



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**  
UDELAR | [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

# Marcado del tegumento y determinación del patrón de expresión espacial de *SLC5* y *CntA* en el cestodo modelo *Hymenolepis microstoma*

Inés Guarnaschelli

Tutor: Uriel Koziol

Co-Tutora: Jimena Montagne

Sección Biología Celular

Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Febrero, 2020



**Marcado del tegumento y determinación del patrón de  
expresión espacial de *SLC5* y *CntA* en el cestodo modelo  
*Hymenolepis microstoma***



URIEL KOZIOL

# Índice

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Introducción</b> .....	2
Los cestodos.....	2
<i>Hymenolepis microstoma</i> como modelo de parásitos cestodos.....	3
El tegumento de los cestodos.....	5
Absorción de glucosa en cestodos.....	6
Absorción de nucleósidos en cestodos.....	9
<b>Metodología</b> .....	12
Preparación del Dextrano.....	12
Marcado del tegumento de <i>H. microstoma</i> con dextrano conjugado, con distintos tiempos de cultivo post-marcado.....	12
Clonado de <i>CntA</i> y <i>SLC5</i> .....	13
<i>Retrotranscripción</i> .....	13
<i>Amplificación de las secuencias codificantes de CntA y SLC5 por PCR</i> .....	13
<i>Ligación</i> .....	15
<i>Transformación</i> .....	16
<i>Cribado de colonias recombinantes mediante PCR</i> .....	16
<i>Minipreps</i> .....	17
Electroforesis.....	18
Preparación de moldes para la síntesis de sondas de ARN.....	18
Transcripción <i>in vitro</i> y purificación de las sondas.....	19
Cuantificación de las sondas por <i>Dot Blot</i> .....	20
Hibridación <i>in situ</i> Fluorescente en especímenes enteros ( <i>Whole Mount in situ hybridization, (WMISH)</i> ).....	20
Microscopía confocal.....	21
Análisis y procesamiento de imágenes.....	21
<b>Resultados y discusión</b> .....	22
1) Clonado de las regiones codificantes de <i>CntA</i> y <i>SLC5</i> y síntesis de sondas de ARN marcadas.....	22

1.1) Amplificación de las regiones codificantes de <i>CntA</i> y <i>SLC5</i> mediante RT-PCR.....	22
1.2) Transformación y verificación de la presencia y sentido de los insertos.....	22
1.3) Secuenciación y análisis de las secuencias.....	23
1.4) Síntesis de sondas de ARN marcadas con digoxigenina.....	24
2) Marcado del tegumento con dextrano conjugado a Rodamina.....	26
2.1) Entre un 40 y un 60% de las células “subtegumentarias” están conectadas al sincitio.....	26
3) Análisis de la expresión de <i>CntA</i> y <i>SLC5</i> mediante WMISH.....	29
3.1) La sonda <i>sense</i> de <i>SLC5</i> utilizada como control negativo hibridiza en testículos.....	29
3.2) <i>CntA</i> se expresa superficialmente en cuello y estróbilo de <i>H. microstoma</i> .....	30
3.3) Co-localización de las marcas fluorescentes de dextrano y <i>CntA</i> .....	33
3.4) <i>SLC5</i> se expresa superficialmente en todo el cuerpo de <i>H. microstoma</i> ....	35
3.5) Co-localización de las marcas fluorescentes de dextrano y <i>SLC5</i> .....	40
<b>Conclusiones finales</b> .....	43
<b>Agradecimientos</b> .....	46
<b>Referencias</b> .....	47

## RESUMEN

Los cestodos son platelmintos parásitos que causan numerosas zoonosis de importancia a nivel regional y mundial, especialmente en países en vías de desarrollo, siendo la infección por *Echinococcus granulosus* la de mayor relevancia a nivel nacional, afectando a humanos y provocando pérdidas económicas importantes en el sector ganadero. A nivel mundial, las echinococosis y cisticercosis, causadas por las larvas de *Echinococcus spp.* y *Taenia solium*, se encuentran entre las enfermedades tropicales desatendidas de mayor prevalencia y severidad. Los cestodos pertenecen al grupo monofilético Neodermata, compuesto por las clases Cestoda, Trematoda y Monogenea (todas de forma de vida parásita), y caracterizado por la presencia de un tegumento sincitial, que consta de un tegumento distal (una “banda” de citoplasma que recubre todo el cuerpo del animal) y los cuerpos celulares (citones) que contienen los núcleos y están conectados al tegumento distal por finos puentes citoplasmáticos. El tegumento cumple funciones esenciales para el modo de vida de estos animales, dado que no sólo los protege contra la respuesta inmune del hospedador, sino que también es la superficie a través de la cual incorporan los nutrientes que toman del hospedador. Datos transcriptómicos sugieren la presencia de un transportador de glucosa (*SLC5*) y de un transportador de nucleósidos (*CntA*) en el tegumento de diversos cestodos, incluyendo en el cestodo modelo *Hymenolepis microstoma*. A través de técnicas de marcado del tegumento, clonado de genes e hibridación *in situ*, en este trabajo nos propusimos determinar los patrones de expresión de los genes *SLC5* y *CntA* en adultos de *H. microstoma*, de forma de confirmar su expresión tegumentaria. Logramos poner a punto la técnica de marcado del tegumento con dextrano, reconociendo el tegumento distal, los citones y los puentes citoplasmáticos conectando ambos. Demostramos que *SLC5* y *CntA* se expresan en células tegumentarias, con patrones de expresión marcadamente diferentes entre sí. *SLC5* se expresa en todo el tegumento, mientras que *CntA* se expresa en el tegumento de cuello y estróbilo. La investigación sobre el tegumento como tejido clave para el anclaje, protección y nutrición de los parásitos es evidentemente relevante respecto a la salud humana y animal. Los resultados de este trabajo pueden contribuir a la identificación de los transportadores tegumentarios de nucleósidos y de glucosa en estos parásitos, los cuales podrían ser blancos interesantes para la búsqueda de nuevos y mejores tratamientos contra las infecciones por cestodos.

## INTRODUCCIÓN

### Los cestodos

Los Platelminfos son un filo de gusanos planos acelomados, que comprende grupos con formas de vida libre y parásitos. La mayoría de las especies descritas en este filo pertenecen al grupo monofilético de parásitos obligados Neodermata, que abarca las clases taxonómicas Cestoda, Trematoda y Monogenea (Baguña y Riutort, 2004). Entre las adaptaciones más notables de los cestodos al parasitismo se encuentran la falta total de aparato digestivo, ciclos de vida complejos que involucran a más de un hospedador y estadios especializados en la infección de cada uno de ellos, la presencia en su cuerpo de estructuras especializadas para el anclaje, como las ventosas del escólex, y un estróbilo (en el adulto) formado por una serie de segmentos repetidos, cada uno con aparatos reproductores completos (la mayoría de los cestodos adultos son hermafroditas) (Koziol, 2017).

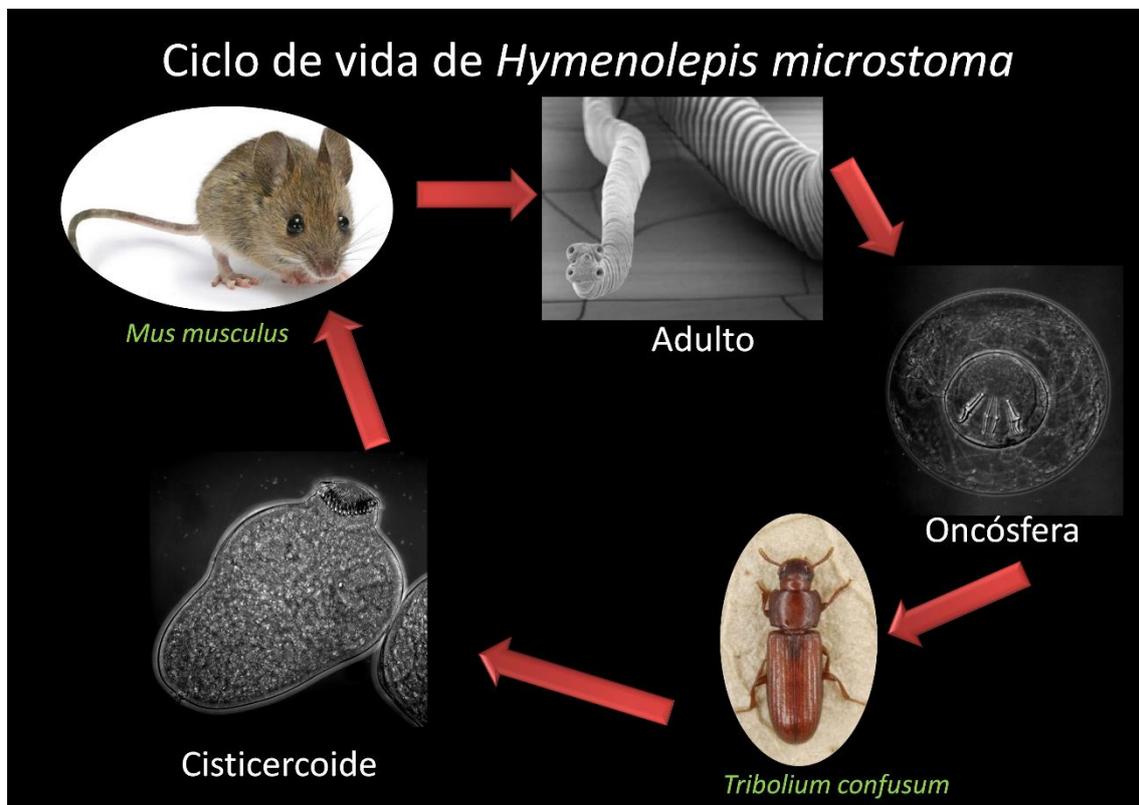
Los nuevos segmentos del estróbilo se generan en la región del cuello, inmediatamente posterior al escólex. Los segmentos no tienen límites internos, y cada uno cuenta con estructuras repetitivas de los principales sistemas del cuerpo, como el sistema nervioso, el sistema excretor, y los aparatos reproductores (Koziol, 2017).

Los cestodos causan numerosas zoonosis de importancia a nivel regional y mundial (Hotez et al, 2008; Budke et al, 2006), especialmente en países en vías de desarrollo. A nivel mundial, las echinococosis y cisticercosis, causadas por las larvas de los cestodos *Echinococcus spp.* y *Taenia solium*, se encuentran entre las enfermedades tropicales desatendidas de mayor prevalencia y severidad ([https://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/)). A nivel nacional, *Echinococcus granulosus*, el agente causal de la hidatidosis, es el cestodo de mayor relevancia, afectando a humanos y provocando pérdidas económicas importantes en el sector ganadero (Torgerson et al, 2000). El perro y otros cánidos son su hospedador definitivo, albergando el parásito adulto en el intestino delgado. Animales ungulados, como ovejas, vacas, cerdos y caballos, son hospedadores intermediarios, que se infectan por ingesta de huevos liberados al ambiente desde el hospedador definitivo. En el hospedador intermediario, la larva de *E. granulosus* puede alojarse en diversos órganos, como hígado, cerebro y pulmones. El hospedador definitivo se infecta por ingesta de órganos del hospedador intermediario infectado. El ser humano es un hospedador aberrante de este cestodo, que puede infectarse al ingerir huevos accidentalmente, por ejemplo, por tomar contacto con tierra contaminada o directamente con las heces del hospedador definitivo (Eckert y Deplazes, 2004). Es por esto que los niños son especialmente susceptibles a la infección por este parásito.

El riesgo que conllevan para el ser humano, y las características de algunos de sus hospedadores, dificultan la investigación sobre las especies de *Echinococcus*. Afortunadamente, se han desarrollado algunas especies de cestodos como organismos modelo, cuyos ciclos de vida se han podido establecer en condiciones de laboratorio.

*Hymenolepis microstoma* como modelo de parásitos cestodos.

*Hymenolepis microstoma* es un cestodo que infecta escarabajos y ratones, y que no reviste peligro para el humano. El ciclo de vida típico de los cestodos implica tres estadios distintos (Koziol, 2017) (Fig. 1). Los adultos de *H. microstoma*, a diferencia de otros hymenolepídeos que viven en el intestino de sus hospederos, se localizan en las vías biliares del ratón (Cunningham y Olson, 2010). Desde allí, los huevos conteniendo oncósferas (primera forma larvaria), son liberados al duodeno, y arrastrados por las heces hacia el ambiente, donde pueden ser ingeridos por un hospedador intermediario apropiado, por ejemplo, escarabajos de las especies *Tribolium confusum* y *Tenebrio molitor* (Cunningham y Olson, 2010). Las cubiertas de los huevos se rompen por acción mecánica del aparato bucal del escarabajo, y la oncósfera es liberada en el tracto digestivo del insecto. Esta larva es un organismo reducido, de menos de 40 células, algunas de ellas células madre indiferenciadas, equipado con tres pares de ganchos y especializado en la infección del hospedador intermediario (Koziol, 2017; Smyth y McManus, 1989). Una vez en el intestino del escarabajo, secreciones proteolíticas de la glándula de penetración y el movimiento periódico de sus tres pares de ganchos, permiten a la oncósfera atravesar la pared del tubo digestivo del escarabajo y llegar al hemocele, donde sufre una metamorfosis extrema que implica la formación *de novo* de los tejidos del segundo estadio larvario: el cisticercoide (Vogue, 1964; Koziol, 2017), a partir de las células madre, en cestodos llamadas células germinativas, presentes en la oncósfera. Este proceso de



**Fig. 1.** Ciclo de vida de *Hymenolepis microstoma*. Los adultos se encuentran en las vías biliares de ratones (hospedadores definitivos), desde donde liberan huevos con oncósferas infectivas, que son liberados al ambiente arrastrados por las heces. Los huevos son ingeridos por escarabajos (hospedadores intermediarios), como *T. confusum*. Allí sufren una metamorfosis que da lugar al segundo estadio larvario del ciclo, el cisticercoide. Los ratones se infectan por ingesta de escarabajos infectados. Imagen amablemente cedida por Matías Preza.

reabsorción de tejidos, y formación del cisticercoide (que, muy a grandes rasgos, consiste en un escólex invaginado en una vesícula), lleva aproximadamente 7 días, y los cisticercoides permanecen infectivos en el hemocele durante 8-9 meses. Los escarabajos infectados son ingeridos por el hospedador definitivo: el ratón, donde la pepsina y el ácido clorhídrico del estómago disuelven las envolturas del cisticercoide, mientras que la tripsina y sales biliares lo activan (Cunningham y Olson, 2010; Koziol, 2017). El escólex evaginado, libre en el tracto digestivo, se establece en los ductos biliares, donde comienza la estrobilación. El estróbilo del adulto no se genera por un proceso de metamorfosis extrema como ocurre en la transición oncósfera-cisticercoide, sino que se mantiene el escólex del cisticercoide y los tejidos posteriores del adulto son generados por expansión y modificación de los presentes en el cisticercoide (Koziol, 2017).

En aproximadamente 14 días, ya se habrán generado segmentos grávidos, y parte del estróbilo comenzará a protruir hacia el duodeno (de Rycke, 1966). Así, el ciclo puede completarse en aproximadamente 3 semanas. La infección del ratón por *H. microstoma* puede persistir por 6 meses (Cunningham y Olson, 2010).

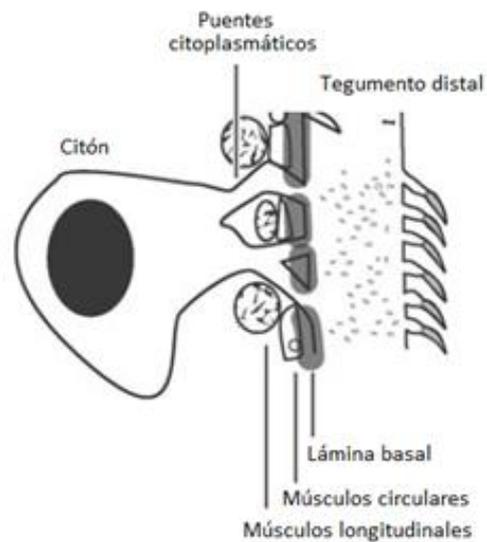
En relación a su uso en laboratorio como modelo de parásito cestodo, *H. microstoma* es una de las tres especies de *Hymenolepis* que han sido estudiadas tradicionalmente. *H. diminuta* infecta roedores y, ocasionalmente, humanos (Burt, 1980), al igual que *H. nana*, de mayor prevalencia a nivel mundial, aunque este último también puede tener un ciclo de vida directo, sin necesidad de un hospedador intermediario, en que el hospedador definitivo puede infectarse o autoinfectarse a partir de oncósferas liberadas en el intestino o al medio ambiente (Fan, 2005).

*H. microstoma* presenta ciertas ventajas con respecto a los otros dos modelos alternativos. En relación a *H. diminuta*, es más pequeño, lo que reduce los costos de los experimentos sobre adultos y del mantenimiento de su ciclo. Por otra parte, *H. nana* es un patógeno humano, y, además de este peligro, su mantenimiento en laboratorio conlleva el riesgo de infectar otros animales por contaminación fecal, a través de su ciclo de vida directo. Mientras que *H. nana* sobrevive semanas en el roedor hospedador, *H. microstoma*, como ya se ha mencionado, puede permanecer 6 meses, requiriendo un menor número de pasajes (Cunningham y Olson, 2010).

En nuestro país se ha establecido el mantenimiento en laboratorio de todo el ciclo de vida de *H. microstoma*. Brevemente, los adultos son mantenidos en colaboración con Jenny Saldaña del Laboratorio de Experimentación Animal, Facultad de Química, (UdelaR), que cuenta con la aprobación del protocolo por parte de la CHEA, por cultivo *in vivo* en ratones, que son sacrificados periódicamente para extraer los parásitos de sus vías biliares. En Facultad de Ciencias (UdelaR), extraemos los huevos con oncósferas maduras de la parte posterior de los adultos y los utilizamos para infectar escarabajos de la especie *Tribolium confusum*. Los escarabajos son sacrificados para extraer las larvas cisticercoides que son administradas oralmente a los ratones.

## El tegumento de los cestodos

Los platelmintos son animales con una pared corporal blanda, formada, a grandes rasgos, por un epitelio que recubre un entramado de fibras musculares. En platelmintos de vida libre (clase Turbellaria), el epitelio consiste en una epidermis celular ciliada, mientras en el grupo monofilético Neodermata, la epidermis tiene características particulares: se trata de una epidermis sincitial no ciliada, llamada tegumento, que consiste en una “banda” continua de citoplasma superficial, el tegumento distal, cuyos núcleos se encuentran en los cuerpos celulares o citones, que se hallan sumergidos por debajo de la capa



**Fig 2. Esquema de la estructura del tegumento de cestodos.** Tomado y modificado de Littlewood, 2006.

muscular adyacente al tegumento, y conectan con el sincitio a través de finos puentes citoplasmáticos que atraviesan la musculatura y la lámina basal (Lumsden y Specian, 1980) (Fig. 2). Se cree que es en los citones donde ocurre la transcripción y la síntesis de proteínas, que luego son transportadas al tegumento distal a través de los puentes citoplasmáticos (Wendt et al., 2018). Ehlers (1985) llamó “neodermis” a esta epidermis modificada porque se forma durante la metamorfosis de la larva (de allí se origina la denominación “Neodermata” para este grupo de parásitos).

El tegumento es rápidamente remodelado a nivel celular y molecular durante la transición entre los hospedadores intermediario y definitivo (Tyler and Hooge, 2004), lo que sugiere un rol importante de este tejido en el establecimiento de ciclos de vida complejos con múltiples hospedadores. Dada su ausencia en organismos de vida libre (Tyler y Hooge, 2004), se cree que el tegumento fue una innovación evolutiva crítica que permitió la evolución del parasitismo en los platelmintos. (Tyler y Tyler, 1997; Tyler y Hooge, 2004). En este sentido, el lugar que habitan estos parásitos presenta una serie de desafíos a la fisiología del tegumento. Se desconocen los mecanismos que impiden la degradación de las proteínas y glicoproteínas de la superficie del parásito en ambientes como el intestino o las vías biliares, con abundante presencia de enzimas proteolíticas, pero se sabe que *H. diminuta* es capaz de inhibir la actividad proteolítica de enzimas digestivas como la tripsina y la quimotripsina, y que dicha inactivación ocurre sin secreción aparente de un inhibidor por parte del parásito al medio (Schroeder, 1981). El tegumento también cumple funciones de protección frente a la respuesta inmune del hospedador, por ejemplo, inmunoglobulinas del organismo infectado son absorbidas por la superficie del parásito, lo que se cree puede obstaculizar la respuesta inmune del hospedador (Smyth y McManus, 1989). Además, el tegumento también contribuye al anclaje del parásito, y es la superficie a través de la cual se produce la captación de nutrientes (Halton, 1997).

Las superficies de absorción, ya sea el tegumento de cestodos o la mucosa intestinal de mamíferos, tienen algunas propiedades morfológicas particulares, siendo la más notable la amplificación del área de absorción. En el intestino de mamíferos, esto se logra por la presencia de microvellosidades en los enterocitos, mientras que los cestodos cuentan con extensiones citoplasmáticas en la superficie del tegumento, llamadas microtricos. Se trata de estructuras digitiformes con un extremo cónico electron-denso por microscopía electrónica, similares a microvellosidades, con filamentos de actina en su eje longitudinal (Lumsden y Specian, 1980; Smyth y McManus, 1989).

Los cestodos carecen de aparato digestivo a lo largo de todo su ciclo de vida, por lo tanto, la absorción de nutrientes debe ocurrir a través de la superficie corporal, y es lógico encontrar similitudes entre la organización del tegumento y el epitelio intestinal de sus hospedadores mamíferos. De hecho, Smyth y McManus (1989) comparan la estructura básica de los cestodos con un intestino dado vuelta, con la superficie de absorción, el tegumento, cubriendo todo el cuerpo del animal. Se sabe que el tegumento cuenta con sistemas específicos de transporte de moléculas e iones (como aminoácidos, hexosas, vitaminas, purinas, pirimidinas, nucleósidos y lípidos), y, por tratarse de un sincitio, no existe la vía de transporte paracelular a través del tejido, por lo que las moléculas deben ser transportadas por vías transcelulares (Brehm y Koziol, 2017). La captación de moléculas esenciales del metabolismo como los nucleósidos y la glucosa depende exclusivamente de la capacidad de absorción del tegumento (Podesta, 1980).

#### Absorción de glucosa en cestodos

Los cestodos utilizan carbohidratos como fuente principal de energía. De hecho, los carbohidratos deben estar presentes en la dieta del hospedador para el correcto establecimiento de estos parásitos, así como para su desarrollo y reproducción normales (Smyth y McManus, 1989).

