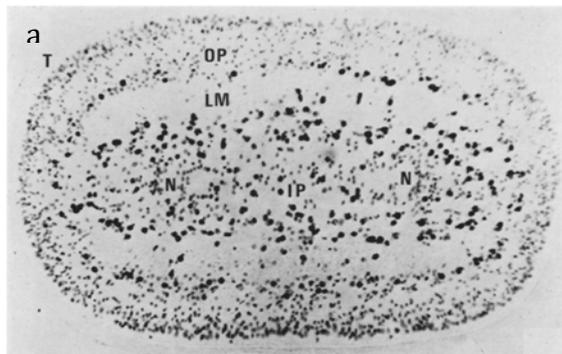


Figura 4a - Distribución Neoblastos en *Dipyllobothrium dendriticum* (corte transversal), (Gustafsson, 1976b)

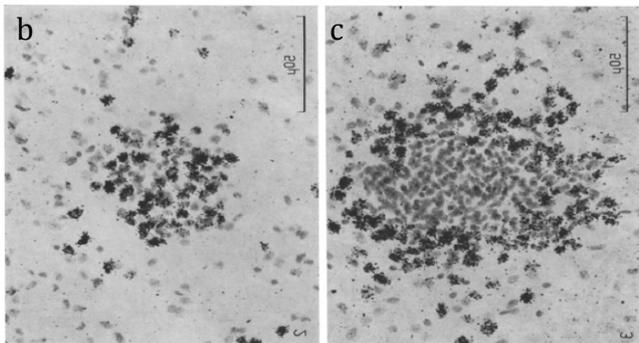


Figura 4 b/c - Primordio genital *Dipyllobothrium dendriticum*. A: Temprano, B: Tardío (Wikgren et al., 1971)

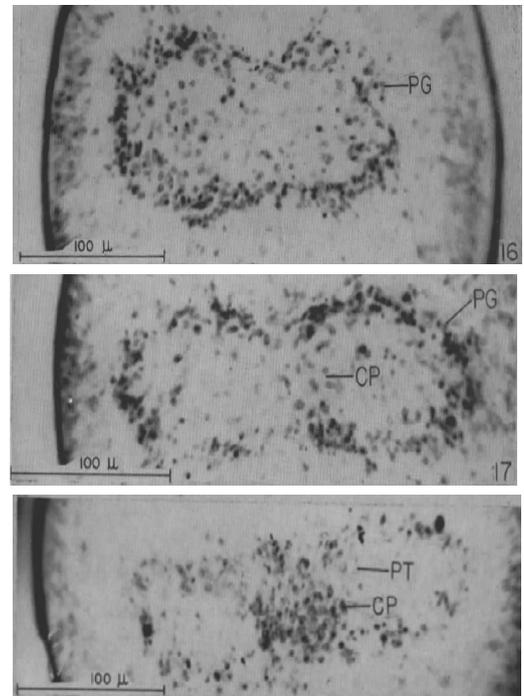


Figura 5 - Etapas sucesivas en la formación del primordio genital en *Cylindrotenia* (Douglas, 1961)

En el caso de *M. corti*, un estudio describió la presencia de los neoblastos durante el desarrollo estrobilar mediante marcado metabólico con timina tritiada (Figura 6), (Espinoza et al., 2007). Caracterizaron en forma cuantitativa la proliferación celular una vez inducida la segmentación. Midió la incorporación de $^3\text{H-T}$, el porcentaje de células que incorporan $^3\text{H-T}$, y los niveles totales de expresión del ARNm del gen para la histona H4. Se identificaron dos fases de proliferación en el desarrollo desde tetratiridio a gusano adulto, y un segundo y mayor aumento al suceder la segmentación. Se determinó la localización en cortes histológicos mediante auto-radiografía de las células que incorporaron $^3\text{H-T}$. En el tetratiridio en división asexual longitudinal, la distribución se observa en todo el organismo pero especialmente en la región anterior (junto a las ventosas y en el extremo apical) y en el límite entre el parénquima cortical y el parénquima medular. Interpretan esto como una asociación o incorporación de las células proliferantes a los cordones nerviosos, si bien en la misma región se encuentran también los haces musculares longitudinales internos. En tetratiridios no inducidos y tras la inducción se observan patrones similares en los que las células proliferantes se observan principalmente en el límite exterior del parénquima cortical.

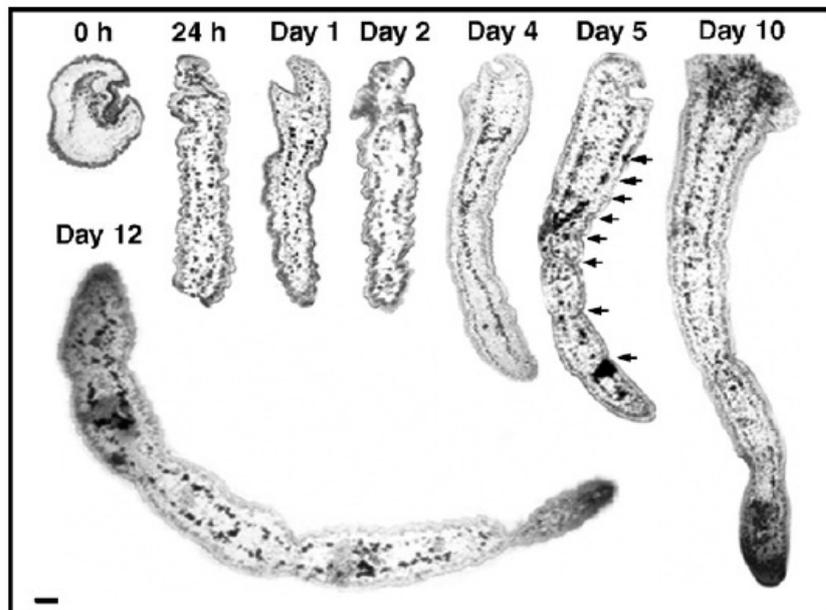


Figura 6 - Análisis auto-radiográfico de la incorporación de $^3\text{H-T}$ por ejemplares de *M. corti* tras diferentes tiempos tras la inducción de la segmentación. La barra representa 100 μm . Tomado de Espinoza et al., 2007

Los estudios de incorporación de BrdU realizados por U. Koziol (Figura 7) en el organismo entero las células BrdU+ se encuentran en toda la región del parénquima medular, en particular en la periferia del mismo.

No se encontró evidencia de acumulación preferencial de células BrdU+ alrededor de la región de los cordones nerviosos principales. En todo el parénquima cortical y en la región sub-tegmentaria no se observan prácticamente células BrdU+.

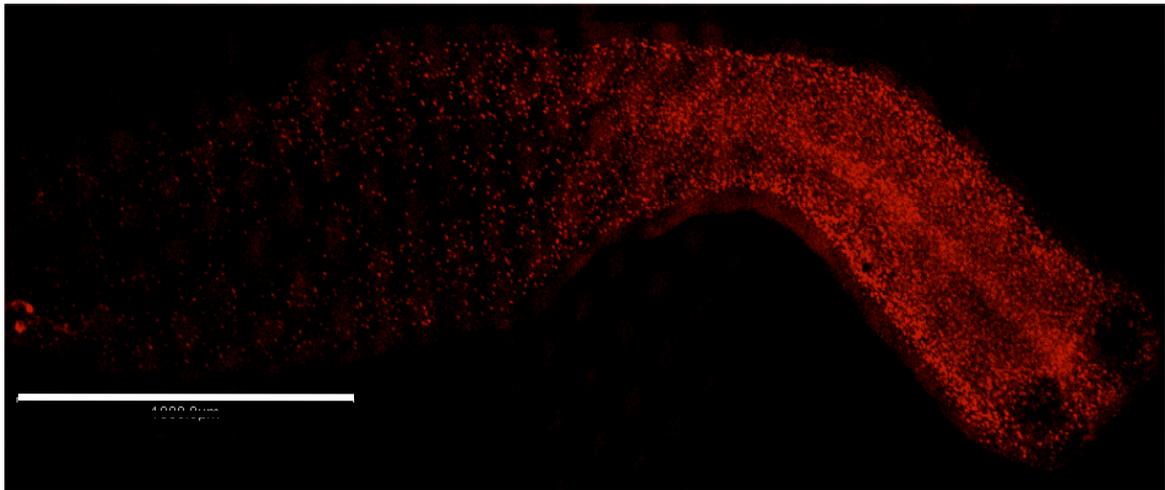


Figura - 7 Inmunodetección de BrdU en tetratiridios inducidos con taurocolato de sodio, tras un pulso de 24 horas con BrdU. Microscopía confocal de fluorescencia Vista general de tetratiridio inducido aún no segmentado. La barra representa 1000 µm Adaptado de U. Koziol 2010

Las células BrdU+ muestran una acumulación en el escólex y en toda la región anterior en particular junto a las ventosas generando un gradiente a lo largo del eje antero-posterior. Entre las ventosas de los tetratiridos el número de células BrdU+ es alto, pero no muestra una concentración mucho mayor de células BrdU+ que en otras regiones cercanas a las ventosas.

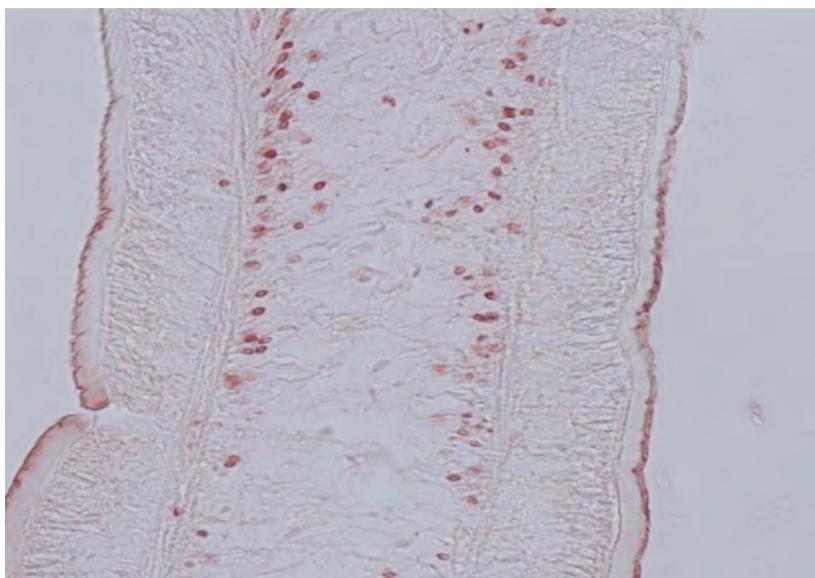


Figura 8 - Incorporación de BrdU en *M. corti* . Revelado con AEC. Adaptado de U. Koziol

Neoblastos e incorporación de Edu en Trematodos

Mediante marcado con un análogo de timina, se mostró que las células proliferantes presentan una distribución a lo largo del parénquima del organismo, obviamente enriquecida en los órganos reproductores de los adultos. Además presentan la misma morfología de los neoblastos de planarias, con un núcleo prominente y un citoplasma pequeño, (Collins et al. 2013).

Son también sensibles a la radiación, ya que los organismos irradiados no son capaces de incorporar EdU. Los organismos irradiados presentan 128 genes con expresión disminuida, los cuales corresponden a los genes caracterizados como marcadores de neoblastos de planarias (Tabla 2).

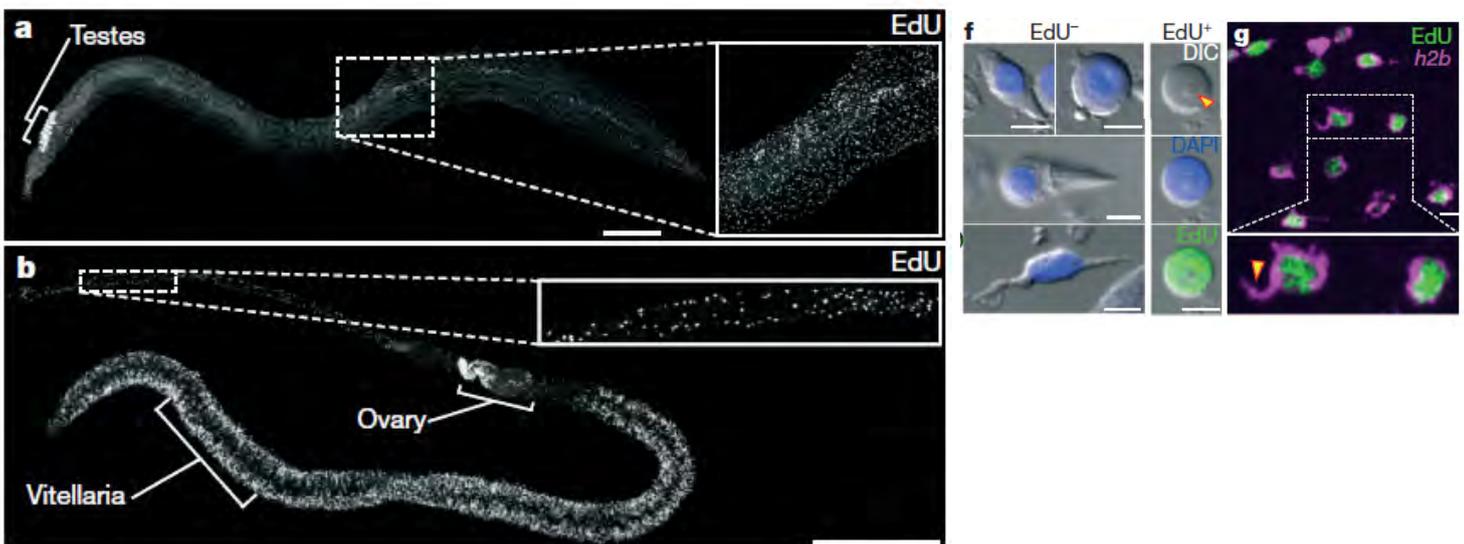


Figura 9 - Proliferación de células somáticas en adultos de Schistosoma. A: Marcado de adulto de Edu. B: Marcado de hembra con EDU. f: Morfología EDU +, EDU - g: FISH para la Histona h2b junto con EDU de células aisladas. Las barras representan en a 500mm, f y g 5mm . Adaptado de Collins et al. (2013). Nature, 494, 476-479

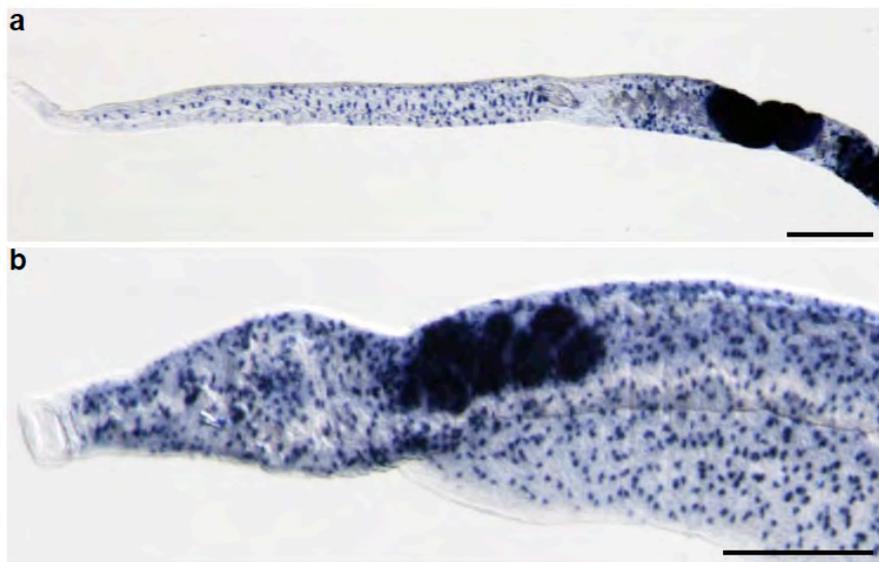


Figura 10 - Hibridación in situ para la detección de la Histona H2b. a: Parasito macho, b: Parasito hembra. Adaptado de Collins et al. (2013). Nature, 494, 476-479

Tabla 2. Expresión en miracidios y esporocistos de genes homólogos de neoblastos en planarias.
Adaptado de Wang et al. 2013

Table 1. Expression in miracidia and sporocysts of schistosome homologs of planarian neoblast-enriched transcripts, measured by RNAseq

Gene name	RPKM (miracidia)	RPKM (sporocysts)	Fold change
<i>vasa-like</i> (<i>vlg</i> , Smp_068440 , 154320, 033710)	20.6/46.1/272.4	98.5/79.2/423.1	4.8/1.7/1.6
<i>polo kinase</i> (Smp_009600)	43.0	149.5	3.5
<i>fgfr</i> (Smp_175590, 157300)	3.5/3.0	10.2/6.4	2.9/2.1
<i>sz12</i> (Smp_047720)	5.6	16.0	2.8
<i>bruli</i> (Smp_041350)	5.5	15.3	2.8
<i>Sedt8</i> (Smp_055310)	1.9	4.8	2.6
<i>egr</i> (Smp_094930)	3.0	7.4	2.5
<i>cyclin B</i> (Smp_082490)	79.7	194.0	2.4
<i>nlk</i> (Smp_074080)	7.5	18.0	2.4
<i>ago2-1</i> (Smp_179320)	258.9	537.5	2.1
<i>PCNA</i> (Smp_046500)	194.0	395.0	2.0
<i>inx</i> (Smp_141290)	102.6	203.7	2.0
<i>ezh</i> (Smp_078900)	8.1	15.5	1.9
<i>PHB</i> (Smp_075210, 075940)	222.0/197.7	421.0/290.8	1.9/1.5
<i>pp32a</i> (Smp_010940)	641.7	1176.3	1.8
<i>H2A</i> (Smp_086860)	240.3	437.1	1.8
<i>THOC</i> (Smp_005260)	219.6	397.3	1.8
<i>egfr</i> (Smp_093930, 165470)	6.8/7.0	12.1/10.0	1.8/1.4
<i>CHD</i> (Smp_158050)	39.6	68.6	1.7
<i>tudor-like</i> (Smp_081570)	222.8	367.8	1.7
<i>H2B</i> (Smp_108390)	124.6	206.5	1.7
<i>ef-tu</i> (Smp_073500)	151.6	243.6	1.6
<i>HSP60</i> (Smp_008545)	2051.5	3224.7	1.6
<i>fhl</i> (Smp_048560)	2.0	3.1	1.5
<i>eed</i> (Smp_165220)	32.7	46.3	1.4
<i>juni</i> (Smp_067520)	5.5	7.7	1.4

Expression of genes in bold is confirmed in this study with qPCR or FISH.

Wang et al. eLife 2013;2:e00768. DOI: 10.7554/eLife.00768

EDU

La incorporación de 5-etinil-2 'desoxiuridina (EDU) al ADN es un método rápido para detectar la síntesis de ADN en células proliferantes que sustituye los ensayos de BrdU (Bromodeoxiuridina). Su rápida detección se debe al uso de una azida fluorescente la cual a través de un enlace Cu hacen que la detección con la molécula EdU sea muy sensible y se puede lograr en minutos. El pequeño tamaño de las azidas fluorescentes utilizadas para los revelados logran un alto grado de penetración y una alta tasa de detección permitiendo una mejor tinción en todo el preparado. En contraste con BrdU, este método no requiere la fijación de la muestra o desnaturalización del ADN lo cual permite una buena conservación a nivel estructural de los tejidos (Timothy J Mead, 2014).

Esta técnica ha sido utilizada para caracterizar las células que proliferan de cestodos (Koziol, 2014) y trematodos (Collins 2013, Wang 2013). En cestodos se puede describir estas células y mostrar que el crecimiento y la regeneración de la larva de *E. multilocularis* es dirigido por estas células germinativas. Dichas células son morfológicamente y funcionalmente similares a los neoblastos de platelmintos de vida libre, pero muestran diferencias en los patrones de expresión de genes reguladores conservados de células madres e incluso alguno de ellos se han perdido. Los autores plantean que las diferencias entre las células germinativas de este cestodo y los neoblastos puede deberse a una adaptación de este parásito por su particular desarrollo asexual. Esto permite plantear a este como un buen modelo para estudiar los orígenes evolutivos de la reproducción asexual y sus efectos en el sistema de células madres en el trematodo *S. mansoni* el uso del EDU permitió caracterizar una población de células neoblastos like. Fue posible mostrar su distribución en el adulto y sus características morfológicas las que son similares a los neoblastos de planaria (Collins, 2013). También realizaron dobles marcados que permitieron determinar la colocalización de células marcadas con EDU y hibridadas con genes marcadores de proliferación. El marcado con EDU también fue usado para determinar el descenso de células proliferativas luego de la irradiación. Estas poblaciones de células irradiadas y no irradiadas fueron analizadas por RNA seq mostrando 128 genes "downregulated". Mediante el uso de marcado con EDU también fue posible identificar estas células en larvas de *S. mansoni* (Wang, 2013). Las células proliferativas de esporocistos expresan muchos de los genes reguladores conservados en las células madre. Usando RNAi identificaron genes reguladores que son requeridos para mantener la capacidad proliferativa de estas células.

PCNA

La identificación de genes relevantes y la caracterización de las células que los “expresan” resulta imprescindible para lograr elucidar los mecanismos moleculares del desarrollo en el phylum *Platyhelminthes* (platelmintos). Nos proponemos estudiar la proteína PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), un cofactor de las ADN polimerasas δ y ϵ (Ayyagari R., et al., 1995; McAlear M. et al., 1994) cuya función es aumentar su procesividad (George-Lucian Moldovan, et al., 2007). Su expresión en células proliferativas se encuentra ampliamente documentada a lo largo de la escala evolutiva.

PCNA fue primero descubierta como un factor de relevante importancia en el proceso de elongación en la replicación del ADN del virus del simio 40 (SV40) (B. Stillman et al., 1988), permitiendo una mayor eficiencia de la misma en presencia de extracto citoplasmático de células humanas. En ausencia de PCNA, la polimerasa δ tiene una actividad limitada quedando resumida en cadenas de varias decenas de nucleótidos, pero con su adición es posible observar un importante incremento en el largo de las hebras de ADN sintetizadas (G. Prelich., et al 1987).

Tiempo atrás utilizando electroforesis de dos dimensiones se encontró una proteína ácida expresada diferencialmente durante el ciclo celular, en consecuencia fue propuesta como una proteína perteneciente a la familia de las ciclinas. Más tarde, se reveló que PCNA y la ciclina eran las mismas proteínas (Mathews M.B. et al., 1984). Y es así que ese factor esencial para la replicación del ADN del SV40 *in vitro* fue identificado como PCNA (Tan C. Ket al 1986, Prelich et al., 1987). Su aparición periódica en núcleos en fase S, co-localizada con la incorporación de bromodesoxiuridina (Bravo R. et al, 1980; Bravo, R. et al 1987), sugirió una relación con la replicación del ADN.

PCNA interactúa con varias proteínas que pueden estar implicados en el control del ciclo celular o en reacciones implicadas en la reparación del ADN (Z. Kelman et al., 1997, Hubscher U. et al., 1996), varios de estos motivos fueron los que años atrás hicieron que se la identificara equívocamente como una proteína dentro de la familia de las ciclinas.

La estructura tridimensional de PCNA se encuentra conservada durante la evolución, su secuencia de aminoácidos en ratas y humanos difiere en tan sólo 4 de 261 aminoácidos. En la figura 11 se muestra por cristalografía de rayos X su estructura, PCNA tiene una organización en forma de toroide (Gulbis J. M et al., 1996, Krishna T. S. et. al, 1994, Schurtenberger P. et. al, 1998, Ellison V. and Stillman B, 2001).

Cada monómero de PCNA se compone de dos dominios unidos estrechamente formando una hoja B extendida (Figura 11b) (Gulbis J et al., 1996,

KrishnaT et al., 1994). Tres monómeros se une entre si para formar el trímero resultante y dar forma de anillo a la proteína (Figura 11c).

El trímero, PCNA se estima en $\sim 34 \text{ \AA}$ para el diámetro interno, $\sim 80 \text{ \AA}$ para el diámetro externo y $\sim 30 \text{ \AA}$ de espesor. A pesar de que PCNA tiene una carga negativa general, la superficie interior está cargado positivamente, debido a la presencia de varios residuos de lisina y arginina (10 por subunidad). Esto sugiere que la carga negativa ADN puede pasar a través del anillo sin repulsiones.

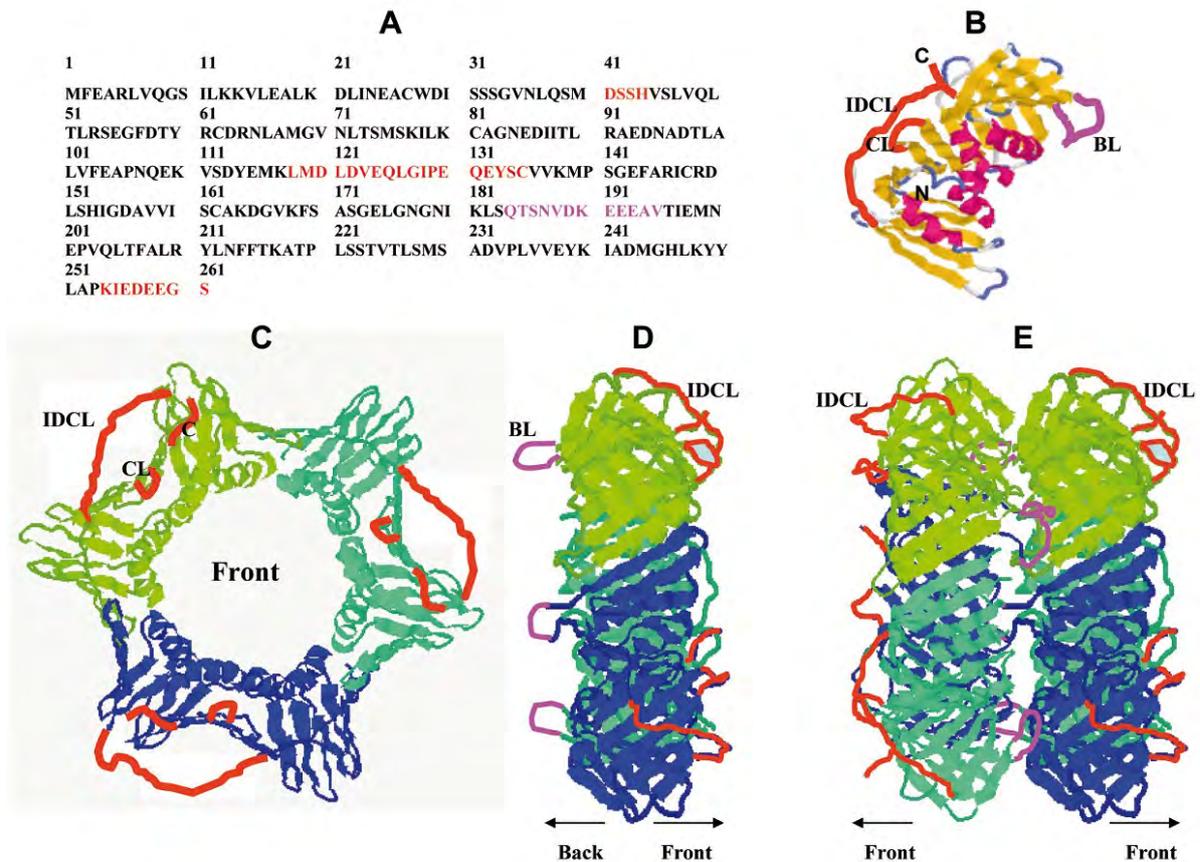


Figura - 11 Diferentes niveles de organización de PCNA. (A) Secuencia amino ácida PCNA humano. , IDCL (Interdomain connecting loop) (118LMDLDVEQLGIPEQEYSC135), Loop central (center loop, CL), CL (41DSSH44), C-terminal, C (254KIEDEEGS261) se muestra en rojo; back side loop, BL (184QTSNVDKEEEAV195) se muestra en rosado. (B) Modelo de la estructura tridimensional de PCNA. IDCL, CL, C; BL. Áreas de hélices (helix areas) (aA1, aB1, aA2, aB2) en rosado y hojas β (bA1, bB1, bC1, bD1, bE1, bF1, bG1, bH1, bI1, bA2, bB2, bC2, bD2, bE2, bF2, bG2, bH2, bI2) se muestran en amarillo. (C). Organización trimerica de PCNA (1XC) se muestra por delante. (D) vista lateral (E) Modelo del doble trímero de PCNA. IDLC, CL C, BL. Adaptado de Gulbis J. Met al., 1996

En cuanto al mecanismo de acción, en la figura 12 se representa el esquema enzimático básico necesario para la replicación del ADN. La replicación es un proceso complejo que tiene lugar durante la fase S del ciclo celular, y básicamente ocurre en dos etapas; iniciación y elongación. En los primeros momentos de la reacción se prepara un complejo ADN/Proteína el cual dará lugar a la iniciación,

una ADN helicasa, topoisomerasas (encargadas de liberar la torsión generada por la doble hebra), proteína de replicación, las proteínas de unión al DNA de cadena simple SSBP (single strand binding protein) y una K/Pol primasa que cumple con dos funciones, la de sintetizar los primeros cebadores de ARN en la que será la hebra líder y en paralelo sintetizar pequeños ARNs discontinuos que darán lugar a los llamados fragmentos de Okazaki en la hebra rezagada). El ADN es desenrollado dando lugar a lo que se conoce como horquilla de replicación. PCNA, RFC y N pol son necesarias para cambiar el aparato de síntesis de la Pol K a la Pol N, quien será la encargada de completar la síntesis de ADN en ambas hebras.