Varios trabajos de las últimas décadas del siglo pasado sobre la captación de glucosa en cestodos indican la presencia, en cisticercoides intactos (no activados) y activados, y adultos, de al menos dos sistemas de absorción de glucosa: transporte activo dependiente de sodio y difusión facilitada independiente de sodio (von Brand y Gibbs, 1966; Pappas et al, 1973; Arme et al, 1973; Pappas et al, 1974; Pappas y Freeman, 1975; Uglem y Love, 1977; Rosen y Uglem, 1988). Muy brevemente, las metodologías utilizadas, a grandes rasgos, consistían en cultivar larvas intactas y activadas, y adultos en medios con glucosa marcada radiactivamente, en presencia o ausencia de sodio por una parte, y de inhibidores por otra. La florizina es un inhibidor competitivo de la absorción activa de glucosa, mientras que la floretina inhibe la absorción por difusión. Se realizaban extracciones con etanol de los animales cultivados, y se medía la radiactividad en las distintas fracciones.

La observación más notoria fue la inhibición del transporte activo de glucosa en adultos en medios sin sodio. Por esto, se concluyó que dicho transporte debe estar acoplado a la entrada de sodio a favor del gradiente electroquímico existente a través de la membrana externa del parásito, que aporta la energía necesaria para transportar glucosa en contra de su gradiente electroquímico.

Por otro lado, cisticercoides intactos de *H. diminuta* son insensibles a la falta de sodio en el medio y a la florizina (Rosen y Uglem, 1988), pero ven afectada su capacidad de captación de glucosa en presencia de floretina, indicando que la absorción de glucosa en larvas inactivas se da predominantemente por difusión facilitada. En cambio, luego de la activación, cuando la pared de la larva intacta es removida, la sensibilidad a la floretina desaparece, por lo que se especula que los transportadores responsables de la difusión se encuentran en la pared externa del cisticercoide inactivo (Rosen y Uglem, 1988). Las larvas activadas, a su vez, se vuelven sensibles a la falta de sodio en el medio y a la florizina, por lo que el sistema de transporte activo dependiente de sodio estaría presente en la membrana del escólex, que se evagina durante la activación. Estos dos sistemas, dependiente e independiente de sodio, fueron descritos también en larvas cisticercoides de *Taenia crassiceps* por Pappas et al (1973), así como también la inhibición por florizina.

En un trabajo posterior, Rosen et al (1994) describieron los cambios temporales en el transporte de glucosa en escólices de larvas cisticercoides activadas de *H. diminuta*. Utilizando una metodología similar a la recién mencionada, midieron la captación de glucosa por larvas a distintos tiempos post-activación, y encontraron que luego de 8 horas de activación, la capacidad de absorción de glucosa aumenta de manera muy notoria. La captación por difusión facilitada aumenta dos veces, de manera gradual, mientras que el transporte activo aumenta unas nueve veces, con dos incrementos abruptos, uno entre 15 y 75 minutos post-activación, y otro entre 4 y 6 horas post-activación.

Pappas y Freeman (1975), realizaron este tipo de experimentos sobre *H. microstoma* adultos, llegando a las mismas conclusiones sobre el transporte de glucosa, a saber, que dicho transporte es mediado, saturable e inhibido por florizina y floretina de manera similar a lo reportado para otras especies de cestodos, y que los parásitos acumulan glucosa en contra de su gradiente de concentración, por lo que debe existir un mecanismo de transporte activo, al igual que en *H. diminuta* y *T. crassiceps*.

En animales y bacterias, el transporte activo de glucosa acoplado a la entrada de sodio, es realizado por cotransportadores que pertenecen a la familia génica SLC5 (*solute carrier 5*).

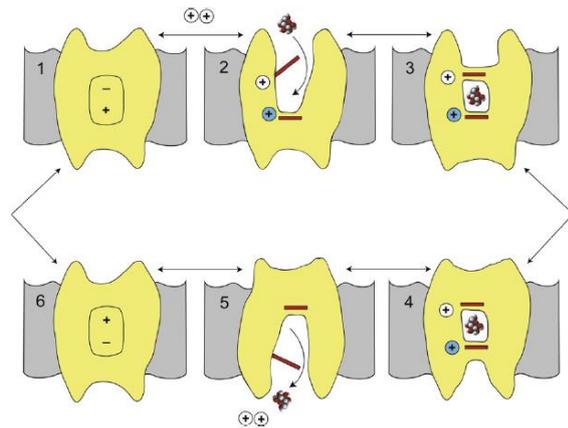
Esta familia cuenta con 12 genes en humanos. A los efectos de este trabajo, mencionaremos únicamente dos de estos transportadores. SGLT1, codificado por *SLC5A1*, es un cotransportador sodio/glucosa localizado en la membrana apical de enterocitos maduros, en el intestino delgado, donde absorbe glucosa y galactosa desde el lumen (Wright, 2013) (Fig. 3).

SGLT2, codificado por *SLC5A2*, es un cotransportador sodio/glucosa localizado en riñón, donde se encarga de la reabsorción de glucosa (en roedores, se encuentra en la membrana apical de las células del túbulo proximal) (Wright, 2013).

Teniendo en cuenta la conservación evolutiva observada en la familia *SLC5*, la identificación de estos cotransportadores sodio/glucosa en animales y en bacterias, y los antecedentes de estudios sobre el transporte de glucosa en cestodos, que indican una similitud con el sistema de transporte activo en células de mamífero (Pappas et al, 1973; Uglem y Love, 1977) y que implican la presencia de un sistema

de transporte mediado dependiente de sodio y sensible a florizina, es fácil especular sobre la posible presencia de al menos un miembro de la familia *SLC5* en cestodos.

Efectivamente, se encuentran secuencias ortólogas a *SLC5* en bases de datos transcriptómicas y proteómicas de cestodos. En *Hymenolepis microstoma* existen dos ortólogos, que se expresan en mayor medida en el adulto que en cisticercoides, lo que es coherente con lo reportado sobre las características del transporte de glucosa en larvas (intactas y activadas), y adultos, sugiriendo la presencia de al menos un transportador activo en la superficie de estos parásitos con actividad diferencial en estos estadios. Además, nuestros análisis de datos de RNA-Seq de *E. multilocularis* (Tsai et al, 2013), indican que el patrón de expresión temporal del ortólogo *SLC5* en dicha especie coincide con el patrón de genes tegumentarios conocidos, lo que sugiere que este gen sería también de expresión tegumentaria.



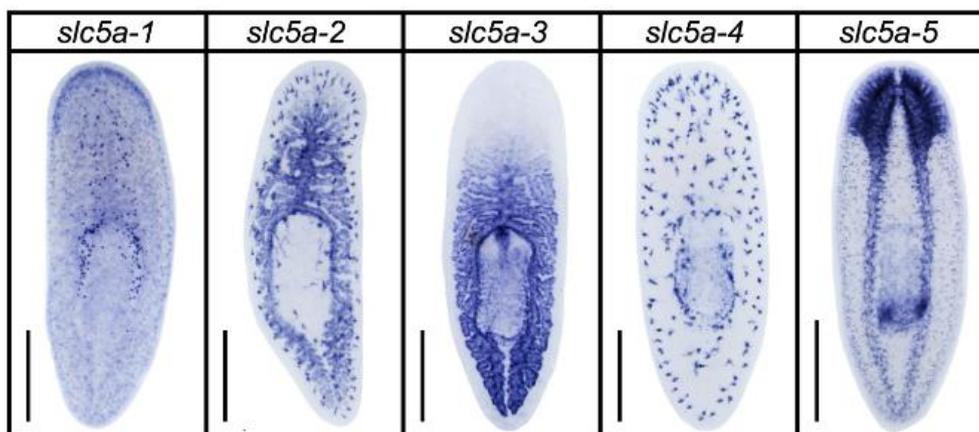
**Fig 3. Mecanismo de transporte por cotransportadores de la familia *SLC5*.** El sustrato se une al transportador de un lado de la membrana y luego de un cambio conformacional, es liberado al otro lado. En condiciones normales, la concentración extracelular de sodio es alta y la intracelular es baja. Dos iones sodio extracelulares se unen al cotransportador, lo que produce la apertura de la compuerta externa de la proteína, y la unión al sustrato. La compuerta externa se cierra, separando el sustrato de la fase acuosa. Se abre la compuerta interna, permitiendo la liberación del sustrato y el sodio al medio intracelular. Tomado y modificado de Wright, 2013.

Por otra parte, el sistema excretor de los platelmintos está formado por protonefridios, órganos ramificados distribuidos por todo el cuerpo del animal. Consisten en células flamígeras conectadas a largos túbulos que desembocan en uno o más poros excretores. (Issigonis y Newmark, 2015). Thi-Kim Vu et al (2015), investigando las capacidades de filtración del sistema de protonefridios en la planaria *Schmidtea mediterranea* (un platelminto de vida libre), realizaron una búsqueda de SLCs (*solute carriers*) por homología de secuencia, e identificaron 318 genes, representantes de 43 familias de SLCs distintas en el genoma. Entre los resultados se encuentran cinco ortólogos de la familia *SLC5*. Observaron sus patrones de expresión por experimentos de hibridación *in situ* (Fig. 4). *slc5a-2* se expresa en todo el túbulo proximal de protonefridios, mientras que *slc5a-4* se expresa en los dos tercios distales del túbulo proximal.

Notablemente, en la Fig. 4, se observa que *slc5a-2*, además de en protonefridios, se expresa claramente en el aparato digestivo de la planaria, al igual que *slc5a-3*. Estos resultados no son discutidos por los autores, pero son consistentes con funciones de absorción intestinal de glucosa y de reabsorción de glucosa en el sistema excretor.

Por último, si bien se han identificado transportadores de glucosa por difusión facilitada en el tegumento del tremátodo *Schistosoma mansoni* (Skelly et al, 1998), y en los cestodos *Taenia solium* (Rodríguez-Contreras et al, 1998) y *E. multilocularis* (Kashiide et al, 2018), hasta donde sabemos, no existen reportes sobre posibles transportadores activos de glucosa en cestodos. Por todo esto, en este trabajo,

buscamos determinar el patrón de expresión espacial en *H. microstoma* de *SLC5*, un gen candidato de codificar un cotransportador sodio/glucosa.



**Fig 4. Patrón de expresión espacial de ortólogos de *SLC5* en *Schmidtea mediterranea*.** *slc5a-1* parece expresarse en el sistema nervioso, aunque no podemos asegurarlo. *slc5a-2* se expresa en protonefridios y en el aparato digestivo. *slc5a-3* se expresa en la región media-posterior del aparato digestivo. *slc5a-4* se localiza en protonefridios. *slc5a-5* se expresa en el sistema nervioso. Imagen tomada y modificada de Thi-Kin Vu (2015). Barra de escala: 500µm.

#### Absorción de nucleósidos en cestodos

Con respecto a la absorción de nucleósidos, existen varios reportes de las últimas décadas del siglo pasado sobre el transporte de purinas y pirimidinas en cestodos, pero son escasos los artículos específicos sobre el transporte de nucleósidos.

Los nucleósidos y sus derivados son moléculas hidrofílicas, por lo que sus concentraciones dentro y fuera de la célula dependen de la presencia de proteínas transportadoras de nucleósidos que permiten el pasaje de estos a través de las membranas biológicas. Se sabe que los cestodos pueden incorporar purinas y nucleósidos purínicos obtenidos del hospedador a sus propios ácidos nucleicos, a través de vías de salvataje. Las enzimas involucradas en esas rutas metabólicas no han sido estudiadas en profundidad, aunque hay reportes de actividad de algunas de ellas en *Hymenolepis diminuta* (Smyth y McManus, 1989).

MacInnis y Litchford (1965), y MacInnis y Ridley (1969) presentaron evidencia de que los nucleósidos son transportados, en *H. diminuta*, por al menos un mecanismo distinto al de transporte de las bases libres. Los experimentos realizados por estos autores son similares a los de transporte de glucosa mencionados previamente: parásitos adultos fueron incubados en medio con sustratos radiactivos (timina, uracilo, adenosina, guanosina, uridina y timidina), se realizaron extracciones en etanol, y la radiactividad fue medida por conteo de centelleo líquido. La absorción de los nucleósidos no es lineal con respecto a la concentración del nucleósido, lo que sugiere que son captados por transporte mediado (Page et al, 1975).

La especificidad del transportador fue puesta a prueba utilizando una variedad de nucleósidos y bases purínicas y pirimidínicas como análogos del nucleósido marcado en estudio. Los resultados indicaron que las bases no inhiben el transporte de nucleósidos, sugiriendo que estos son transportados por mecanismos distintos a

los del transporte de las bases libres. Además, experimentos con análogos de nucleósidos modificados en la pentosa, en la base, o en ambas, sugieren la posibilidad de que más de un mecanismo pueda estar actuando en el transporte de nucleósidos (Page et al, 1975).

La existencia en *H. diminuta* de sistemas de transporte de glucosa, aminoácidos y glicerol sensibles a la presencia de sodio en el medio impulsó a McCracken et al (1975) a investigar si este ion afecta también el transporte de nucleósidos. Sus resultados indican que la absorción de timidina y uridina depende de la presencia de sodio en el medio de cultivo, y que, en medios libres de sodio, la captación mediada de nucleósidos disminuye de forma muy pronunciada. Otros cationes monovalentes, utilizados como sustitutos del sodio, no restituyeron el transporte de nucleósidos a valores normales.

Por otra parte, con respecto a las funciones de los nucleósidos purínicos y pirimidínicos y sus derivados, es sabido que juegan roles críticos en la fisiología de todos los organismos. Son moléculas que tienen funciones importantes en procesos de señalización, pueden ser convertidas en nucleótidos, que sirven como compuestos de alta energía del metabolismo intermedio, y son precursores de ácidos nucleicos.

Nuevamente, una búsqueda por homología con otras especies puede permitir identificar posibles transportadores de nucleósidos en cestodos.

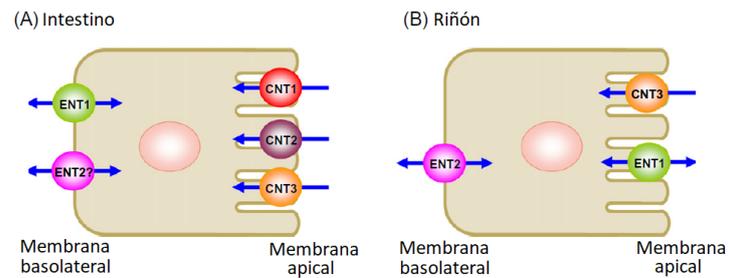
En mamíferos existen dos tipos de transportadores de nucleósidos: los transportadores equilibrativos, de transporte bidireccional (ENTs por *equilibrative nucleoside transporters*), y los transportadores concentrativos sodio-dependientes (CNTs por *concentrative nucleoside transporters*). Estos dos grupos de proteínas no están relacionados evolutivamente. En humanos, existen tres genes de la familia SLC28 de CNTs, *SLC28A1*, *SLC28A2* y *SLC28A3*, que codifican CNT1, CNT2 y CNT3 respectivamente, y son cotransportadores que acoplan el transporte de nucleósidos al gradiente electroquímico de sodio transmembrana. Se encuentran fundamentalmente en la membrana plasmática de las células de una gran variedad de tejidos (riñón, hígado, intestino, corazón, músculo esquelético, páncreas, placenta, cerebro, médula ósea, glándulas mamarias y tráquea) (Young et al., 2013).

Los tres transportan uridina, mostrando distintas permeabilidades por otros sustratos. CNT1 muestra selectividad por nucleósidos pirimidínicos y en menor medida por adenosina, CNT2 por nucleósidos purínicos, y CNT3 por ambos tipos. Estos genes muestran poca variación genética, sugiriendo que se encuentran bajo una alta presión selectiva, y que son, por lo tanto, fisiológicamente importantes (Young et al., 2013).

Los transportadores cumplen importantes roles en la homeóstasis de nucleósidos, ya que proveen estas moléculas, derivadas de la dieta o producidas por tejidos (en el hígado, por ejemplo), para las vías de salvataje de síntesis de nucleótidos en tejidos y células deficientes en rutas de síntesis *de novo* (como cerebro, músculo, eritrocitos, leucocitos y médula ósea). En las vías de salvataje, una vez dentro de las células, los nucleósidos son convertidos en nucleótidos por enzimas propias de estas

vías. Estos nucleótidos participarán en procesos del metabolismo intermedio, como por ejemplo señalización celular, síntesis de fosfolípidos y oligosacáridos, y precursores de la síntesis de ácidos nucleicos.

En el intestino delgado, los CNTs se encuentran en la membrana apical de los enterocitos (Fig. 5). En el riñón, CNT3 se localiza en la membrana apical de las células de túbulo proximales, donde se encarga de reabsorber nucleósidos (Young et al., 2013).



**Fig. 5. Localización de CNTs en intestino y riñón de humanos.** Los CNTs se localizan fundamentalmente en la membrana apical de enterocitos (A), donde se encargan de absorber nucleósidos desde el lumen intestinal; y en la membrana apical de células del riñón, donde reabsorben nucleósidos desde la luz de túbulo proximales. Tomado y modificado de Young et al, 2013.

Se hallaron dos secuencias ortólogas de SLC28 en los transcriptomas y proteomas de cestodos (incluido *H. microstoma*). Datos transcriptómicos de *H. microstoma* indican que uno de los parálogos se expresa masivamente en adultos (*CntA*) y el otro se expresa en larvas y huevos. Además, los datos de RNA-Seq de *E. multilocularis* que analizamos (Tsai et al, 2013) indican el mismo patrón de expresión temporal coincidente con el de genes tegumentarios conocidos mencionado anteriormente. Hasta donde sabemos, no hay reportes sobre la identidad de los posibles genes y/o proteínas involucradas en la absorción activa de nucleósidos por parte de parásitos cestodos. Por todo lo anterior, buscamos determinar el patrón de expresión de *CntA*, gen ortólogo a la familia SLC28, y candidato de cotransportador sodio-nucleósidos de cestodos.

En este trabajo, buscamos determinar el patrón de expresión espacial en *H. microstoma* de *CntA* y *SLC5*, dos genes predichos, candidatos de cotransportadores de nucleósidos y glucosa, respectivamente. Para ello, utilizaremos técnicas de amplificación y clonado de genes, e hibridación *in situ*. Por los análisis de homología y de datos de RNA-Seq realizados, nos interesa en particular determinar si estos genes se expresan en células del tegumento, por lo que resulta necesario contar con un método para distinguir los citones del resto de las células subyacentes al tegumento distal, como pueden ser células musculares o futuras células tegumentarias que aún no se hayan fusionado al sincitio. Para ello, optimizaremos el protocolo de marcado del tegumento con dextrano fluorescente publicado por Wendt et al, 2018.

La investigación sobre el tegumento como tejido clave para el anclaje, protección y nutrición de los parásitos es evidentemente relevante respecto a la salud humana y animal. Los resultados de este trabajo pueden contribuir a la identificación de los transportadores tegumentarios de nucleósidos y de glucosa en estos parásitos, los cuales podrían ser blancos interesantes para la búsqueda de nuevos y mejores tratamientos contra las infecciones por cestodos.

## METODOLOGÍA

### Preparación del Dextrano (ThermoFisher, D3312).

Se trata de un polisacárido hidrofílico de 10 kD, modificado con rodamina (lo que lo vuelve fluorescente) y mediante la adición de lisinas, lo que permite la fijación por aldehídos. El producto consiste en una tableta de 10 mg del compuesto que diluimos en 1 mL de agua estéril. Hicimos alícuotas de 50  $\mu$ L que guardamos a  $-20^{\circ}\text{C}$  protegidas de la luz hasta su uso.

Para los experimentos preliminares de marcado de tegumento se realizaron diluciones de las alícuotas de 1:2 (5 mg/mL) y de 1:5 (2 mg/mL). No se observaron diferencias significativas en los resultados entre ambas concentraciones, por lo que se continuó utilizando la concentración de 2 mg/mL ya que permite obtener mayor volumen de cada alícuota, lo que resultó importante a la hora de marcar más de un gusano a la vez.

### Marcado del tegumento de *H. microstoma* con dextrano conjugado, con distintos tiempos de cultivo post-marcado

Adaptamos el protocolo publicado por Wendt et al, 2018 para el marcado del tegumento del trematodo *Schistosoma mansoni* con dextrano conjugado. Si bien el protocolo de Wendt et al funciona, la marca obtenida en *H. microstoma* no es uniforme. Para mejorar este aspecto se realizaron experimentos con un paso de cultivo en medio RPMI - 1640 tras la incorporación del dextrano, para permitir la difusión del mismo. Se probaron tres tiempos de cultivo distintos: 0, 10 y 60 minutos.

Gusanos adultos de *H. microstoma* fueron colectados en buffer fosfato salino (PBS) (provistos por Jenny Saldaña del Laboratorio de Experimentación Animal de la Facultad de Química). En placa de Petri con PBS y bajo lupa, se separó a los gusanos utilizando pinzas, y se los colocó en 3 tubos con PBS, uno por condición. Los volúmenes a continuación son los utilizados para 2 gusanos en 1 tubo.

Utilizando pipeta automática, se retiró el PBS y se agregó rápidamente 250  $\mu$ L de solución de dextrano a 2 mg/mL a cada uno de los 3 tubos. Inmediatamente se llevó a vórtex a velocidad media por 3 minutos. Se cree que la solución hipotónica de dextrano produce un shock osmótico que genera algún daño al tegumento, lo que permite la entrada del dextrano y su difusión dentro del sincitio, a través de los puentes citoplasmáticos hasta los citones (Wendt et al., 2018). A partir de este punto los animales marcados debieron ser protegidos de la luz. Transcurridos los 3 minutos, se retiró la solución de dextrano con pipeta. Se realizaron 5 lavados rápidos con 8 mL de medio RPMI - 1640 recién preparado, para eliminar el dextrano que pudiera haberse adherido a la superficie del animal. Los gusanos de las condiciones 10 y 60 minutos de cultivo fueron traspasados a placas de Petri con el RPMI - 1640 del último lavado, se agregó 10% de suero fetal bovino (SFB, Capricorn) sobre la placa, y se llevó a estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  por el tiempo correspondiente a cada condición, mientras que los gusanos de la condición 0 minutos de cultivo fueron fijados inmediatamente.

Para los gusanos de todas las condiciones, se retiró el RPMI - 1640 del último lavado, se colocó el tubo en hielo brevemente para que los animales se relajaran, y se agregaron 15 mL de Paraformaldehído (PFA, Sigma) al 4% preparado en PBS y precalentado a 80°C (de este modo los animales mueren por el calor antes que por el efecto del fijador, lo que impide que mueran contraídos). Se dejaron fijando *overnight* a 4°C. Al día siguiente se retiró el PFA y se realizaron 4 lavados con PBS con Tritón al 0,3% (PBS-Tx 0,3%) por 5 minutos cada uno, con agitación. Se reemplazó el PBS-Tx 0,3% del último lavado por una solución de PBS-Tx 0,3% con DAPI (1 µg/mL, Sigma) y Verde de Metilo (Prieto et al, 2014) (1:5000) como marcadores nucleares y se dejó *overnight* a 4°C.

Para el montaje, se “volcó” el contenido del tubo en una placa de Petri con PBS-Tx 0,3%. Bajo lupa, se cortaron fragmentos de gusano según su grosor. Utilizando pinzas, los fragmentos fueron depositados en portaobjetos, se secó el exceso de líquido con papel absorbente teniendo cuidado de no tocar la muestra. Sobre un cubreobjetos de 20x20 mm se colocó una gota de aproximadamente 40 µL de Glicerol (Sigma) 80% con Tris-HCl (Sigma) 50 mM, pH 8 y se cubrió cuidadosamente la muestra apoyando un borde primero y dejando caer suavemente. Se sellaron los bordes con esmalte de uñas, que evita la desecación de la muestra.

Para gusanos destinados a experimentos de hibridación *in situ*, el PFA 4% fue preparado con PBS tratado con DEPC (PBS-DEPC) y en condiciones libres de ARNasas. En el paso de fijación, los gusanos fueron “volcados” a tubos nuevos libres de ARNasas y fijados *overnight* allí. Al día siguiente se retiró el PFA 4% y se agregó metanol (Dorwil), se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos con agitación, se reemplazó el metanol por nuevo y se guardó a -20°C hasta su uso.

### Clonado de *CntA* y *SLC5*

#### *Retrotranscripción*

Partiendo de ARN total de *H. microstoma* adulto (gentileza de Matías Preza), se realizó una retrotranscripción. Se preparó una mezcla con 1 µL de Oligo dT 100 µM (ThermoFisher), 1 µL de dNTP 10 mM (Fermentas), 1,5 µL de ARN molde 1,9 µg/µL, y 8,5 µL de agua doble destilada. Se calentó la mezcla a 65°C por 5 minutos, luego se enfrió en hielo (4°C), y se centrifugó brevemente para bajar el contenido del tubo. Se agregó 4 µL 5X First Strand Buffer (Invitrogen), 2 µL de DTT 0,1 M (Invitrogen) y 1 µL del inhibidor de ARNasas RNaseOUT (Invitrogen). Se mezcló suavemente y se incubó a 42°C por 2 minutos para permitir la hibridación del oligo dT a los ARNm. Se adicionó 1 µL de la enzima SuperScript II RT (Invitrogen) y se dejó transcurrir la reacción a 42°C durante 50 minutos, y luego se inactivó la misma a 70°C por 15 minutos.

#### *Amplificación de las secuencias codificantes de *CntA* y *SLC5* por PCR*

Para el diseño de cebadores se utilizaron las bases de datos *Proteins* y *CDS transcripts* de la versión 3 del genoma de *H. microstoma*, disponible en [parasite.wormbase.org/index.html](http://parasite.wormbase.org/index.html).

*CntA* es uno de dos ortólogos de CNT predichos, su código es HmN 003032110. En el caso de *SLC5* hay dos genes predichos muy similares entre sí: HmN 003033200 y HmN 003033190. El segundo es 105 nucleótidos más largo en el extremo 5' de su secuencia codificante, de modo que a partir del nucleótido 106 de HmN 003033190 la identidad entre ambos genes es casi perfecta (99%). Dado que análisis de homología de ambos genes con *E. multilocularis* y *Homo sapiens* indican que los primeros 35 aminoácidos de HmN 003033190 no estarían conservados, predecimos que los primeros 105 nucleótidos probablemente no forman parte de la verdadera secuencia codificante, y que el verdadero codón de inicio es el homólogo al codón de inicio de HmN 003033200. Adicionalmente, análisis de RT-PCR demostraron que esta región inicial no puede amplificarse en forma robusta (datos no mostrados). Se diseñaron por lo tanto sólo dos pares de cebadores, para amplificar la totalidad de las regiones codificantes de HmN 003032110 y HmN 003033200 (Tabla 1). Dado que las diferencias entre ambos genes *SLC5* predichos en la región del cebador Forward son mínimas (apenas dos pares de bases), probablemente los cebadores son capaces de amplificar ambos genes en forma indistinta.

Los cebadores fueron utilizados a una concentración de 10 µM.

Tabla 1. Cebadores para amplificar las regiones codificantes de *CntA* y *SLC5*

	<b><i>CntA</i></b>	<b><i>SLC5</i></b>
Código	HmN 003032110	HmN 003033200
Forward (Fwd)	5'- ATG CCA AGG AAG AAT AAA TTC G -3'	5'- ATG GAG CCG ATT GGA TAC CTG G -3'
Reverse (Rv)	5'- TTA TGT ATC CTT GAA GAG ACC TGC -3'	5'- CTA AGC GAA GGC CCA GAA G -3'

Para *CntA*, el tamaño esperado del producto es de 2034 pb; y para *SLC5*, de 2073 pb. En primera instancia se utilizó la enzima Mango *Taq* (Bioline), según el protocolo del fabricante, para confirmar la especificidad de los cebadores (protocolo de ciclado en Tabla 2). Posteriormente, amplificamos los genes utilizando una enzima con actividad 3'→5' exonucleasa (corrección de errores o *proofreading*), la KAPA HiFi (Roche), según el protocolo del fabricante (protocolo de ciclado en Tabla 2).

Tabla 2. Protocolos de ciclado para PCR con Mango *Taq* Y KAPA HiFi

	<i>CntA</i> y <i>SLC5</i> (Mango)		<i>CntA</i> y <i>SLC5</i> (KAPA)		
	Temperatura	Tiempo	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización inicial	95°C	3 minutos	95°C	3 minutos	
Desnaturalización	95°C	30 segundos	98°C	20 segundos	X 35 ciclos
<i>Annealing</i>	58°C	30 segundos	60°C	15 segundos	
Extensión	72°C	1 minutos	72°C	2 minutos	
Extensión final	72°C	2 minutos	72°C	2 minutos	

En ambos casos, se realizaron electroforesis en gel de agarosa 1%, para verificar el tamaño del producto.



## Transformación

Alícuotas de 50  $\mu$ L de células *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes preparadas mediante el protocolo de tratamiento con cloruro de calcio (Sambrook et al, 1989) fueron descongeladas 5 minutos en hielo. En zona estéril se añadieron 5  $\mu$ L de mezcla de ligación y se mezcló muy suavemente. Se incubó 20 minutos en hielo, luego 90 segundos a 42°C y 90 segundos más en hielo. Se añadieron 250  $\mu$ L de medio LB (Triptona 10 g/L, Extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.0) precalentado a 37°C, y se incubó a 37°C con agitación durante 45 minutos para vectores con resistencia a Ampicilina y durante 2 horas para vectores con resistencia a Kanamicina (la Ampicilina es un antibiótico betalactámico que interfiere con la síntesis de la pared celular de las bacterias durante la división celular. La Kanamicina es un antibiótico aminoglucósido que interfiere con la síntesis proteica uniéndose al ARNr 16S, por lo que es necesario darle tiempo a la bacteria que haya adquirido el vector para sintetizar y acumular la enzima de resistencia).

Previo al plaqueo de las células transformadas con la mezcla de ligación del vector pCR-Blunt y el amplicón de *CntA*, se prepararon placas con LB-agar con 30  $\mu$ g/ml kanamicina (Duchefa) plaqueando una mezcla de 4  $\mu$ L de isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 M (Duchefa) y 50  $\mu$ L de LB (para facilitar el plaqueo). El IPTG es necesario para inducir la expresión del promotor *lac* que controla el gen letal del vector pCR-Blunt. Se plaquearon 50  $\mu$ L y 250  $\mu$ L de células en estas placas de Petri con LB-agar + Kanamicina + IPTG. Para bacterias transformadas con la mezcla de ligación del vector pJET1.2 y el amplicón de *SLC5*, se plaquearon 50  $\mu$ L y 250  $\mu$ L en placas con LB-agar + Ampicilina 100  $\mu$ g/ml (Duchefa). Las placas fueron incubadas en estufa a 37°C *overnight*.

## Cribado de colonias recombinantes mediante PCR

Una vez crecidas las bacterias, en zona estéril, se picaron colonias aisladas con un *tip* y se resuspendieron esas bacterias en 10  $\mu$ L de agua estéril en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Como control negativo, se picó el agar en una zona libre de colonias. Se tomaron 2  $\mu$ L de la suspensión de bacterias de cada colonia para plaquear cada clon seleccionado por estriación en una nueva placa con LB-agar + Kanamicina + IPTG para el caso del clonado de *CntA*, y con LB-agar + Ampicilina para el clonado de *SLC5*. Esas placas fueron incubadas *overnight* a 37°C y guardadas en heladera. De este modo guardamos los clones seleccionados para futuros experimentos.

A continuación, se analizaron las colonias mediante PCR para verificar la presencia y conocer el sentido del inserto en cada clon. Para ello, se hicieron una serie de reacciones de PCR para cada gen, utilizando la enzima HighTaq (Bioron) según el protocolo del fabricante. Como molde, se utilizó 1  $\mu$ L de la suspensión de bacterias de cada colonia (las bacterias se lisan durante el paso de desnaturalización inicial, liberando los plásmidos con inserto).

Para *CntA* se realizaron dos reacciones por clon: una con los cebadores del gen (ver más arriba “Amplificación de las secuencias codificantes de *CntA* y *SLC5* por PCR”) para verificar la presencia del inserto, y otra combinando el cebador T7 (5'-TGTAATACGACTCACTATAGGG-3') y el cebador Fwd del gen, lo que nos permitió

conocer la orientación del inserto (solo se espera que ocurra amplificación si la hebra *antisense* de la secuencia codificante se encuentra bajo el promotor T7). La Tabla 3 muestra el protocolo de ciclado.

Tabla 3. Protocolos de ciclado para PCR con HighTaq (*CntA*)

	Cebadores Fwd y Rv de <i>CntA</i>		Cebadores T7 y Fwd de <i>CntA</i>		
	Temperatura	Tiempo	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización inicial	94°C	3 minutos	94°C	3 minutos	
Desnaturalización	94°C	10 segundos	94°C	10 segundos	X 35 ciclos
<i>Annealing</i>	55°C	20 segundos	50°C	20 segundos	
Extensión	72°C	2 minutos	72°C	2 minutos	
Extensión final	72°C	2 minutos	72°C	2 minutos	

Para *SLC5* se realizó, en primera instancia, una reacción utilizando los cebadores Fwd del gen y Fwd del kit (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3') para conocer la orientación del inserto (de nuevo, solo se espera amplificación si la hebra *antisense* de la secuencia codificante se encuentra bajo el promotor T7). Como todas las reacciones realizadas dieron negativo, se hicieron nuevas PCR colonia con los cebadores Fwd y Rv del gen, para verificar que los resultados negativos previos se debieran a que los insertos fueron incorporados en el sentido *sense* y no a la falta de inserto. La Tabla 4 muestra el protocolo de ciclado.

Se realizaron electroforesis en gel de agarosa 1% (ver más abajo "Electroforesis") para evaluar los resultados.

Tabla 4. Protocolos de ciclado para PCR con HighTaq (*SLC5*)

	Cebadores Fwd del kit y Fwd de <i>SLC5</i>		Cebadores Fwd y Rv de <i>SLC5</i>		
	Temperatura	Tiempo	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización inicial	94°C	3 minutos	94°C	3 minutos	
Desnaturalización	94°C	10 segundos	94°C	10 segundos	X 35 ciclos
<i>Annealing</i>	55°C	20 segundos	58°C	20 segundos	
Extensión	72°C	2 minutos	72°C	2 minutos	
Extensión final	72°C	2 minutos	72°C	2 minutos	

### *Minipreps*

Se seleccionaron, según la orientación del inserto, tres clones de bacterias transformadas con *CntA* y tres clones transformados con *SLC5*. Se añadieron 5 µL de la suspensión de bacterias de cada clon seleccionado a un tubo de ensayo con 3 mL

de medio LB con Kanamicina 30 µg/ml para pCR-Blunt/*CntA*, y Ampicilina 100 µg/mL para pJET1.3/*SLC5*. Se incubaron *overnight* a 37°C con agitación (200 RPM). Al día siguiente se colectaron las bacterias pasando el medio a un tubo tipo Eppendorf de 1.5mL y centrifugando a 14.000 RPM durante 1 minuto (esto se realizó dos veces para colectar todas las bacterias de los 3 mL de cultivo). Las minipreps se realizaron con el kit GeneJET (ThermoFisher, K0502), según el protocolo del fabricante.

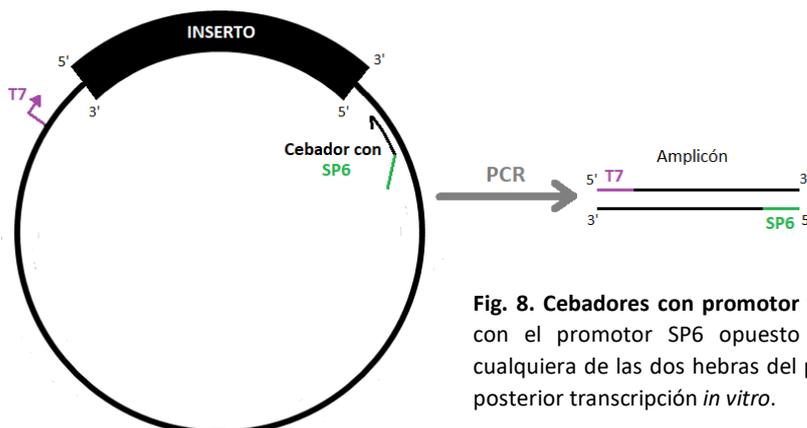
Se midió la concentración de ADN en Nanodrop (ThermoFisher, NanoDrop™ Lite Spectrophotometer), se diluyó hasta 100 ng/µL y se envió para su secuenciación a Macrogen, Korea. Se solicitó al servicio que se utilizaran los cebadores M13-FP (5'-TGTAACGACGGCCAGT -3') y M13R-pUC (5'- CAGGAAACAGCTATGAC -3') para el vector pCR-Blunt (*CntA*), y los cebadores pJET1\_2F (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC -3') y pJET1\_2R (5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG -3') para el vector pJET1.2 (*SLC5*). Una vez obtenida la secuencia, el análisis se realizó utilizando el programa BioEdit y las bases de datos disponibles en <https://parasite.wormbase.org/> para *H. microstoma*.

### Electroforesis

Todos los experimentos de electroforesis de este trabajo fueron realizados en geles de 50 mL de agarosa (Sigma) 1%, en buffer Tris Acetato EDTA (TAE). Las muestras fueron mezcladas con buffer de carga (Fermentas, R0611) y luego cargadas a los pocillos. Se utilizaron 2,5 µL de SYBR Safe (Invitrogen) como colorante de ácidos nucleicos. La corrida se realizó a un voltaje de 40 V (voltaje constante) resultando en una corriente de unos 120 mA. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron: GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (ThermoFisher, SM1331) y GeneRuler DNA Ladder mix (ThermoFisher, SM0331).

### Preparación de moldes para la síntesis de sondas de ARN

Para sintetizar la sonda, se realizaron reacciones de PCR con un volumen final de 100 µL, utilizando la enzima Mango *Taq*. Como los vectores utilizados sólo tenían promotor T7, y dada la orientación de los clones para *SLC5* (hebra *sense* del gen bajo el control de T7), se diseñaron nuevos cebadores para un fragmento de cada vector flanqueante del inserto y opuesto a T7 (Tabla 5), con el promotor de la ARN polimerasa SP6 agregado al extremo 5' (Fig. 8):



**Fig. 8. Cebadores con promotor SP6.** El diseño de cebadores con el promotor SP6 opuesto a T7 permitió seleccionar cualquiera de las dos hebras del producto amplificado para la posterior transcripción *in vitro*.

Tabla 5. Cebadores para los vectores de clonado con el promotor SP6 agregado

ZeroBlunt+SP6	5'- ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT GCC AGT GTG CTG GAA TTC AG -3'
pJET1.2+SP6	5'- ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT CCA TGG CAG CTG AGA ATA TTG TAG GAG -3'

De este modo, cada hebra del producto de PCR estará bajo el control de T7 o SP6. Se realizó electroforesis en gel de agarosa 1% con una alícuota de 5 µl para observar los resultados. A continuación, se purificaron los restantes 95 µl de los productos de PCR por precipitación con 0,1 volúmenes de acetato de sodio y 2,5 volúmenes de Etanol 100%. Se dejó precipitando *overnight* a -20°C, se centrifugó a 12.000 g durante 20 minutos, se retiró el sobrenadante, se lavó con Etanol 70% (en caso de desprenderse el pellet del fondo del tubo, se vuelve a centrifugar a 12.000 g por 20 minutos), se centrifugó brevemente para poder retirar todo el Etanol 70%, y se dejó secar bajo lámpara unos minutos (también puede hacerse en Termoblock a 42°C). Una vez que el pellet cambió de color (se vuelve transparente), se disolvió en 30 µL de agua doble destilada y se cuantificó la concentración en Nanodrop.

#### Transcripción *in vitro* y purificación de las sondas

En este paso se sintetizaron las sondas de ARN marcadas con Digoxigenina (Dig). Para ello se realizó la mezcla de reacción con 5 µL de agua libre de ARNasas, 4 µL 5X Buffer de transcripción (ThermoFisher), 0,5 µL de RNase OUT (Invitrogen), 2 µL de una mezcla de NTPs (ATP, CTP, GTP 10 mM, y UTP 6.5 mM) (Biolabs), 2 µL de Digoxigenina-UTP 3,5 mM (Dig-UTP, Roche), 1,5 µL de ARN polimerasa T7 o SP6 (ThermoFisher), y 5 µL del producto de PCR a 400 ng/µL (se utilizaron 2 µg de molde por reacción). Debe utilizarse entre 1 y 2 µg de producto de PCR. El UTP se utiliza en menor concentración porque es complementado con la adición de Dig-UTP. Se utiliza este último en conjunto con uridina normal porque las ARN polimerasas lo incorporan con baja eficiencia, y de utilizarlo de manera exclusiva, se generaría una alta proporción de transcriptos truncos.

Se sintetizaron las hebras *antisense* de *CntA* y *SLC5*, y la hebra *sense* de *SLC5* que sería utilizada como control negativo en los experimentos de hibridación *in situ*. Para la síntesis de las hebras *antisense* de *CntA* y *sense* de *SLC5* se utilizó la ARN polimerasa T7, mientras que para la síntesis de la hebra *antisense* de *SLC5* se utilizó la enzima SP6.

La mezcla se incubó 2 horas a 37°C. Luego se adicionó 1 µL de DNasa I (ThermoFisher) para eliminar el molde y se incubó 15 minutos más a 37°C.

Se purificaron las sondas con el kit RNA Clean & Concentrator (Zymo, R1015). Al final del protocolo, se obtuvieron 30 µL de sonda en agua libre de ARNasas. 25 µL se guardaron a -80°C, y alícuotas de 5 µL fueron utilizadas para verificar la integridad del ARN y para cuantificar la sonda. Se utilizaron 3 µL para electroforesis en gel de agarosa 1% para verificar que el ARN no se hubiera degradado. Los 2 µL restantes se utilizaron para la cuantificación por *Dot Blot*.

### Cuantificación de las sondas por *Dot Blot*

En una membrana de nylon cargada se sembraron gotas de 1  $\mu$ L de diluciones seriadas de cada sonda: 1, 1/10, 1/100 y 1/1000, junto con las mismas diluciones de una sonda de ADN control marcada con digoxigenina de concentración conocida (Boehringer). La membrana fue colocada entre dos papeles Whatman y puesta a secar a 65°C durante 30 minutos (en este punto, la membrana puede ser guardada varios días hasta su revelado). Se realizó *crosslinking* durante 1 minuto bajo luz UV.

A continuación, se realizó un lavado con Buffer 1 (Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) durante 5 minutos, con agitación. Luego se bloqueó durante 10 minutos con Buffer 2 (Buffer 1 + 0.5% Reactivo de bloqueo, Roche), con agitación. Se incubó con anticuerpo anti-Dig conjugado a fosfatasa alcalina (Roche), diluido 1:2000 en Buffer 2, durante 20 minutos, con agitación. Se realizaron 2 lavados de 10 minutos cada uno en Buffer 1, con agitación. Luego de un lavado breve con Buffer 3 (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, pH 9.5), con agitación, se realizó el revelado por incubación con nitro-azul de tetrazolio (NBT, Sigma) y 5-bromo-4-cloro-3'-indolil fosfato (BCIP, Sigma) en Buffer 3, en oscuridad, sin agitación (la reacción de detección implica la formación de un precipitado, la agitación puede dispersar el precipitado y dificultar la cuantificación). La reacción demora menos de 5 minutos, y se corta con enjuagues con agua corriente. Se compara la intensidad de la reacción entre las diluciones de las sondas y el control de concentración conocida para determinar la concentración aproximada de la sonda.

### Hibridación *in situ* Fluorescente en especímenes enteros (*Whole Mount in situ hybridization*, (WMISH)).

Se hizo según lo descrito por Koziol et al, 2014. Muy brevemente, la técnica consiste en la hibridación de sondas de ARN marcadas con digoxigenina, en tejidos permeabilizados. Estas sondas se unirán con alta especificidad a los ARNm complementarios presentes en los tejidos. La detección se realiza con un anticuerpo anti-Digoxigenina conjugado a peroxidasa. Esta enzima es capaz de activar un sustrato fluorescente, la tiramida-FITC, que se une covalentemente a las proteínas de las inmediaciones de la peroxidasa.

Todo el trabajo se realizó en condiciones libres de ARNasas, en superficies limpiadas con etanol 70%, utilizando guantes en todo momento, y con pipetas y *tips* libres de ARNasas. Las soluciones fueron tratadas con dietil pirocarbonato (DEPC) y posteriormente autoclavadas durante 40 minutos.

La concentración inicial de las sondas fue de 5 ng/ $\mu$ L para las *antisense* de *CntA* (T7) y *SLC5* (SP6), y de 1 ng/ $\mu$ L para la *sense* de *SLC5* (T7). 10 $\mu$ L de las sondas *antisense* y 25 $\mu$ L de la sonda *sense* fueron diluidos en 500 $\mu$ L de solución de hibridación, por lo que las concentraciones finales utilizadas fueron de 0,1 ng/ $\mu$ L y 0,05 ng/ $\mu$ L respectivamente. Dado que nuestras sondas son de más de 2000pb, la temperatura de hibridación y de lavados post-hibridación fue de 57,5°C.