En eucariotas la replicación requiere de una enzima adicional llamada Polimerasa δ que se ha sugerido participa en la replicación del ADN indirectamente a través de la mediación de respuestas frente a daño en el ADN o en la transferencia incompleta de señales de replicación, ya que sus subunidades tienen un rol en los puntos de control (A. Sugino et al., 1995)

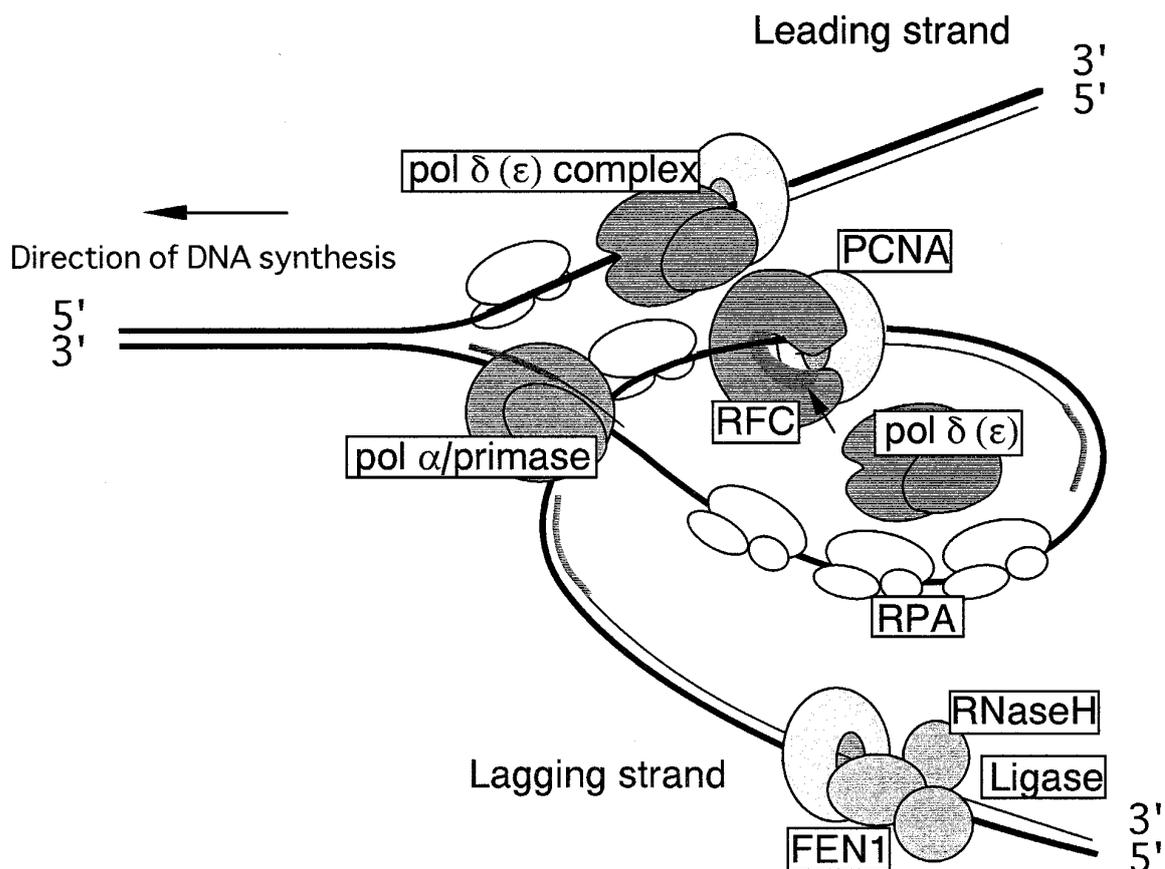


Figura 12 - Modelo del inicio de replicación eucariota con la ubicación hipotética de las diferentes enzimas que participan en el. Toshiki et. Al, 1998

Antecedentes del grupo de trabajo

En el laboratorio donde se llevó a cabo esta tesina de Maestría, se pudo caracterizar la localización, abundancia y morfología de las células proliferativas de *M. corti* desde su estadio larval hasta el adulto. Además, se esclareció el recorrido que realiza la progenie de las mismas luego de su división (Koziol, 2009). También, mediante la técnica de citometría de flujo y tinción con diversos colorantes, se pudo observar que las células proliferantes tienen características similares a las células germinativas de otros cestodos; núcleo grande con cromatina poco compacta, nucléolo prominente, forma redondeada o con pequeñas extensiones, alta basofilia debido a la abundancia de ARN ribosomal, y no muestran indicios de diferenciación (Domínguez et al., 2014). A través de diversos estudios se pudo determinar que estas células se encuentran en el parénquima interior de *M. corti*, próximas a la capa muscular interna. En la larva se observa un gradiente antero-posterior, y luego de proliferar, la progenie celular migra al parénquima exterior y tejido subtegumentario donde se diferencian.

Durante el desarrollo de *M. corti* se observaron acumulaciones periódicas de células proliferantes en el cuello (región posterior al escólex que genera los segmentos sucesivos) incluyendo una masa central en cada primordio que corresponde al primordio genital que generará los órganos reproductores masculinos y femeninos en cada segmento. Estas características en la formación y proliferación celular en el primordio genital muestran similitudes con otros cestodos estudiados (Douglas, 1961; Wikgren et al., 1971), sugiriendo que estos eventos y mecanismos del desarrollo se encuentran conservados en esta clase. Debido a que la distribución de células proliferantes que presenta *M. corti* parece ser una característica conservada en el desarrollo estrobilar de las especies de cestodos estudiadas (Bolla y Roberts, 1971; Douglas, 1961; 27 Gustafsson, 1990), el mismo representa un modelo ideal para estudiar este tipo de células en cestodos.

Hemos clonado y caracterizado varios genes como por ejemplo uno tipo pumilio y un homólogo de pcna como marcadores moleculares de células proliferantes. Los genes pumilio de *M. corti* se expresan en varios tejidos a lo largo de todo el desarrollo entre la forma larvaria y adulta, observándose una expresión preferencial de dichos genes en células proliferantes. En cuanto al gen pcna, se pudo clonar el homólogo de *M. corti* y demostrar mediante Western Blot la utilidad

del anticuerpo monoclonal PC10 (Waseem & Lane, 1990) para reconocer la proteína PCNA de este organismo.

Hipótesis de trabajo: Por su papel en la síntesis de ADN PCNA ha sido descrito como marcador de células proliferantes en otros modelos. Dado que los neoblastos parecen ser las únicas células que proliferan en platelmintos de vida libre entonces PCNA podría ser un posible Marcador Molecular específico de células proliferantes en Platelmintos Parásitos.

Objetivo general:

El objetivo general busca contribuir al conocimiento de la biología de desarrollo de los platelmintos parásitos estudiando en particular las células proliferativas y PCNA como un posible marcador molecular

Objetivos Específicos:

1. Identificación y conservación de PCNA en los genomas de Platelmintos
2. Clonado y expresión de la proteína recombinante y generación de un anticuerpo anti *PCNA*
3. Estudiar el patrón espacial de expresión del gen marcador PCNA en *F. hepática* y *M. corti* Nivel ARN / Proteína
4. Identificar las células proliferantes mediante marcación con EDU en *M. corti* y en estadios abordables de *F. hepática*

Materiales y Métodos

Materiales y Métodos

Clonado en el vector de expresión

Se diseñaron cebadores para clonar la región codificante de la proteína *EgPCNA* completa (Fw 5'ATGTTTGAGGCTCGGTTGCCGCA, Rev 3' GGATCCTTCTCAGCCTCATCGTCCTC) Estos cebadores se fusionaron a los sitios de restricción para las enzimas PstI y BamHI para el clonado direccional en el vector pET14b. De esta manera se obtuvo la secuencia codificante en marco para PCNA y una cola de histidinas en el extremo C-terminal presente en el Vector. Se realizó una reacción de PCR con la enzima Taq DNA Polymerase (Invitrogen) a partir de 0.5µl del plásmido PGem-T el cual contenía la secuencia casi completa de *EgPCNA* (cita) utilizando estos cebadores. Las condiciones de reacción y el programa de amplificación se describen en la tabla 3.

Tabla 3 - Condiciones del programa de amplificación

Etapas	Programa 1	
	Temp (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	5 min.
Desnaturalización	94	45 seg.
Annealing	56	45 seg.
Extensión	72	1 min.
Extensión final	72	10 min.
Ciclos	35	

Los amplicones se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% con tinción con GelRedTM. Los productos de PCR se purificaron mediante el kit ISOLATE PCR and Gel (Bioline). El vector de expresión pET14b y los amplicones se digirieron con 10 unidades de la enzima PstI (Fermentas - Thermo Scientific) en buffer Tango 1X (Fermentas - Thermo Scientific) en una reacción de 50µl de volumen final conteniendo 10µg de plásmido. Se incubó esta reacción durante 2 horas a 37°C y se analizó una alícuota en gel de agarosa para verificar la linealización total del plásmido. Se ligaron los insertos y el vector pET14b utilizando 10 unidades de la enzima T4 DNA Ligase (Fermentas). Se siguió con la transformación en la cepa *E. coli* DE3 y el aislamiento de plásmidos para la verificación de la construcción por secuenciación.

Minipreparaciones de ADN plasmídico

Se realizó cultivo en 3 ml de LB a partir de una colonia aislada y se incubó durante toda la noche a 37°C con agitación. Se centrifugó 30 segundos a 13600xg para colectar las células y se descartó la totalidad del medio. Se resuspendieron las células en 200µl de solución I (Tris - HCl 50mM pH8, EDTA 10mM) sin vórtex y se agregó 200µl de solución II (NaOH 200mM, SDS 1%). Se mezcló por inversión suavemente y se incubó 2 minutos a temperatura ambiente. Se agregó 200µl de solución III (Acetato de potasio 3M pH 4,8), se mezcló por inversión y se incubó 5 minutos en hielo. Se centrifugó 20 minutos a 12000xg a temperatura ambiente y se recuperó el sobrenadante. Se agregó 10mg de RNasa y se incubó 15 minutos a 37°C. Se purificó el ADN plasmídico mediante el agregado de 1 volumen de cloroformo : isoamílico (24:1) y centrifugación para separar las fases. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó agregando un volumen de isopropanol, centrifugando por 15 minutos a 10000xg a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el sedimento con 300µl de Etanol 70%. Se secó bajo lámpara y se resuspendió en 30 µl de agua mQ.

Transformación (Shock térmico) de los productos de ligación

Se descongelan las células competentes, cepas de *Escherichia coli* preparadas con CaCl₂, en hielo por 10 minutos. Se añade el producto de la ligación y se deja incubar en hielo por 20 minutos. Se colocan las células en baño a 42 oC 90 segundos (shock térmico), luego se colocan en hielo por 1-2 minutos. Se agrega 600µl de LB líquido termostatzado a 37°C, y se incuba con agitación durante 45-60 minutos. Se plaquea con rastrillo en placa LB agar la cual contiene ampicilina 100 µg/µl, 4 l de IPTG (2%) y 40 l de X-Gal (20mg/ml). Se agrega el producto de la ligación y se incuba en hielo por 20 minutos.

Expresión de la proteína recombinante

Se utilizaron las cepas *E. Coli* DE3 (Invitrogen) para la expresión de EgPCNA en el vector pET14b. La expresión de proteínas se realizó en medio LB suplementado con antibiótico LB-Ampi (100 µg/mL). Se partió de un precultivo con una colonia aislada en 3ml de medio selectivo crecido durante toda la noche a 37°C. Se inocularon matraces conteniendo 250ml de medio con 2.5ml de precultivo y se incubaron a 200 rpm y 37°C hasta alcanzar un DO₆₀₀ de 0.6. En ese momento se indujo la expresión con IPTG a una concentración final de 1mM. Se dejó inducir

a 30°C y 37°C durante distintos tiempos. Se tomaron alícuotas de 1ml de cultivo para la verificación de la expresión. Se centrifugaron durante 2 minutos a máxima velocidad y se recuperó el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento celular en 0.1 volúmenes de 100mM Tris – HCl pH8 y se combinó con el mismo volumen de buffer de carga de proteínas 4X. (apéndice I). Esta muestra constituyó la denominada Fracción Total (FT). El medio de cultivo se volvió a centrifugar 20 minutos a máxima velocidad para eliminar cualquier célula remanente. Una vez combinadas con buffer de carga de proteínas, las muestras se calentaron a 90°C durante 5 minutos y se almacenaron a -20°C o se procedió inmediatamente a su análisis por SDS-PAGE.

El resto del cultivo fue centrifugado a 10000xg por 10 minutos, descartando el medio de cultivo y congelando el sedimento celular para análisis posteriores.

Análisis de la solubilidad de la proteína recombinante (mL)

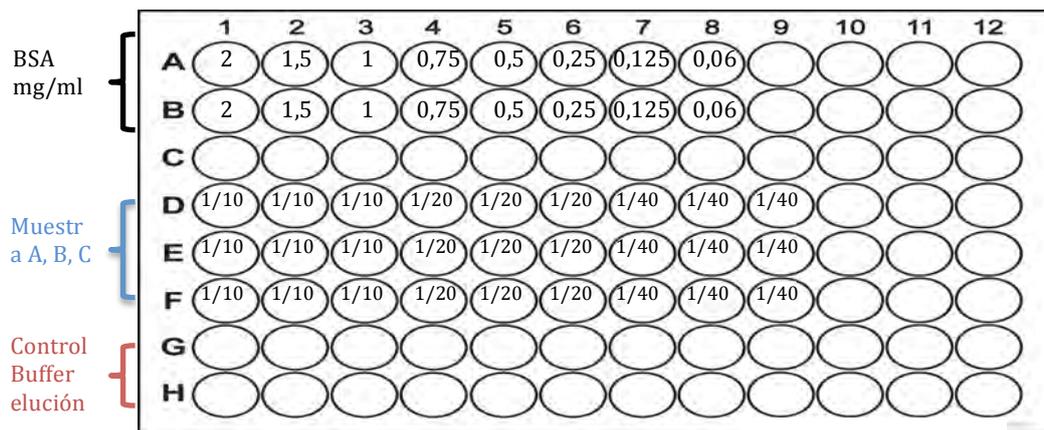
Para la determinación de la solubilidad de la proteína recombinante, se realizó un fraccionamiento subcelular. Se tomó una alícuota de 1mL de cultivo para obtener la fracción total (FT) Se analizó la presencia de la proteína recombinante en la fracción soluble o en la fracción insoluble. Para ello, el sedimento celular se resuspendió en buffer de lisis y se congeló a -20°C. Al descongelarse se lisaron las células por sonicado al 60% de la amplitud mediante la aplicación de 3 pulsos de 30 segundos interrumpidos por 1 minuto en hielo. Se centrifugó a 10000xg durante 45 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante que constituyó la denominada Fracción Soluble (FS). Se tomó un volumen de FS y se mezcló con un volumen de buffer de carga de proteínas 4X. El sedimento remanente se lavó 2 veces con 50mM Tris – HCl pH 7.5 y se resuspendió en un buffer de resuspensión desnaturizante, constituyendo la denominada fracción insoluble (FI). Se mezcló un volumen de FI con un volumen de buffer de carga de proteínas 4X. Todas las muestras una vez mezcladas con buffer de carga de proteínas fueron calentadas a 90°C durante 5 minutos y almacenadas a -20°C o analizadas en el momento por SDS – PAGE y tinción con Coomassie Blue

Purificación

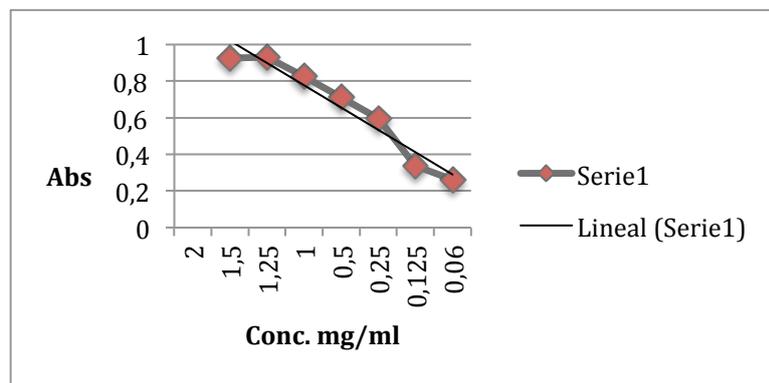
Para la purificación se siguió el protocolo de purificación recomendado por el equipo (Akta Prime Plus GE). Las soluciones utilizadas para la creación del gradiente se describen en el Apéndice 1

Cuantificación Proteína recombinante

Una vez expresada y purificada resta cuantificar el producto obtenido, para esto se utilizo el método de Bradford realizando diluciones por triplicado de 3 muestras y comparando los resultados sobre una calibración con BSA. El equipo que se utilizo fue un varioSkAN configurado para trabajar y medir a $\lambda = 595\text{nm}$



Representación sembrado de muestras para analizar espectro de Absorción y estimar la concentración de rPCNA



Curva de calibración con concentraciones conocidas de BSA

Cuantificación de PCNA recombinante: concentración de 0,125 mg/ml (resultados valores Abs no mostrados)

Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.

Para el análisis de proteínas se realizaron geles discontinuos de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes (SDS - PAGE) siguiendo el método de Laemmli modificado por Gallagher (2003). Para la siembra de las muestras se utilizó el buffer de carga de proteínas 4X que se describe en el Apéndice 1. Se realizó la electroforesis a 15mA por gel durante la corrida en el gel

concentrador y a 30mA por gel durante la corrida en el gel separador.

La tinción de proteínas se realizó por incubación en Coomassie Blue R (Sigma – Aldrich) (Apéndice 1) durante toda la noche y decolorado hasta la visualización de bandas discretas con Solución decolorante (Apéndice 1).

Análisis Informático

Las secuencias obtenidas fueron alineadas utilizando ClustalX (Thompson et al., 1997) bajo parámetros estándar, y las regiones con *gaps* eliminadas del alineamiento. El alineamiento fue visualizado con BioEdit y coloreado para homología mayor a 85 %.El análisis filogenético por unión de vecinos (Neighbor Joining) fue realizado en bioedit.

Las imágenes de estructura génica se muestran bajo capturas de pantalla realizadas con el programa Artemis y las inferencias informáticas de la estructura se realizaron utilizando el servidor de <http://swissmodel.expasy.org/> con las secuencias aminoacídicas de cada organismo comparando en la web contra el modelo cristalográfico de PCNA de *Drosophila melanogaster* (cita)

Obtención de material Parasitario

Cultivo de Mesocestoides corti

Los tetratiridios de *M. corti* se mantuvieron mediante pasajes intraperitoneales en ratones por Jenny Saldaña y colaboradores (Facultad de Química, Universidad de la República). La cepa de *M. corti* estudiada fue obtenida originalmente por Specht y Vogé (1965). Para el cultivo *in vitro* de *M. corti*, los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical, y se extrajeron los tetratiridios en condiciones estériles mediante el lavado de la cavidad peritoneal con solución de Hanks (Sigma - Aldrich, catálogo número H6136, Lote 087K83012) Los tetratiridios recogidos fueron lavados cinco veces con solución de Hanks estéril, y puestos en cultivo en placas con medio RPMI 1640 modificado (RPMI 1640-mod; con 10 % de suero fetal bovino (SFB; el origen del mismo fue Laboratorios Santa Elena, Uruguay, o GIBCO, Invitrogen, Estados Unidos) en una estufa incubadora a 37 ° C en una atmósfera con 5 % CO₂

Se cultivaron aproximadamente 400 a 500 µl de tetratiridios por cada 15 ml de medio. Se cambiaron dos tercios del medio de cultivo cada 48 a 72 horas. Los cultivos fueron realizados con la colaboración de la Lic. María Fernanda Domínguez y la Lic. Serrana Estrade. Para inducir el desarrollo estrobilar, se añadió al medio tras dos días de cultivo Taurocolato de Sodio (TC; Sigma-Aldrich; 1 mg/ml concentración final).

Obtención de Adultos *Fasciola hepática*

Los gusanos adultos de *F. hepatica* se extrajeron mecánicamente del conducto biliar de animales infectados naturalmente, disponibles en el frigorífico Carrasco. Estos fueron transportados al laboratorio vivos, en bilis a baño maría una vez allí fueron lavados en 10 mM tampón fosfato de sodio (PBS) pH 7.3 a 37 °C. Algunos de los gusanos luego de los lavados fueron cultivados en medio RPMI-1640 (Sigma Aldrich) pH 7.3 conteniendo 2% de glucosa, 30 mM de HEPES y 25 mg/ml de gentamicina a 37° C para su uso en experimentos de incorporación de EDU. Los gusanos cultivados y los lavados fueron secados con papel, masados (peso húmedo), congelados y almacenados a -80° C hasta su utilización.

Obtención de huevos, miracidios y esporocistos

La larva ciliada miracidio se desarrolla dentro del huevo entre los 10-20 días de extraídos los huevos (13 días normalmente) la luz estimula al miracidio, el cual eclosiona al medio. Una vez obtenidos los miracidios estos se inducen a transformar en esporocistos mediante el agregado de CBSS al medio de cultivo el cual simula el interior del caracol a infectar

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

Los fragmentos ya aislados de los genes *McPCNA* y *FhPCNA* fueron clonados en el vector pGem T. Este mismo tiene junto al sitio de clonado múltiple un sitio promotor T7 por un lado y SP6 para el otro. Un inserto (*McPCNA*) se encuentra clonado de tal manera que la transcripción desde el promotor T7 genera transcritos anti-sense no siendo así para *FhPCNA* que genera un transcrito anti sense a partir de Sp6.

Estos plásmidos fueron utilizados directamente para transcribir con ARN polimerasa SP6 o T7 (Promega) para generar sondas *antisense*. Las reacciones de marcado consistieron en 20 µl de volumen en las siguientes condiciones: buffer de transcripción 1 x, mezcla de rNTPs con DIG-UTP (concentraciones finales 1 mM ATP, 1 mM CTP, 1 mM GTP, 0.65 mM UTP, 0,35 mM DIG-UTP (Roche)), inhibidor de ARNasa (40 unidades), ADN molde (1 µg) y ARN polimerasa SP6 o T7 (20 unidades por reacción). Las reacciones se incubaron durante 60 min a 37 ° C, siendo luego tratadas con ADNasa RQ1 (1 unidad; Promega) durante 15 minutos a 37 ° y precipitadas con etanol absoluto y LiCl. Las sondas se disuelven entonces en 50% formamida.

Integridad y cuantificación de las sondas

Las sondas separadas mediante electroforesis se transfirieron a membranas de nylon (Hybond N, Amersham) por el método de transferencia seca. Para la cuantificación se sembraron diluciones seriadas de las mismas en membranas de nylon junto a diluciones seriadas de una sonda de concentración conocida (Roche) para el blot. El ARN se fijó a la membrana por exposición a luz ultravioleta.

Para el revelado se incubaron las membranas con agitación durante 5 minutos en Buffer 1 (Apéndice 1), seguido de un bloqueo durante 20 minutos en Buffer 2 (Apéndice 1). Se realizó un lavado durante 5 minutos en Buffer 1 y se incubó durante 20 minutos en una dilución 1/1000 en Buffer 2 de un anticuerpo anti-Digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (Roche). Finalmente, las membranas se lavaron 2 veces durante 5 minutos en Buffer 3 y se revelaron mediante incubación con los reactivos cromogénicos NBT y BCIP (Buffer de revelado, Apéndice 1)

Hibridación *in situ* sobre criocortes y organismos enteros

Criocortes

Ejemplares de *M. corti* cultivados durante 6 días fueron fijados durante 90 min en PFA /PBS a temperatura ambiente, lavados 5 veces con PBS (5 minutos cada una), y dejados en sacarosa 30% a 4-8 ° C durante 48 horas. Los ejemplares fueron entonces embebidos en la resina de inclusión (OCT), congelados rápidamente con nitrógeno líquido, y cortados con un criostato en cortes de 10 µm, montados sobre portaobjetos SilanePrep (Sigma-Aldrich). Los cortes se dejaron secar 2 horas a temperatura ambiente y se congelaron a -20 ° C hasta el momento de su uso.

Hibridación *in situ* sobre criocortes.

Se descongelaron los criocortes durante 30 minutos a temperatura ambiente, se fijaron 15 minutos en PFA 4% diluido en PBS y se lavaron 3 veces con PBS durante 5 minutos cada vez. Se permeabilizaron por incubación 30 minutos en PBSTx (Apéndice 1) y 10 minutos en HCl 0,2N. Todas las incubaciones anteriores fueron realizadas a temperatura ambiente. A continuación se prehibridaron los cortes con solución de prehibridación (Apéndice 1) por 10 min a 60°C y, luego de un cambio de solución, durante 120 minutos a 53°C.

Se desnaturalizó la sonda por incubación 2 minutos a 80°C y enfriado rápido en hielo. Se realizó la hibridación con 0.1ng/µl de sonda desnaturalizada en solución

de prehibridación sobre el portaobjetos cubierto con Parafilm en cámara húmeda a 53°C durante toda la noche. Para desprender el Parafilm sin dañar los cortes, se incubó con agitación en abundante SSC 2X precalentado a 53°C. Se realizaron lavados de rigurosidad decreciente durante 20 minutos cada uno a 53°C sobre el portaobjetos con solución 1 y solución 2 (Apéndice 1).

Los cortes fueron lavados a temperatura ambiente 2 veces en buffer MAB (Apéndice 1) durante 30 minutos cada vez y se bloquearon durante 1 hora en solución de bloqueo (Apéndice 1) a temperatura ambiente. A continuación se incubaron en cámara húmeda durante 90 minutos a 37°C con un anticuerpo monoclonal anti-Digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (Roche) diluido 1/500 en solución de bloqueo. Se lavaron 6 veces en MABT (Apéndice 1) durante 15 minutos cada vez y se equilibraron 10 minutos en buffer AP (Apéndice 1). Se aplicó el reactivo NBT/BCIP (Apéndice 1) y se incubó en oscuridad hasta la aparición de la señal. Se detuvo la reacción con PBSTw (Apéndice 1), y se fijaron los cortes con PFA 4% en PBS durante 20 minutos. Se lavaron con PBS, se montaron en glicerol 80% diluido en PBS y se fotografiaron en un microscopio Olympus modelo BHA con una cámara adaptada (USB Eye-Piece Digital Microscope Camera – Dino-Lite).

Hibridación sobre organismos enteros

Se rehidrataron los organismos almacenados en metanol 100% por incubación a temperatura ambiente en metanol 50% y PBSTx (Apéndice 1) durante 10 minutos cada uno. Se trataron con Proteinasa K (Apéndice 1) para permeabilizar los organismos y se fijaron 10 minutos a temperatura ambiente en PFA 4% en PBS. Se lavaron 2 veces durante 5 minutos cada vez en PBSTx y durante 10 minutos en solución de prehibridación (Apéndice 1) diluida 1/2 en PBSTx. Se prehibridaron los organismos durante 10 minutos a 60°C para inactivar la fosfatasa endógena y 2 horas a 56°C en solución de prehibridación.

Se desnaturalizó la sonda durante 5 minutos a 80°C y se enfrió rápidamente en hielo. Para la hibridación se incubaron los organismos toda la noche a 56°C en solución de hibridación precalentada (Apéndice 1). A continuación se realizaron 2 lavados de rigurosidad decreciente durante 30 minutos a 56°C con cada una de las soluciones de lavado precalentadas descritas en el apéndice 1. A continuación se lavaron 2 veces en MABT (Apéndice 1) durante 10 minutos cada vez a temperatura ambiente y se bloquearon durante 2 horas en solución de bloqueo (Apéndice 1) a temperatura ambiente. Se incubaron con anticuerpo anti- Digoxigenina (Roche) diluido 1/4000 en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Se lavaron 6 veces con MABT durante 20 minutos cada vez a temperatura ambiente y se incubaron 10 minutos en buffer AP (Apéndice 1) a temperatura

ambiente. Se revelaron con reactivo NBT/BCIP (Apéndice 1) siguiendo el desarrollo de color bajo lupa y se fijaron en PFA 4% diluido en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de un lavado en PBSTx. Se incubaron en etanol 100% durante 20 minutos y en etanol 50% durante 5 minutos. Se montaron en glicerol 80% en PBS y se fotografiaron un microscopio Olympus modelo BHA con una cámara adaptada (USB Eye-Piece Digital Microscope Camera – Dino-Lite).

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

Generación anticuerpo policlonal anti-EgPCNAr

La inmunización del conejo para la producción del anticuerpo policlonal anti PCNA de EgPCNAr fue realizada por la Dra. Ileana Corvo

Inmunohistoquímica

Inmunohistoquímica sobre criocortes

Los criocortes realizados se descongelaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y se incubaron 15 minutos en PFA 4% diluido en PBS a temperatura ambiente. Se lavaron 3 veces durante 5 minutos cada vez con PBS a temperatura ambiente y se inactivó la peroxidasa endógena por incubación durante 10 minutos en peróxido de hidrógeno diluido al 3% en PBS. Se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo (Apéndice 1) y se incubaron toda la noche a 4°C en cámara húmeda con suero anti- PCNA diluido 1/500 en solución de bloqueo. Se realizaron 4 lavados en PBS durante 15 minutos cada vez a temperatura ambiente y se incubaron con anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano (GE Healthcare, N° catálogo: NA934 o Sigma – Aldrich, N° catálogo: A6154) diluido 1/1000 en solución de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. Se realizaron 4 lavados en PBS durante 15 minutos cada uno y un lavado de 2 minutos en buffer acetato de sodio 50mM pH5. Se reveló con el reactivo cromogénico 9- etilcarbazol-3-amina (AEC – Sigma Aldrich – Número de catálogo A6926) monitoreando el desarrollo de color bajo lupa. Se detuvo la reacción con PBS, se montaron en Glicerol 80% y se fotografiaron un microscopio Olympus modelo BHA con una cámara adaptada (USB Eye-Piece Digital Microscope Camera – Dino-Lite).

Inmunohistoquímica sobre organismos enteros

En el momento de realizar la inmunohistoquímica, los organismos fueron rehidratados por incubación en soluciones de concentración decreciente de etanol en PBS. Una vez hidratados, se trataron los organismos con proteinasa K (20µg/ml en PBS) durante 20 min a temperatura ambiente seguido de un lavado de 1 minuto en PBS. A continuación se incubaron en HCl 1N por 30 minutos a temperatura ambiente con agitación y se lavaron en PBS hasta que el pH fuera de 7.4. Se lavaron dos veces con PBSTx (Apéndice 1) durante 15 minutos cada uno seguido de un lavado de 1 minuto en PBS. Se bloquearon los organismos en solución de bloqueo (Apéndice 1) toda la noche a 4°C. Se incubaron con suero anti-PCNA producido en conejo, diluido 1/500 en solución de bloqueo, durante 2 horas seguido de 6 lavados de 20 minutos cada uno en PBSTw. A continuación se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano (GE Healthcare, N° catálogo: NA934 o Sigma – Aldrich, N° catálogo: A6154) diluido 1/5000 en solución de bloqueo, seguido de 6 lavados de 20 minutos cada uno con PBSTw. Para el revelado se incubaron 5 minutos en buffer acetato de sodio 50mM pH 5 y se incubaron con el reactivo cromogénico 9-etilcarbazol-3-amina (AEC – Sigma Aldrich – Número de catálogo A6926) hasta la aparición de color. Los organismos fueron montados con glicerol 80% y fotografiados con un microscopio Olympus modelo BHA con una cámara adaptada (USB Eye-Piece Digital Microscope Camera – Dino-Lite). Como control positivo se realizó el mismo procedimiento incubando con un suero anti- tropomiosina producido en conejo disponible en nuestro laboratorio.

Western blot

Se transfirieron las proteínas desde el gel poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa de 0.45µm (Thermo Scientific - Número de catálogo 88018) equilibrada en buffer de transferencia (Apéndice 1) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La transferencia se realizó en un cassette de transferencia húmedo (BioRad Mini – PROTEAN® TetraCell) durante 2 horas a 200mA en buffer de transferencia y a continuación se bloqueó la membrana a 4°C durante toda la noche en buffer de bloqueo (Apéndice 1). Se incubó con suero anti PCNA producido en conejo durante 2 horas a temperatura ambiente. Se realizaron 12 lavados de 5 minutos cada uno en TBST (Apéndice 1) a temperatura ambiente con agitación vigorosa. A continuación, se incubó con anticuerpo anti-IgG conejo conjugado a peroxidasa de rábano, diluido en buffer de bloqueo, y se realizaron 12 lavados de 5 minutos cada uno en TBST a temperatura ambiente con agitación

vigorosa. Se visualizó la reacción mediante incubación durante 1 minuto con el reactivo quimioluminiscente Chemiluminescent Peroxidase Substrate - 3 (CPS-3, Sigma - Aldrich) y se capturó la quimioluminiscencia mediante el uso de un Gbox (Syngene) o exposición a placas Biomax MR Film (Kodak) en oscuridad. Alternativamente, se reveló con el sustrato cromogénico AEC (3-Amino-9-etilcarbazol, Sigma - Aldrich, número de catálogo A6926) con una incubación previa de la membrana en buffer acetato durante 5 minutos.

Western blot sobre extractos proteicos

Se sembraron muestras proteicas en un SDS - PAGE al 15%. Se utilizaron 5µg de proteínas totales del extracto proteico de *M. corti* y un equivalente a extractos de proteína de *E. coli*. Se procedió a realiza la transferencia e incubación de anticuerpos, utilizando una dilución 1/1000 del suero anti EgPCNAr producido en conejo y una dilución 1/5000 de anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano (Sigma - Aldrich, N° catálogo: A6154). Se visualizó la reacción mediante quimioluminiscencia

Incorporación de EDU

El EDU esta alicuotado a -20°C disuelto en DMSO a un concentración de 10 mM.

Incorporación de EDU *Mesocestoides Corti*

Se cultivaron con EDU. se cultivaron *M. corti* durante 5 días en medio sin taurocolato. Se lavaron con medio RPMI varias veces y se incubaron en placas de 12 pocillos conteniendo 4ml de medio RPMI con 20µM de EDU. se incubaron 3 horas y se lavaron con PBS exhaustivamente. Se fijaron O.N. (toda la noche) en 4%PFA a temperatura ambiente y se deshidrataron en etanoles de concentración creciente, se almacenaron a -20 C hasta su uso

Fijación permeabilización y revelado de EDU *M. corti*

Se rehidrataron las muestras en etanol de concentración decreciente, se lavaron con PBS 1X por 10 minutos. Se fijaron durante 15 minutos en PFA 4%, se incubaron 15 minutos en proteasa K 20µg/ml, se lavaron 5 minutos en BSA 3% en PBS y se incubaron 15 minutos en PBStx. Se lavaron 10 minutos en PBS 15 minutos en BSA 3% en PBS y se reveló con 200µl de cocktail de reacción.

Incorporación de EDU *Fasciola hepática*

Suspensiones celulares, cultivo e incubación con EDU

Se cultivaron fasciolas 3 días en Somule media y se recuperaron las vivas, se cambio en medio y se incubaron O.N con 20 μ M de EDU sin extracto de levadura en 3ml de medio. Se recuperaron las fasciolas, se lavaron en PBS y se resuspendieron en 1mL de PBS. Se tomaron 200 μ L para cultivar en 6mL de Somule media, se fijaron O.N. en PFA4% en placa de Petri. Se lavaron O.N. con agua de la canilla. Se realizaron las suspensiones celulares mediante el protocolo Tripsina EDTA concentración

Fijación, permeabilización y revelado de EDU

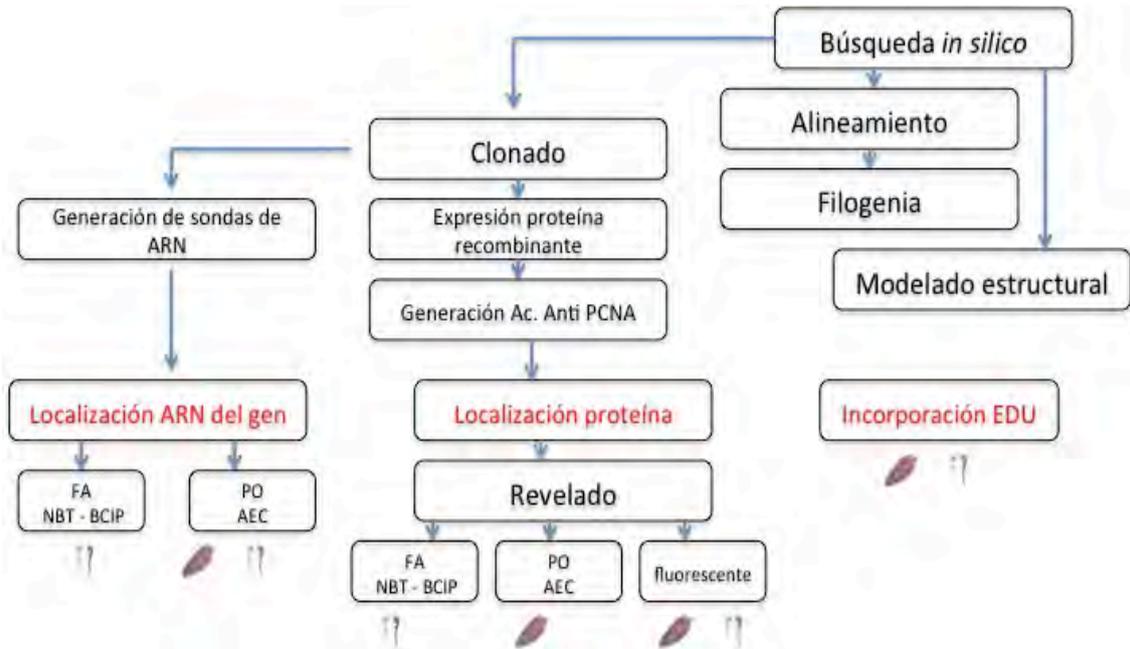
El resto se centrifugaron 6 minutos a 4000RPM y se resuspendieron en 1mL de PFA 4%, fijándose durante 15 minutos con agitación, se centrifugaron 6 minutos a 4000 RPM y se resuspendieron en PBS – 3% BSA. Se centrifugaron en iguales condiciones y se lavaron sin resuspender en PBS. Se resuspendieron en 20 μ L de PBS y se depositaron sobre portaobjetos xilanados. Se dejaron secar aproximadamente 20 minutos y se incubaron con PBStx durante 20 minutos. Se lavaron durante 5 minutos con PBS – BSA3% y se procedió al revelado con 400 μ L de coctail de reacción

Miracidios

Los huevos fueron incubados en Somule media. Se probó diferentes concentraciones de EDU, 5 μ M de EDU, 10 μ M de EDU, 20 μ M de EDU y 30 μ M de EDU, añadiendo al medio CBSS (brindado por el Lic. Federico Fossa).

Resultados

Estrategia experimental



Mc



Fh



Análisis Bioinformáticos

Estructura Génica PCNA

Con el advenimiento de las nuevas técnicas y tecnologías de secuenciación hoy día es posible contar con los genomas completos para una gran variedad de Platelminos, tanto de vida libre como parásitos. Entre estos últimos se encuentran disponibles los genomas completos de nuestros modelos de estudio *Fasciola hepatica* y *Mesocestoides corti*, información que años atrás no estaba disponible cuando se comenzó con el desarrollo y puesta a punto de este trabajo. En las figuras 13 a,b,c,d es posible visualizar la gran similitud que existe a nivel de estructura génica del gen de PCNA para estos ejemplos tanto de Cestodos como Trematodos. Estos datos serían congruentes con lo obtenido en los alineamientos para la realización de la Filogenia (Figura 14) dado el alto porcentaje de identidad que presentan a nivel de secuencia aminoacídica, esto brinda información acerca de lo conservado que se encuentra el gen a lo largo de la evolución. Son genes pequeños de menos de 1Kb (900pb aproximadamente) compuesto por 5 exones y 4 intrones los cuales presentan igual disposición y tamaño similar.

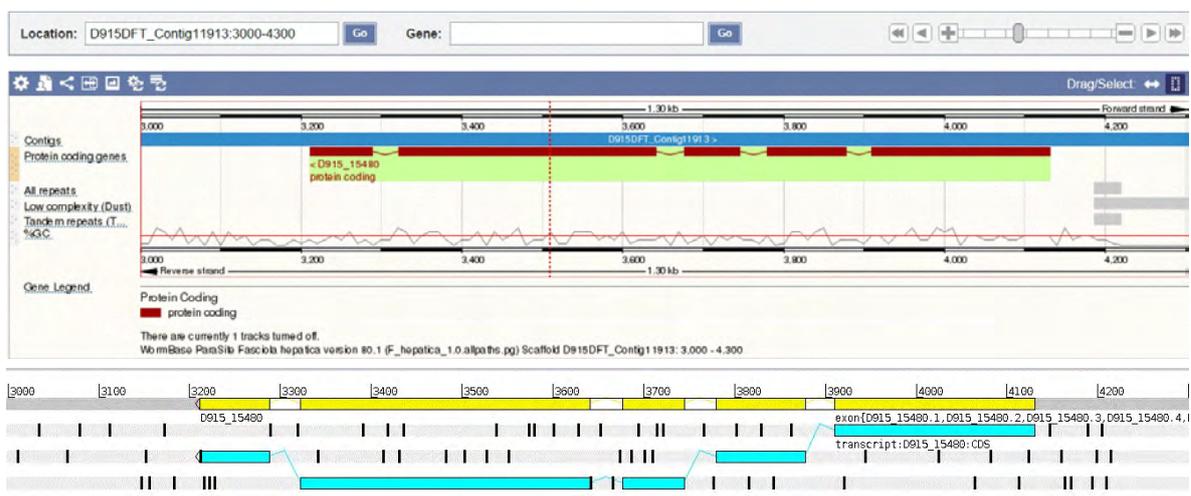


Figura 13a - Estructura génica PCNA *Fasciola hepática*. Se marca en celeste la CDS (coding sequence) región que codifica para el transcritpo de ARNm igual que en amarillo los exones. Se puede visualizar en la estructura del gen que pose 4 intrones representados en blanco.



Figura 13b - Estructura génica PCNA *Mesocostoides corti*. Se marca en celeste la CDS (coding sequence) región que codifica para el transcripto de ARNm igual que en amarillo los exones. Se puede visualizar en la estructura del gen que pose 4 intrones representados en blanco.



Figura 13c - Estructura génica PCNA *Schistosoma mansoni* Se marca en celeste la CDS (coding sequence) región que codifica para el transcripto de ARNm. Se puede visualizar en la estructura del gen que pose 4 intrones representados en blanco y un sitio de splicing en anaranjado.

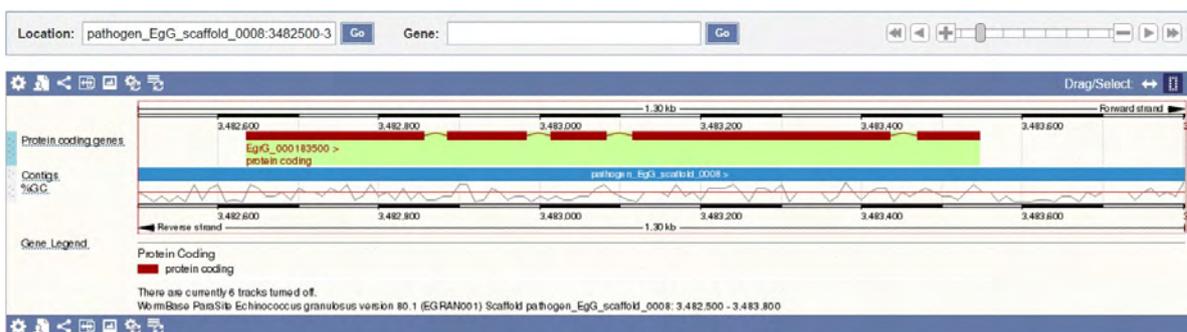


Figura 13d - Estructura génica PCNA *Echinococcus granulosus*. Se marca en rojo la CDS (coding sequence) región que codifica para el transcripto de ARN. Se puede visualizar en la estructura del gen que pose 4 intrones.

Análisis Filogenético

En la Figura 15 se puede visualizar como el grupo de trematodos queda junto, por fuera los cestodos formando un clado distinto y por fuera de estos los platelmintos de vida libre. El alineamiento para la elaboración de la filogenia (Figura 14) revela la alta identidad que presentan las secuencias aminoácidas entre los diferentes organismos como mencionamos anteriormente. Los grupos externos seleccionados son *Drosophila Melanogaster* y *Homo Sapien* caen por fuera de los clados de Platelminfos y su elección se debió a lo bien documentado que se encuentra este gen en la Bibliografía de cada organismo

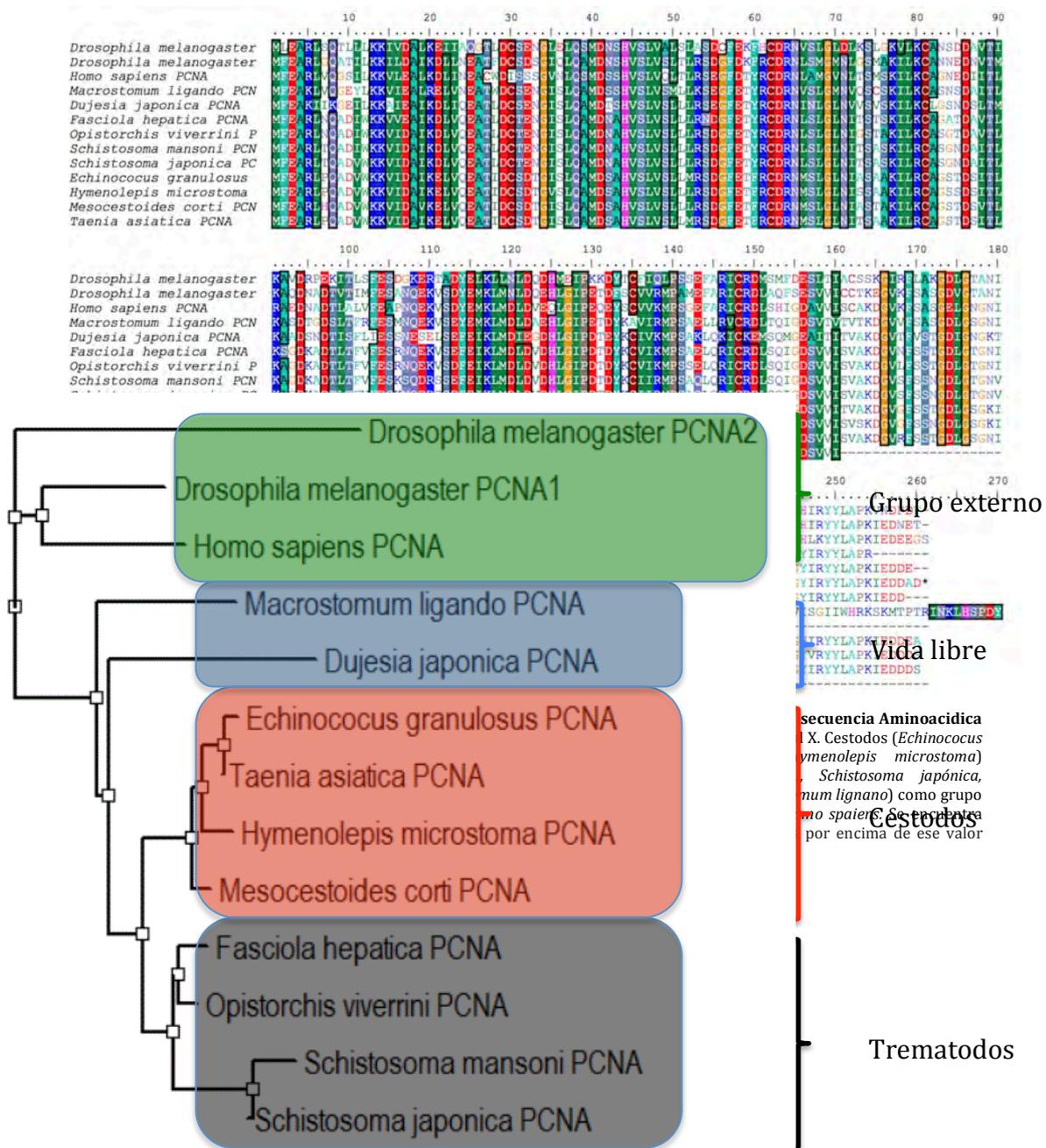
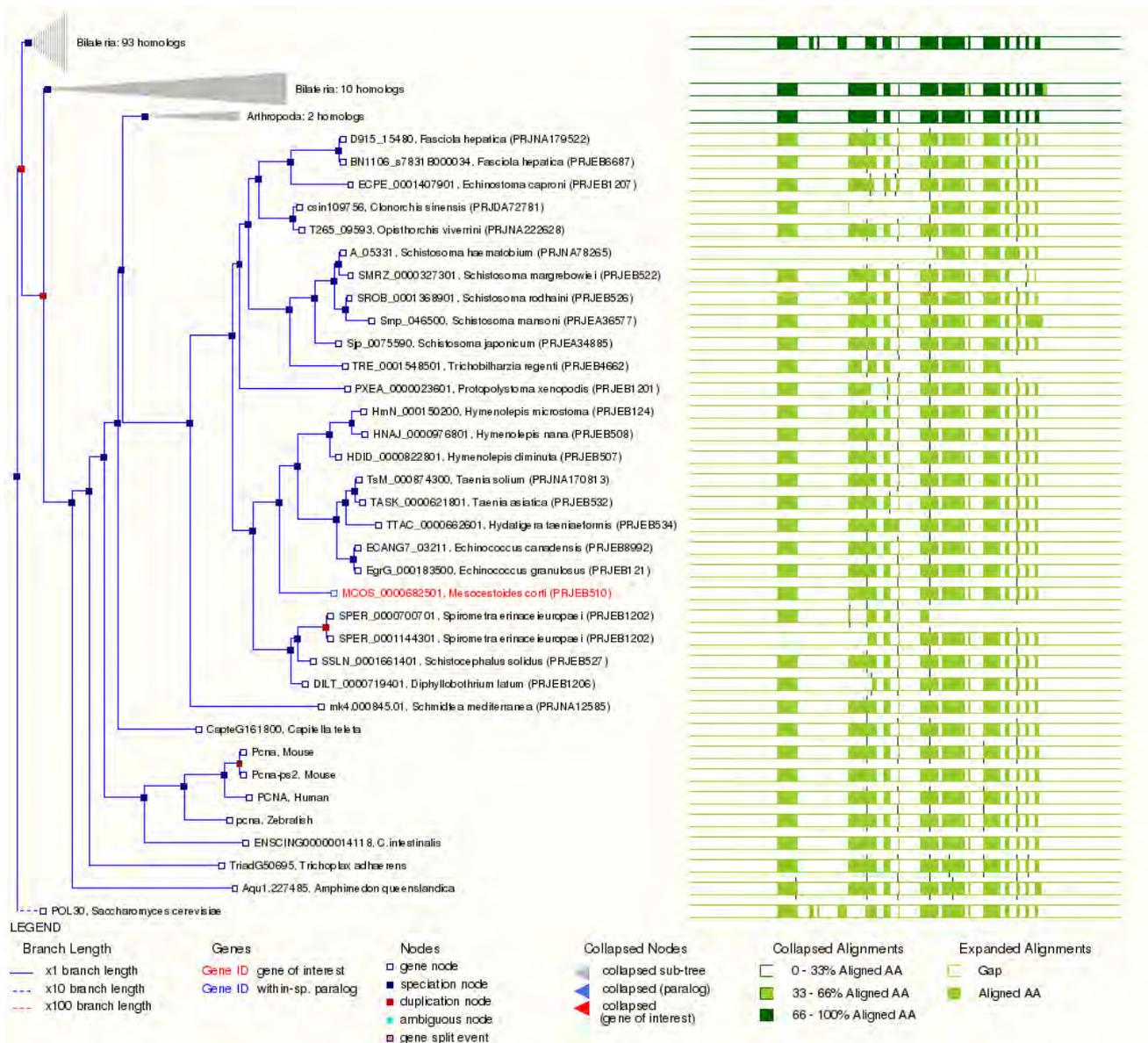


Figura 15 - Análisis filogenético de PCNA en platelmintos. Platelmintos Párasitos, de Vida libre y otros organismos como

Las proteínas PCNA tanto de Trematodos como Cestodos forman un grupo monofilético que excluye genes de otro tipo de Plelmintos como ser los de Vida libre (Figura 15). Nuestros resultados son similares a lo observado en la base de datos de wormbase.parasite.org (Figura 16), donde es posible observar una distribución idéntica de los organismos en sus clados, formando así grupo monofileticos según la clase de los organismos.