Las sondas diluidas son recuperadas luego de la hibridación, y guardadas a -80°C. Pueden reutilizarse varias veces

## Microscopía confocal (servicio del Instituto Pasteur de Montevideo)

Las imágenes de este trabajo fueron tomadas en el Microscopio de barrido láser confocal semi-espectral Zeiss LSM 800CyAn, por captura secuencial para evitar señal cruzada (“*bleedthrough*”). Por los espectros de excitación-emisión de los fluoróforos utilizados (FITC y Rodamina), fue necesario la realización de controles para verificar que no se produjera pasaje de señal de un canal hacia otro (Fig. 9).

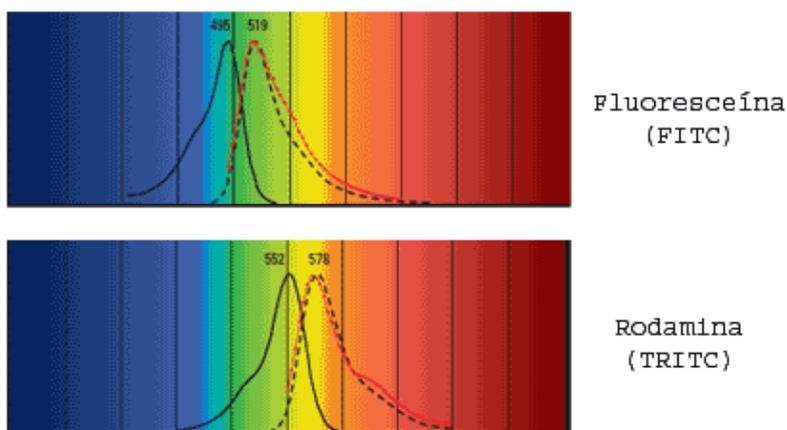


Fig. 9 Espectros de absorción y emisión de luz de los fluoróforos FITC y Rodamina. Tomado de [www.medic.ula.ve](http://www.medic.ula.ve)

Para ello se realizaron controles con muestras que tenían únicamente señal de WMISH o de dextrano. Se probaron distintas intensidades de láser para evaluar, en primer lugar, el pasaje de la señal de FITC al canal de Rodamina, y, en segundo lugar, el pasaje de la señal de Rodamina al canal de

FITC.

En el primer caso (muestra con WMISH detectada mediante tiramida-FITC y sin dextrano), confirmamos que con una intensidad del láser de 561 nm de hasta 40% y una ganancia de Fotomultiplicador de 711 V, no se observa señal en el canal de Rodamina.

En el segundo caso (muestra con Dextrano conjugado a Rodamina y sin WMISH), confirmamos con una intensidad del láser de 488nm de 0.4% y una ganancia de Fotomultiplicador de 650 V, no se observa señal en el canal de FITC.

Con esas intensidades de láser de 0.4% y 40%, y esos valores de ganancia se pueden observar las señales de FITC y Rodamina en ambos controles y en las muestras sin problemas.

### Análisis y procesamiento de imágenes

Todas las imágenes obtenidas por microscopía confocal fueron procesadas y analizadas utilizando el programa FIJI (Fiji Is Just ImageJ).

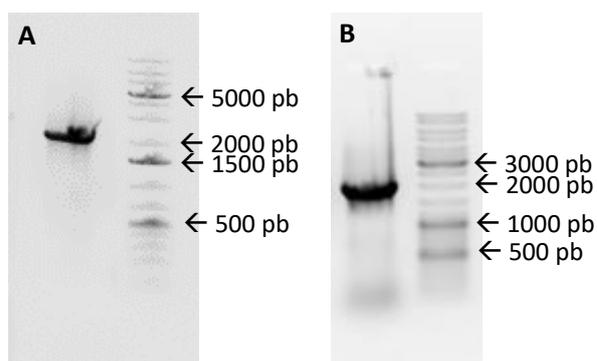
Se cuantificaron, en cortes ópticos, células totales en la región subtegumentaria, y células dextrano-positivas (Herramienta Plugins/Analyse/Cell counter). En los experimentos de co-localización de las marcas de dextrano e hibridación *in situ*, se cuantificaron células totales en la región subtegumentaria, células dextrano-positivas, y células FITC-positivas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1) Clonado de las regiones codificantes de *CntA* y *SLC5* y síntesis de sondas de ARN marcadas

#### 1.1) Amplificación de las regiones codificantes de *CntA* y *SLC5* mediante RT-PCR

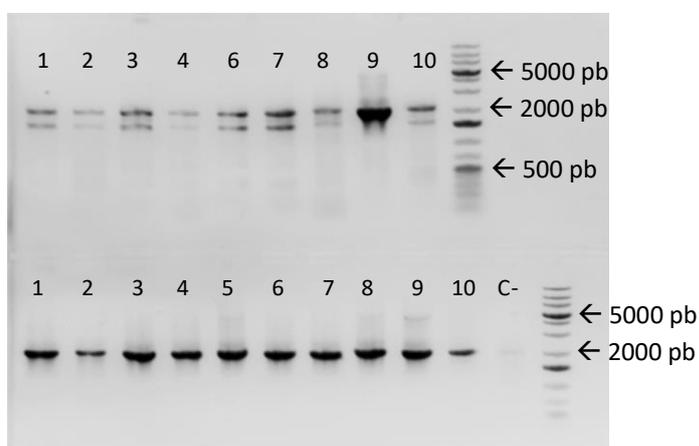
Los cebadores diseñados para la amplificación de las regiones codificantes de *CntA* y *SLC5* a partir de cDNA resultaron específicos. Las bandas observadas por electroforesis en gel de agarosa 1% fueron congruentes con el tamaño esperado: 2034 pb para *CntA* y 2073 pb para *SLC5* (Fig. 10), observándose resultados similares utilizando las enzimas MangoTaq y KAPA HiFi.



**Fig 10. Amplificación de *CntA* y *SLC5* por PCR utilizando la enzima MangoTaq** (ver Metodología). Los productos obtenidos son del tamaño esperado. (A) *CntA*, el marcador de peso molecular utilizado fue GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. (B) *SLC5*, el marcador de peso molecular utilizado fue GeneRuler DNA Ladder mix.

#### 1.2) Transformación y verificación de la presencia y sentido de los insertos

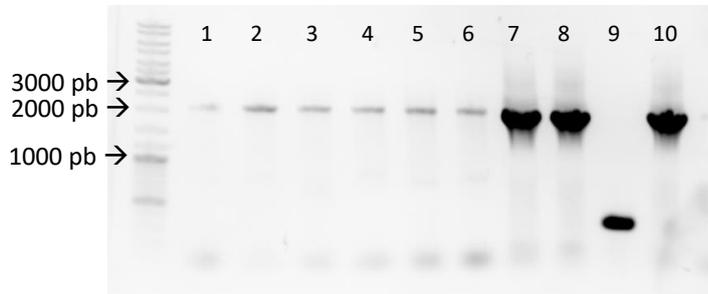
Luego de la transformación de la mezcla de ligación de vector y productos de PCR, se criaron 10 colonias por PCR para *CntA*. Se realizaron dos reacciones de PCR por colonia, una con los cebadores del gen, para verificar la presencia del inserto, y otra con los cebadores T7 y Fwd del gen para determinar su orientación (ver Metodología) (Fig. 11). Seleccionamos tres clones para la realización de minipreps y secuenciación: los clones 1, 3 y 9.



**Fig 11. Cribado de colonias transformantes para *CntA* por PCR.** En la fila superior\* se observan las reacciones de las PCR con cebadores T7 y Fwd del gen. Únicamente el clon 9 tiene la hebra *antisense* bajo el control de T7. Las bandas dobles observadas en el resto de los carriles son producto de amplificación inespecífica. En la fila inferior se observan los resultados de las reacciones de PCR con los cebadores del gen. Todos los clones incorporaron el inserto. C-, control negativo. El marcador de peso molecular utilizado fue GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. \*La reacción para el clon 5 se perdió debido a una rotura en el tubo de PCR.

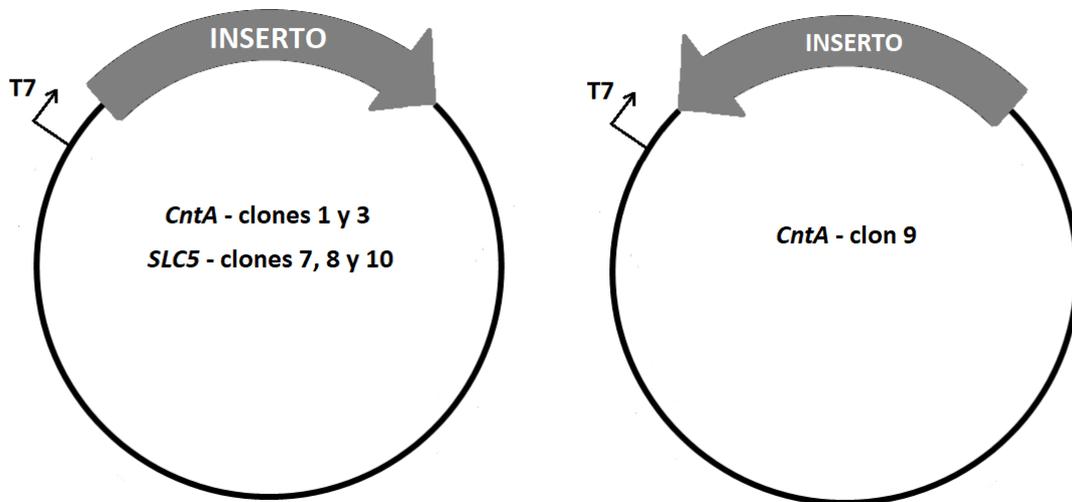
En el caso de *SLC5*, el cribado inicial de 25 colonias por PCR con los cebadores Fwd del vector (que se encuentra en la misma hebra que el promotor T7) y Fwd del gen arrojó resultados negativos para todas las colonias (datos no mostrados). Este resultado pudo deberse a la ausencia de inserto, o a que el mismo se encuentra en

sentido inverso en todos los clones cribados. Para discernir entre ambas posibilidades, se procedió a verificar la presencia del inserto por PCR con los cebadores del gen en 10 de las 25 colonias. Como se observa en la Fig. 12 el inserto se encontró en sólo tres clones, de los cuales seleccionamos el 7 y el 8 para minipreps y secuenciación.



**Fig. 12. Resultados del cribado de colonias transformantes por PCR con cebadores del gen.** Se observa amplificación específica en los clones 7, 8 y 10. La banda observada en el clon 9 es producto de amplificación inespecífica. Las bandas tenues observadas en los clones 1-6 probablemente se deban a la presencia de restos de mezcla de ligación sobre el agar del cual se "picaron" las colonias. El marcador de peso molecular utilizado fue GeneRuler DNA Ladder mix.

Los resultados del cribado por PCR indican que la orientación de los insertos en los diferentes clones seleccionados es la que se indica en la Fig. 13.



**Fig. 13** Los resultados del cribado de colonias por PCR indican las orientaciones de inserto que se muestran en los esquemas.

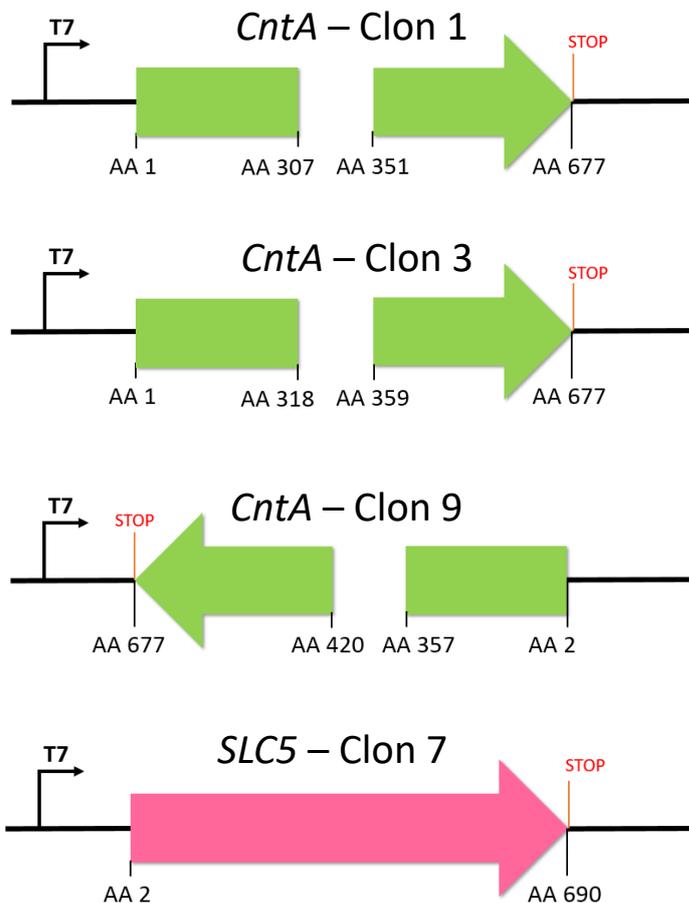
### 1.3) Secuenciación y análisis de las secuencias

Dado el gran tamaño de los insertos, en algunos casos la secuenciación desde ambos extremos no alcanzó a cubrir toda la secuencia. De todas formas, el objetivo era confirmar la identidad de los insertos, lo que pudimos lograr mediante Blast con el software BioEdit y las bases de datos disponibles para *H. microstoma* (ver Metodología).

Para los clones 1, 3 y 9 de *CntA* obtuvimos una identidad del 100% en los análisis de Blastx en ambos extremos del inserto de cada clon. Existe una región sin secuenciar de 44, 41 y 63 codones entre los extremos de cada secuencia (Fig. 14) para los clones 1, 3 y 9 respectivamente. Todos los clones incluyen el codón STOP (UAA). Los clones

1 y 3 tienen el codón “ATG” inicial completo, al clon 9 le faltan las dos primeras bases (“AT”) del codón inicial, lo que no es significativo para la síntesis de sonda para experimentos de hibridación *in situ* (sí lo sería para experimentos de análisis funcional).

En el caso de *SLC5*, para el clon 7 logramos secuenciar todo el inserto, obteniendo una identidad del 100% por Blastx. El codón STOP (CTA) está presente, aunque falta la base inicial (“A”) del codón de inicio. El clon 8 presentó dos deleciones en su secuencia, por lo que se descartó su uso en experimentos posteriores.



El único clon que nos serviría para sintetizar sonda *antisense* es el clon 9 de *CntA*, dado que tiene dicha hebra bajo el promotor T7. Para el resto de los clones se hizo necesario el diseño de nuevos cebadores para los vectores de clonado con el promotor SP6 agregado al extremo 5' (ver Metodología).

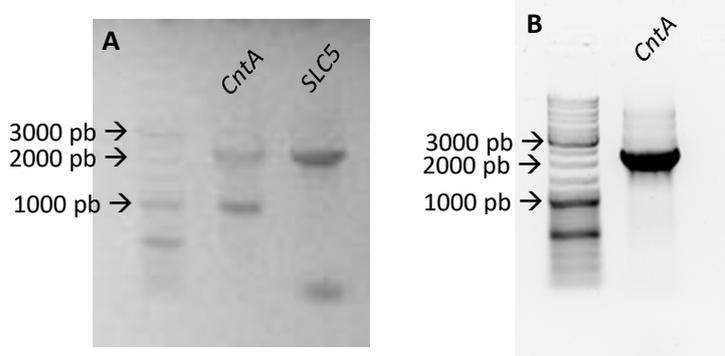
**Fig. 14. Análisis de las secuencias obtenidas para cada clon seleccionado.** El único clon que nos serviría para sintetizar sonda *antisense* es el clon 9 de *CntA*, dado que tiene dicha hebra bajo T7. AA, aminoácido.

#### 1.4) Síntesis de sondas de ARN marcadas con digoxigenina

Para sintetizar las sondas se procedió a amplificar por PCR, a partir de los plásmidos recombinantes, los moldes que serían utilizados en la transcripción *in vitro*. Como los vectores de clonado utilizados carecen de un promotor de ARN polimerasa distinto y opuesto a T7, diseñamos los cebadores ZeroBlunt+SP6 y pJET1.2+SP6 con el promotor SP6 agregado al extremo 5' (ver Metodología), y buscamos amplificar

los insertos de ambos genes. En este punto seleccionamos únicamente un clon de cada gen: el clon 9 para *CntA*, y el clon 7 para *SLC5*.

La amplificación resultó específica para *SLC5*, mientras que en *CntA* apareció un producto inespecífico (Fig. 15A), por lo que realizamos una PCR adicional con los cebadores T7 y Fwd del gen (Fig. 15B), ya que en este caso de todos modos podíamos sintetizar la sonda *antisense* con la ARN polimerasa T7.



**Fig. 15. Resultados de PCR para síntesis de sondas.** (A) Reacciones utilizando los cebadores ZeroBlunt+SP6 y pJET1.2+SP6. Se observa amplificación inespecífica para *CntA*. (B) Reacción utilizando los cebadores T7 y Fwd del gen *CntA*. El marcador de peso molecular utilizado fue GeneRuler DNA Ladder mix.

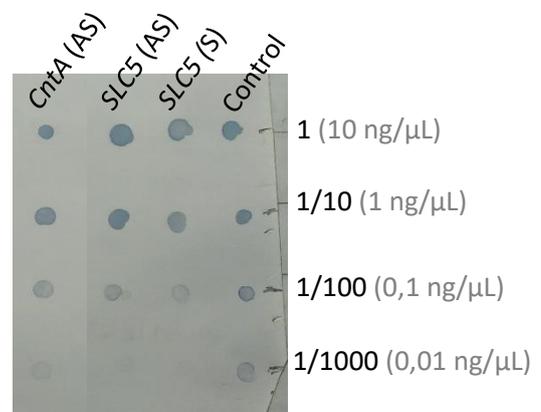
Luego de la purificación se procedió a realizar la síntesis de las sondas marcadas por transcripción *in vitro*. Se sintetizaron las hebras *antisense* de ambos genes y la hebra *sense* de *SLC5* para utilizar en el experimento de control negativo. Se comprobó la integridad del ARN por electroforesis en gel de agarosa 1% (Fig. 16). De haberse degradado el ARN, aparecerían *smears*. La presencia de bandas definidas indica que el ARN no se degradó.



**Fig. 16. Verificación de la integridad del ARN.** Al observar bandas en todos los carriles comprobamos que el ARN no se degradó. Se observan varias bandas debido a que el ARN puede adoptar conformaciones de estructura secundaria distintas, por este motivo la velocidad de migración puede no corresponder con el tamaño de la molécula.

Se cuantificó la concentración de cada sonda por *Dot Blot* (ver Metodología) (Fig. 17). La concentración estimada de las sondas fue de 5 ng/ $\mu$ L para las *antisense* de *CntA* y *SLC5*, y de 1 ng/ $\mu$ L para la *sense* de *SLC5*.

**Fig. 17. Cuantificación de sondas por Dot Blot.** Se realizaron diluciones seriadas de las sondas y se estimó la concentración de cada una por comparación de intensidad de reacción con una sonda control de ADN marcada con digoxigenina (Control), de concentración conocida (se indica entre paréntesis en letra gris). AS, *antisense*; S, *sense*.

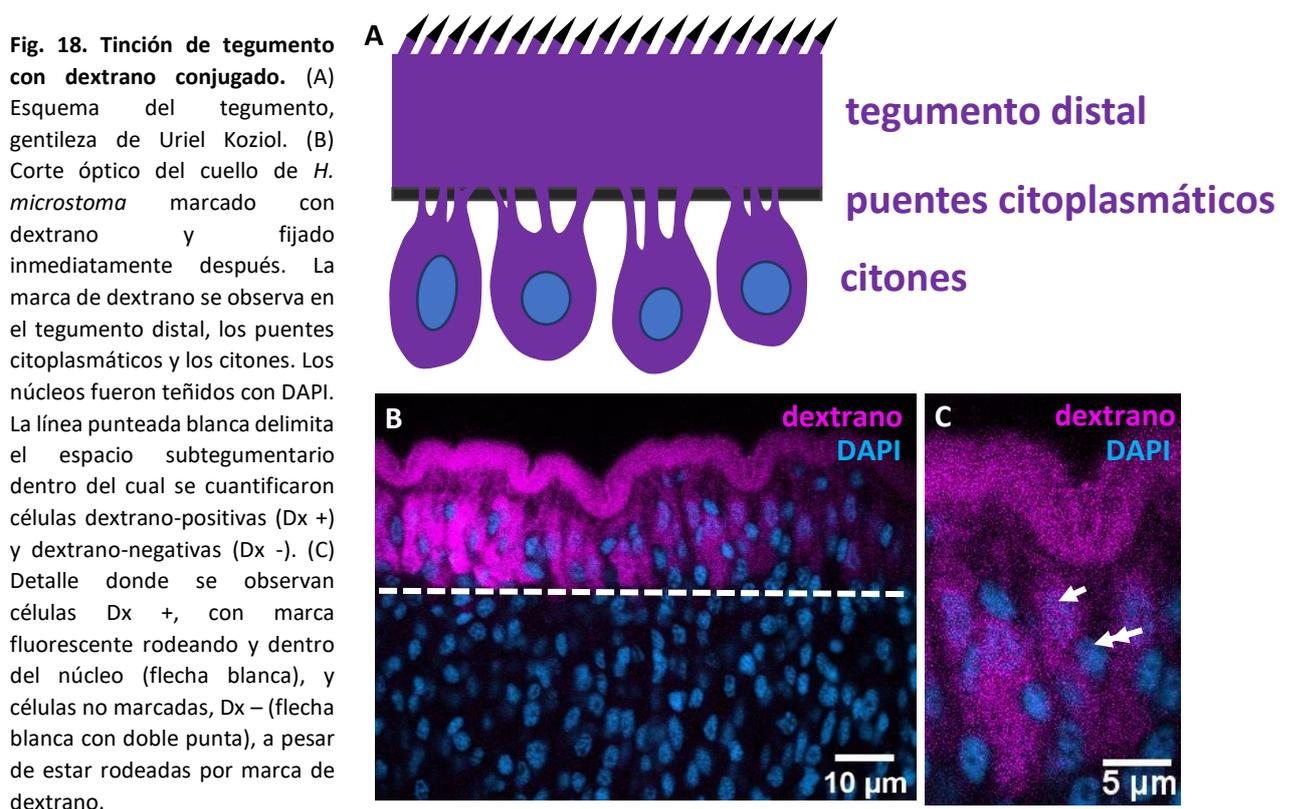


## 2) Marcado del tegumento con dextrano conjugado a Rodamina

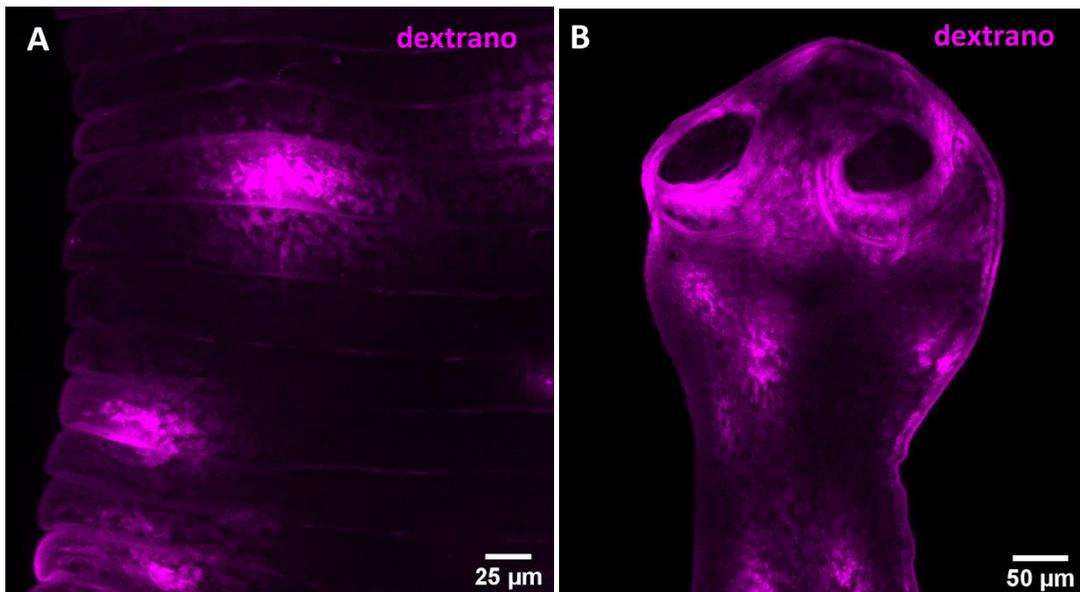
### 2.1) Entre un 40 y un 60% de las células “subtegumentarias” están conectadas al sincitio

Como se mencionó en Metodología, se especula que la solución hipotónica de dextrano genera un daño en la membrana externa del tegumento que permite la entrada y difusión del dextrano fluorescente a través de los puentes citoplasmáticos hasta los citones, marcando únicamente células tegumentarias. Este método fue validado con marcadores específicos del tegumento en *S. mansoni* por Wendt et al (2018).