Figura 16 - Análisis filogenético de PCNA tomado del link de Treefam en wormbase.parasite.org Marcar grupos



Predicción informática de la estructura tridimensional de PCNA para diferentes Parásitos

Con el tiempo los avances en el campo de la Bioinformática han permitido realizar aproximaciones e inferencias *in silico* que resultan ser muy útiles al momento de interpretar resultados. Estas herramientas son un potente motor para el avance y desarrollo de los experimentos ya que en ocasiones es posible prever y/o encontrar soluciones rápidas a posibles interrogantes, lo que presenta una mejora en cuanto a los tiempos de espera, direccionamiento de fondos y esfuerzos.

En este caso el servidor de <http://swissmodel.expasy.org/> permite modelar la estructura tridimensional de proteínas partiendo de la secuencia aminoacídica. Este modelado lo hace por homología y resulta ser un método ampliamente utilizado para el modelado de estructuras 3D de proteínas. La construcción se realiza entre la secuencia de aminoácidos brindada y la estructura tridimensional experimental de una proteína ya cristalografiada. Estudios han demostrado que las estructuras proteicas se encuentran mas conservadas entre homólogos que sus secuencias, aunque secuencias con menos de un 20% de identidad pueden presentar estructuras muy diferentes Chothia, et. al (1986), no siendo el caso para estas proteínas las cuales presentan altos grados de identidad en su secuencia aminoacídica.

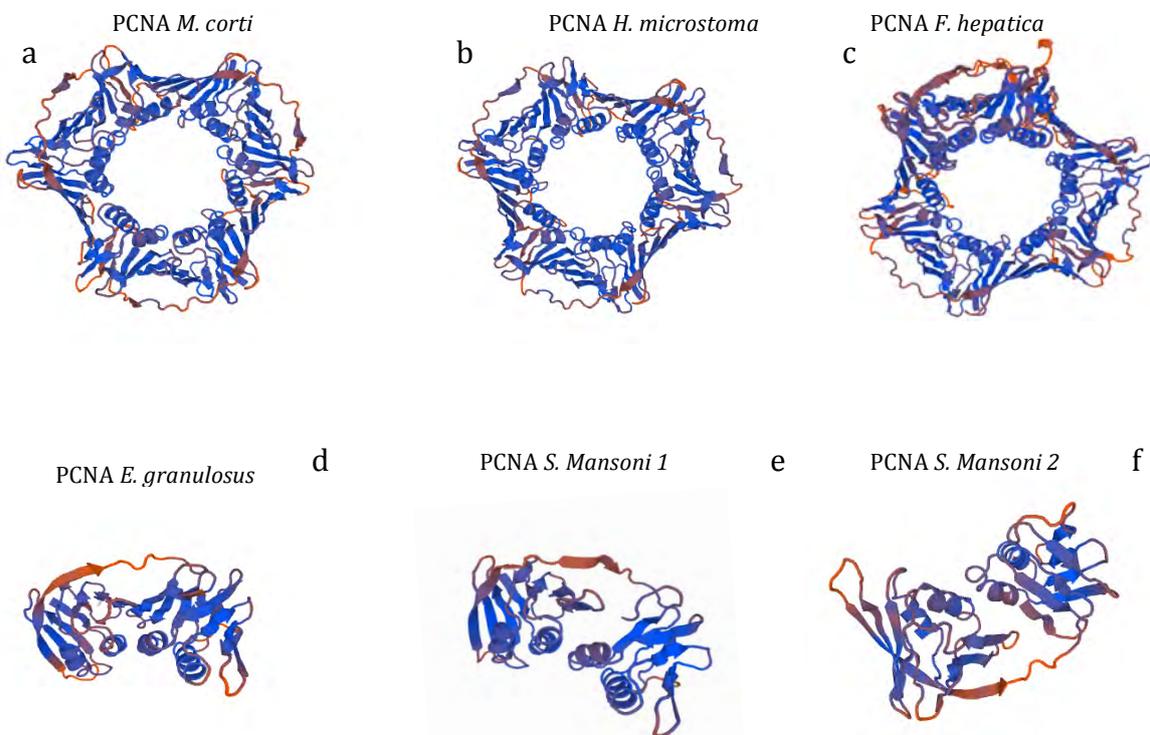


Figura 17 - Estructura tridimensional de PCNA. Modelado por homología de PCNA de a: *M. corti*, b: *H. Microstoma*, c: *F. hepática*, d: *E. granulosus*, e y f: *S. Mansoni 1 y 2* respectivamente. Obtenido de <http://swiss model.expasy.org>

En la figura 17 es posible observar la similitud a nivel de estructura que presentan los modelos de las diferentes proteínas. En el caso de *S. Mansoni* y *E. Granulosus* si bien no se observa el trímero se modelaron los monómeros los cuales presentan características similares que sus homólogos en los demás organismos.

Estos resultados informáticos resultan de gran interés y justifican de los ensayos de esta tesis ya que si bien años atrás no se contaba con todo este desarrollo bioinformático, los datos disponibles mostraban lo conservado de esta proteína lo cual sería esencial para el diseño y producción de un anticuerpo policlonal producido a partir de una proteína PCNA recombinante de *Echinococcus granulosus* y utilizado en nuestros modelos de estudio *F. hepática* y *M. corti* para los ensayos de inmunolocalización presentados en los próximos capítulos.

Producción de la proteína PCNA en forma recombinante

Como antecedente en trabajos anteriores (tesis grado German Caurla) (citar), se intentó producir la proteína recombinante PCNA de *Echinococcus granulosus* (*EgPCNA*r) en un sistema de expresión procariota conocido y utilizado nuestro laboratorio en ensayos similares, el vector pET14b y la cepa de *E. coli* BL21 Star (Invitrogen). La elección de trabajar con la secuencia de *EgPCNA* se debió a que contábamos con limitada información detallada en las bases de datos para nuestros modelos de estudio mientras que el genoma de *Echinococcus granulosus* se encontraba disponible en la web. De esta manera fue posible realizar un juego de cebadores para poder amplificar el gen de PCNA de *E. granulosus*. Se logro obtener la secuencia de *EgPCNA* parcialmente completa, aislada y clonada en el vector de clonación PGem-T. Una vez que se cambio el vector (al Pet-14b) se transformaron las cepas BL21 Star y realizados los ensayos de expresión se obtuvo la proteína en forma insoluble. Lo que imposibilitaba a priori la producción de un antisuero en conejo contra la proteína recombinante *EgPCNA*.

Dentro del marco del trabajo de maestría esto fue corregido con la adición de los primeros 5 AA (los cuales eran los únicos faltantes en el diseño de la producción de *EgPCNA*r) que resultarían ser esenciales para el correcto plegamiento de la proteína en forma soluble, en la Figura 14 se pueden visualizar esos cinco primeros AA (MFEAR) que tuvieron que ser añadidos a la secuencia para la producción de la proteína recombinante en forma soluble. Si bien la incorporación de estos AA no garantizaba su solubilidad los resultados expuestos a continuación confirmaron que resultarían de suma importancia.

Expresión de la proteína recombinante

La expresión de la proteína recombinante *EgPCNA* fue llevada a cabo en cepas de *E. coli* BL21 DE3 (star), el gen fue clonado en el vector Pet14b el cual fue digerido con enzimas de restricción (Pst I y Bam H1 para este estudio) que permite que la secuencia quede en fase y evitar problemas de corrimiento de marco que puedan desplazar el sentido de "lectura" al momento de la traducción. El clonado en este vector permite incorporar a la proteína una cola de histidinas en el extremo C- terminal para luego poder purificarla por columna de afinidad.

La expresión se indujo a diferentes temperaturas 30°C y 37°C (Figura 18.) Las muestras a sembrar en cada carril del gel fueron estandarizadas con el fin de cargar la misma cantidad de proteína total por carril y así poder tener datos comparables.

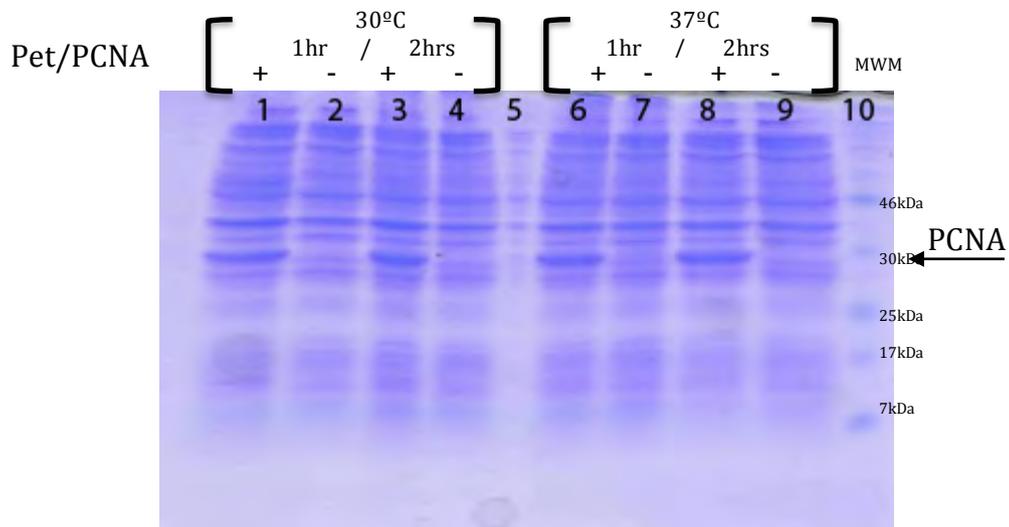


Figura 18 - Expresión *EgPCNA*. Gel de Poliacrilamida del 15%. Vector sin inserto (Pet), vector con inserto Pet/PCNA Gel Poliacrilamida 15%, carriles 1, Pet/PCNA 1hr 30°C, 2 Pet 1hr 30°C , 3. Pet/PCNA 2hr 30°C, 4 Pet 2hr 30°C, 6 Pet/PCNA 1hr 37°C, 7 Pet 1hr 37°C , 8. Pet/PCNA 2hr 37°C, 9 Pet 2hr 37°C . 10: Marcador de peso molecular. Se señala con flecha el tamaño esperado para PCNA

En la figura 18 se puede observar una banda del tamaño esperado 30KDa presente en los carriles correspondientes al vector con el inserto (Pet/PCNA), no siendo así para el caso del vector solo (Pet). Esto indicaría que la proteína se expresa en estas condiciones. Una vez definida la temperatura de 37°C se procedió a verificar la solubilidad de dicha proteína.

Solubilidad PCNA

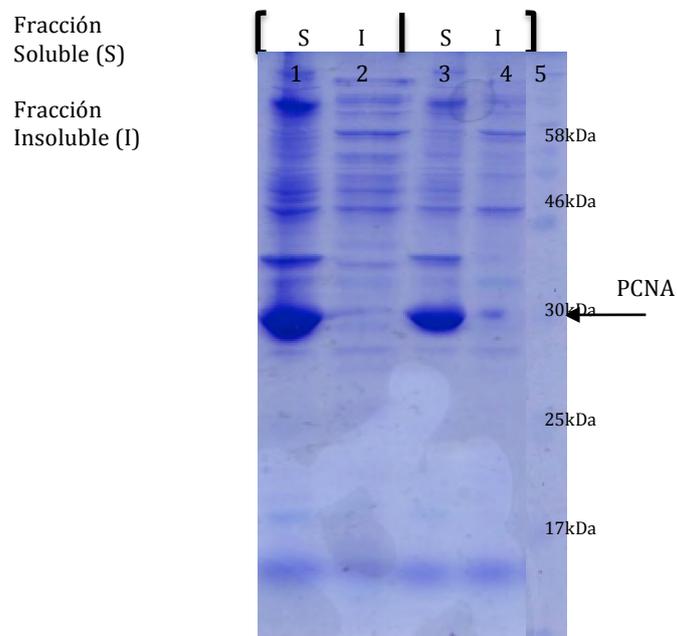


Figura 19 - Expresión PCNA Soluble (Sol) vs insoluble (Insol) SDS-PAGE al 15% en Buffer Tris – Glicina, teñido con Coomassie Blue. Carriles 1. Pet/PCNA Sol 2. Pet/PCNA Insol 3. Pet/PCNA Sol 4. Pet/PCNA Insol 5 MPM. Se señala PCNA con el tamaño esperado

Para la determinación de la solubilidad de la proteína recombinante, se realizó un fraccionamiento subcelular donde se analizó la presencia de la proteína recombinante en la fracción soluble o en la fracción insoluble. Del resultado de la Figura 19 es posible concluir que EgPCNAr fue expresada y visualizada en fracción Soluble. Estos resultados nos permitieron expresarla en mayores cantidades para luego proceder a purificarla.

Purificación EgPCNAr FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)

La purificación de *EgPCNAr* se realizó por cromatografía de afinidad con el AKTA prime plus de General Electric. La proteína se encuentra fusionada a una cola poli Histidina en el extremo C- Terminal lo que permite su purificación mediante el uso de la resina Thermo Scientific HisPur Ni-NTA (Níquel-IMAC) donde los iones divalentes de Níquel (Ni^{2+}) quedan unidos a la resina, y las proteínas con las colas de histidina quedan retenidas en la misma. Por lo que esperamos que la proteína *EgPCNAr* se una para su posterior elución. Para eluirla se utilizó un gradiente en ascenso de buffer de elución (línea amarilla figura 20)

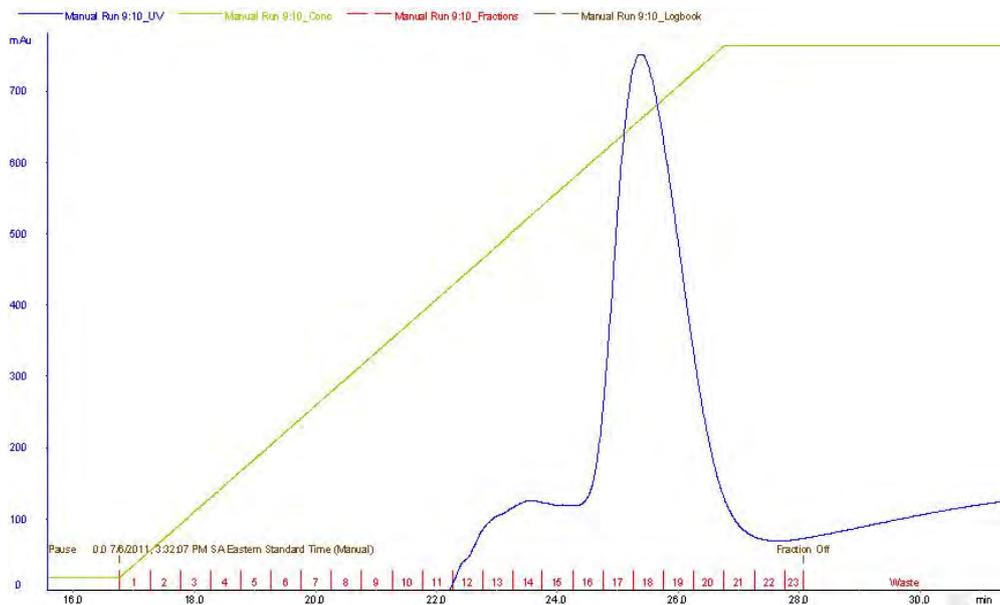


Figura 20 - Grafica de elución del AKTA prime plus GE; en amarillo el aumento en la concentración de buffer de elución y en Azul la curva de elución de proteína en la columna de afinidad

En la Figura 20 se puede observar un pico que corresponde a *EgPCNAr* una vez obtenidas estas fracciones fueron visualizadas en un gel de poliácridamida (Figura 21) para confirmar la presencia de una única proteína en el pico y evaluar su migración a modo de estimar su tamaño.

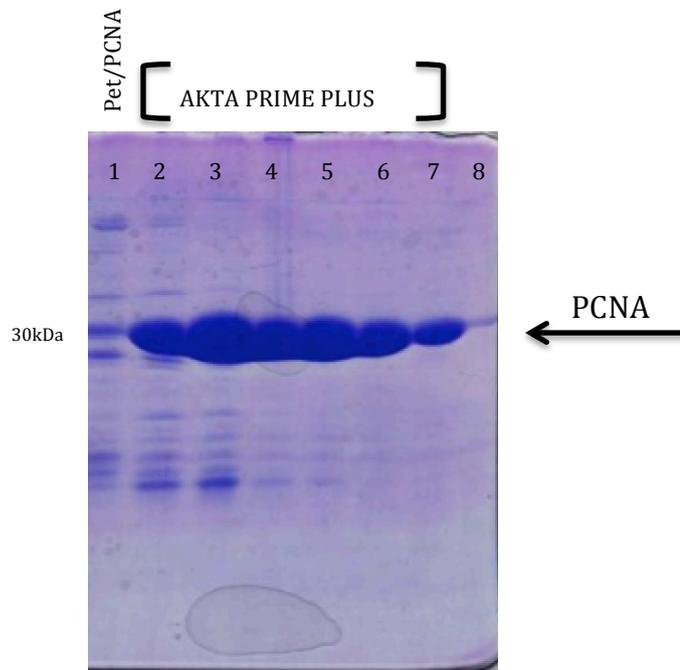


Figura 21 - Fracciones eluidas AKTA Prime plus. SDS-PAGE al 15% en Buffer Tris – Glicina, teñido con Coomassie Blue. Se observa las fracciones colectadas del AKTA Prime plus y control PCNA soluble. Carriles 2 – 7 Fracciones 16 – 21 respectivamente; carril 1: 12 Pet/PCNA: 8: MPM

Como se puede observar en la Figura 21 para los carriles correspondidas al pico de elución se observa una banda predominante si bien en la primeras colectas aparecen otras entidades o fracciones proteicas ni bien nos acercamos al pico la muestra se vuelve mas pura y con el tamaño esperado para PCNA

Confirmación EgPCNAr mediante Western Blot

Una vez purificada la proteína se procedió a la realización de un ensayo de Wstern Blot (Figura 22) con el objetivo de confirmar efectivamente la identidad de esa proteína como *EgPCNAr* con el anticuerpo monoclonal PC10. Como se puede observar claramente *EgPCNAr* es reconocida por el anticuerpo Monoclonal PC10 el cual como ya mencionamos (Antecedentes del grupo de trabajo) reconoce PCNA. Si bien existen otras bandas reconociendo otras entidades proteicas para la fracción colectada en el pico de la curva de purificación el reconocimiento en dicha fracción es único.

Parte de estas otras bandas observadas pueden deberse a productos de degradación de la proteína recombinante y/o productos proteicos propio del sistema de expresión (*E. coli*) que se adhieren a la columna inespecíficamente.

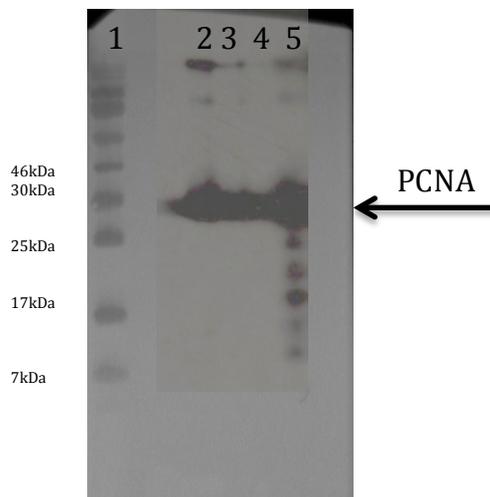


Figura 22 - Detección de *EgPCNAr* purificada por western blot. Carril 1 MWM. carril 2, 3,4 fracción 19, 20, 21 respectivamente. Carril 5. expresión *E.coli* BL21

Logramos obtener la proteína PCNA de forma recombinante. Esta proteína se usará para inmunizar conejos y de esta manera obtener un anticuerpo que nos permitirá seguir profundizando en el posible rol de la PCNA durante el ciclo de vida de los parásitos.

Detección de PCNA en extractos proteicos de *M. corti* y *F. hepática*

Una vez obtenido el suero anti *EgPCNAr* se utilizó para detectar PCNA en extractos totales proteicos de *M. corti* y *F. hepática*. Como se observa en la Figura 23 es que existe un reconocimiento por parte del Antisuero en las fracciones correspondientes a los Parásitos.

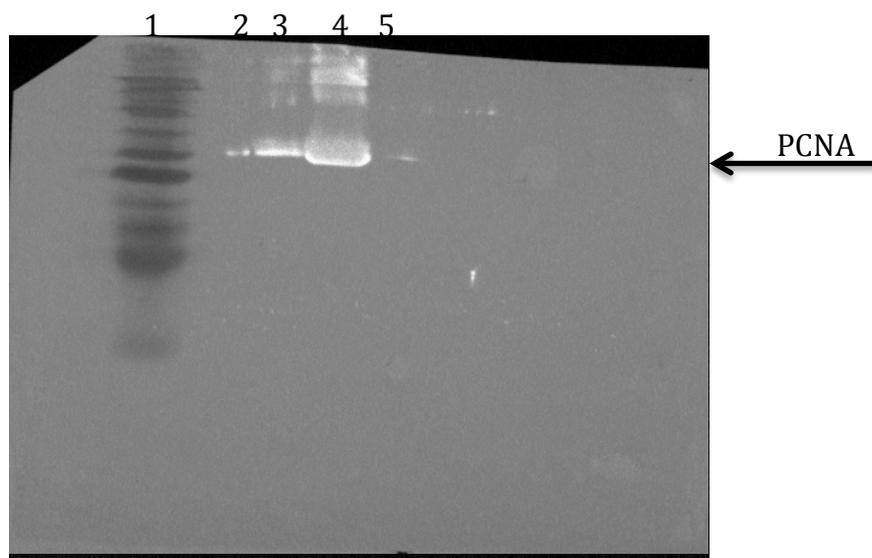


Figura 23 - Detección de PCNA en extractos proteicos de *M. corti* y *F. hepática*. Carril 1 MWM, carril 2 extracto de *F. hepática*, carriles 3 y 4 extracto de *E.coli* PET/*EgPCNA* carril 5 extracto de *M. corti*

Ensayos de hibridación in situ

Expresión espacial del ARN de PCNA en *Mesocestoides corti*

Como primera aproximación al estudio de la expresión del gen PCNA de *M. corti*, se confirmó mediante PCR a partir de cDNA la transcripción del gen *PCNA* utilizando cebadores degenerados. Se obtuvieron fragmentos de amplificación por PCR con un tamaño similar al esperado (alrededor de 600 p.b.) partiendo de ADNc. Los fragmentos obtenidos fueron clonados en el vector de clonación PGem - T y secuenciados, confirmando que correspondieran al gen PCNA una vez comparados y alineados con genomas conocidos en la base de datos (Obtenido de tesis de grado German Caurla)

El análisis de la expresión espacial del ARNm se realizó mediante hibridaciones sobre criocortes y sobre organismos enteros de diversos ejemplares, para lo cual se utilizó una sonda antisentido complementaria a la del transcripto.

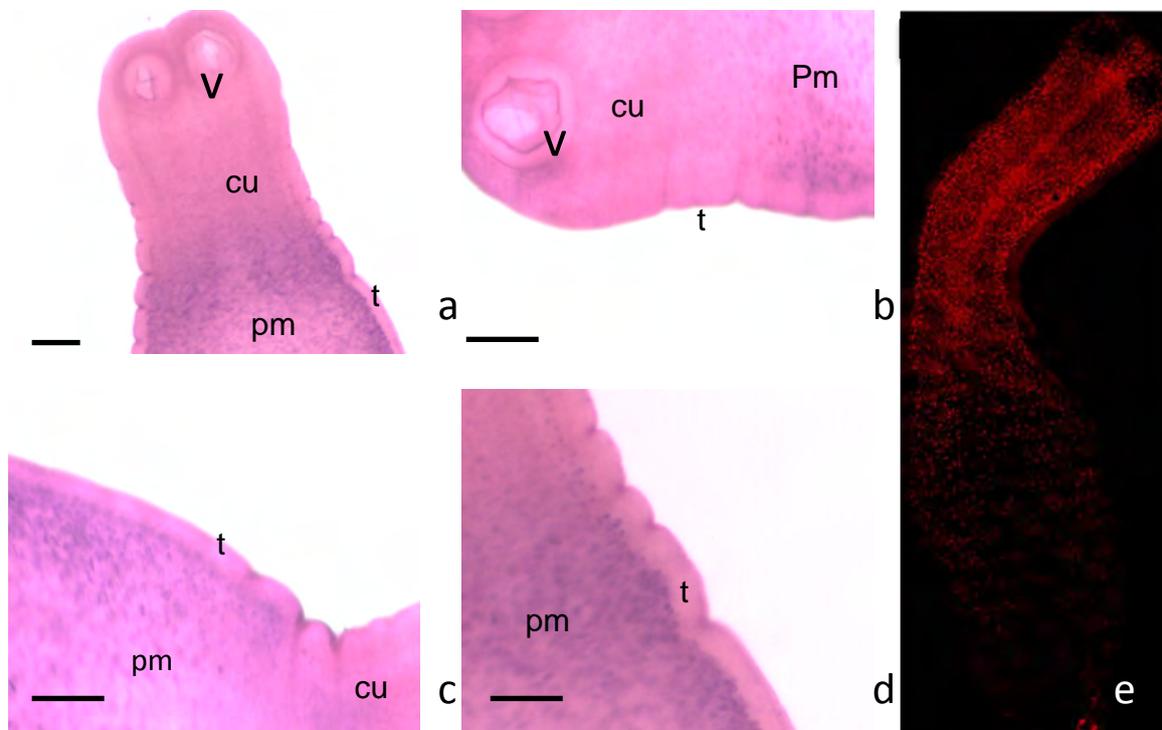


Figura 24 - Hibridación *in toto* con sonda anti sentido del gen *Mcpca*. Revelado con NBT-BCIP. a. Imagen longitudinal de un ejemplar, en un estadio temprano del desarrollo, se muestra la zona del escolex y cuello. C, d. Ampliación de una región de a. Abreviaciones (v) ventosas, (cu) cuello, (pm) parenquima medular (t) tegumento). e. Inmunodetección de BrdU en tetratiridios inducidos con taurocolato de sodio tras un pulso de 24 horas con BrdU. Microscopía confocal de fluorescencia. Vista general de tetratiridio inducido aún no segmentado donde se observa el gradiente antero posterior de células proliferativas obtenido por Koziol, 2009) Las barras representan 50µm, excepto en A que representa 100µm.