Efectivamente, con la tinción de dextrano logramos visualizar claramente el tegumento distal, los citones y los puentes citoplasmáticos conectando ambos (Fig. 18).

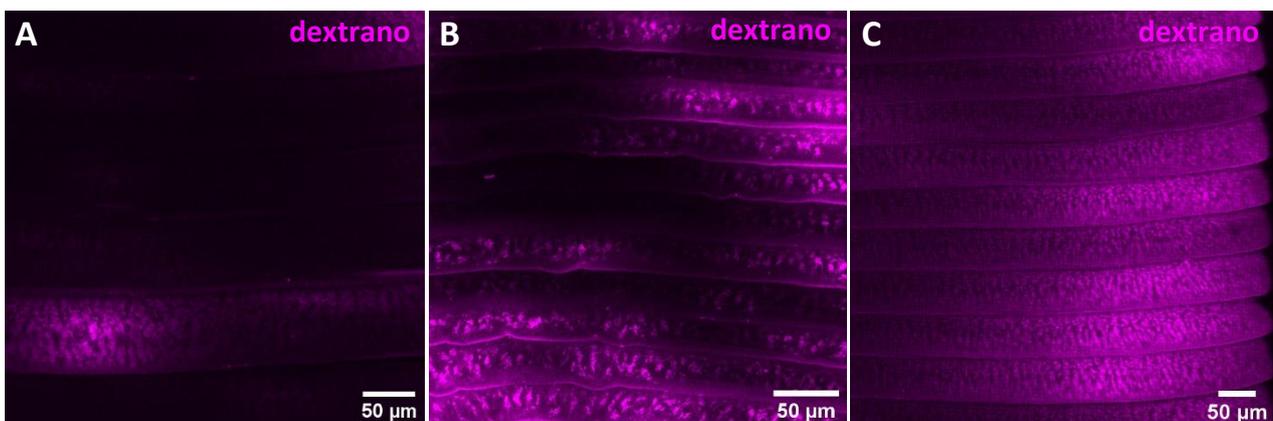


Durante los experimentos preliminares de puesta a punto, se ensayaron dos concentraciones distintas de dextrano en agua destilada: 5 mg/mL y 2 mg/mL. No se observaron diferencias en la distribución o intensidad de la marca, por lo que en adelante se siguió utilizando la de 2 mg/mL. En ambos casos la marca no fue uniforme cuando se fijó el animal inmediatamente después de la incubación con la solución de dextrano (Fig. 19).



**Fig. 19. Señal no uniforme tras marcado del tegumento con dextrano conjugado.** Z-Stacks donde se observan focos de gran intensidad de señal de rodamina alternados con regiones de baja intensidad de señal. (A) Segmentos tempranos del estróbila en *H. microstoma*. (B) Escólex de *H. microstoma*.

Para permitir la difusión del dextrano y mejorar la distribución de la marca en el tegumento, probamos dos tiempos de cultivo post-marcado: 10 y 60 minutos (ver Metodología). Como se observa en la Fig. 20, con 10 minutos de cultivo la distribución mejora, y con 60 minutos de cultivo la marca es casi homogénea.



**Figura 20. Distintos tiempos de cultivo tras el marcado del tegumento con dextrano en *H. microstoma*.** Se muestran Z-Stacks de estróbilos de gusanos fijados luego de distintos tiempos de cultivo tras la incubación en solución de dextrano. Producto del Stack se pueden observar los citones a través del tegumento distal. (A) Segmentos tempranos sin cultivo tras el marcado con dextrano. Se observan focos con señal intensa y regiones con muy baja señal. (B) Segmentos tempranos tras 10 minutos de cultivo post marcado con dextrano, la señal aparece más homogénea. (C) Segmentos tempranos tras 60 minutos de cultivo, si bien la marca no es completamente uniforme, la distribución mejora notoriamente.

Con el fin de cuantificar la proporción de células dextrano-positivas (Dx +) definimos el espacio subtegumentario para el conteo de núcleos, trazando una línea imaginaria donde termina la señal de dextrano, como se muestra en la Fig.18B. Consideramos células Dx + a aquellos núcleos que contienen y están rodeados por la marca fluorescente (Fig. 18C).

Cuantificamos la proporción de células Dx + sobre el total de núcleos subtegumentarios en las regiones del cuello y segmentos tempranos. Los resultados se observan en la Tabla 6.

**Tabla 6. Cuantificación de células Dx + en la zona subtegumentaria.**

<b>Cuello</b>				
n	Corte óptico	Células totales	Células Dx +	% de células subtegumentarias Dx +
1	A	77	35	45
2	A	62	32	52
	B	38	16	42
3	A	266	160	56
<b>Total</b>		<b>443</b>	<b>243</b>	<b>55</b>
<b>Promedio +/- desvío estándar</b>				<b>48,57 +/- 6,4</b>
<b>Segmentos tempranos</b>				
1	A	95	40	42
	B	304	151	50
2	A	57	27	47
3	A	86	46	54
4	A	62	30	48
	B	122	68	56
<b>Total</b>		<b>726</b>	<b>362</b>	<b>50</b>
<b>Promedio +/- desvío estándar</b>				<b>49,5 +/- 5,1</b>

n, número de gusanos en que se cuantificó; Corte óptico, planos en que se cuantificó; Células Dx +, células dextrano-positivas.

Dado que solo entre un 40-60 % de las células subtegumentarias están conectadas al sincitio, se impone la interrogante sobre la identidad del resto de las células. Una posibilidad, según lo visto por Wendt et al (2018) y Collins et al (2016) en *Schistosoma mansoni* es que algunas de esas células estén destinadas a fusionarse al tegumento, produciendo el recambio del mismo, proceso fundamental en la resistencia del parásito a la respuesta inmune del hospedador (Collins et al, 2016).

Según el modelo de Wendt et al (2018), los neoblastos (células madre de platelmintos no cestodos) dan lugar a una población de células especificadas que migran hacia el tegumento, extienden proyecciones a través de la musculatura y la lámina basal, y se fusionan con el tegumento distal. Las células madre en cestodos se denominan células germinativas, y son las únicas proliferantes en todo el organismo (Wikgren y Gustafsson, 1971; Koziol et al, 2010; Koziol et al, 2014).

Diversos experimentos realizados por varios autores sustentan el modelo expuesto por Wendt et al para cestodos. Wikgren y Knuts (1970) y Gustafsson (1976) realizaron experimentos de incubación con timidina marcada sobre larvas y adultos del cestodo *Diphyllobothrium dendriticum*. Demostraron que las células subtegumentarias no se dividen, y observaron que existe migración de células germinativas hacia el espacio subtegumentario. Koziol et al (2010) incubaron larvas de *Mesocestoides corti*, un cestodo modelo, con 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU), un análogo de timidina, demostrando que la proliferación celular está restringida a células del parénquima medular, y que la renovación de las células

subtegumentarias ocurre por migración de células desde el parénquima medular. Koziol et al (2014) realizaron ensayos de pulso y caza y de marcado continuo con EdU, análogo de timidina, en vesículas larvianas de *E. multilocularis*, encontrando que la marca de EdU aparece en células tegumentarias solamente luego de cierto tiempo post-marcado.

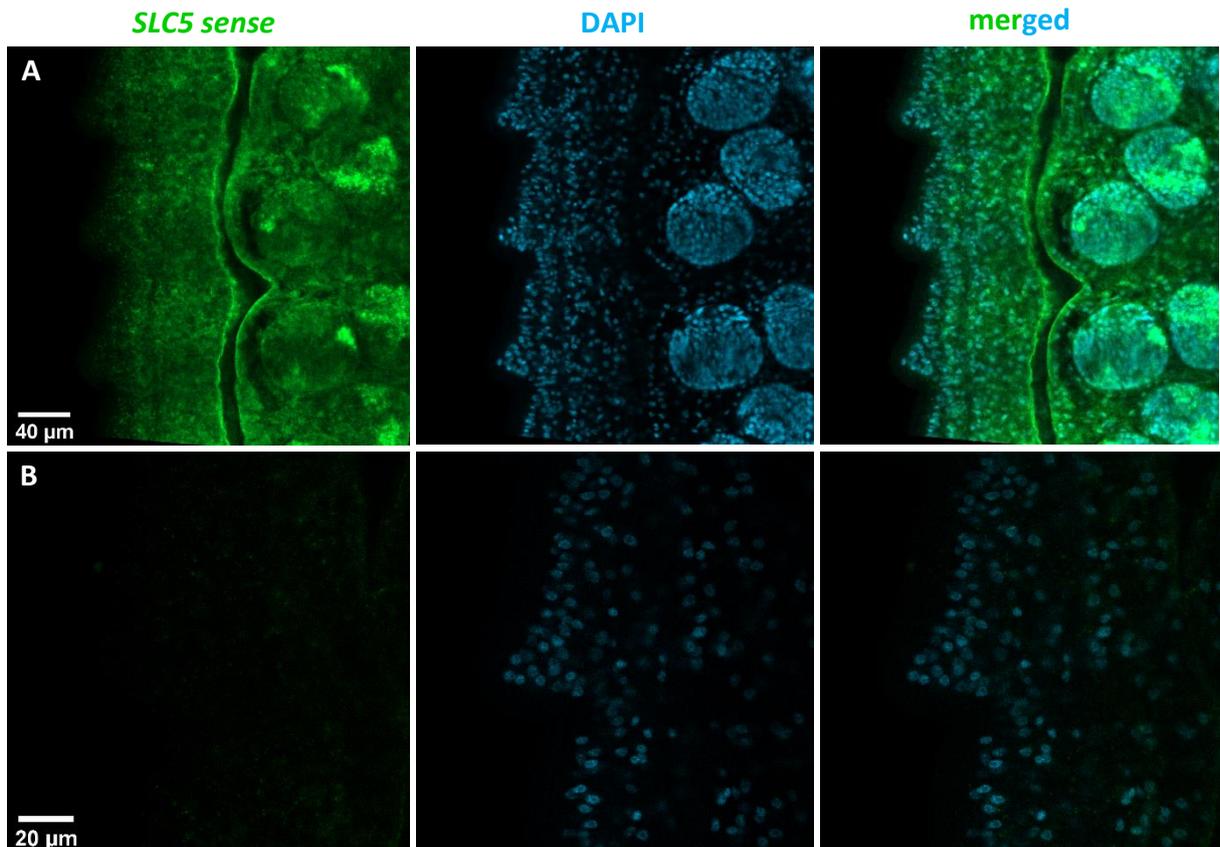
Sería novedoso utilizar *H. microstoma* marcado con dextrano para experimentos de tinción de células proliferantes con EdU (Invitrogen), que marca fluorescentemente las células que entran en fase S del ciclo celular. Se podrían ensayar distintos tiempos caza: a tiempo cero esperaríamos ver la marca solo en células germinativas, luego en los supuestos progenitores, cercanos al tegumento, y posteriormente en los citones (en este último caso co-localizando con la marca de dextrano).

Por otra parte, por la organización de la pared corporal en cestodos, es muy probable que parte de las células subtegumentarias dextrano negativas (Dx -) sean células musculares. Para evaluar esto, podríamos realizar sobre *H. microstoma* marcados con dextrano, experimentos de hibridación *in situ* para las isoformas de alto peso molecular de los dos genes de tropomiosina, marcadores de músculo en cestodos (Koziol et al, 2011). Incluso se pueden combinar técnicas y realizar inmunofluorescencia (sobre la hibridación *in situ*) con un anticuerpo contra tropomiosina de *E. granulosus* (Esteves 2002). Este anticuerpo fue probado con éxito en adultos y larvas de *H. microstoma* (datos no publicados) y otros cestodos (Koziol 2011 y 2014), y, si bien la proteína, al estar localizada en las miofibrillas, puede encontrarse físicamente lejos de los núcleos celulares que la produjeron, la combinación de esta información con la de hibridación *in situ* puede arrojar luz sobre la organización de las fibras musculares subtegumentarias. Resultados no publicados de nuestro grupo, sugieren que gran proporción (aunque no todas) las células subtegumentarias Dx - son células musculares.

### **3) Análisis de la expresión de *CntA* y *SLC5* mediante WMISH**

#### 3.1) La sonda *sense* de *SLC5* utilizada como control negativo hibridiza en testículos

La realización de un control negativo permite afirmar que los resultados obtenidos son válidos, es decir, que la señal que podamos observar en nuestros experimentos se debe a una hibridación específica de la sonda de ARN marcada con el ARNm deseado y no a algún artefacto de la técnica o error de manipulación. En este trabajo se utilizó una sonda *sense* de *SLC5* para el control negativo. Se trata de la hebra codificante de un gen de aproximadamente 2000 pb, por lo que no debería haber encontrado complementariedad con ningún ARN en *H. microstoma*. Inesperadamente, la sonda *sense* utilizada hibridizó en testículos (Fig. 21). Sin embargo, por tratarse de una señal de características muy distintas a las esperadas para nuestros genes, cumple su función como control negativo, ya que da una señal tenue en testículos, pero no en otros tejidos, y esperamos que *CntA* y *SLC5* se expresen en la superficie del parásito.



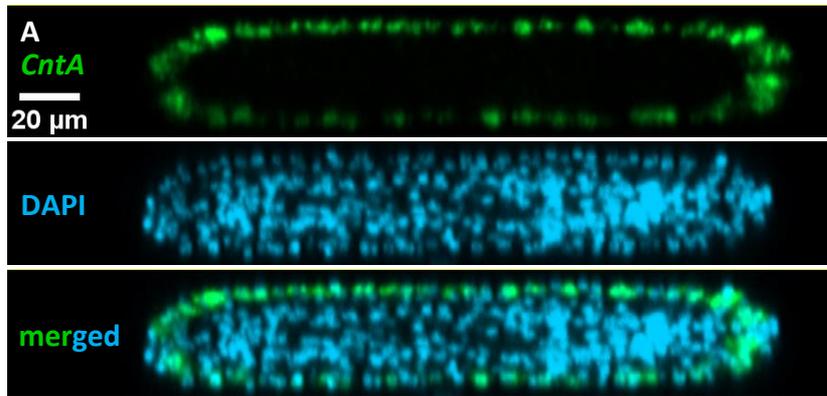
**Fig. 21. Control negativo de hibridación *in situ* con sonda *sense* de *SLC5*.** (A) A mayor ganancia, se observa claramente señal en testículos, más intensa que el ruido de fondo. (B) A mayor aumento se observa una ausencia total de señal sobre la superficie del parásito.

### 3.2) *CntA* se expresa superficialmente en cuello y estróbilo de *H. microstoma*.

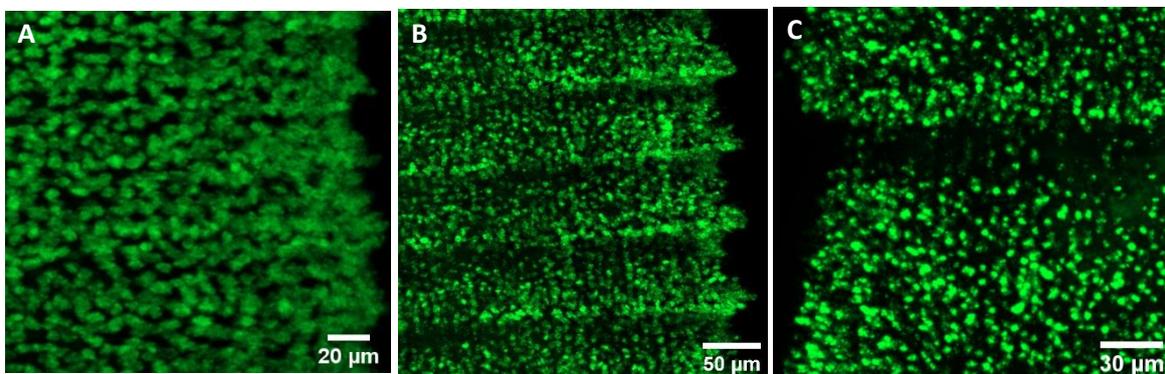
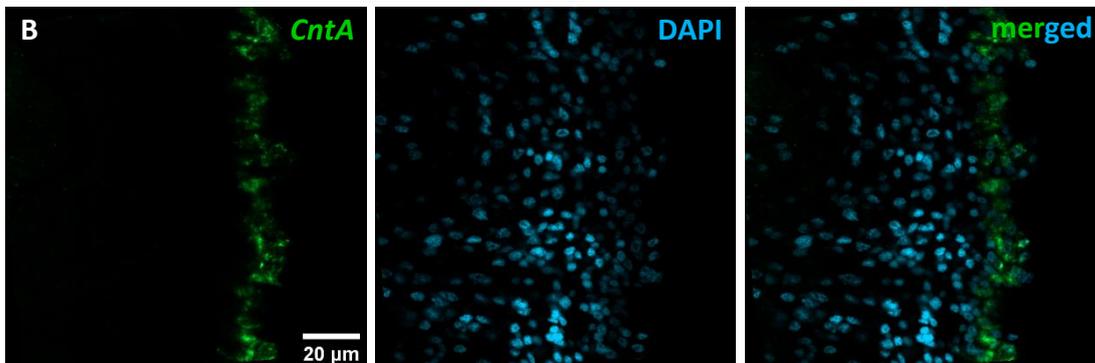
Como mencionamos en la Introducción, los experimentos realizados por otros autores, los análisis de homología y datos de RNA-Seq fundamentaban nuestra hipótesis sobre la expresión de *CntA* a nivel de tegumento. Los experimentos de hibridación *in situ* realizados en primera instancia, apoyan esta suposición.

*CntA* es un gen de alta expresión en cuello y estróbilo de adultos de *H. microstoma*. La expresión se da exclusivamente a nivel de la superficie del animal (Fig. 22), con intensidad constante a lo largo del estróbilo y distribución homogénea en los segmentos (Fig. 23). No todos los núcleos superficiales parecen tener señal de expresión del gen.

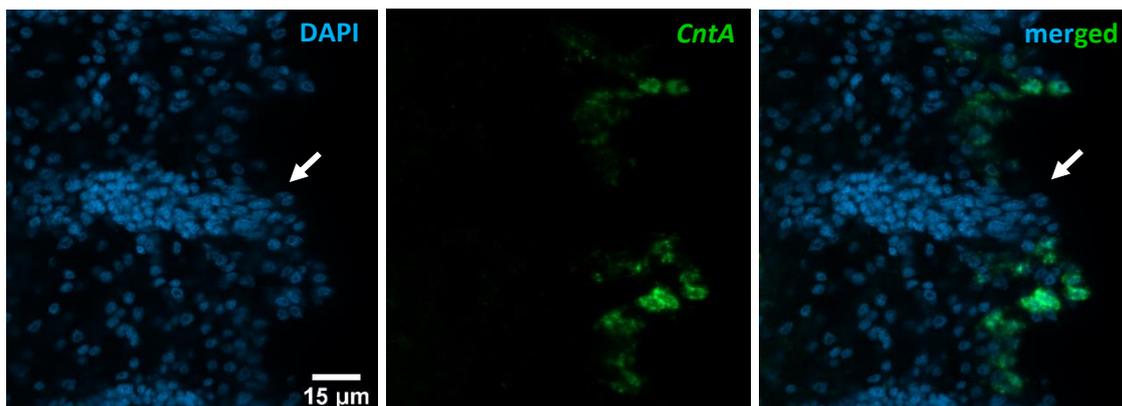
A menor aumento, se observa claramente que la expresión es similar en intensidad y distribución en cuello, segmentos tempranos, segmentos maduros y segmentos grávidos, y únicamente se interrumpe a nivel del poro genital (Fig. 23 y 24).



**Fig. 22.** Expresión superficial de *CntA* en *H. microstoma*. (A) Vista ortogonal de sección transversal del estróbilo de *H. microstoma* a nivel del cuello. Se aprecia la expresión superficial de *CntA*, detectada por hibridación *in situ*. (B) Señal superficial de *CntA* en segmentos tempranos del estróbilo.



**Fig. 23.** Intensidad y distribución de la expresión de *CntA* detectada por hibridación *in situ*. Z-Stacks de distintas regiones del estróbilo de *H. microstoma*. (A) Segmentos tempranos. (B) Segmentos maduros tempranos. (C) Segmentos grávidos tempranos. En todos los casos la señal es de intensidad similar, y distribución pareja en los segmentos.



**Fig. 24.** La señal de *CntA* se interrumpe a nivel del poro genital en cada segmento. Z-Stack evidenciando la interrupción de la señal de *CntA* en la apertura del poro genital. La flecha blanca señala el poro genital.

Sorprendentemente, no se observa prácticamente expresión del gen en el escólex (únicamente aparecen 10 células con señal, en la base del rostelo). La expresión comienza a observarse en el cuello del animal, lo que indica que existe una expresión diferencial de este gen en las diferentes partes de la región subtegumentaria (Fig. 25).

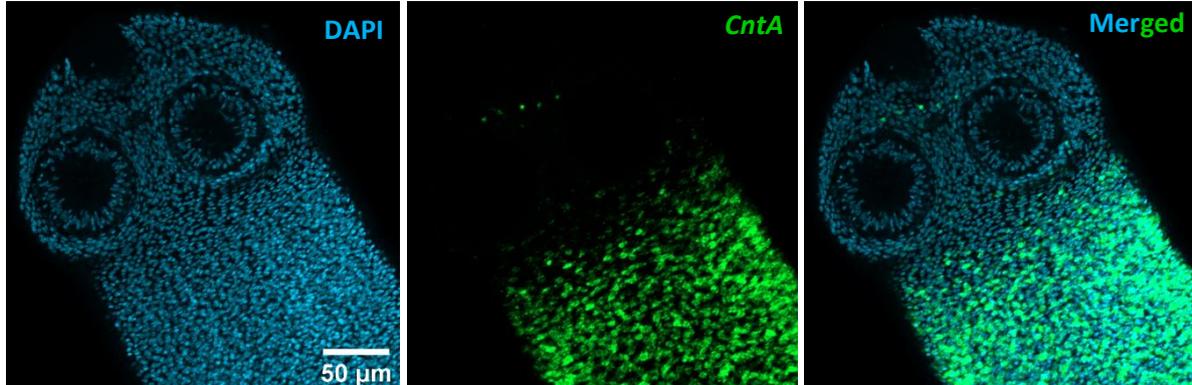


Fig. 25. *CntA* no se expresa en el escólex de *H. microstoma*. El ARNm del gen comienza a detectarse en el cuello del parásito.

La expresión ocurre siempre en la región subtegumentaria, donde se encuentran los citones, en ningún caso solapa con el tegumento distal observado con luz transmitida (Fig. 26), y, si bien la señal es mayormente citoplasmática, hay co-localización de puntos intensos de señal con núcleos (Fig. 27). Se desconocen qué mecanismos pueden estar reteniendo el ARNm en el núcleo, o regulando su salida hacia el citoplasma.

Fig. 26. El ARNm de *CntA* se localiza por debajo del tegumento distal. La marca fluorescente de hibridación *in situ* nunca se solapa con el sincitio del tegumento, que se observa como una franja bordeando los segmentos con microscopia de luz transmitida.

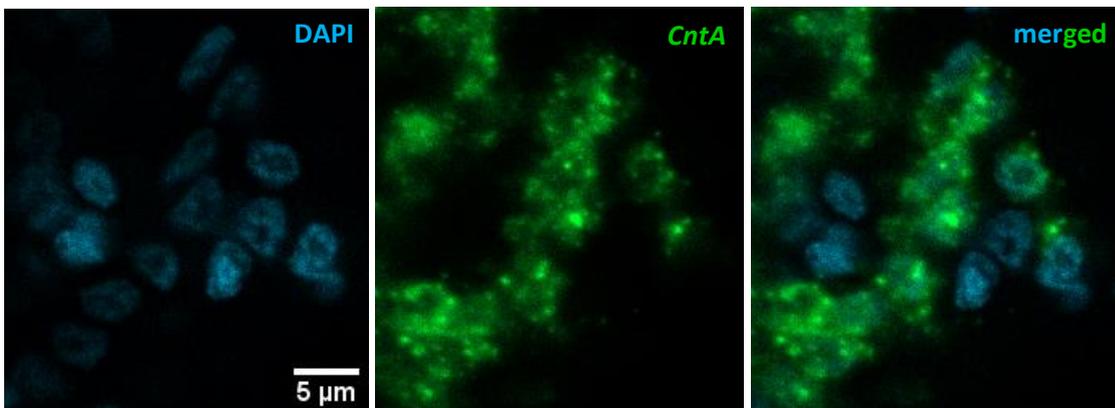
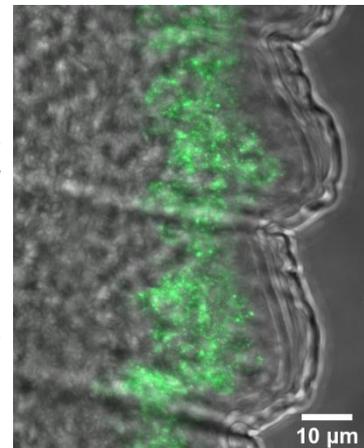
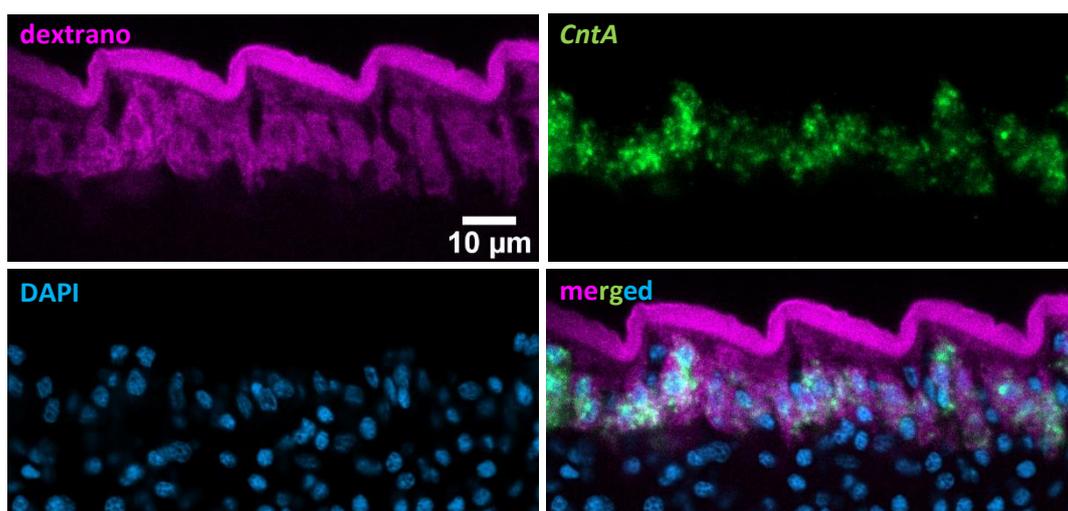


Fig. 27. Localización celular de la señal de *CntA*. La localización del ARNm de *CntA* es citoplasmática, aunque existen algunos puntos de señal intensa en el núcleo.

### 3.3) Co-localización de las marcas fluorescentes de dextrano y *CntA*

Dado que *CntA* se expresa en la superficie del parásito, la principal pregunta a responder es si las células positivas para *CntA* son tegumentarias. Para ello combinamos experimentos de marcado del tegumento con dextrano e hibridación *in situ*.

Se realizaron experimentos de hibridación *in situ* sobre adultos de *H. microstoma* previamente marcados con dextrano conjugado. Confirmando lo visto en los experimentos de hibridación *in situ* anteriores, no existe señal de *CntA* en el tegumento distal, tampoco parece llegar a los puentes citoplasmáticos (Fig. 28). Existe amplia co-localización de ambas marcas (Fig. 28) en los citones, en el espacio subtegumentario. La señal de *CntA* co-localiza siempre con la de dextrano, por lo que su expresión es exclusiva de células tegumentarias.



**Fig. 28.** *CntA* se expresa en los citones del tegumento. En este montaje se observa que la señal de *CntA* co-localiza siempre con la de dextrano asociada a los citones, en ningún caso alcanza el tegumento distal, y tampoco parece alcanzar los puentes citoplasmáticos. Además, la marca de *CntA* está presente en la gran mayoría, sino en todas, las células tegumentarias.

Cuantificamos cantidad de células Dx + con señal de *CntA* en núcleo y citoplasma en varios cortes ópticos de la región subtegumentaria del cuello y segmentos tempranos de dos gusanos adultos diferentes. Los resultados se observan en la Tabla 7.

**Tabla 7. Conteo de células dextrano-positivas (Dx +) y *CntA*-positivas (*CntA* +) en la región subtegumentaria de segmentos tempranos de *H. microstoma*.**

n	Corte óptico	Núcleos totales	Dx +	<i>CntA</i> +	Dx + y <i>CntA</i> +	Dx + y <i>CntA</i> -	Dx - y <i>CntA</i> +	% Dx + y <i>CntA</i> + Dx +	% Dx + y <i>CntA</i> + <i>CntA</i> +
1	A	57	27	27	27	0	0	100	100
	B	342	188	188	188	0	0	100	100
	C	51	24	24	24	0	0	100	100
2	A	86	46	46	46	0	0	100	100
	B	29	19	19	19	0	0	100	100
<b>Total</b>		<b>565</b>	<b>304</b>	<b>304</b>	<b>304</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

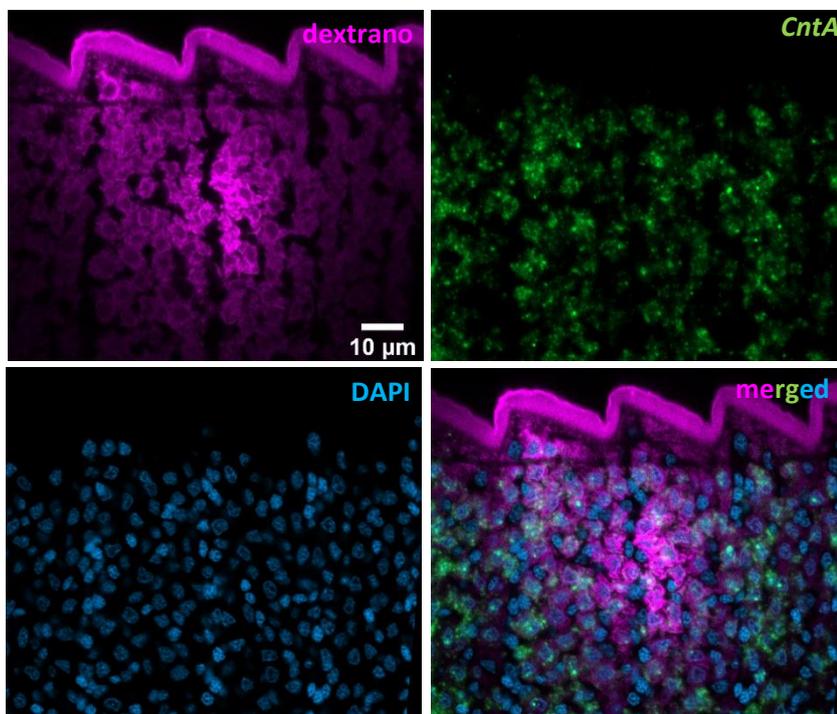
n, número de gusanos en que se cuantificó; Corte óptico, planos en que se cuantificó.

Según nuestras observaciones, *CntA* podría ser un buen marcador de citones de cuello y estróbilo de *H. microstoma*. Se trata de un gen de expresión exclusivamente tegumentaria, presente en todos los citones de dichas regiones, con un patrón parejo dentro de y entre segmentos (Fig. 29).

El ARNm de *CntA* parece estar restringido a los citones, sin alcanzar los puentes citoplasmáticos ni el sincitio. Si bien esto es coherente con el hecho sabido de que la síntesis de proteínas ocurre en los citones (Smyth y MacManus, 1989), los mecanismos que restringen la localización del ARNm a los citones aún no están descritos.

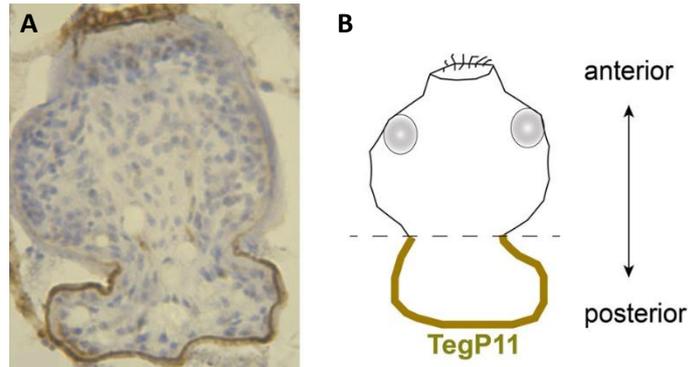
Sería sumamente interesante realizar experimentos de hibridación *in situ* en cisticercoides activados. Si bien probablemente no exista expresión del gen a nivel del escólex, podríamos determinar si la hay en la región posterior del cuerpo de la larva activada. Además, contar con un anticuerpo contra el transportador codificado por *CntA*, nos permitiría realizar experimentos de inmunofluorescencia en adultos de *H. microstoma* de diferentes edades y en cisticercoides con el fin de determinar la localización de la proteína.

Por la función conservada de los transportadores CNTs y por nuestros resultados, creemos que es altamente probable que la proteína se halle en la superficie de *H. microstoma*, más específicamente, en cuello y estróbilo. Sin embargo, quedan muchas interrogantes por responder, por ejemplo: ¿la proteína se encuentra en el tegumento distal del escólex? De encontrarse, ¿por qué no se produce en los citones del escólex? De no encontrarse, ¿por qué estos parásitos no absorben nucleósidos en el tegumento del escólex? ¿La proteína difunde en la membrana externa del sincitio o su localización se encuentra restringida? De ser así, ¿cuáles serían los mecanismos de restricción? Dado que no existen uniones intercelulares que definan dominios de membrana, otros mecanismos entrarían en juego.



**Fig. 29.** *CntA* como posible marcador de citones tegumentarios. Corte óptico cercano a la superficie de *H. microstoma*. *CntA* parece expresarse en forma pareja en todos los citones del cuello y estróbilo de *H. microstoma*, y su expresión parece estar restringida a células tegumentarias (no se observa señal en ninguna célula Dx -).

Hasta donde sabemos, solo existen dos reportes sobre localización diferencial de proteínas en el tegumento superficial en cestodos. El estudio de Holy et al (1991) será mencionado más adelante. El otro reporte existente involucra una proteína tegumentaria de *E. multilocularis*. Zheng et al (2018) demostraron que TegP11 varía su localización espacio-temporal durante el



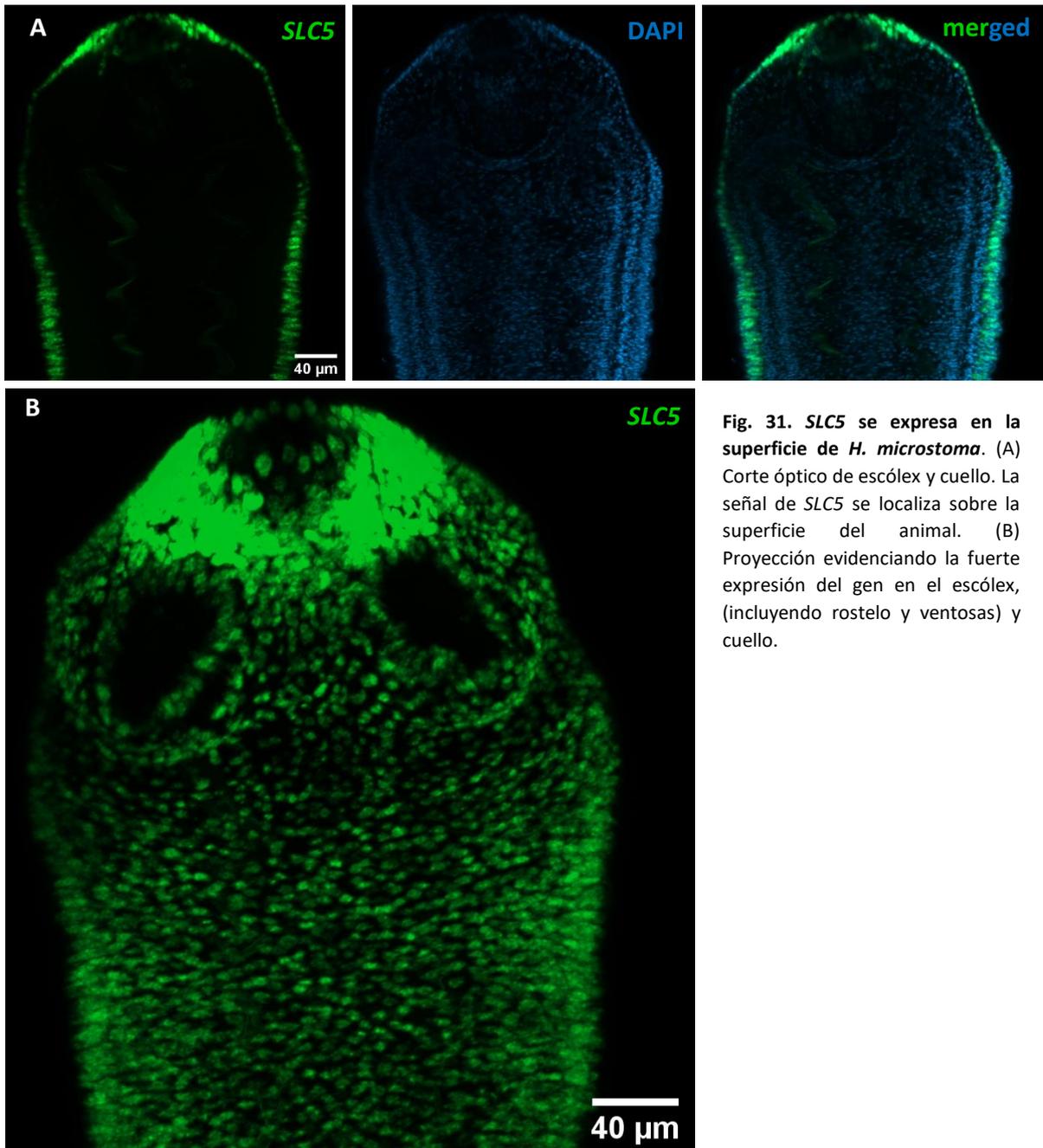
**Fig. 30 Localización de TegP11 en protoescólices de *E. multilocularis*.** (A) Inmunohistoquímica para detección de TegP11. (B) Esquema indicando la localización posterior de TegP11. El patrón de localización es similar al patrón de expresión de *CntA* en adultos de *H. microstoma*. Tomado y modificado de Zheng et al, 2018.

desarrollo de protoescólices, la forma infectiva de *E. multilocularis* para el hospedador definitivo, que se desarrolla como un brote invaginado en la pared de la vesícula que constituye una de las formas larvarias de la especie (Koziol et al, 2014). El protoescólex activado, como su nombre lo indica, consiste en un escólex y una región posterior pequeña. Zheng et al realizaron experimentos de inmunohistoquímica, y demostraron que TegP11 se localiza en la región posterior del protoescólex, y no en el escólex mismo (Fig. 30). Si bien se trata de un estadio aún no desarrollado, el patrón de localización de TegP11 es similar en sus características al patrón de localización del ARNm de *CntA* en adultos de *H. microstoma*, en el sentido de que existen dos regiones bien marcadas: una posterior con presencia de la proteína/expresión del gen, y una anterior, el escólex, sin presencia de la proteína/sin expresión del gen. Basándonos en estos dos estudios, podríamos especular sobre la existencia de al menos dos grandes dominios en el cuerpo de cestodos en cuanto a la expresión génica tegumentaria: escólex y estróbilo. Los mecanismos reguladores de tal patrón se desconocen.

#### 3.4) *SLC5* se expresa superficialmente en todo el cuerpo de *H. microstoma*.

Al igual que *CntA*, *SLC5* es un gen de alta expresión, cuyo ARNm se localiza en la superficie del parásito (Fig. 31A). *SLC5* se expresa fuerte y homogéneamente en cabeza, cuello y estróbilo. El gen se expresa en toda la superficie del escólex, incluyendo ventosas y rostelo, y la señal continúa de manera ininterrumpida en el cuello y estróbilo (Fig. 31B).

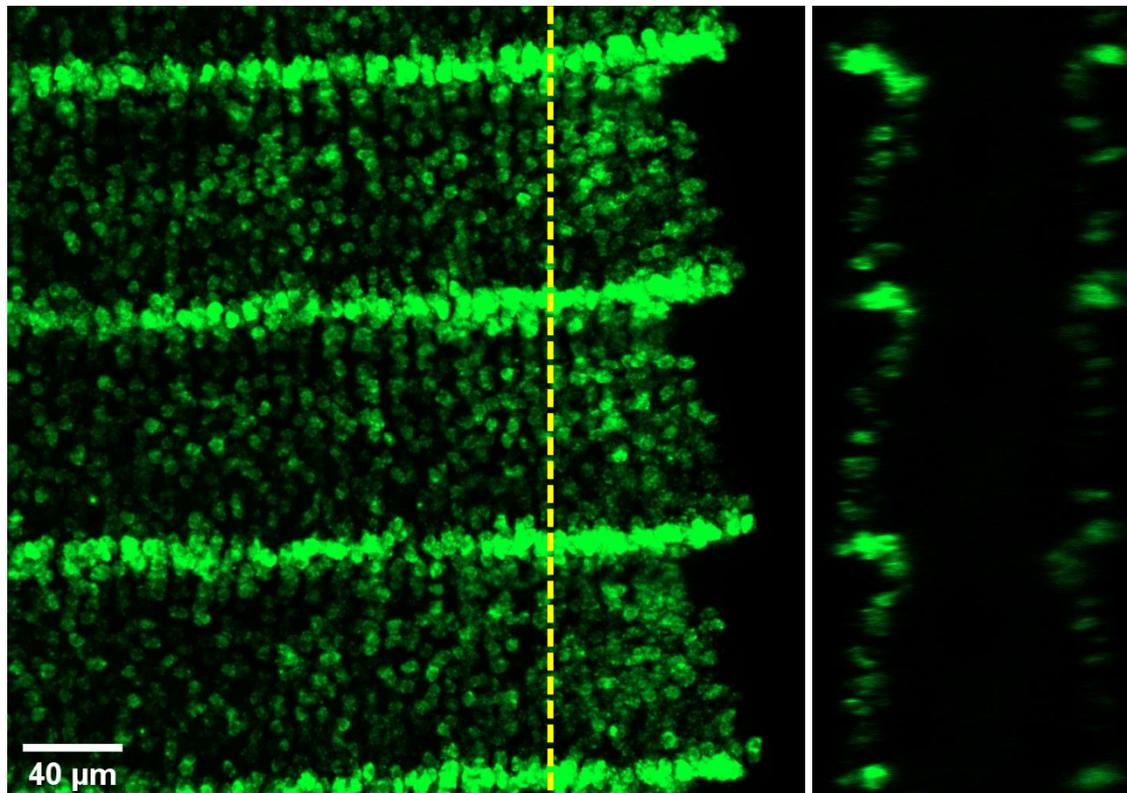
A partir de segmentos maduros tempranos y en dirección posterior del estróbilo, se comienza a apreciar una franja de células con mayor intensidad de señal en el pliegue delimitante de cada segmento (Fig. 32). Esto podría indicar expresión diferencial de *SLC5* en el tegumento que recubre cada segmento.