En la Figura 24 se observa claramente la expresión preferencial de *McPCNA* en células de la región interna en el parenquima medular dejando en evidencia la ausencia de las mismas en la region tegumental. No se detectan abundates celulas positivas para PCNA en la zona del escolex. En cambio en la zona del cuello la acumulación es representativamente mayor lo cual concuerda con el hecho de que en esa región comenzara la segmentación y por ende habra mayor proliferación. Resultados similares se pueden observar como muestra la (Figura 24 e) para las células proliferantes marcadas con BrdU U. Koziol, a su vez estos resultados concuerdan con lo obtenido en (Espinoza et al., 2007) la formación de un gradiente antero posterior de células.

Al cambiar la técnica de revelado, realizando el revelado con AEC (Amino etil Carbazol) es posible observar una distribución similar en organismos no desarrollados aun pero con un mayor grado de crecimiento que los mostrados en la Figura 25 donde la tinción se concentra en el parénquima medular interno, y mayor abundancia en cuello y escólex. Resultados similares a los que presentaremos en los ensayos de Inmunodetección. Con lo que podríamos comenzar a inferir este tipo de distribución de células positivas para PCNA ya que ambas técnicas sitúan las marcas en las mismas regiones, resultados similares se observan en células proliferantes en Smith y McKerr, 2000 si bien todavía no es posible realizar esa correlación.

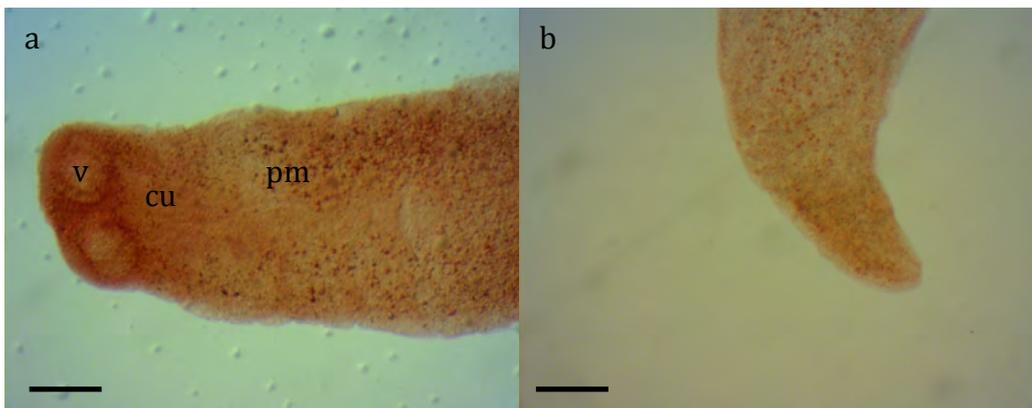


Figura 25 - Hibridación *in toto* con sonda anti sentido del gen *McPCNA* Revelado AEC (Amino etil carbazol). Corte longitudinal de un ejemplar, con 7 días de desarrollo. a: Region anterior. b: Zona posterior de otro ejemplar del mismo ensayo. Abreviaciones (v) ventosas, (cu) cuello, (pm) parenquima medular. Las barras representan 100µm

Hibridación sobre organismos enteros comenzando el proceso de segmentación.

En base a los resultados obtenidos en los primeros ensayos en Tetratiridios se analizo el patrón que presentan las células positivas para PCNA a nivel de ARN mensajero en organismos mas desarrollados.

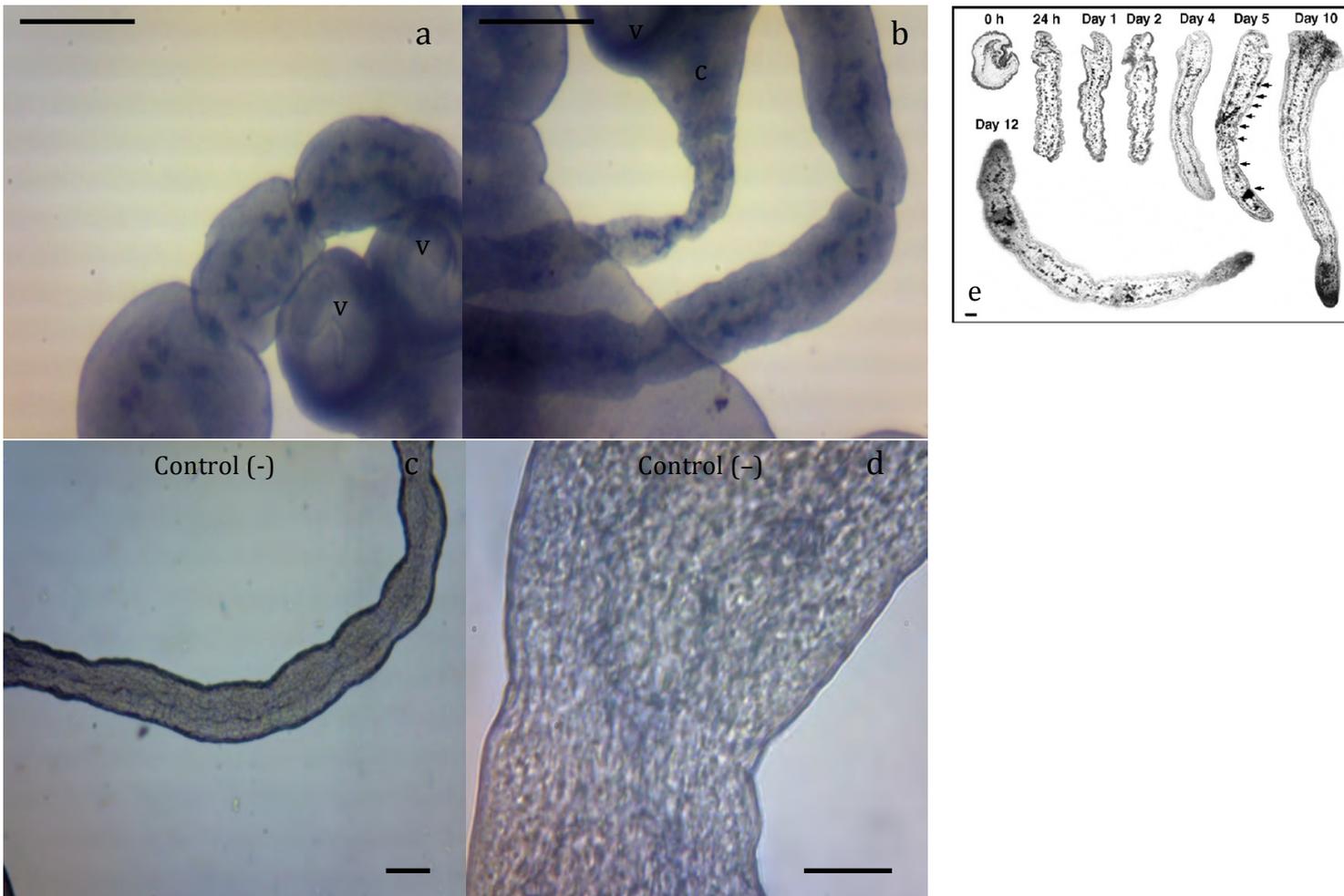


Figura 26 - Hibridación *in toto* con sonda anti sentido del gen *McPCNA*. Revelado AEC (Amino etil carbazol). Vista longitudinal de un ejemplar, con 9 días de desarrollo iniciando la segmentación del cuerpo a: Region media y escolex. B: aumento de la zona del Cuello del organismo de la imagen c y d: controles sondas sentido. Abreviaciones (v) ventosas, (cu) cuello. La barra representan 100µm e: Análisis autoradiográfico de la incorporación de $^3\text{H-T}$ por ejemplares de *M. corti* tras diferentes tiempos tras la inducción de la segmentación. La barra representa 100 µm. Excepto figura d 30 µm. Tomado de Espinoza et al., 2007

Los resultados de los estudios de localización del ARNm del gen PCNA en ejemplares iniciando el proceso de segmentación (Figura 26) muestran una expresión preferencial (evidenciada por una mayor intensidad de señal) en células distribuidas en el parénquima medular próximas a los haces musculares al igual que Espinoza et. al 2007. Los sitios de mayor expresión son las regiones donde darán lugar los primordios genitales en cada segmento. Para poder sacar mejores

conclusiones de la expresión del ARNm en estas regiones serían necesarios experimentos de doble marcado mediante inmunodetección de PCNA e hibridación *in situ*, esto confirmaría la colocalización de ARN y proteína para confirmar la identidad y ubicación espacial clara de la población de células proliferantes.

Expresión espacial del ARN de PCNA en *Fasciola hepática*

Hibridación sobre cortes histológicos *F. hepática*

Al igual que en los estudios sobre cortes histológicos de *M. corti* el revelado para *F. hepática* se llevo a cabo con AEC (Amino etil Carbazol), no fue utilizado NBT-BCIP debido a la alta actividad Fosfatasa alcalina que presentan los Adultos. Se utilizo AEC el cual utiliza la enzima Peroxidasa y todos los organismos fueron tratados para inhibir la actividad Peroxidasa endogena.

Los adultos fueron incubados con sonda antisentido para PCNA y revelados. En la Figura 28 se observa claramente la marca en células de la región de glandulas vitelogenas al igual que lo observado en estudios de inmunolocalización presentados en el próximo capítulo dejando en evidencia la ausencia de las mismas en la region del tegumento, no es posible descartar aun que no exista alguna zona teñida perteneciente al aparato reproductor especialmente los testiculos que como se menciono se encuentran altamente ramificados a lo largo de los dos primeros tercios del organismo. En los controles realizados con una sonda sentido para el gen PCNA se puede ver tincion a nivel de las glandulas vitelogenas también lo cual es comun para todos los preparados. Para lograr evitar esta tinción sería conveniente realizar los revelados con algun marcador anti dig (ver materiales y metodos) conjugado a un fluoroforo. De la misma manera es posible observar también una señal inespecifica a nivel del tegumento.

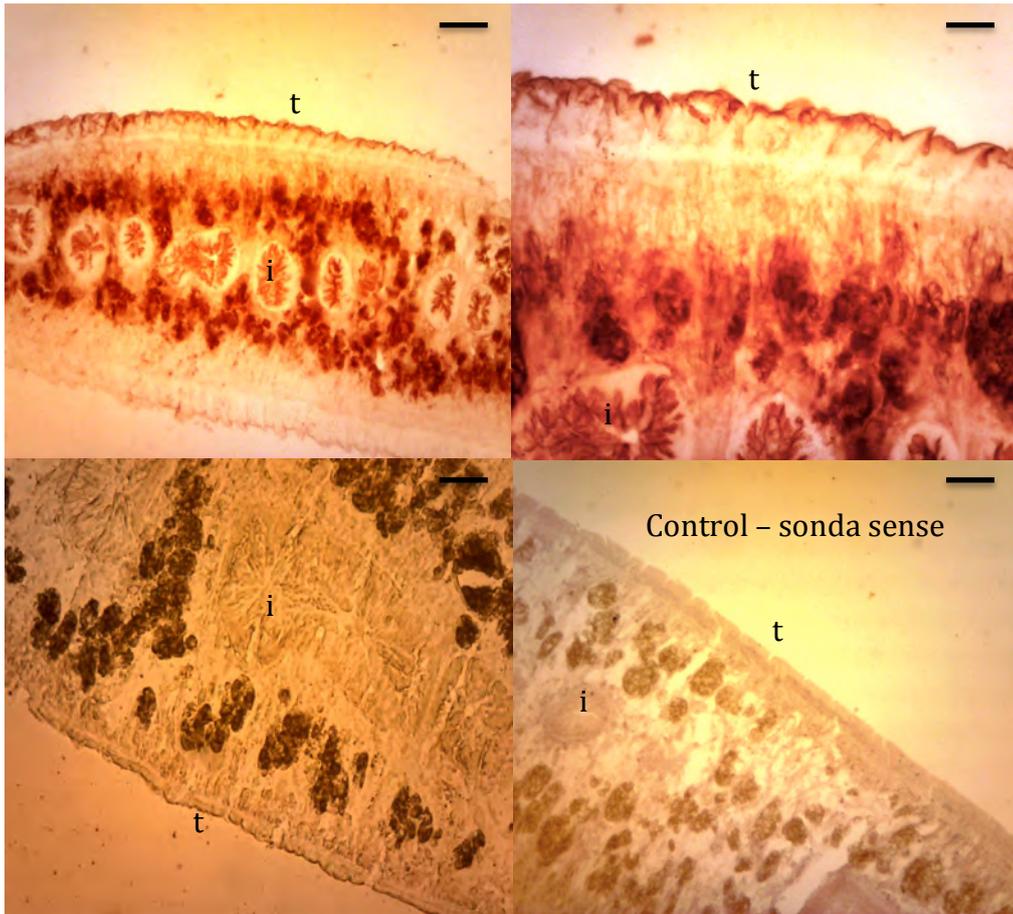


Figura 28 - Hibridación in situ sobre criocorte de *F. hepática* con sonda anti sentido del gen *FhPCNA* Revelado AEC. Corte longitudinal de un ejemplar Adulto zona media. Abreviaciones (T) tegumento, (I) Intestino. La barra representa 50µm

Localización espacial de la proteína PCNA mediante inmunohistoquímica con anticuerpos anti-EgPCNA.

Basándonos en la hipótesis de que PCNA es un posible marcador molecular específico de células proliferantes buscamos la localización espacial y temporal de estas usando un anticuerpo policlonal el cual fue obtenido usando como antígeno la proteína recombinante *EgPCNA_r* obtenida al principio de este trabajo. Habiendo expresado la proteína en forma soluble exitosamente y producido un anticuerpo en conejo, se procedió a realizar los ensayos de inmunodetección. Esperando encontrar resultados concluyentes acerca de la localización de células positivas para PCNA y poder realizar futuras inferencias acerca de la localización de células proliferativas. Para los revelados de PCNA se utilizó un anticuerpo anti - Ig de conejo conjugados a fluorocromos (Alexa Fluor 594).

Se utilizó Faloidina para teñir actina en los revelados fluorescentes que nos permite teñir actina y así lograr una mejor resolución a nivel de estructura en el organismo. Se realizaron los ensayos en Adultos de *F. hepática obtenidos del frigorífico (Frigorífico Carrasco)* y mantenidos en bilis por 4 horas hasta su fijación, inclusión en Parafina u OCT para criocortes y posterior corte.

Inmunolocalización de PCNA en *M. corti*

Como primera aproximación a la inmunolocalización de PCNA se realizó el revelado con NBT - BCIP. En la Figura 29 es posible observar los resultados de la distribución espacial de células positivas para PCNA en un organismo comenzando a desarrollarse aunque no segmentado aun. La tinción se mantiene constante y congruente a lo visto en los ensayos de Hibridación *in toto/in situ*.

A medida que el organismo comienza a desarrollarse la presencia de células proliferantes comienza a acumularse en la zona del cuello y escólex. parénquima medular interno tal como ha sido demostrado en los resultados publicados por Uriel Koziol 2010 y lo ya visto en la Figura 25 en los ensayos de Hibridación *in situ*.



Figura 29 - Inmunolocalización de PCNA in toto de *M. corti*. Imágenes Camara Dino-Eye Premier AM4023X sección medio - anterior del organismo. Revelado con NBT - BCIP La barra corresponde a 100 μ m Abreviaciones v (ventosas), t (tegumento) pm (parénquima medular)

Inmunolocalización de PCNA en *M. corti*, revelado fluorescente

Los ensayos de inmunodetección fluorescente en *M. corti* se llevaron a cabo en organismos con 7 días de desarrollo donde se espera que la segmentación comience a ser evidente en cultivo con taurocolato de sodio. Debido a que el desarrollo es asincrónico es posible encontrar en la misma población diferencias de crecimiento donde la segmentación pueda ser menos evidente, si bien los ejemplares ya comienzan a tener una forma mas alargada con cuello y escólex bien definidos. Tal como se vio en los resultados de Hibridación sobre organismos enteros donde la expresión preferencial de PCNA se da en células de la región interna en el parenquima medular y próximas a las fibras musculares. Los resultados de Inmunomarcado muestran que a medida que se desarrolla y crece según lo observado en la figuras 30 y 31 la marca es clara a nivel del parenquima interno y sub-tegumentaría. Si bien a nivel del tegunemento aparece una señal inespecifica ya observada en otras tecnicas y revelados tanto con *M. corti* como *F. hepatica* (Figura 28)

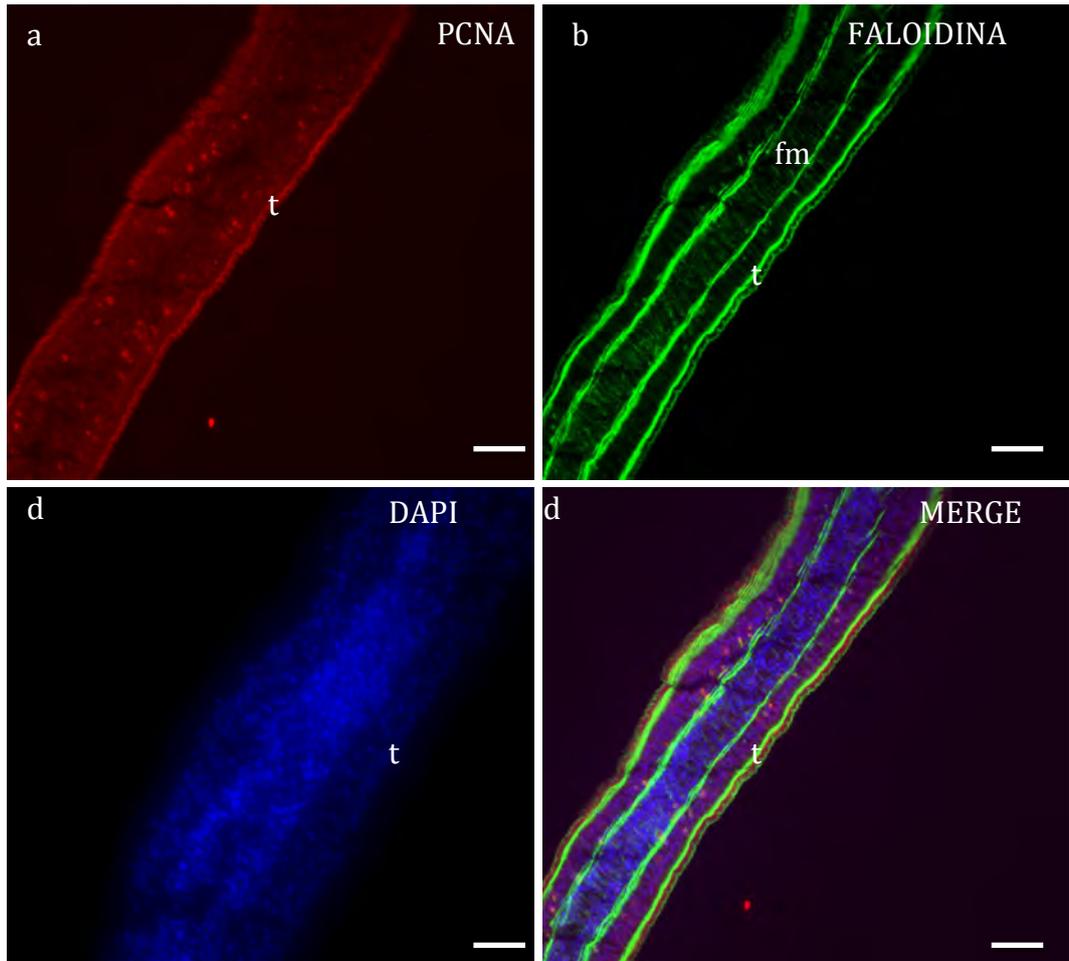


Figura 30 - Inmunolocalización de PCNA sobre Criocortes de *M. corti*. Corte longitudinal de 7 μ m de espesor 40X. Imágenes Microscopio invertido Olympus IX2 sección medio - posterior a: Detección PCNA / Alexa Fluor 594 b: Tinción con DAPI Azul. c: Faloidina Verde, d: Merge DAPI – PCNA; e: Merge PCNA – DAPI – Faloidina La barra corresponde a 25 μ m Abreviaciones t (tegumento) fm (fibras musculares)

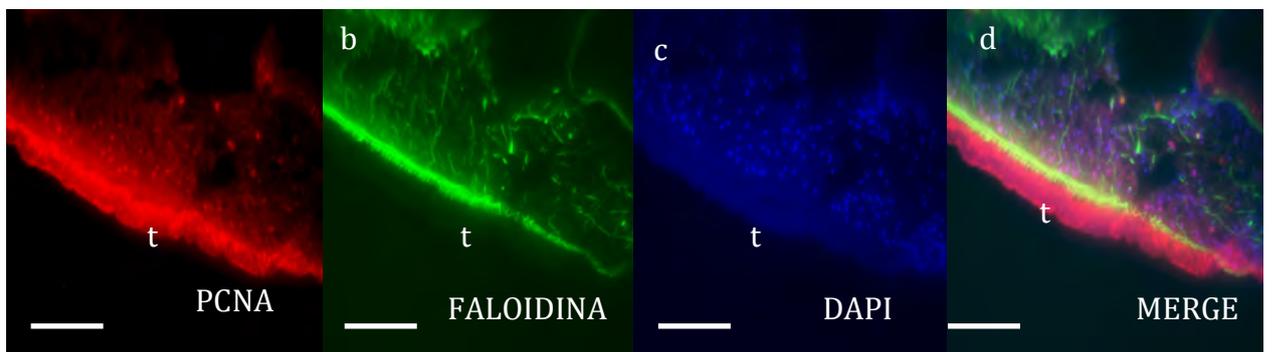


Figura 31 - Inmunolocalización de PCNA sobre criocortes de *M. corti*, corte longitudinal de 7 μ m de espesor 40X. Imágenes Microscopio invertido Olympus IX2 sección medio - posterior a: Detección PCNA / Alexa Fluor 594 b: Tinción con DAPI Azul. c: Anti cuerpo anti Faloidina Verde, d: Merge DAPI – PCNA Faloidina. La barra corresponde a 100 μ m

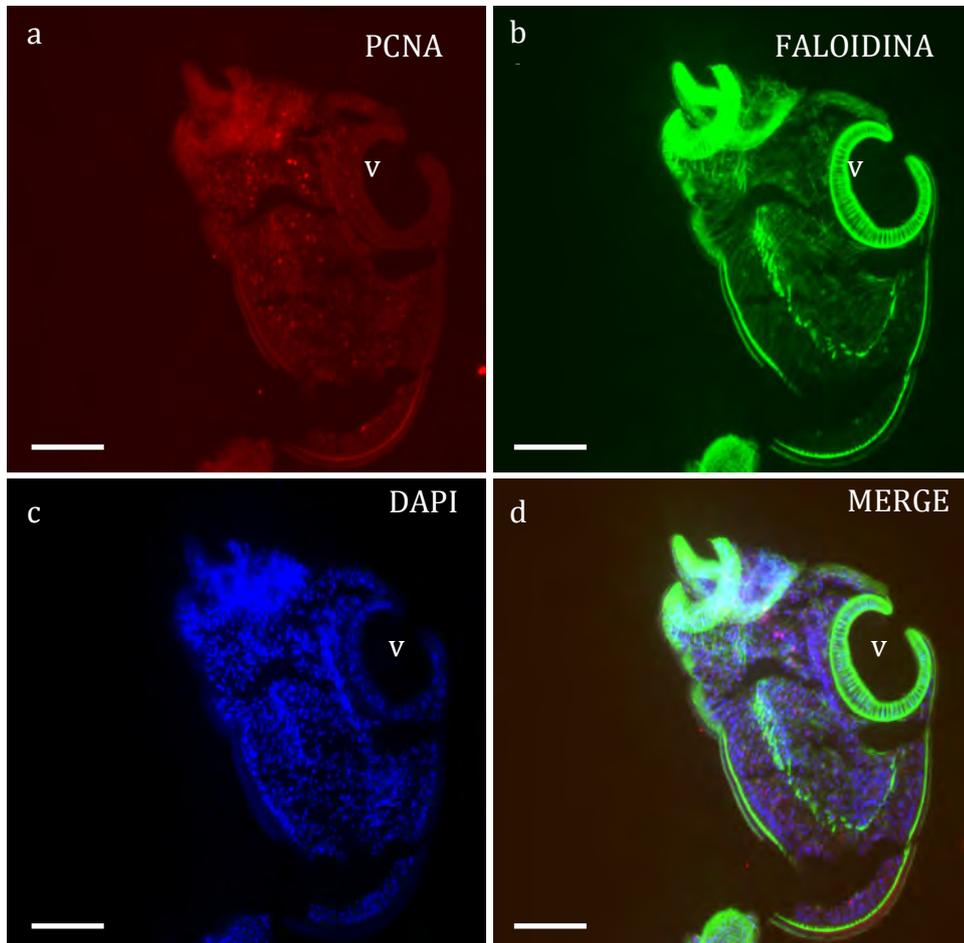


Figura 32 - Inmunolocalización de PCNA sobre Criocortes de *M. corti* , corte longitudinal de 7 μ m de espesor 40X. Imágenes Microscopio invertido Olympus IX2 sección medio - posterior a: Detección PCNA / Alexa Fluor 594 b: Tinción con DAPI Azul. c: Anti cuerpo anti Faloidina Verde, d: Merge DAPI – PCNA - Faloidina Abreviaciones v (ventosas) La barra corresponde a 100 μ m

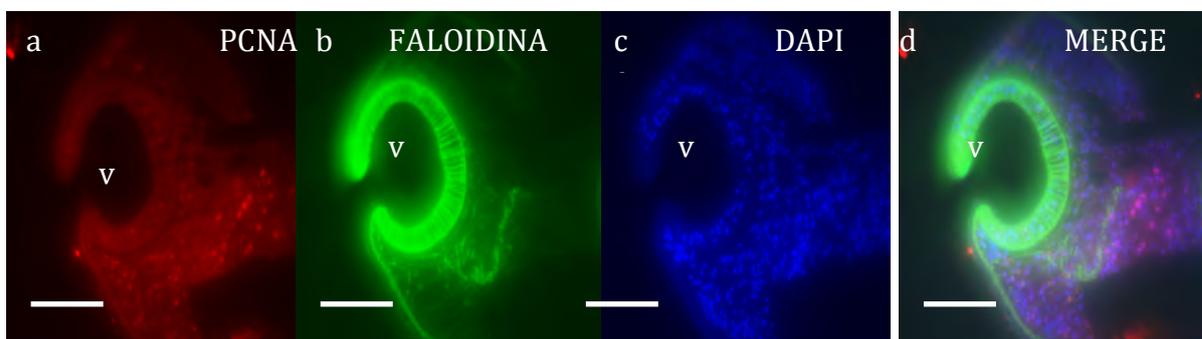


Figura 33 - Inmunolocalización de PCNA sobre criocortes de *M. corti*, corte longitudinal de 7 μ m de espesor 40X. Imágenes Microscopio invertido Olympus IX2 sección medio - posterior a: Detección PCNA / Alexa Fluor 594 b: Tinción con DAPI Azul. c: Anti cuerpo anti Faloidina Verde, d: Merge DAPI – PCNA – Faloidina. La barra corresponde a 100 μ m

Los resultados mostrados de las Figuras 32 y 33 presentan similitud con lo descrito para células que incorporan BrdU en Koziol 2010. (mostrar proliferación

en la zona del escólex) Al alcanzar un mayor grado de desarrollo en *M. corti*, existe un incremento de células en el escólex y el cuello, seguido por un número menor de células en la región inmediatamente posterior al cuello. Esto es esperable ya que en muchos cestodos el cuello es la región donde se comienza a generar los nuevos segmentos por ende una zona de mayor proliferación esperada.

Los resultados muestran células positivas para PCNA que comienza a ser mas evidente en el escólex Figura 33 así también próximas a las fibras musculares longitudinales que se prolongan por delante de las ventosas.

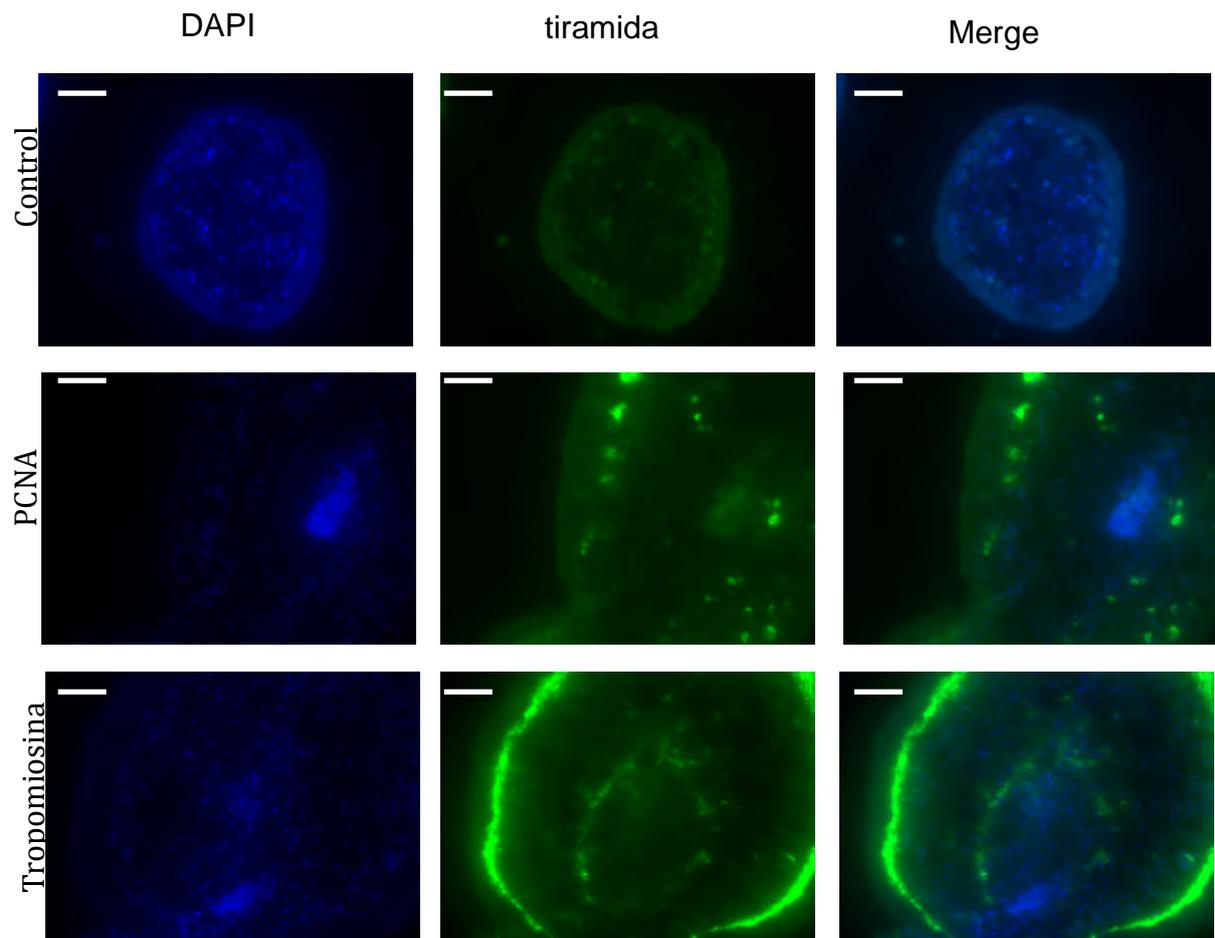


Figura 34 - Inmunolocalización de PCNA sobre Criocortes de *M. corti*, corte transversal de 10 μ m de espesor . Imágenes Microscopio invertido Olympus IX2 sección medio – posterior. Detección PCNA, Tiramida y Tropomiosina La barra corresponde a 50 μ m

En la Figura 34 nuevamente se observa una distribución parenquima para las células positivas para PCNA con una aparente acumulación en la zona del (características de) aparato excretor, donde se encuentran los poros excretores accesorios tras la reproducción asexual.

Inmunolocalización de PCNA en *Fasciola hepática*

Inmunolocalización de PCNA en Fasciola hepática, revelado fluorescente

En la Figura 35 podemos observar con claridad células positivas para el anticuerpo contra PCNA en la zona subtegumentaria y de glándulas vitelógenas estas últimas se encuentran distribuidas en forma de racimos localizados en las caras laterales del cuerpo. De dichas glándulas se desprenden células vitelógenas, llenas de corpúsculos de vitelo que viajan por los tubos colectores que conducen a conductos vitelinos transversales para juntarse y formar lo que es el conducto vitelino principal y luego desembocar en el ootipo, que es donde se sintetizan los materiales que formarán al huevo.

De estos resultados no es posible afirmar aun que exista tinción de células pertenecientes al aparato reproductor que este se encuentra altamente distribuido y ramificado para el caso de los testículos en los dos tercios anteriores del organismo.

En la Figura 36 aparte de la señal para PCNA en el canal rojo se puede ver ruido de fondo producto de la autofluorescencia de los portaobjetos, si bien la tinción dentro del organismo es clara y diferencial. La detección de células positivas para PCNA en la zona media es notable. Es de esperar también en estos resultados que parte de la marcación se encuentre compartida con regiones comprendida por los testículos, muy ramificados a lo largo del Adulto, aunque estos datos al igual que los analizados para las hibridaciones in situ sobre cortes de *Fasciola hepática* no serían concluyentes acerca de la localización específica de células proliferantes, si evidenciando el marcado de células positivas para PCNA lo cual marca el camino

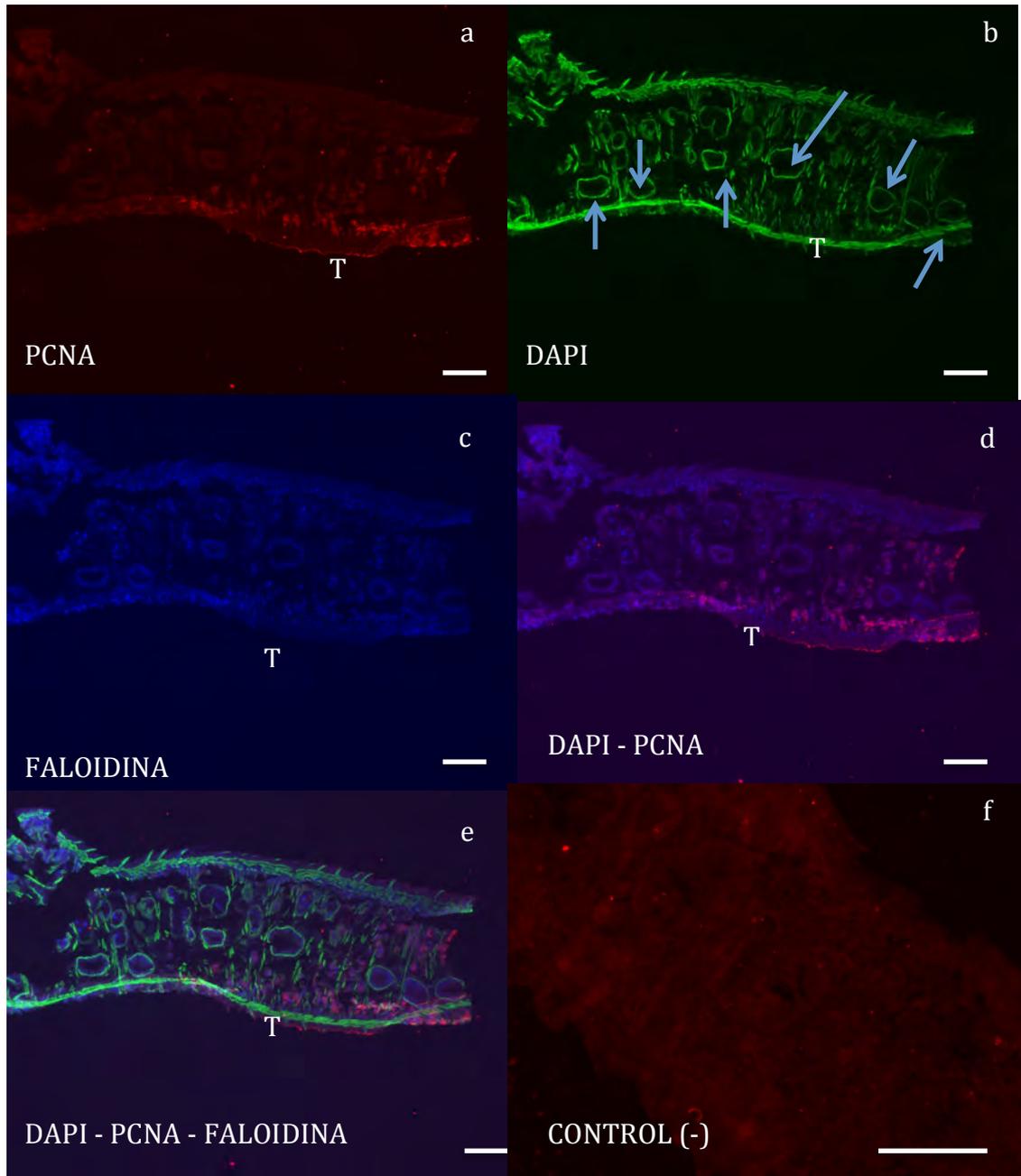


Figura 35 - Inmunolocalización de PCNA en Adultos de Fh, corte longitudinal de 7µm de espesor. Imágenes Microscopio invertido Olympus IX2 región medio – anterior. Las flechas señala los cortes transversales del tubo digestivo. a: Detección PCNA / Alexa Fluor 594 b: Tinción con DAPI Azul. c: Anti cuerpo anti Faloidina Verde, d: Merge DAPI – PCNA e: Merge DAPI - PCNA – Faloidina.f: Control negativo sin EDU. Abreviaciones (T) Tegumento. La barra corresponde a 25µm

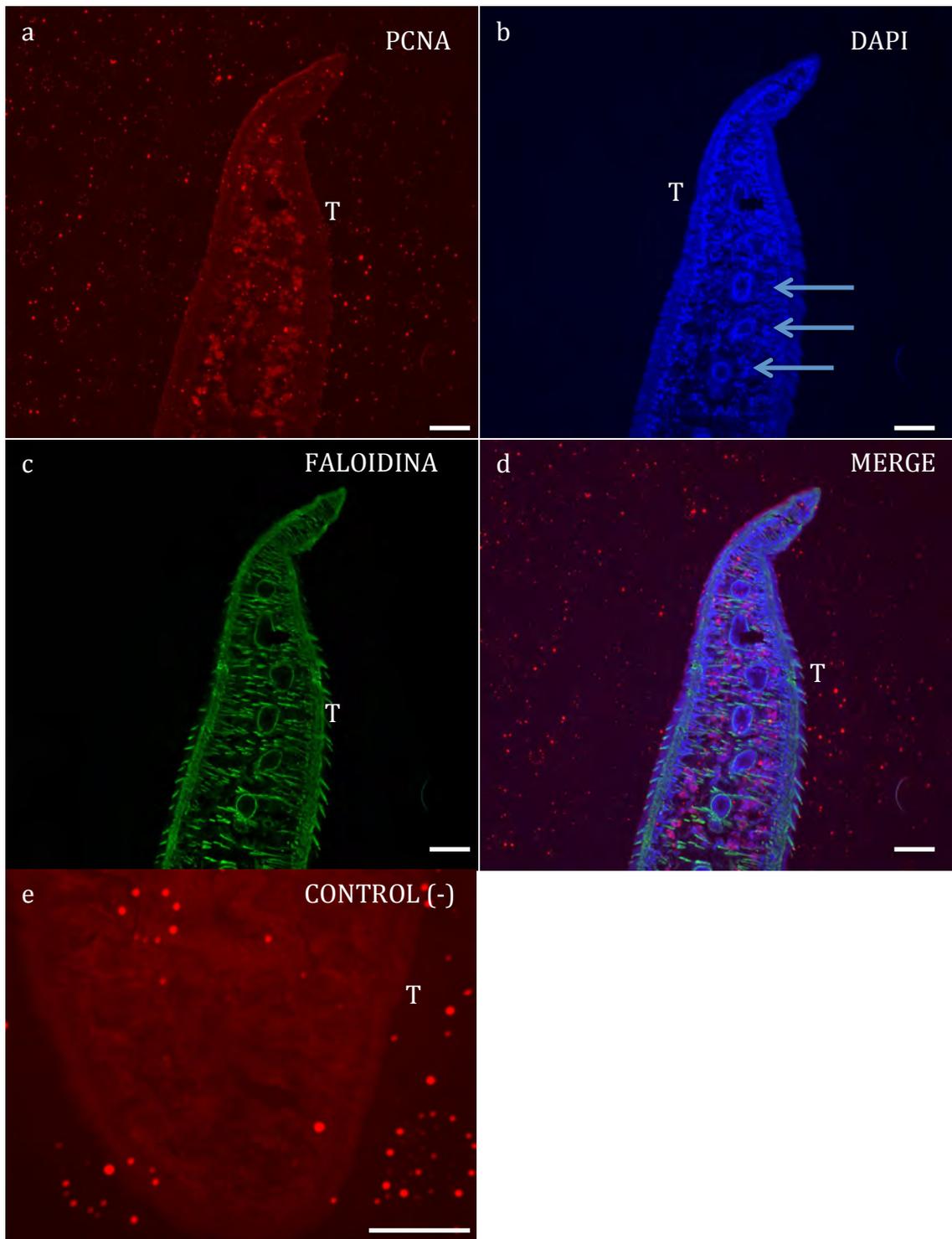


Figura 36 - Inmunolocalización de PCNA en Adultos de *F. hepática*, corte longitudinal de 7 μ m de espesor. Imágenes Microscopio invertido Olympus IX2 sección medio - posterior a: Detección PCNA / Alexa Fluor 594 b: Tinción con DAPI Azul. c: Anti cuerpo anti Faloidina Verde, d: Merge DAPI - PCNA - Faloidina, e: Control negativo sin primario. La barra corresponde a 25 μ m Abreviación T (Tegumento) V (Ventosa), las felchas señalan los cortes trasversales del intestino

De estos resultados no es posible concluir que existiría un proceso de “proliferación celular” (células positivas para pcna) desarrollado en la zona de las glándulas vitelogenas. Si bien los resultados obtenidos concuerdan con lo visto en ensayos de Hibridaciones con sondas de ARN antisentido para PCNA en la Figura 28 y la bibliografía (Robinson, 2001) y lo obtenido en Collins et al. (2013) para la distribución de células proliferantes donde visualizaron marca positiva para células vitelogenas.

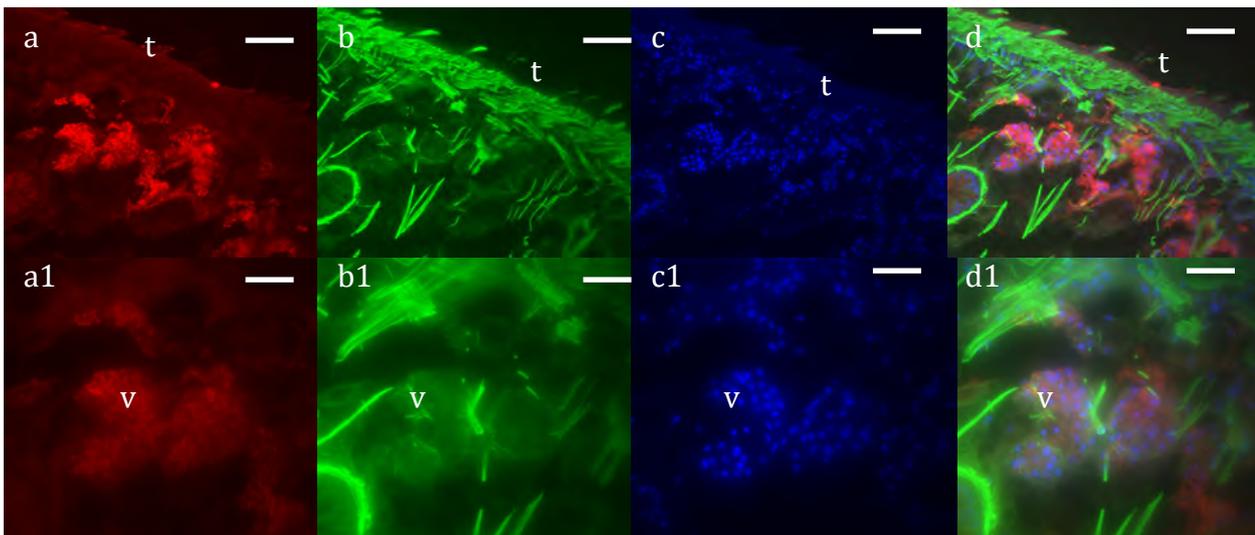


Figura 37 - Inmunolocalización de PCNA en Adultos de Fh, corte longitudinal de 7 μ m de espesor 40X. Imágenes Microscopio invertido Olympus IX2 sección medio - posterior a: Detección PCNA / Alexa Fluor 594 b: Tinción con DAPI Azul. c: Anti cuerpo anti Faloidina Verde, d: Merge DAPI - PCNA - Faloidina La barra corresponde a 5 μ m (Abrebiaciones)

Immunolocalización de PCNA en *Fasciola hepática*

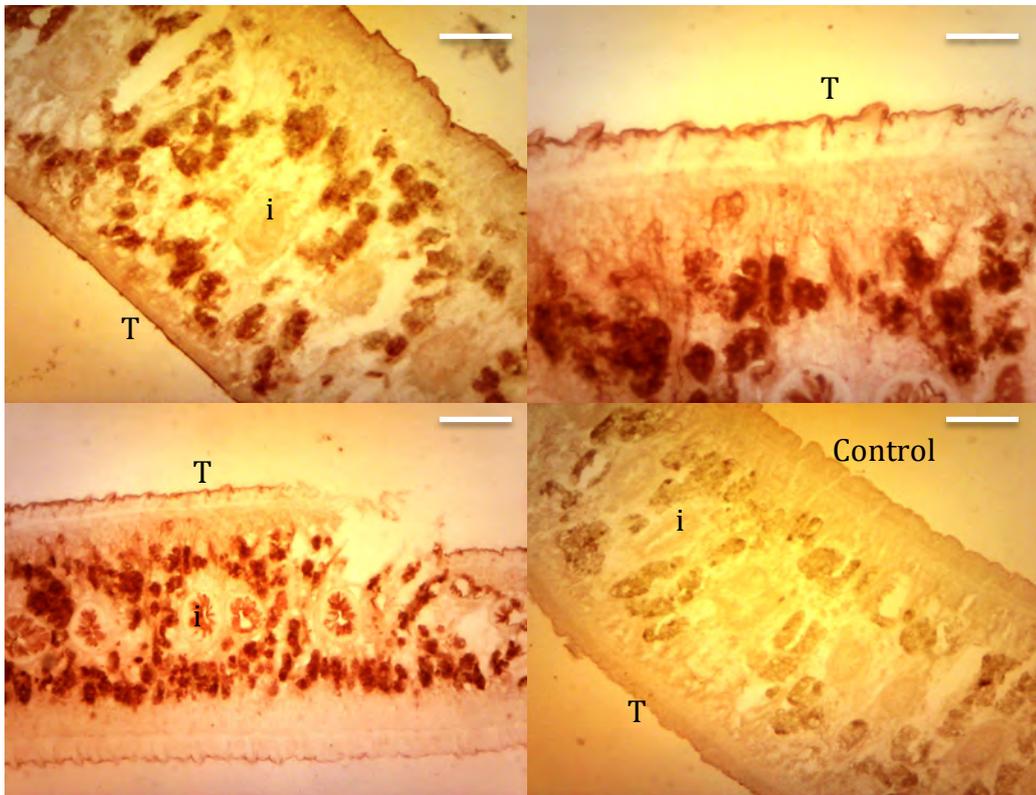


Figura 38 -Immunolocalización de PCNA en Adultos de *F. hepatica*, corte longitudinal de 10 μ m de espesor. Imágenes Camara Dino-Eye Premier AM4023X sección medio del organismo. Detección PCNA con anticuerpo secundario conjugado a Peroxidasa. La barra corresponde a 10 μ m Abreviaciones I (intestino) T (Tegumento)

Tal como lo visto para los resultados de inmunodetección con fluorescencia recién descritos y los resultados para hibridaciones in situ del capítulo anterior las marcas se hacen predominantes en las regiones de glándulas vitelogenas. Estos resultados llevarían a una primera aproximación a la localización y/o distribución así como también a la morfología de las células positivas para PCNA ya que con técnicas distintas se visualizo lo mismo. En la detección con fluoroforos queda demostrado que no existiría marcado inespecífico por actividad de la enzima Peroxidasa endógena como se podría esperar del organismo en el revelado con AEC si bien como mencionamos anteriormente se realiza una inactividad de la enzima previo al ensayo.

Detección de células en diferentes estadios abordables de desarrollo de *F. hepática* y *M. corti* tras incorporación de Edu

La detección de células entrando en la fase S del ciclo celular se determinó mediante la incorporación de Edu (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) ensayo análogo al de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) que es incorporado al ADN durante su síntesis. Estos estudios se llevaron a cabo tanto en adultos de *F. hepática*, suspensiones celulares, Miracidios y Esporocitos.

Basándonos en que en *M. corti* ya habíamos realizado estudios previos de incorporación de BrdU para localizar las células proliferantes, (Smith y McKerr (2000). Se realizaron estudios tras pulsos de 2, 4 y 8 horas de duración con Edu en diferentes etapas del desarrollo de *F. hepática*. La elección del tiempo de incubación se decidió plantear así debido en primer lugar a la viabilidad de los organismos y por otro lado comparando con los cestodos donde la duración del ciclo celular es de 24 horas (Wikgren y Gustafsson, 1967; Bolla y Roberts, 1971), se espera en estos plazos que una porción de la población de células proliferantes que incorporan EDU quede marcada.

Detección de la incorporación de Edu en *F. hepática*

Detección de la incorporación de Edu en suspensiones celulares de Adultos de Fasciola hepática

La incorporación de EDU se realizó en adultos incubados con EDU los cuales fueron sometidos posteriormente al protocolo Tripsina – EDTA a modo de obtener una suspensión celular de adultos de *F. Hepática*. La decisión de realizar este ensayo fue debido a que por mas de los numerosos intentos por lograr la incorporación de EDU en adultos enteros no era posible la detección de ningún área marcada luego de la fijación y posterior inclusión, (imágenes no mostradas) sin embargo en estudios anteriores se observo mediante extracción de ADN y dot que Incorporaban BrdU. Esto puede deberse a lo impermeable del tegumento o por acción del aparato digestivo. Incluso se probó seccionar en dos un adulto con el fin de visualizar una región de células proliferantes en la zona del corte pero sin éxito alguno siendo que en esa área la zona se encontraba desprovista de tegumento (imágenes no mostradas).

Debido a esto se decidió realizar suspensiones celulares luego de incubar los Adultos de *F. hepática* con EDU.

En la Figura 39 se muestra una población celular la cual incorpora EDU exitosamente y según la morfología descrita para este tipo de células (los

neoblastos) se puede visualizar que presentarían cierta característica similar en cuanto al pequeño tamaño, alta relación núcleo/citoplasmática, según lo descrito por Koziol 2010, Shibata, N. 2010.

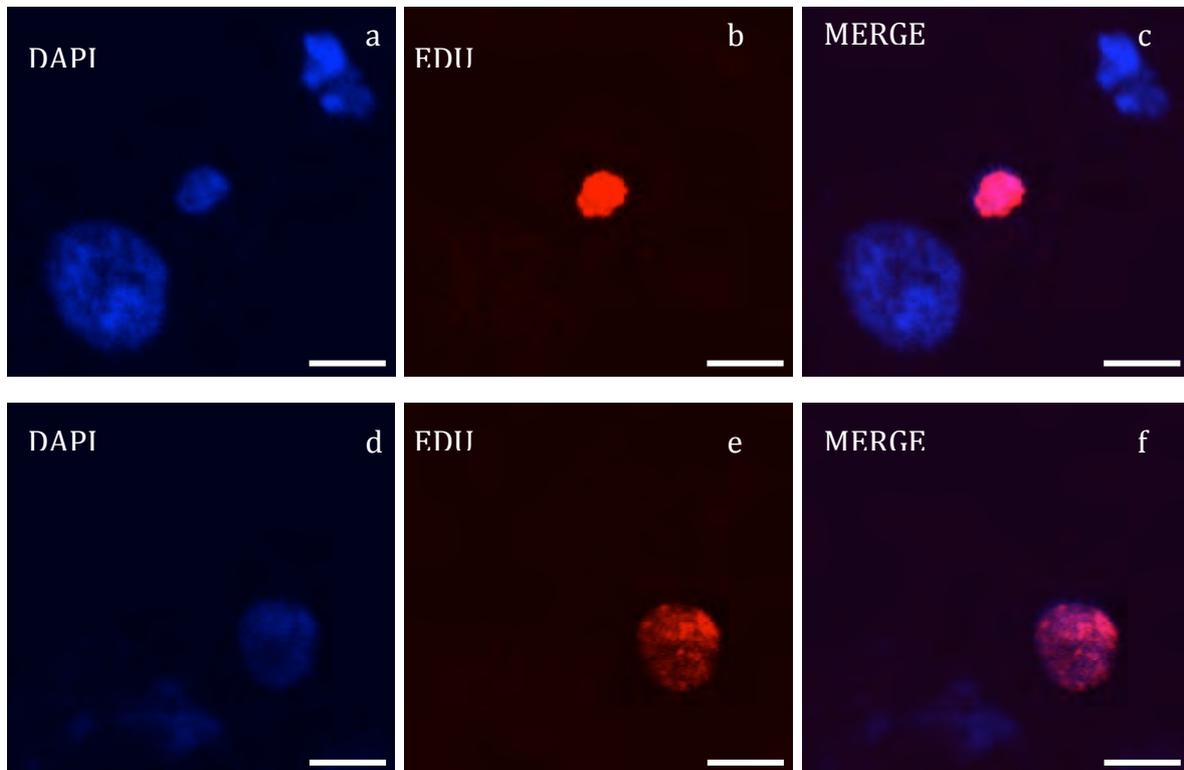


Figura 39 - Detección de Edu Suspensiones celulares de Adultos de *F. hepática* incubados O.N. Microscopía confocal de fluorescencia a y d: DAPI. b y e: EDU, c y f: Merge. La barra corresponde a 5 μ m

Incorporación de EDU en huevos Fasciola hepática

Los huevos miden de 130 a 150 micras de longitud por 60 a 90 micras de ancho; tienen opérculo y la cubierta formada por proliferol y proteínas. La maduración se efectúa en a los 9 a 15 días a temperatura de 22 a 25°C con lo que estos pueden ser mantenidos en frío y protegidos de la luz sin que maduren. Son altamente herméticos lo cual dificulta en varias ocasiones su estudio ya que no pueden ser analizados en su interior sin modificar drásticamente su morfología.