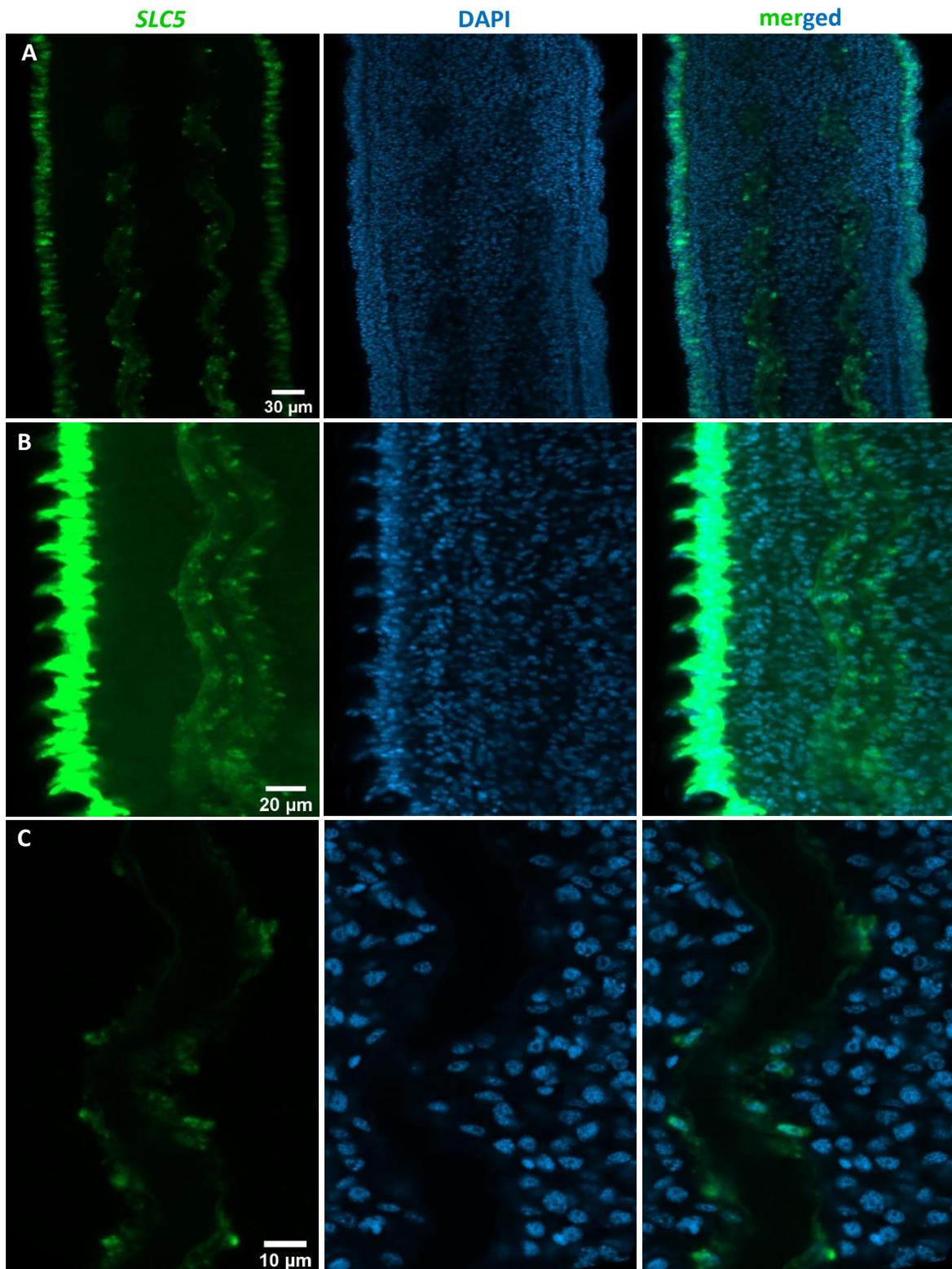
**Fig. 31. SLC5 se expresa en la superficie de *H. microstoma*.** (A) Corte óptico de escólex y cuello. La señal de SLC5 se localiza sobre la superficie del animal. (B) Proyección evidenciando la fuerte expresión del gen en el escólex, (incluyendo rostelo y ventosas) y cuello.

Por otra parte, aunque con menor intensidad, hay señal en células de los conductos excretores a partir de segmentos tempranos y en dirección posterior del estróbilo (Fig. 33). No se observó señal en conductos de cabeza ni cuello. El sistema excretor en cestodos, consiste en cuatro canales longitudinales: un par dorsolateral y un par ventrolateral, que se unen en la base del rostelo, y sirven a modo de drenaje de un sistema de finos túbulos capilares, cada uno de los cuales termina en una célula flamígera. Las paredes de los canales son sincitiales, con los cuerpos celulares correspondientes inmersos en el parénquima adyacente. En este aspecto, el sistema excretor de cestodos difiere del de planarias, donde los canales son de naturaleza celular, con desmosomas en las uniones intercelulares (Lumsden y Specian, 1980).

Dado que los carbohidratos son la fuente principal de energía de cestodos, y los antecedentes mencionados en la Introducción sobre la presencia de ortólogos de *SLC5* en protonefridios de planarias (Thi-Kim Vu et al, 2015) y en riñón de otros animales (Wright, 2013), no es de extrañar la expresión de este gen en los conductos excretores de *H. microstoma*. Sin embargo, se trata de una señal muy tenue en comparación con la de la superficie del parásito. Una vez más, el paso siguiente sería evaluar la distribución del transportador mediante inmunofluorescencia en las distintas regiones del cuerpo.



**Fig. 32.** La señal de *SLC5* es más intensa en los pliegues que marcan el límite de los segmentos. (A) Z-Stack que permite apreciar la fila de células con mayor expresión de *SLC5* en segmentos maduros tempranos. La línea punteada amarilla indica el corte óptico observado en B. (B) Vista ortogonal donde se aprecia la mayor intensidad de señal en los pliegues del estróbilo.



**Fig. 33. Expresión de *SLC5* en conductos excretores de *H. microstoma*.** (A) Señal de *SLC5* en conductos excretores ventrolaterales, en segmentos tempranos del estróbilo. (B) A mayor aumento, se observa la diferencia de intensidades con la señal de la superficie. (C) Detalle donde se observa la co-localización de la señal con ciertos núcleos.

Al igual que en *CntA*, la señal se interrumpe en el poro genital (Fig. 34). A nivel celular, la señal se encuentra siempre en la región subtegumentaria, donde se encuentran los citones, no solapa con el tegumento distal, y se localiza en el citoplasma, con puntos intensos en algunos núcleos (Fig. 35).

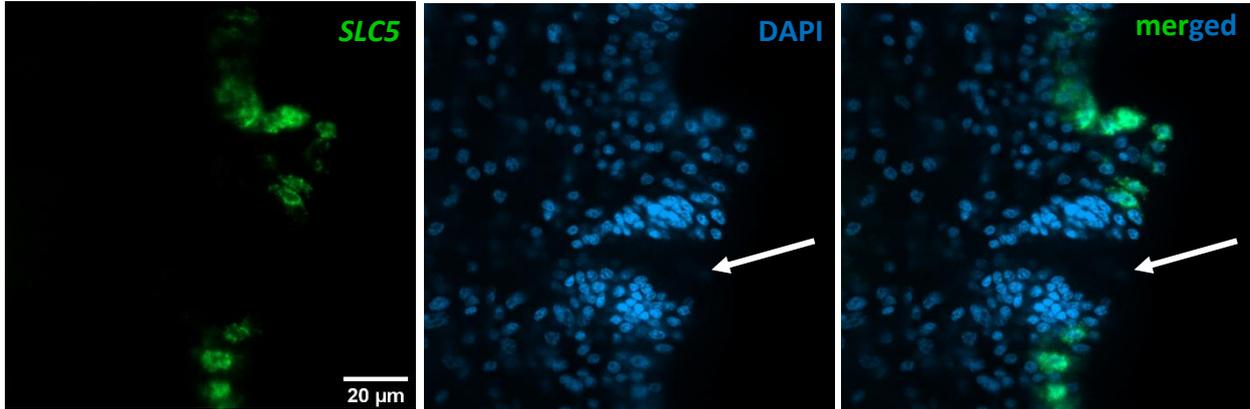


Fig. 34. La señal de *SLC5* se interrumpe en el poro genital de cada segmento.

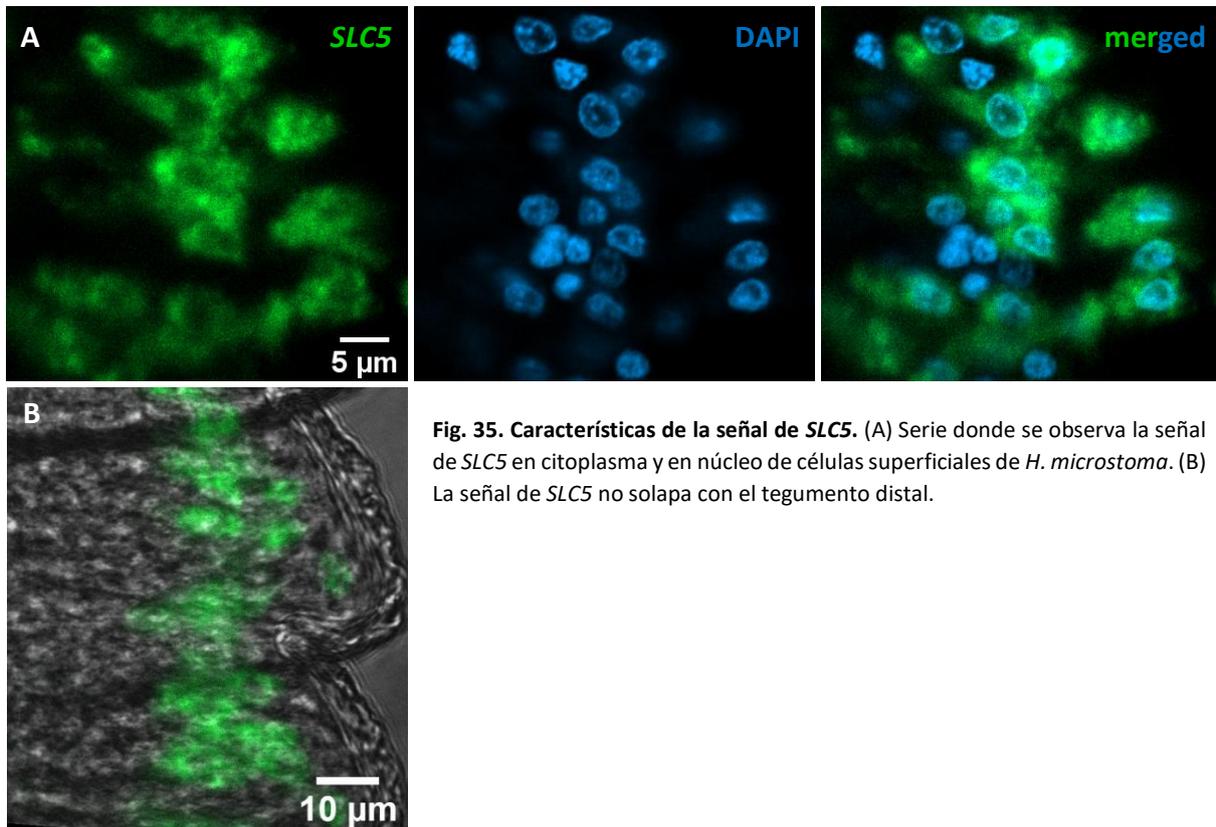
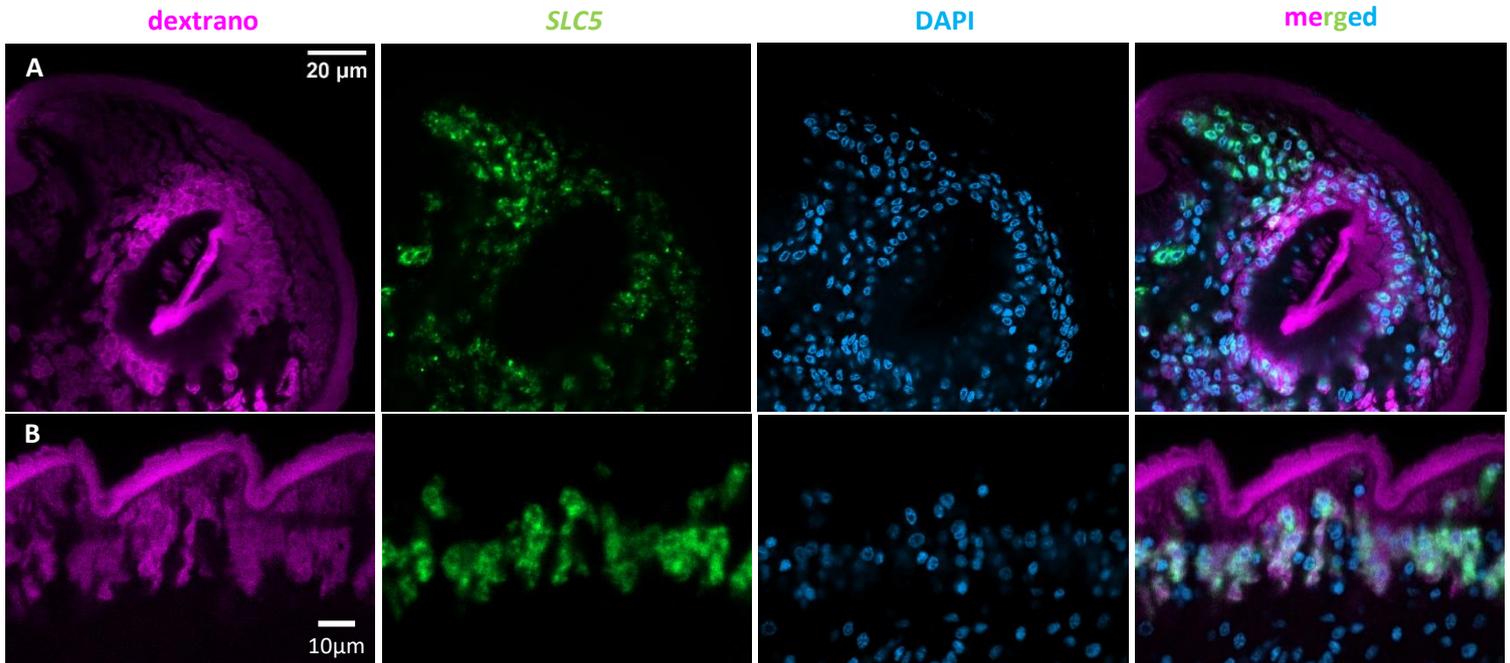


Fig. 35. Características de la señal de *SLC5*. (A) Serie donde se observa la señal de *SLC5* en citoplasma y en núcleo de células superficiales de *H. microstoma*. (B) La señal de *SLC5* no solapa con el tegumento distal.

Los resultados presentados aquí son coherentes con los resultados de los experimentos mencionados en la Introducción, que sugieren la presencia de al menos un transportador activo de glucosa en el tegumento de distintas especies de cestodos, y ciertamente apoyan nuestra hipótesis sobre la expresión tegumentaria de *SLC5* en *H. microstoma*.

### 3.5) Co-localización de las marcas fluorescentes de dextrano y *SLC5*

Adultos de *H. microstoma* fueron marcados con dextrano y utilizados en experimentos de hibridación *in situ* para confirmar la expresión de *SLC5* en células tegumentarias. Coherentemente con lo observado en los experimentos de hibridación *in situ* anteriores, no existe co-localización de la marca de *SLC5* con el tegumento distal. Tampoco parece alcanzar los puentes citoplasmáticos. La co-localización existe a nivel de citones. Al igual que para *CntA*, la señal superficial de *SLC5* siempre co-localiza con señal de dextrano (Fig. 36) lo que implica que, a nivel de la superficie, se expresa únicamente en células tegumentarias.



**Fig. 36.** *SLC5* se expresa en los cuerpos celulares unidos al tegumento de *H. microstoma*. La señal de *SLC5* siempre co-localiza con la señal de dextrano de los citones, por lo que su expresión es tegumentaria. No se observa señal en el tegumento distal ni en los puentes citoplasmáticos. (A) Expresión en el escólex, con señal en células del rostelo y de las ventosas. (B) Expresión en segmentos tempranos.

Realizamos la cuantificación de células Dx + con señal de *SLC5* (*SLC5* +) en varios cortes ópticos de dos individuos (Tabla 8).

Nuestras observaciones coinciden nuevamente con el modelo aceptado para la síntesis y el tráfico de proteínas en el tegumento de cestodos, donde las proteínas son sintetizadas en los citones, y transportadas a través de los puentes citoplasmáticos hasta el sincitio. *SLC5* es un gen de expresión tegumentaria, y puede ser un buen marcador de citones, ya que se expresa intensamente en todo el cuerpo del parásito.

Estas observaciones apoyan nuestra hipótesis sobre la presencia de un transportador de glucosa en la superficie de *H. microstoma*.

**Tabla 8. Conteo de células dextrano-positivas (Dx +) y SLC5-positivas (SLC5 +) en la región subtegumentaria de segmentos tempranos de *H. microstoma*.**

n	Corte óptico	Núcleos totales	Dx +	SLC5 +	Dx + y SLC5 +	Dx + y SLC5 -	Dx - y SLC5 +	%	%
								Dx + y SLC5 +	Dx + y SLC5 +
1	A	62	30	30	30	0	0	100	100
	B	82	52	52	52	0	0	100	100
	C	122	68	66	66	2	0	97	100
2	A	204	164	162	162	2	0	99	100
	B	221	190	187	187	3	0	98	100
	C	38	16	16	16	0	0	100	100
	D	62	32	31	31	1	0	97	100
<b>Total</b>		<b>791</b>	<b>552</b>	<b>544</b>	<b>544</b>	<b>8</b>	<b>0</b>	<b>99</b>	<b>100</b>

n, número de gusanos en que se cuantificó; Corte óptico, planos en que se cuantificó.

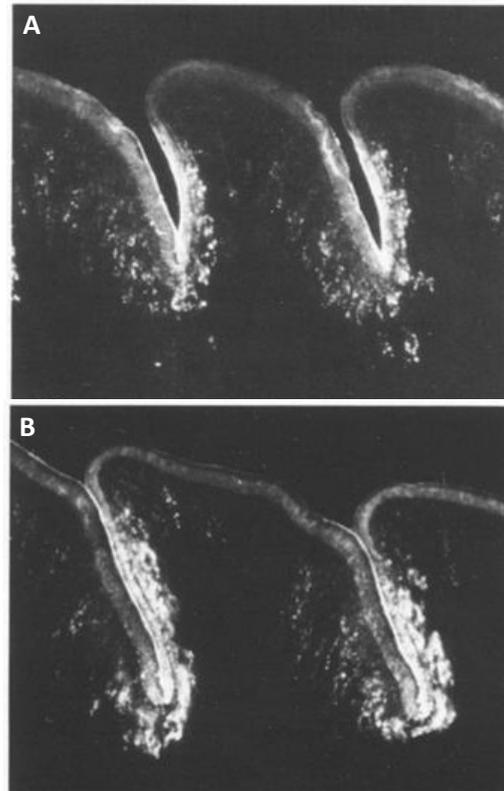
A diferencia de *CntA*, *SLC5* se expresa en todo el escólex (Fig. 31 y 36), lo que era esperable dados los experimentos mencionados en la Introducción sobre cisticercoides intactos y activados, que indicaban la presencia de un sistema de transporte de glucosa activo en el escólex recién evaginado. Sin duda, un próximo paso podría ser la realización de experimentos de WMISH sobre cisticercoides recién activados. En este sentido, dado el reporte de Rosen et al (1994) sobre los dos incrementos abruptos en el transporte de glucosa luego de la activación de cisticercoides, sería bueno realizar WMISH a distintos tiempos post-activación, manteniendo las larvas activadas en cultivo. Esto permitiría aclarar parcialmente el proceso que lleva a los dos incrementos abruptos, y responder algunas preguntas como ¿el transportador codificado por *SLC5* está involucrado en el proceso? ¿Está el ARNm de *SLC5* ya sintetizado y listo para ser traducido durante la activación? ¿O tal vez parte de la proteína ya esté en la superficie del escólex para ese momento? La desaparición del segundo incremento pero no del primero en medios sin calcio sugiere que los nuevos transportadores, responsables del segundo incremento en la absorción, están asociados a vesículas citoplasmáticas en el tegumento, que se fusionan con la membrana externa, proceso dependiente de calcio en muchos animales. Esto implicaría que los transportadores responsables del primer incremento ya estarían localizados en la membrana externa, por lo que su actividad no dependería del calcio presente en el medio (Rosen et al, 1994).

En relación a esto último, otra vez, sería de enorme interés contar con un anticuerpo anti-*SLC5*, para poder analizar la distribución del transportador.

Si bien *SLC5* se expresa en cabeza, cuello y estróbilo, no dando lugar a grandes dominios de expresión como *CntA*, observamos una hilera de células con señal más intensa sobre el borde posterior de cada segmento, desde segmentos maduros tempranos en dirección posterior del estróbilo. Esto sugiere cierto grado de expresión diferencial de *SLC5*, con una subpoblación de citones en cada segmento que presenta mayor intensidad de señal. Este patrón remite al trabajo realizado por Holy et al (1991), quienes desarrollaron anticuerpos monoclonales contra

preparaciones de tegumento de *H. diminuta*. Realizaron experimentos de inmunofluorescencia y sus resultados sugieren la existencia de subpoblaciones de citones con distintos perfiles de expresión génica. En particular, uno de los anticuerpos que utilizaron, marca el tegumento distal y los citones de los pliegues que indican los límites entre segmentos en la parte medio-posterior del estróbilo (Fig. 37). La marca en los citones varía según la posición en el estróbilo y la edad del gusano. Si bien se trata de experimentos de detección de proteínas, y, hasta donde sabemos, los autores no identificaron las proteínas detectadas por los anticuerpos que produjeron, es inevitable encontrar similitudes entre el patrón mencionado con el observado para el mensajero de *SLC5*. Más allá de este antecedente, nuestras observaciones indican una posible expresión diferencial de *SLC5* dentro de cada segmento, condicionada por la madurez del mismo. Experimentos de inmunofluorescencia permitirían determinar si la distribución del transportador coincide con el patrón de localización espacio-temporal del ARNm. A su vez, sería bueno realizar estos experimentos en gusanos de diferentes edades, para determinar si existe un componente relacionado con esta variable en los patrones de expresión observados.