En la figura 40 se puede visualizar claramente lo antes mencionado ya que en la imagen a y las demás de la primer fila el huevo se encuentra con el opérculo abierto es decir que ya no esta sellado completamente y es así que se puede apreciar tanto la entrada de EDU como DAPI y la tinción de algunas células de tejidos del miracidio. La figura 40 i y las demás de la fila se muestra un escenario distinto donde es posible apreciar la presencia de dos huevos, uno vacío (izquierda) y otro conteniendo la larva dentro (derecha) y el opérculo cerrado, en las Figura 40 j,k,l se ven fantasmas de los huevos que no incorporan EDU o DAPI

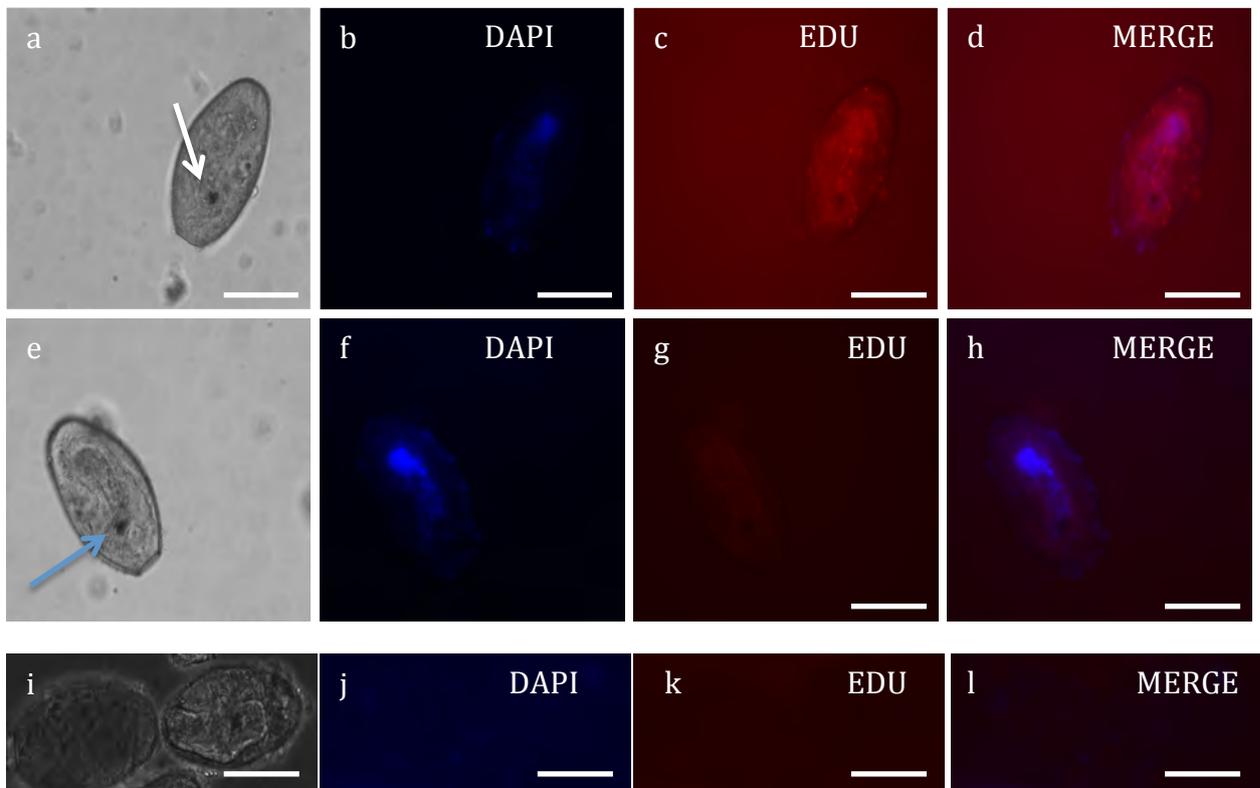


Figura 40 - Detección de Edu en huevos de *Fasciola hepática* Microscopía confocal de fluorescencia a, e, i: Imagen de campo claro. b, f, j: DAPI. c, g, k .EDU. d, h, i: Merge EDU DAPI. Se señala el miracidio dentro del huevo Las barras representan 50µm

Incorporación de EDU en Miracidios

El miracidio es una larva ciliada que eclosiona tras la maduración de los huevos, abriendo el opérculo y liberados al medio. Estas larva debe encontrar al hospedero primario (un caracol pulmonado de la familia Lymnaeidae) en unas 8 horas aproximadamente. En los primeros resultados (no mostrados) analizando la incorporación de EDU en miracidios no mostraron incorporación alguna (imágenes no mostradas), esto se podría deber a la falta de proliferación celular. Una posible explicación a lo observado es que el miracidio desde que eclosiona debido a la corta viabilidad que tiene no destina recursos a la proliferación y si al movimiento y metabolismo energético.

Para resolver ese problema optamos por simular el medio del interior del caracol donde el miracidio comienza a desarrollarse redondeándose para formar el esporocisto, estadio siguiente en la evolución del ciclo. En la Figura 41 queda comprobado que la actividad celular de los miracidios cambio completamente comenzando a aparecer poblaciones celulares que proliferan. Dichas células que incorporan EDU se encuentran distribuidas a lo largo de todo el organismo que cambia completamente su morfología.

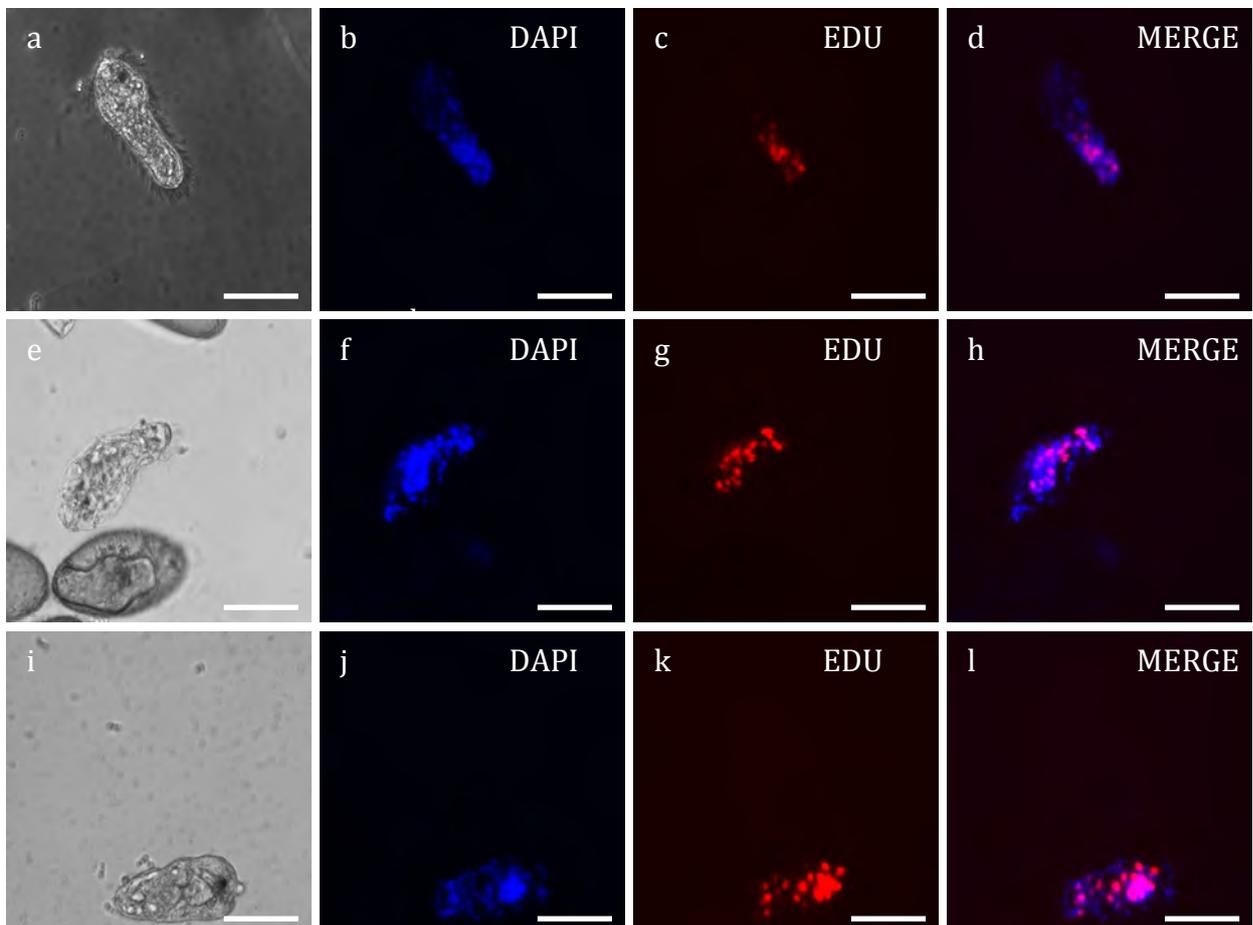


Figura 41 - Detección de Edu en Miracidios. Microscopía confocal de fluorescencia a, e, i: Imagen de campo claro. b, f, j: DAPI. c, g, k: EDU. d, h, l: Merge EDU DAPI. La flecha señala la mancha ocular Las barras representan 50µm

Incorporación de EDU en Esporocistos

Los esporocistos son el estadio siguiente al miracidio. en el desarrollo, estado el cual dará lugar a las redias con el trascurso de las semanas en el hospedero y posteriormente las cercarías que abandonan el caracol y nadan libremente hasta enquistarse y seguir con el ciclo. La sobrevivencia tanto de Miracidios como de Esporocios en medio con EDU se ve dificultada ya que el EDU es disuelto en DMSO (Dimetilsulfoxido) el cual es altamente nocivo para los organismos y varios ensayos a diferentes concentraciones de EDU fueron realizados

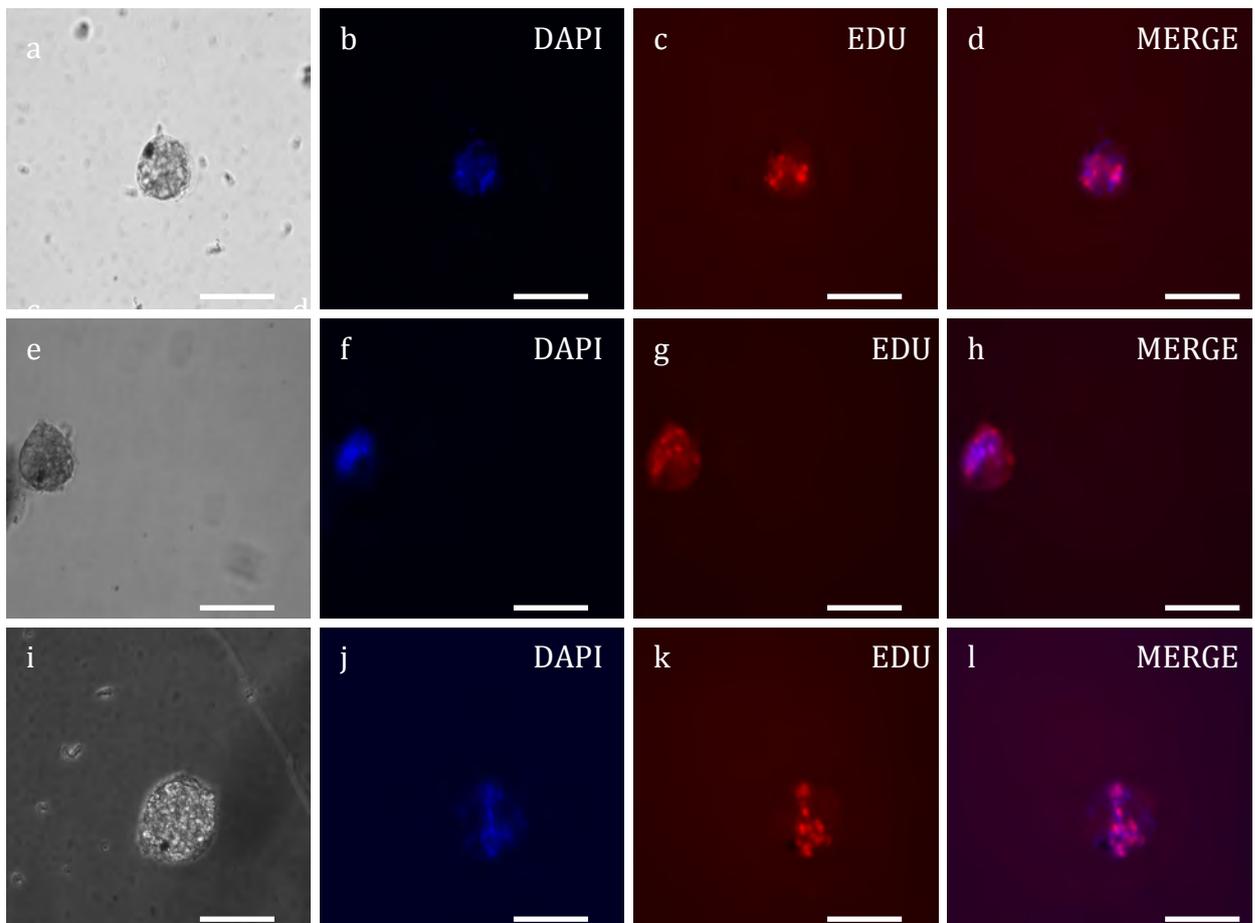


Figura 42 - Detección de Edu en Esporocistos. Microscopía confocal de fluorescencia a, e, i: Imagen de campo claro. b, f, j: DAPI. c, g, k: EDU. d, h, l: Merge EDU DAPI. Las barras representan 50 μ m

La incorporación de EDU en esporocistos Figura 42 es clara al igual que lo observado en los miracidios, es posible apreciar una intensa señal a nivel de células proliferativas las cuales acompañan con el proceso el cual está desarrollando el organismo (descrito en la introducción)

Incorporación de Edu *M. corti*

Para los ensayos de detección de la incorporación de EDU en *M. Corti* se utilizaron cultivos de *M. corti* con 5 días de desarrollo y se incubaron con EDU por 3 horas para luego ser fijados y revelados. Es posible la detección de incorporación de EDU a nivel del esoclex y cuello tal como lo observado en los demás ensayos. También se observó un grupo celular que incorporó EDU exitosamente y se encuentra en la región del parénquima medular interno tal como se observó en los resultados obtenidos por Koziol 2010.

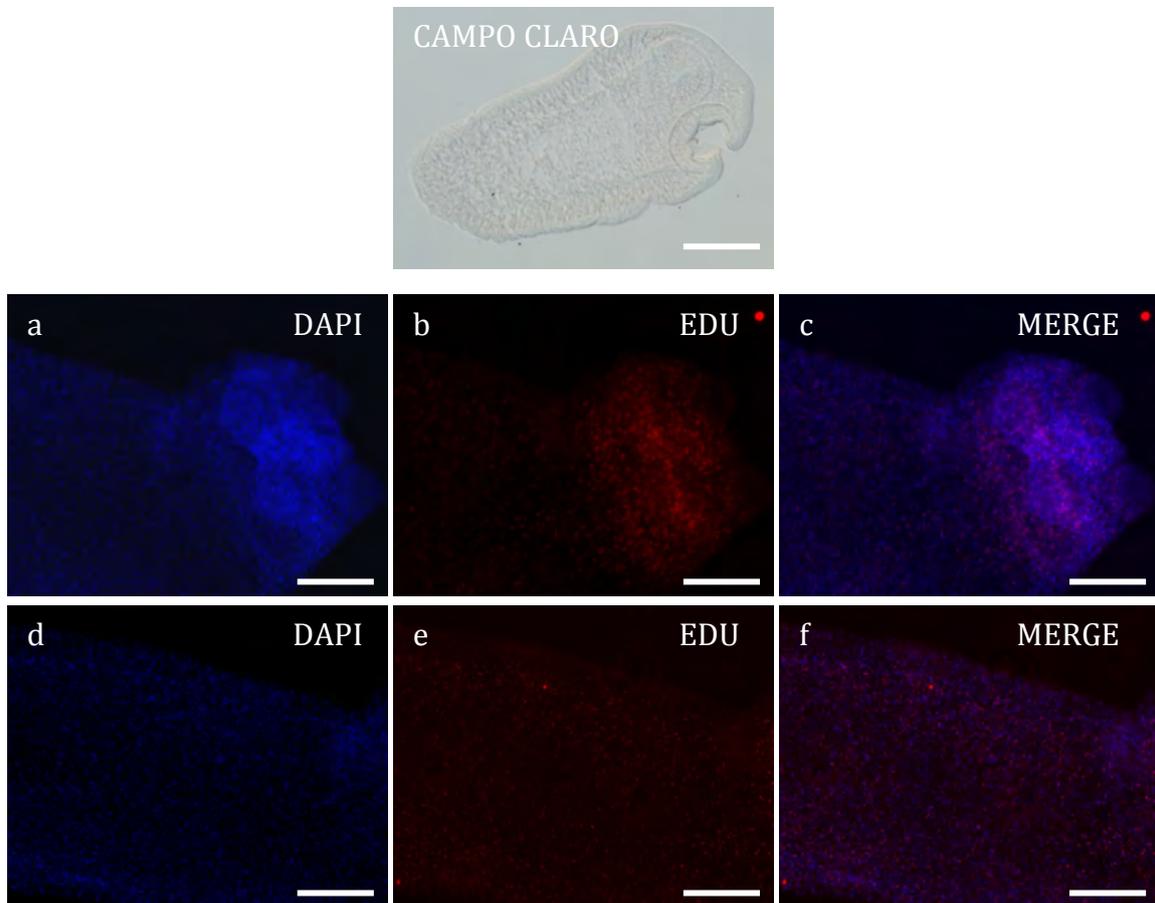


Figura 44 - Detección de Edu *M. corti* Microscopía confocal de fluorescencia a y d: DAPI, b y e: EDU c y f: Merge. La barra corresponde a 150 μ m

Conclusiones y perspectivas

Este trabajo aportó al conocimiento de un posible marcador molecular de células proliferantes en Platelminfos parásitos. En concordancia con lo descrito en la bibliografía se comprobó que PCNA se encuentra altamente conservada a lo largo de la escala evolutiva (S. N. Naryzhny, 2008). Tanto sus secuencias como estructura génica muestran un alto porcentaje de identidad y similitud respectivamente manteniéndose incambiada de una especie a otra. Los resultados de los modelados bioinformáticos son congruentes con lo antes dicho ya que las predicciones estructurales para la proteína resultarían ser idénticas de un organismo a otro. Si bien es posible ahondar en el detalle estructural y comparar sitios específicos dentro de las diferentes proteínas, siempre se espera encontrar homología de estructuras. Parte de esta conservación se explica con el hecho evolutivo de lo incambiado que se ha mantenido el escenario de acción de PCNA ya que la maquinaria de replicación celular tiene sus orígenes en la base de la evolución manteniéndose funcional e incambiada a lo largo de la historia. Ciertamente estos estudios son de relevancia ya que hacen a la caracterización del gen en estos Platelminfos Parásitos.

Se logró expresar la proteína recombinante *EgPCNAr* en forma soluble, purificarla exitosamente e inmunizar un conejo para así obtener un anticuerpo policlonal contra *EgPCNAr*. Los ensayos de inmunolocalización revelaron la utilidad del anticuerpo si bien en algunos resultados las tinciones inespecíficas no serían congruentes con lo esperado tanto para *M. corti* como *F. hepática*. En *M. corti* se observó distribuciones de células positivas para PCNA que se localizan principalmente en el parénquima medular junto a la capa muscular longitudinal interna, si bien se observó localización en todo el parénquima medular. Incluso en la región del escólex se localizan principalmente cerca de los haces musculares. No se visualizaron células en la región del parénquima cortical exterior y subtegumentaria. La abundancia de estas células es mayor en la región anterior (escólex y cuello), siendo especialmente escasas en la región más posterior, se observó señal donde se acumulan los poros excretores accesorios. En líneas generales se genera un gradiente anteroposterior conforme comienza el desarrollo y crecimiento para *M. corti*. La localización se da a nivel del parénquima medular encontrando mayores concentraciones en cuello y escólex. Resultados de iguales características se encuentran en la bibliografía anteriormente descrita en el texto.

Los ensayos de hibridación con sondas de ARN antisentido en *M. corti* para el gen PCNA revelaron resultados similares los de las inmunolocalizaciones en

cuanto a la distribución de células positivas para PCNA. En el caso de *F. hepática* tanto en ensayos de hibridación como inmunomarcado la distribución se concentra a nivel de las glándulas vitelogenas no descartando la tinción en aparato reproductor. Según la técnica de revelado se observó tinción en el tegumento pero se infiere a pegado inespecífico propio de la técnica.

Se probó la incorporación de 5-etinil-2 'desoxiuridina (EDU) al ADN, el cual es un método para detectar la síntesis de ADN en células proliferantes. Para el caso de *M. corti* se observó un patrón similar de mayor concentración a nivel del cuello y escólex lo que generaría un gradiente anteroposterior tal como se observó en Koziol 2010, Espinoza et al., 2007.

En *F. hepática* los ensayos sobre organismos enteros no arrojaron información alguna ya que no se detectó incorporación, tanto porque el EDU no era permeable al tegumento o que fuera eliminado por el organismo. Es así que se optó por la disgregación celular de adultos incubados y en estas condiciones sí se observó tinción y fue posible caracterizar las células las cuales presentaron la misma morfología descrita en la bibliografía pequeño tamaño, alta relación núcleo/citoplasmática, nucléolo prominente según lo descrito por Koziol 2010, Shibata, N. 2010.

Los resultados sobre huevos mostraron lo impermeables que son ya que en huevos totalmente cerrados no fue posible visualizar incorporación tanto de EDU como DAPI, una vez abiertos presentando el miracidio dentro se logró observar marca. Los primeros ensayos de incorporación en miracidios eclosionados no revelaron incorporación de EDU hecho el cual asociamos a que una vez el miracidio es liberado tiene poca sobrevivencia hasta encontrar su hospedero y no sería esperable encontrar proliferación celular en esta etapa. Una vez simulado el medio del interior caracol e incubados los huevos en el mismo, los miracidios que eclosionan se transforman a esporocistos (etapa siguiente en el ciclo de vida) y en esas condiciones fue posible visualizar células que incorporan EDU, tanto en miracidios como esporocistos. La distribución es uniforme, resultado esperado ya que el cambio morfológico que se presenta es significativo. Profundizar en otras etapas del ciclo de vida sería de suma relevancia así como también realizar ensayos de disgregación celular en estos dos estadios abordados con el fin de caracterizar con mayor resolución la morfología de las células proliferantes.

En conclusión con los datos aportados en este trabajo restaría realizar ensayos de co-localización utilizando combinaciones de estas técnicas si bien ensayos de incorporación de EDU e inmunolocalización conjuntos fueron realizados en adultos de *F. hepática* sin resultados positivos. En este trabajo se puso a punto cada técnica por separado con la puesta a punto de los ensayos en conjunto será posible identificar con precisión y caracterizar exhaustivamente la población de

células proliferantes en estos modelos de platelmintos y evaluar la exclusividad de PCNA como posible marcador de células proliferantes

Referencias Bibliográficas

- Andrews, S. J. (1999). "The life cycle of *Fasciola hepatica* ." In: Dalton, J.P. (Ed.), *Fasciolosis*. CABI Publishing, Oxin, UK: pp. 1-29.
- Ayyagari R., Impellizzeri K. J., Yoder B. L., Gary S. L. and Burgers P. M. (1995) "A mutational analysis of the yeast proliferating cell nuclear antigen indicates distinct roles in DNA replication and DNA repair". *Mol. Cell Biol.* 15, pp. 4420– 4429.
- Baguñá, J.; Romero, R. (1981). "Quantitative analysis of cell types during growth, degrowth and regeneration in the planarians *Dugesia mediterranea* and *Dugesia tigrina*". *Hydrobiologia* 84: pp. 181–194
- Baguñá, J. (1976). "Mitosis in the intact and regenerating planarian *Dugesia mediterranea*" n. sp. II. *J Exp Zool* pp. 195: 65–79
- Baguñá, J. (2012). "The planarian neoblast: the rambling history of its origin and some current black boxes". *Int J Dev Biol* 56: pp. 19–37.
- Baguñá, J. y 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: pp. 77–86
- Betchaku, T. (1967). "Isolation of planarian neoblasts and their behavior *in vitro* with some aspects of the mechanism of the formation of regeneration blastema. *J Exp Zool* 164: pp. 407–433
- Bolla, R.I. y Roberts, L. S. (1971). "Developmental physiology of cestodes, IX. Cytological characteristics of the germinative region of *Hymenolepis diminuta*". *Journal of Parasitology* 57: pp. 267-277
- Bravo R. Y J.E. Celis, J. (1980) "A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells" *Cell Biol.* 1980, 84 pp. 795/802.
- Bravo R. y H. Macdonald-Bravo, J. (1987) "Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites". *J Cell Biol.* 1987 Oct 1;105(4): pp. 1549–1554.
- Britos, L., (2000). "Estudios celulares y moleculares del desarrollo estrobilar de *Mesocestoides corti*". Tesis de Maestría. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- Brøndsted, H. V. (1969). "Planarian regeneration". 1º ed. Oxford, New York. *Pergamon Press*
- Challberg MD. y Kelly TJ. "Animal virus DNA replication". *Annu Rev Biochem.* (1989) ;58: pp. 671–717.

Collins J., Bo Wang, Bramwell G. Lambrus, Marla E. Tharp, Harini Iyer & Phillip A. Newmark (2013). "Adult somatic stem cells in the human parasite *Schistosoma mansoni*" *Nature*. 2013 Feb 28; 494(7438): pp. 476–479.

Coward, S. J. (1974). "Chromatoid bodies in somatic cells of the planarian: observations on their behavior during mitosis". *Anat Rec* 180: pp. 533–545

Domínguez, M. F.; Koziol, U.; Porro, V.; Costábile, A.; Estrade, S.; Tort, J.; Bollati-Fogolin, M.; Castillo, E. (2014). "A new approach for the characterization of proliferative cells in cestodes". *Exp Parasitol* 138: pp. 25–9

Douglas, L.T. (1961). "The development of organ systems in nematodaeniid cestodes. I. Early histogenesis and formation of reproductive structures in *Baerietta Diana*" (Helfer. 1948). *J Parasitol* 47: pp. 669-680

Egger, B., Gschwentner, R., Hess, M.W., Nimeth, K.T., Adamski, Z., Willems, M., Rieger, R., Salvenmoser, W., 2009a. "The caudal regeneration blastema is an accumulation of rapidly proliferating stem cells in the flatworm *Macrostomum lignano*". *BMC Dev Biol* pp. 9, 41.