Por último, para ampliar el panorama sobre el transporte de glucosa en cestodos, sería interesante identificar por homología posibles transportadores por difusión facilitada, como los descritos para *T. crassiceps* (Rodríguez-Contreras et al, 1998) y *E. multilocularis* (Kashiide et al, 2018). Experimentos de WMISH complementarían y aportarían enormemente a la comprensión global del transporte de glucosa en cestodos.



**Fig. 37. Resultados de inmunofluorescencia con el anticuerpo MAB-7.** Los autores desarrollaron anticuerpos monoclonales contra antígenos tegumentarios desconocidos. Uno de estos anticuerpos, MAB-7, produce un patrón de señal similar al de WMISH para *SLC5*. Tomado y modificado de Holy et al, 1991.

## CONCLUSIONES FINALES

Demostramos la expresión de *CntA* y *SLC5*, dos genes candidatos de cotransportadores de nucleósidos y glucosa, respectivamente, en el tegumento de *H. microstoma*.

Si bien ambos genes se expresan en el tegumento, presentan dos patrones de expresión muy diferentes. *CntA* se expresa de forma pareja en los citones a lo largo del cuello y estróbilo, pero no en el escólex. *SLC5*, en cambio, se expresa en todo el cuerpo del parásito, presentando una franja de mayor expresión en el borde posterior de cada segmento a partir de los segmentos maduros tempranos. Ya existen reportes que sugieren la existencia de subpoblaciones de citones con distintos perfiles de expresión génica. En este trabajo encontramos al menos tres perfiles de expresión génica distintos: células tegumentarias con expresión de *SLC5* pero no de *CntA* (presentes en el escólex), células tegumentarias con expresión de ambos genes (en cuello y estróbilo), y células tegumentarias con expresión de *CntA* y mayor expresión de *SLC5* (en el borde posterior de segmentos, dependiendo de su madurez). Para *CntA* en particular, aparecen dos grandes y evidentes dominios de regulación de su expresión: escólex y resto del cuerpo.

Estos resultados generan interrogantes sobre qué mecanismos están actuando en la regulación génica de estos genes en cada región corporal. También surgen preguntas sobre las implicancias evolutivas y fisiológicas de la ausencia de expresión de *CntA* en el escólex por una parte, y de la intensificación en la expresión de *SLC5* en el borde posterior de los segmentos por otra.

Estas interrogantes, a su vez, imponen la necesidad de determinar la localización de las proteínas codificadas por ambos genes. ¿Las proteínas alcanzan la superficie del parásito? Asumiendo que sí lo hacen, una vez en la membrana plasmática distal ¿difunden libremente o encuentran su localización restringida a ciertos lugares?

Por otra parte, hace falta caracterizar funcionalmente estos supuestos cotransportadores. Una estrategia muy utilizada para el análisis funcional de proteínas es la expresión en sistemas heterólogos como, por ejemplo, para el caso de transportadores, el sistema del ovocito de *Xenopus*. Estos ovocitos tienen la notable particularidad de ser prácticamente impermeables, lo que los vuelve ideales para estudios funcionales de proteínas candidatas de transportadores y/o canales. A grandes rasgos, el experimento consistiría en inyectar el ARNm de interés en el ovocito, incubarlo en medio con sustrato marcado radiactivamente (nucleósidos o glucosa), lisarlo, y medir la radiactividad del lisado. La cinética del transporte se evalúa variando la concentración de sustrato en el medio. La potencialidad de este tipo de experimentos, en nuestro caso, es enorme. Por mencionar algunas ideas, podría evaluarse el requerimiento de sodio para la actividad de ambos cotransportadores, la capacidad de transporte a concentraciones de sustrato fisiológicas, y el efecto de distintos inhibidores.

Otro paso a dar, sin dudas, es la identificación de ortólogos de *CntA* y *SLC5* en cestodos de importancia para la salud humana, como *Echinococcus spp.* y *Taenia spp.*

Es necesario realizar experimentos como los reportados en este trabajo para demostrar la presencia de ortólogos de estos genes en otros cestodos, y evaluar su expresión en los distintos estadios del ciclo de vida, dado que los cestodos de mayor relevancia para la salud son los que infectan al humano y a animales domésticos en estadios larvarios.

En cestodos típicos, como *H. microstoma*, la segunda forma larvaria consiste en un escólex como el de adultos, con una región corporal posterior no segmentada. *Echinococcus spp.*, en cambio, tiene un estadio larvario de características únicas en cuanto a su morfología y desarrollo, que consiste en una vesícula llena de fluido, el fluido hidático, con una capa de células, la capa germinal, que incluye un tegumento sincitial recubriendo la vesícula. El tegumento sintetiza y secreta la capa laminar, una capa acelular externa rica en carbohidratos. La capa germinal forma engrosamientos que se invaginan en la vesícula, formando cápsulas donde se desarrollan los protoescólices (Brehm y Koziol, 2017). Esta forma larvaria vesicular es la que se desarrolla en hospedadores intermediarios, como el humano.

Mientras que en *E. granulosus* la oncósfera se desarrolla y forma una sola vesícula que puede crecer hasta superar los 20 centímetros de diámetro, en *E. multilocularis* se genera una vesícula de la cual brotan nuevas, generando un laberinto de vesículas interconectadas (Brehm y Koziol, 2017).

Como se mencionó en la Introducción, no existe la vía de transporte paracelular a través del tegumento, por su naturaleza sincitial, por lo que los solutos deben ingresar a la vesícula por transporte transcelular. A su vez, las células de la capa germinal carecen de uniones estrechas, por lo que el tegumento es la única barrera entre los fluidos del hospedador y los espacios intercelulares del parásito, incluyendo el fluido hidático (Brehm y Koziol, 2017).

El fluido hidático de las vesículas acumula nutrientes, como aminoácidos y glucosa, a concentraciones similares o mayores a las del suero del hospedador, por lo que puede pensarse como un reservorio de nutrientes para el parásito (Brehm y Koziol, 2017). Ritler et al (2019), midieron la “huella metabólica” de vesículas de *E. multilocularis* midiendo las concentraciones de solutos en el medio de cultivo luego de un tiempo de incubación. Hallaron que, de todos los solutos investigados, la glucosa mostró la mayor reducción de concentración, luego de 72 horas de incubación de vesículas en el medio, lo que indica que el parásito está absorbiendo este nutriente. Sin embargo, la concentración de glucosa en el líquido hidático fue menor que la hallada en el medio de cultivo, por lo que, si bien es claro que el parásito está absorbiendo este nutriente, no se puede concluir sobre si lo hace por un proceso de transporte activo o pasivo. Vale aclarar que en condiciones *in vivo*, la concentración de glucosa en el entorno del parásito probablemente sea menor que la del medio de cultivo utilizado en el estudio, por lo que es probable que estén actuando mecanismos de transporte activo.

Si bien se desconoce cómo son transportadas las macromoléculas desde el hospedador hasta el fluido hidático, se sabe que el tegumento recubriendo la vesícula es la principal barrera para dicho pasaje. Según nuestros resultados y datos

transcriptómicos de *E. multilocularis*, que indican que el ortólogo de *SLC5* en esta especie se expresa en el tegumento de vesículas larvarias, creemos que este gen es un gran candidato a estar involucrado en la absorción de glucosa por parte de las vesículas. De confirmarse su expresión en el tegumento de esta forma larvaria, este transportador sería un buen candidato a blanco de drogas que interfieran con la captación de glucosa, la principal fuente de energía de estos parásitos.

Por otra parte, no existen reportes sobre la presencia de nucleósidos en el fluido hidático. A diferencia de lo encontrado para *H. microstoma*, donde uno de los dos genes ortólogos de SLC28 (CNTs) se expresa masivamente en adultos (*CntA*) y el otro en larvas y huevos, datos transcriptómicos de *E. multilocularis* indican la presencia de dos ortólogos de la familia SLC28, uno de ellos, ortólogo de nuestro *CntA*, parece expresarse en adultos, así como también en el tegumento de vesículas larvarias y en protoescólices activados, mientras que el otro ortólogo no parece tener expresión significativa en ningún estadio del parásito. Quizás *E. multilocularis* se sirva únicamente del ortólogo de *CntA* durante todo su ciclo de vida, lo que vuelve aún más interesante el análisis de la expresión de ortólogos de *CntA* en todos los estadios de vida de este parásito. Como se mencionó anteriormente, los cestodos se valen de un solo tipo de células proliferantes, las células germinativas, por lo que también sería interesante explorar el impacto de *CntA* sobre la síntesis de ADN y la proliferación de estas células tanto en vesículas de *E. multilocularis* como en cisticercoides y adultos de *H. microstoma*. Este podría ser otro camino interesante a seguir en la búsqueda de nuevas drogas contra infecciones por *Echinococcus spp.*

Este trabajo representa un puntapié inicial de líneas de investigación relacionadas con los procesos de captación de nutrientes por el tegumento de cestodos. De encontrarse en la superficie de estos parásitos, y debido a los roles preponderantes que suponemos tienen en la absorción de nutrientes, los cotransportadores codificados por *CntA* y *SLC5* serían excelentes candidatos a blanco de la acción de drogas.

## **Agradecimientos**

A Uriel, quién se sobrepuso a su nombre extraño y pudo convertirse en un genio (hacés todo bien, excepto jugar al ping pong). Si me tomara en serio esto de agradecer, tendría que dedicarte como mínimo 3 carillas... Gracias por convertir esta etapa que se suponía debía ser de cierre, en un comienzo.

A Jime, por los consejos, ayuda y buena disposición en todo momento. Y por decirme con tanta delicadeza que había aplastado aquel valioso escólex.

A Mati, por la ayuda, por su generosidad casi infinita, y por prestarme un poco de su calma. Todos a la m...

A los tres, gracias por hacerme un lugar, y por la catarata de oportunidades.

A todos en la Sección Biología celular, gracias por los almuerzos, el english day, el campeonato de ping pong, y por hacer que el piso 7 sea un lugar genial para aprender y trabajar.

Por último, a mis padres, porque sin ellos no estaría aquí, literalmente. Y a mi hermano, por su constante buen humor y sus incesables demostraciones de cariño. Gracias por bancarme un poco más de la cuenta, mientras buscaba un camino nuevo. Creo que lo encontré.

## Referencias

Arme, C., Middleton, A., Scott, J. P. (1973) Absorption of glucose and sodium acetate by cysticeroid larvae of *Hymenolepis diminuta*. The Journal of Parasitology, 59(1):214.

Baguña, J., Riutort, M. (2004). Molecular phylogeny of the Platyhelminthes. Canadian Journal of Zoology, 82: 168–193.

Brehm, K., Koziol, U. (2017). *Echinococcus*-Host interactions at cellular and molecular levels. Advances in Parasitology, 95: 147-212.

Budke, C. M., Deplazes, P., Torgerson, P. R. (2006). Global socioeconomic impact of Cystic Echinococcosis. Emerging Infectious Diseases, 12: 296–303.

Burt, M. D. B. (1980) Aspects of the life history of and systematics of *Hymenolepis diminuta*. In: Arai, H (Ed.), Biology of the tapeworm *Hymenolepis diminuta*, Academic Press, New York.

Collins, J. J., Wendt, G. R., Iyer, H., Newmark, P. A. (2016) Stem cell progeny contribute to the schistosome host-parasite interface. eLife, 5:e12473.

Cunningham, L.J., Olson, P.D. (2010) Description of *Hymenolepis microstoma* (Nottingham strain): a classical tapeworm model for research in the genomic era. Parasites & Vectors 3: 123.

de Ryke, P. H. (1966) Development of the cestodes *Hymenolepis microstoma* in *Mus musculus*. Zeitschrift für Parasitenkunde 27: 350-354.

Eckert, J., Deplazes, P. (2004) Biological, Epidemiological, and Clinical Aspects of Echinococcosis, a Zoonosis of Increasing Concern. Clinical Microbiology Reviews, 17: 107–135.

Ehlers, U. (1985) Das Phylogenetische System der Plathelminthes. Gustav Fischer, Stuttgart, Germany.

Esteves, A., Señorale, M., Ehrich, R. (2002) A tropomyosin gene is differentially expressed in the larval stage of *Echinococcus granulosus*. Parasitology Research, 89:501-502.

Fan, P. C. (2005) Infectivity and development of the human strain of *Hymenolepis nana* in ICR mice. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 36(1):97-102.

Gustafsson, M. K. (1976) Observations on the histogenesis of nervous tissue in *Diphyllobothrium dendriticum* Nitzsch (Cestoda, Pseudophyllidea). Zeitschrift für Parasitenkunde 50:313-321.

Halton, D. W. (1997) Nutritional adaptations to parasitism within the Platyhelminthes. International Journal for Parasitology. 27: 693-704.

Holy, J. M., Oaks, J. A., Mika-Grieve, M., Grieve, R. (1991) Development and dynamics of regional specialization within the syncytial epidermis of the rat tapeworm, *Hymenolepis diminuta*. Parasitology Research, 77:161-172.

- Hotez, J. P., Brindley, P. J., Bethony, J. M., King, C. H., Pearce, E. J., Jacobson, J. (2008). Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, 118: 1311-1321.
- Issigonis, M., Newmark, P. A., (2015) Planarian 'kidneys' go with the flow. *eLife*, 4:e09353.
- Kashiide, T., Kikuta, S., Yamaguchi, M., Irie, T., Kouguchi, H., Yagi, K., Matsumoto, J. (2018) Molecular and functional characterization of glucose transporter genes of the fox tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 225:7-14.
- Koziol, U., Domínguez, M. F., Marín, M., Kun, A., Castillo, E. (2010) Stem cell proliferation during *in vitro* development of the model cestode *Mesocestoides corti* from larva to adult worm. *Frontiers in Zoology*, 7:22.
- Koziol, U., Costábile, A., Domínguez, M. F., Iriarte, A., Alvite, G., Kun, A., Castillo, E. (2011) Developmental expresión of high molecular weight tropomyosin isoforms in *Mesocestoides corti*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 175: 181-191.
- Koziol, U., Rauschendorfer, T., Zanon Rodríguez, L., Krohne, G., Brehm, K. (2014). The unique stem cell system of the immortal larva of the human parasite *Echinococcus multilocularis*. *EvoDevo*, 5:10.
- Koziol, U. (2017). Evolutionary developmental biology (evo-devo) of cestodes. *Experimental Parasitology*. 180:84-100.
- Littlewood, D. T. J. (2006). The Evolution of Parasitism in Flatworms. In: Maule, A. G. and Marks N. J. (Ed.), *Parasitic Flatworms: molecular biology, biochemistry, immunology and physiology*. CAB International, UK.
- Lumsden, R. D., Specian, R. (1980). The morphology, histology, and fine structure of the adult stage of the cyclophyllidean tapeworm *Hymenolepis diminuta*. In: Arai, H. (Ed.), *Biology of the tapeworm Hymenolepis diminuta*, Academic Press, New York.
- MacInnis, A. J., Fisher, F. M., Read, C. P. (1965) Membrane transport of purines and pyrimidines in a cestode. *The Journal of Parasitology*, 51(2):260-287.
- MacInnis, A. J., Ridley, R. K. (1969) The molecular configuration of pyrimidines that causes allosteric activation of uracil transport in *Hymenolepis diminuta*. *The Journal of Parasitology*, 55(6):1134-1140.
- McCracken, R. O., Lumsden, R. D., Page, C. R. (1975) Sodium-sensitive nucleoside transport by *Hymenolepis diminuta*. *The Journal of Parasitology*, 61(6):999-1005.
- Page, C. R., MacInnis, A. J. (1975) Characterization of nucleoside transport in hymenolepidid cestodes. *The Journal of Parasitology*, 61(2):281-290.
- Pappas, P. W., Uglem, G. L., Read, C. P. (1973) *Taenia crassiceps*: absorption of hexoses and partial characterization of Na<sup>+</sup>-dependent glucose absorption by larvae. *Experimental Parasitology*, 33:127-137.

- Pappas, P. W., Uglem, G. L., Read, C. P. (1974) Anion and cation requirements for glucose and methionine accumulation by *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). *Biological Bulletin*, 146:56-66.
- Pappas, P. W., Freeman, B. A. (1975) Sodium-dependent glucose transport in the mouse bile duct tapeworm, *Hymenolepis microstoma*. *The Journal of Parasitology*, 61(3):434-439.
- Podesta, R. D. (1980). Concepts of membrane biology in *Hymenolepis diminuta*. *Biology of the tapeworm Hymenolepis diminuta*, 505-549.
- Prieto, D., Aparicio, G., Morande, P. E., Zolessi, F. R. (2014) A fast, low cost, and highly efficient fluorescent DNA labeling method using methyl green. *Histochemistry and Cell Biology*, 142(3), 335-345.
- Ritler, D., Rufener, R., Li, J. V., Kämpfer, U., Müller, J., Bühr, C., Schürch, S., Lundström-Stadelmann, B. (2019) *In vitro* metabolomic footprint of the *Echinococcus multilocularis* metacestode. *Scientific Reports*, 9(1).
- Rodríguez-Contreras, D., Skelly, P. J., Landa, A., Shoemaker, C. B. (1998) Molecular and functional characterization and tissue localization of 2 glucose transporter homologues (TGTP1 and TGTP2) from the tapeworm *Taenia solium*. *Parasitology*, 117:579-588.
- Rosen, R., Uglem, G. L. (1988) Localization of facilitated diffusion and active glucose transport in cysticercoïd of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). *International Journal for Parasitology*, 18(5):581-584.
- Rosen, R., San, M. L., Denton, M. E., Wolfe, J. M., Uglem, G. L. (1994) The rapid development of the glucose transport system in the excysted metacestode of *Hymenolepis diminuta*. *Parasitology*, 108:217-222.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1982) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schroeder, L. L., Pappas, P. W., Means, G. E (1981) Trypsin inactivation by intact *Hymenolepis diminuta* (Cestoda): some characteristics of the inactivated enzyme. *The Journal of Parasitology*, 67: 378-385.
- Skelly, P. J., Tielens, A. G. M., Shoemaker, C. B. (1998) Glucose transport and metabolism in mammalian-stage Schistosomes. *Parasitology Today*, 14:402-406.
- Smyth, J. D., McManus, D. P. (1989). *The physiology and biochemistry of cestodes*. Cambridge University Press.
- Thi-Kim Vu, H., Rink, J. C., McKinney, S. A., McClain, M., Lakshmanaperumal, N., Alexander, R., Sánchez Alvarado, A. (2015) Stem cells and fluid flow drive cyst formation in an invertebrate excretory organ. *eLife*: e07405.
- Torgerson, P. R., Carmona, C., Bonifacino, R. (2000). Estimating the economic effects of cystic echinococcosis: Uruguay, a developing country with upper-middle income. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 94: 703-713.

Tsai, I., Zarowiecki, M., Holroyd, N., Garcarrubio, A., Sanchez-Flores, A., Brooks, K., Tracey, A., Bobes, R., Fragoso, G., Sciutto, E., Aslett, M., Beasley, H., Bennett, H., Cai, J., Camicia, F., Clark, R., Cucher, M., De Silva, N., Day, T., Deplazes, P., Estrada, K., Fernandez, C., Holland, P., Hou, J., Hu, S., Huckvale, T., Hung, S., Kamenetzky, L., Keane, J., Kiss, F., Koziol, U., Lambert, O., Liu, K., Luo, X., Luo, Y., Macchiaroli, N., Nichol, S., Paps, J., Parkinson, J., Pouchkina-Stantcheva, J., Riddiford, N., Rosenzvit, M., Salinas, G., Wasmuth, J., Zamanian, M., Zheng, Y., Cai, X., Soberon, X., Olson, P., Lacleite, P., Brehm, K., Berriman, M. (2013). The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature*. 496: 57-63

Tyler, S., Hooge, M., (2004) Comparative morphology of the body wall of flatworms (Platyhelminthes). *Canadian Journal of Zoology*. 82:194–210.

Tyler, S., Tyler, M.S., (1997) Origin of the epidermis in parasitic platyhelminths. *International journal for parasitology* 27:715-738.

Uglem, G. L., Love, D. (1977) *Hymenolepis diminuta*: properties of phlorizin inhibition of glucose transport. *Experimental Parasitology*, 43:94-99.

Vogue, M. (1964). Development of *Hymenolepis microstoma* (Cestoda: Cyclophyllidea) in the intermediate host *Tribolium confusum*. *The Journal of Parasitology*, 50: 77-80.

von Brand, T., Gibbs, E. (1966) Aerobic and anaerobic metabolism of larval and adult *Taenia taeniaeformis*. III. Influence of some cations on glucose uptake, glucose leakage, and tissue glucose. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*. 33:1-4.

Wendt, G. R., Collins J. N. R., Pei, J., Pearson, M. S., Bennet, H. M., Loukas, A., Berriman, M., Grishin, N. V., Collins, J. J. (2018). Flatworm-specific transcriptional regulators promote the specification of tegumental progenitors in *Schistosoma mansoni*. *eLife*, e33221.

Wikgren B. J., Knuts, G. M. (1970) Growth of subtegumental tissue in cestodes by cell migration. *Acta Acad Abo Ser B* 30: 1-6.

Wikgren, B.-J., and M. K. S. Gustafsson. (1971). Cell proliferation and histogenesis in diphylobothrid tapeworms (Cestoda). *Acta Acad Abo Ser B* 31:1-10.

Wright, E. M. (2013). Glucose transport families SLC5 and SLC50. *Molecular Aspects of Medicine*, 34: 183-196.

Young, J. D., Yao, S. Y. M., Baldwin, J. M., Cass, C. E., Baldwin, S. A. (2013). The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Molecular Aspects of Medicine*, 34: 529-547.

Zheng, Y., Guo, X., Su, M., Chen, X., Jin, X., Ding, J., Wang, Z., Bo, X., Ayaz, M., Kuttyrev, I., Jia, W., Zhang, X., Zhang, J. (2018) Identification of emu-TegP11, an EF-hand domain-containing tegumental protein of *Echinococcus multilocularis*. *Veterinary Parasitology*, 255:107-113.