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

Eisenhoffer, G. T.; Kang, H.; Sánchez Alvarado, A. (2008). "Molecular analysis of stem cells and their descendants during cell turnover and regeneration in the planarian *Schmidtea mediterranea*". *Cell Stem Cell* 3: pp. 327–339

Ekaterina M.F. C. Gray, Stuart A. MacNeill^{b,c} and Ladensteina R. "Structural insights into the adaptation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) from *Haloferax volcanii* to a high-salt environment" (2009) *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* ISSN 0907-4449.

Ellison V. and Stillman B (2001) "Opening of the clamp: an intimate view of an ATP-driven biological machine". *Cell* 106, pp. 655–660.

Espinoza, I., Galindo, M., Bizarro, C.V., Ferreira, H.B., Zaha, A., Galanti, N., (2005) "Early post-larval development of the endoparasitic platyhelminth *Mesocostoides corti*: trypsin provokes reversible tegumental damage leading to serum-induced cell proliferation and growth". *J Cell Physiol* 205, pp. 211-217.

Espinoza, I., Gomez, C.R., Galindo, M., Galanti, N. (2007). "Developmental expression pattern of histone H4 gene associated to DNA synthesis in the endoparasitic platyhelminth *Mesocostoides corti*". *Gene* 386 pp. 35-41.

Galindo, M.; Paredes, R.; Marchant, C.; Mino, V.; Galanti, N. (2003). "Regionalization of DNA and protein synthesis in developing stages of the parasitic platyhelminth *Echinococcus granulosus*". *J Cell Biochem* 90: pp. 294-303

Gustafsson, M.K., (1976b). "Observations on the histogenesis of nervous tissue in *Diphyllobothrium dendriticum* Nitzsch, 1824 (Cestoda, Pseudophyllidea). *Z Parasitenkd* 50, pp. 313-321.

Gustafsson, M. K. S. (1990). "The cells of a cestode. *Diphyllobothrium dendriticum* as a model in cell biology". *Acta Acad Abo Ser B* 50: pp. 13-44

Gulbis J. M., Kelman Z., Hurwitz J., O. Donnell M. and Kuriyan J (1996) "Structure of the C-terminal region of p21(WAF1/CIP1) complexed with human PCNA". *Cell* 87, pp. 297-306.

Hay, E. D.; Coward, S. J. (1975). "Fine structure studies on the planarian, *Dugesia: I.* Nature of the "neoblast" and other cell types in noninjured worms". *J Ultrastruct Res* 50: pp. 1-21.

Higuchi, S., Hayashi, T., Hori, I., Shibata, N., Sakamoto, H., Agata, K., (2007). "Characterization and categorization of fluorescence activated cell sorted planarian stem cells by ultrastructural analysis". *Dev Growth Differ* 49, pp. 571-581.

Hori, I. (1982). "An ultrastructural study of the chromatoid body in planarian regenerative cells". *J Electron Microsc* 31: pp. 63-72

JJ Li, Kelly TJ. (1984) "Simian virus 40 DNA replication in vitro". *Proc Natl Acad Sci U S A*. PMID: 6095264. PMCID: PMC392058

Keiser, J. (2010). "In vitro and in vivo trematode models for chemotherapeutic studies." *Parasitology* 137 (3): 589-603.

Koziol, U., M. F. Dominguez, M. Marín, A. Kun&E. Castillo (2010). "Cell proliferation during in vitro development of the model cestode *Mesocestoides corti* from larva to adult worm." *Frontiers in Zool Biology* 2010 7:22.

Koziol, U. (2009) "Caracterización de células proliferantes en *Mesocestoides corti* (Cestoda) y de genes pumilio como posibles marcadores moleculares de las mismas". Tesis de Maestría PEDECIBA, Facultad de Ciencias - Montevideo Uruguay

Koziol, U., Lalanne, A. I. Castillo, E. (2009). "Hox genes in the parasitic platyhelminthes *Mesocestoides corti*, *Echinococcus multilocularis*, and *Schistosoma mansoni*: evidence for a reduced Hox complement". *Biochem Genet*, 47, pp. 100-116.

Koziol, U.; Rauschendorfer, T.; Zanon Rodriguez, L.; Krohne, G.; Brehm, K. (2014). "The unique stem cell system of the immortal larva of the human parasite *Echinococcus multilocularis*". *Evodevo* 5 (1): 10

Krishna T. S. Kong X. P. Gary S. Burgers P. M. and Kuriyan J (1994) "Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA". *Cell* 79, pp. 1233-1243.

- Lalanne, A. I.; Britos, L.; Ehrlich, R.; Castillo, E. (2004). “*Mesocestoides corti*: a LIM-homeobox gene upregulated during stribilar development”. *Exp Parasitol* 108 (3-4): pp. 169-175.
- Lobo, D.; Beane, W. S.; Levin, M. (2012). “Modeling planarian regeneration: A primer for reverse-engineering the worm”. *PLoS Comput Biol* 8: e1002481
- Markoski, M.M., Bizarro, C.V., Farias, S., Espinoza, I., Galanti, N., Zaha, A., Ferreira, H.B., (2003). “In vitro segmentation induction of *Mesocestoides corti* (Cestoda) tetrathyridia”. *J Parasitol* 89, pp. 27-34.
- McAlear M. A., Howell E. A., Espenshade K. K. and Holm C (1994) “Proliferating cell nuclear antigen (pol30) mutations suppress cdc44 mutations and identify potential regions of interaction between the two encoded proteins.Mol” . *Cell Biol.* 14, pp. 4390–4397.
- MB, Mathews, Bernstein, RM, Franza, BR Jr, Garrels, JI: (1997) “Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin”. *Nature* 1984 309: pp. 374–376
- Merchant, M. T.; Corella, C.; Willms, K. (1997). “Autoradiographic analysis of the germinative tissue in evaginated *Taenia solium* metacestodes”. *J Parasitol* 83: pp. 363-367.
- Miranda L. Byrne-Steelea and Joseph D. Nga,b*. (2009) “Expression, purification and preliminary X-ray analysis of proliferating cell nuclear antigen from the archaeon *Thermococcus thio-reducens*,” *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications* ISSN 1744-3091
- Moldovan George-Lucian, Boris Pfander, and Stefan Jentsch. (2007) “PCNA, the Maestro of the Replication Fork”. Department of Molecular Cell Biology, Max Planck Institute of Biochemistry, Am Ipferspitze 18 82152 Martinsried, Germany DOI 10.1016/j.cell.2007.05.003
- Morita, M.; Best, J. B. (1984). “Electron microscopic studies of planarian regeneration”. *J Exp Zool* 229: pp. 425–436
- Naryzhny N. (2008) “Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view” *S.Cell. Mol. Life Sci.* 65 (2008) 3789.
- Naushin H. Waseem y David P. Lane, (1990). “Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) Structural conservation and the detection of a nucleolar form”. ICRF Clare Hall Laboratories, South Mimms, Potters Bar, Herts EN6 3LD, UK
- Newmark, P.A., Sanchez Alvarado, A., (2000). “Bromodeoxyuridine specifically labels the regenerative stem cells of planarians”. *Dev Biol* 220, pp. 142-153.

Newmark, P.A., Reddien, P.W., Cebria, F., Sanchez Alvarado, A. (2003). "Ingestion of bacterially expressed double-stranded RNA inhibits gene expression in planarians". *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 1, 11861-11865.

Nimeth, K. T.; Mahlknecht, M.; Mezzanato, A.; Peter, R.; Rieger, R.; Ladurner, P. (2004). "Stem cell dynamics during growth, feeding, and starvation in the basal flatworm *Macrostomum* sp. (Platyhelminthes)". *Dev Dyn* 230: pp. 91-99

Nodono, H.; Ishino, Y.; Hoshi, M.; Matsumoto, M. (2012). "Stem cells from innate sexual but not acquired sexual planarians have the capability to form a sexual individual". *Mol Reprod Dev* 79 (11): pp. 757-66

Orii, H.; Sakurai, T.; Watanabe, K. (2005) "Distribution of the stem cells (neoblasts) in the planarian *Dugesia japonica*". *Dev Genes Evol* 215: pp. 143-157

Osimani, J. (1982). *Parasitología Médica*. Librería Médica Editorial, 1982

Pedersen, K. J. (1959). "Cytological studies on the planarian neoblast". *Zeitschrift fuer Zellforschung* 50: PP. 799-817.

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". *Journal of Applied Biomedicine* 2, pp. 21-35.

Pfister, D.; De Mulder, K.; Philipp, I.; Kuaes, G.; Hroudá, M.; Eichberger, P.; Borgonie, G.; Hartenstein, V.; Ladurner, P. (2007). "The exceptional stem cell system of *Macrostomum lignano*: screening for gene expression and studying cell proliferation by hydroxyurea treatment and irradiation." *Front Zool* 4, 9

Prelich G., M. Kostura, D.R. Marshak, M.B. Mathews, B. Stillman. (1987) "The cell-cycle regulated proliferating cell nuclear antigen is required for SV40 DNA replication in vitro". *Nature* 326: pp. 471/476.

Prelich G., C.-K. Tan, M. Kostura, M.B. Mathews, A.G. So, K.M. Downey, B. Stillman, (1987) "Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-auxiliary protein" *Nature* 326: pp. 517-520

Reddien, P.W., Sanchez Alvarado, A., (2004). "Fundamentals of planarian regeneration". *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, pp. 725-757.

Reuter, M., Kreshchenko, N., (2004). "Flatworm asexual multiplication implicates stem cells and regeneration". *Can J Zool* 82, pp. 334-356.

Reddien, P.W., Bermange, A.L., Murfitt, K.J., Jennings, J.R., Sanchez Alvarado, A., (2005a). "Identification of genes needed for regeneration, stem cell function, and tissue homeostasis by systematic gene perturbation in planaria". *Dev Cell* 8, pp. 635-649.

Reddien, P.W., Sanchez Alvarado, A., (2004). "Fundamentals of planarian regeneration". *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, pp. 725-757.

- Reddien, P.W. (2013) "Specialized progenitors and regeneration". *Development* 140 : pp. 951-957
- Robb, S.M., Ross, E., Sanchez Alvarado, A. (2008). "SmedGD: the Schmidtea mediterranea genome database". *Nucleic Acids Res* 36, pp. D599-606.
- Rink, J. C. (2013). "Stem cell systems and regeneration in planaria". *Dev Genes Evol* 223: pp. 67-84
- Rossi, L., Salvetti, A., Marincola, F.M., Lena, A., Deri, P., Mannini, L., Batistoni, R., Wang, E., Gremigni, V., (2007). "Deciphering the molecular machinery of stem cells: a look at the neoblast gene expression profile". *Genome Biol* 8, R62.
- Rossi, L., Salvetti, A., Batistoni, R., Deri, P., Gremigni, V. (2008). "Planarians, a tale of stem cells" *Cell Mol Life Sci* 65, pp. 16-23.
- Salvetti, A., Rossi, L., Deri, P., Batistoni, R., (2000). "An MCM2-related gene is expressed in proliferating cells of intact and regenerating planarians": *Dev Dyn* 218, pp. 603-614.
- Salvetti, A., Rossi, L., Lena, A., Batistoni, R., Deri, P., Rainaldi, G., Locci, M.T., Evangelista, M., Gremigni, V., (2005). "DjPum, a homologue of *Drosophila* Pumilio, is essential to planarian stem cell maintenance". *Development* 132, pp. 1863-1874.
- Sanchez Alvarado, A., Newmark, P.A., Robb, S.M., Juste, R., (2002). "The Schmidtea mediterranea database as a molecular resource for studying platyhelminthes, stem cells and regeneration". *Development* 129, pp. 5659-5665.
- Sanchez Alvarado, A., Newmark, P.A., (1999). "Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration". *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, pp. 5049-5054.
- Sanchez Alvarado, A. (2003). "The freshwater planarian Schmidtea mediterranea: embryogenesis, stem cells and regeneration." *Curr Opin Genet Dev* 13(4): pp. 438-44.
- Shibata, N., Umesono, Y., Orii, H., Sakurai, T., Watanabe, K., Agata, K., (1999). "Expression of vasa (vas)-related genes in germline cells and totipotent somatic stem cells of planarians". *Dev Biol* 206, pp. 73-87.
- Schurtenberger P., Egelhaaf S. U., Hindges R., Maga G., Jonsson Z. O., May R. P., Glatter O. y Hubscher U (1998) "The solution structure of functionally active human proliferating cell nuclear antigen determined by small-angle neutron scattering". *J. Mol. Biol.* 275, pp. 123-132.
- Stillman B., Annu. (1988). "Initiation of eukaryotic DNA replication in vitro". *Rev. Cell. Biol.* 5. Cold Spring Harbor Laboratory.

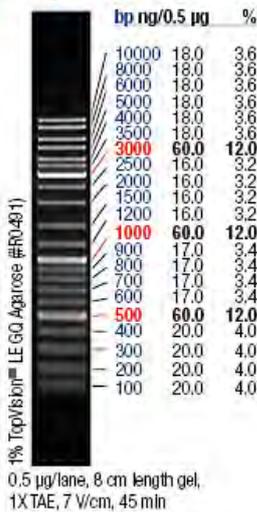
- Sugino A. Yeast (1995) "DNA polymerases and their role at the replication fork". Trends Biochem Sci. Aug;20(8):319-23
- Tan C., .K., Castillo, C., So, A.G., and Downey, K.M. (1986) "An auxiliary protein for DNA polymerase δ from fetal calf thymus". J. Biol. Chem. 261, pp. 12310-12316
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997). "The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 25: pp. 4876-4882.
- Thompson, R.C., Jue Sue, L.P., Buckley, S.J., (1982). "In vitro development of the strobilar stage of *Mesocestoides corti*". Int J Parasitol 12, pp. 303-314.
- Timothy J Mead, Veronique Lefebvre (2014). "Proliferation Assays (BrdU and EdU) on Skeletal Tissue Sections". Methods Mol Biol. 2014; 1130; pp. 233-243
- Toshiki Tsurimoto. (1998) "PCNA, a multifunctional ring on DNA. September Biochimica et Biophysica Acta 1443: pp. 23/39.
- Wagner E. Daniel, Irving E. Wang, Peter W. Reddien , (2011). "Clonogenic Neoblasts Are Pluripotent Adult Stem Cells That Underlie Planarian Regeneration". Science 13 May 2011:Vol. 332 no. 6031 pp. 811-816
- Wang B, Collins JJ 3rd, Newmark PA (2013) "Functional genomic characterization of neoblast-like stem cells in larval *Shistosoma mansoni*". Elife. 2013 Jul 30;2:e00768.
- Webster, J.D. Webster, (1949) "Fragmentary studies on the life history of previous term *Mesocestoides* next term *latus*", Journal of Parasitology 35 (1949), pp. 83-90.
- Wenemoser y Reddien, (2010). Planarian regeneration involves distinct stem cell responses to wounds and tissue absence. Dev Biol. 2010 Aug 15;344(2): pp. 979-91
- Wikgren, B.-J., Gustafsson, M., Knuts, G., (1971). "Primary Anlage Formation in Diphyllbothriid Tapeworms". Z Parasitenkd 36, pp. 131-139.
- Wikgren, B.-J., Gustafsson, M.K.S. (1971). "Cell proliferation and histogenesis in diphyllbothriid tapeworms (Cestoda)". Acta Acad Abo Ser B 31, 1-10.
- Wilson, R. A.&T. Draskau (1976). "The stimulation of daughter redia production during the larval development of *Fasciola hepatica*." Parasitology 72 (3): pp.245-57.
- Zayas, R.M., Hernandez, A., Habermann, B., Wang, Y., Stry, J.M., Newmark, P.A., (2005). "The planarian *Schmidtea mediterranea* as a model for epigenetic germ cell specification: analysis of ESTs from the hermaphroditic strain". Proc Natl Acad Sci U S A 102, pp. 18491-18496.

Z. Kelman, (1997) "PCNA: structure, functions and interactions", *Oncogene* 14 (6) pp. 629-640.

Z.O. Jonsson, U. Hubscher (1997) "Proliferating cell nuclear antigen: More than a clamp for DNA polymerases" *EMBO J.* Apr 15; 17(8): pp. 2412-2425

Apéndice I

GeneRuler™ DNA Ladder Mix
O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix,
ready-to-use



GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder
O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder,
ready-to-use

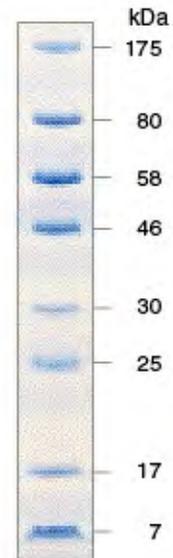
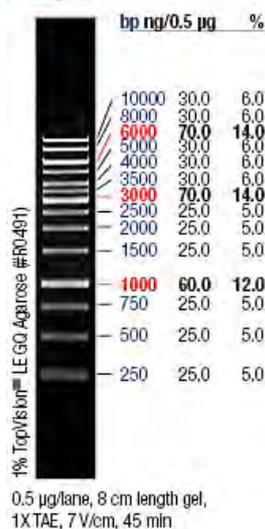
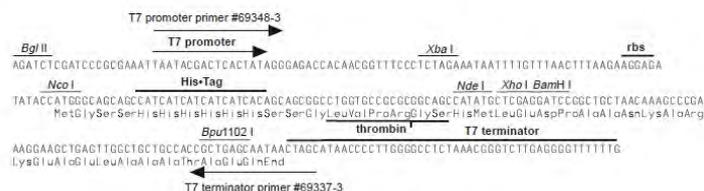
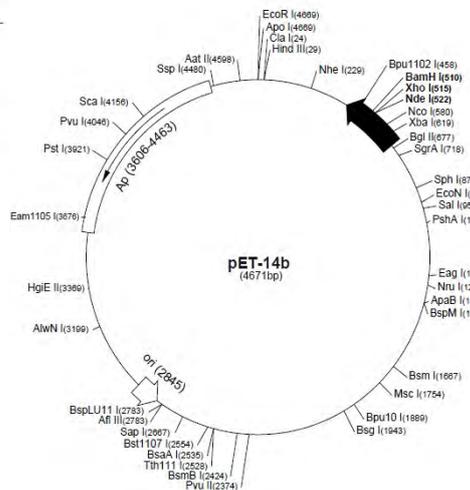


Figura 1 Apéndice Materiales y Metodos - Marcadores de peso molecular

pET-14b sequence landmarks

T7 promoter	646-662
T7 transcription start	645
His-Tag coding sequence	554-571
Multiple cloning sites (<i>Nde</i> I- <i>Bam</i> HI)	510-526
T7 terminator	404-450
pBR322 origin	2845
<i>bla</i> coding sequence	3606-4463



pET-14b cloning/expression region

Figura 2 Apéndice 1 Materiales y Metodos. Mapa restricción vector pET 14b

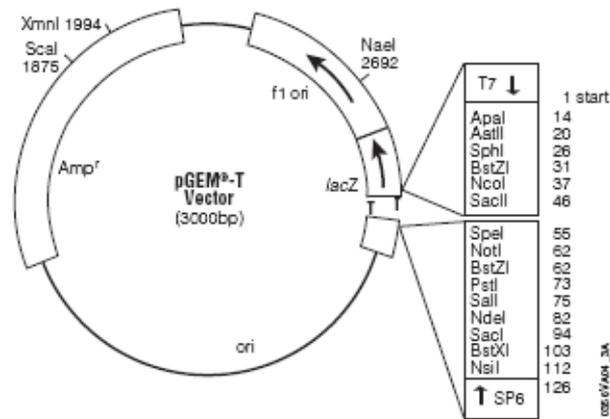


Figura 3 Apéndice 1 Materiales y Métodos - Mapa de restricción del vector pET 14b - Mapa de restricción del vector pGEM T

Soluciones Cultivo de Mesocestoides corti

1. Hanks: 9.8g/l sales de Hanks (Sigma - Aldrich, catálogo número H6136, Lote 087K83012), 350mg/l NaHCO₃ (Fluka). Se ajustó el pH a 7.5 y se esterilizó por filtración.
2. Medio RPMI 1640 modificado: 10.4g/l RPMI (Sigma - Aldrich, catálogo número R4130, Lote 049K8307), 4.2g/l NaHCO₃ (Fluka), 4.3g/l Glucosa (Sigma - Aldrich), 4.8g/l extracto de levadura (Sigma - Aldrich). Se ajustó el pH a 7.5, se agregó gentamicina 50µg/ml concentración final y se esterilizó por filtración.

Extracción de ARN y proteínas

- a. PBS (Buffer Fosfato salino): 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄. Se ajustó el pH a 7.4 y se esterilizó por autoclavado. En el caso de utilizarlo para extracción de ARN se utilizó PBS en tabletas (Sigma - Aldrich, catálogo número P4417) disueltas en agua DEPC (Sigma - Aldrich).
- b. Buffer de Lisis: 50mM Tris - HCl pH 8; 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 1mM PMSF (Sigma - Aldrich).

Preparación de material para estudios histológicos

Hibridación in toto de ARN

- a. PBSTx: PBS – 0.5% Triton-X100 b. Solución reductora: 50mM DTT, 1% NP-40, 0.5% SDS en PBS

Electroforesis

Ácidos nucleicos

- a. Buffer TAE 1X: 40mM Tris base, 20mM ácido acético, 1mM EDTA; pH 8.4.
b. Buffer de carga 6X: 0.25% Azul de bromofenol, 0.25% Azul de xilencianol, 30% Glicerol

Proteínas (agregar buffer's acrilamida, bis)

- a. Buffer de carga 4X: 0.25M Tris – HCl pH 6.8, 40% Glicerol, 4% SDS, 4% 2-Mercaptoetanol, 0.02% Azul de bromofenol
b. Tinción con Coomassie Blue b.1. Solución de Coomassie Blue: 0.2% Coomassie Blue R-250, 30% Etanol, 7% Ácido acético b.2. Solución decolorante: 30% Etanol, 7% Ácido acético
c. Tinción con nitrato de plata c.1. Solución fijadora: 40% Etanol, 10% ácido acético

Expresión de la proteína recombinante EgPCNA_r en Escherichia coli

- a. Medio LB (Luria – Bertani): 1% Triptona, 0.5% Extracto de Levadura, 1% NaCl, pH 7.0
b. Buffer Extracción Periplasma: 0.5M Sacarosa, 20mM Tris – HCl, pH8, 0.25mg/ml lisozima, 0.1M EDTA, 1mM PMSF.
c. Buffer de lisis: 50mM Tris – HCl, pH 7.5, 5% Glicerol, 50mM NaCl
d. Buffer desnaturalizante: 40mM Tris–HCl, pH7.5, 8M Urea

Cuantificación de sondas marcadas con Digoxigenina

- a. Buffer 1: 100mM Tris – HCl pH 7.5, 150mM NaCl.
b. Buffer 2: 0.5% w/v agente de bloqueo (Boehringer) en buffer 1

c. Buffer 3: 100mM Tris – HCl pH 9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂.

d. Buffer derevelado: 330µg/ml NBT (Amresco), 167µg/ml BCIP (Amresco) en Buffer 3

Hibridación in situ sobre criocortes.

a. PBS: 8g/l NaCl, 0.2g/l KCl, 1.44g/l Na₂HPO₄, 0.24g/l KH₂PO₄. Se ajusta el pH a 7.4 y se esteriliza por autoclavado

b. PBSTx: PBS–0.5% Triton-X100

c. SSC 20X: 3M NaCl, 0.3M citrato de sodio

d. Denhart 50X: 1% Ficoll 400, 1% polyvinilpyrolidona, 1% BSA

e. Solución de prehibridación: SSC 5X, 50% formamida desionizada, 10% sulfato de dextrano, 1mg/ml ARNt de levadura, 1X Denhardt

f. Solución 1: SSC 1X, 50% formamida, 0,1% Tween-20

g. Solución 2: SSC 1X - 50% formamida.

h. MAB: 100mM ácido maleico, 150mM NaCl

i. Solución de bloqueo: 0.5% reactivo de bloqueo (Boehringer), 1% BSA y 5% suero de oveja (Sigma-Aldrich) en buffer MAB

j. MABT: MAB – 0.1% Tween-20

k. Buffer AP: 100mM Tris – HCl pH 9.5, 25mM MgCl₂, 150mM NaCl

l. Reactivo NBT//BCIP: Ready to use tablets (Roche) disueltas en agua o 330µg/ml NBT (Amresco), 167µg/ml BCIP (Amresco)) en Buffer AP

m. PBSTw: PBS – 0.1% Tween-20

Hibridación in toto sobre organismos enteros

a. Solución reductora: 50mM DTT, 1% NP-40, 0.5% SDS en PBS

b. PBSTx: PBS–0.5% Triton-X100

- c. Proteínasa K: 2µg/ml (New England Biolabs) en PBSTx con 0.1% SDS
- d. Solución de prehibridación: 50% Formamida, 5XSCC, 1mg/ml tRNA, 1% Tween-20
- e. Solución de hibridación: 1ng/µl de sonda desnaturalizada en buffer de prehibridación complementado con 5% de sulfato de dextrano.
- f. Solución de lavado 1: Una parte de Solución de prehibridación con una parte de 2X SCC, 0.1% TritonX-100.
- g. Solución de lavado 2: 2X SCC, 0.1% TritonX-100
- h. Solución de lavado 3: 0.2XSCC, 0.1% TritonX-100
- i. MABT: 1X MAB, 0.1% Tween-20
- j. Solución de bloqueo: 5% Suero de caballo en MABT
- k. Buffer AP: 100mM Tris – HCl pH 9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂.
- l. Reactivo NBT//BCIP: Ready to use tablets (Roche) disueltas en agua o 330µg/ml NBT (Amresco), 167µg/ml BCIP (Amresco) en Buffer AP

Inmunohistoquímica sobre criocortes

- a. Solución de bloqueo: 1% BSA, 5% suero de oveja (Sigma – Aldrich), 0.05% Tween-20 en PBS

Inmunohistoquímica sobre organismos enteros.

- a. PBSTx: 0,1% Triton X-100 en PBS
- b. PBSTw: 0,05% Tween-20 PBS.
- c. Solución de bloqueo: 1% seroalbúmina bovina (BSA) y 5% suero de oveja (Sigma- Aldrich, número de catálogo S-3772) en PBSTw

Purificación (elución proteína recombinante)

- a. Solución A: 6M urea, 0.5M NaCl, 10% glicerol, 50mM Tris – HCl (pH 9.6)
- b. Solución B: 1M urea, 0.5M NaCl, 10% glicerol, 2.5mM glutatión reducido, 0.5mM

glutati3n oxidado, 50mM Tris - HCl (pH 9.0)

c. Buffers de eluci3n: 50mM Tris - HCl pH 9.6, 0.15mM NaCl, 250mM Imidazol, 0.01% Triton X100. g.2. 50mM Tris - HCl pH 9.6, 0.15mM NaCl, 250mM Imidazol. g.3. 50mM Tris - HCl pH 9.6, 0.15mM NaCl, 250mM Imidazol, 8M Urea g.4. 50mM Tris - HCl pH 9.6, 0.15mM NaCl, 250mM Imidazol, 1M Urea.