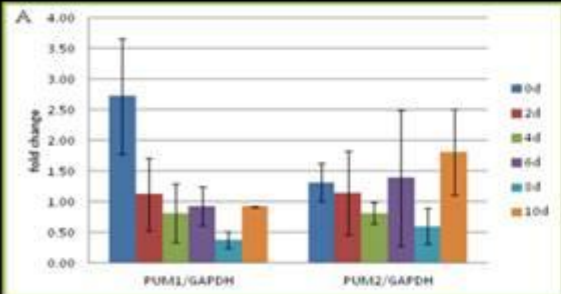
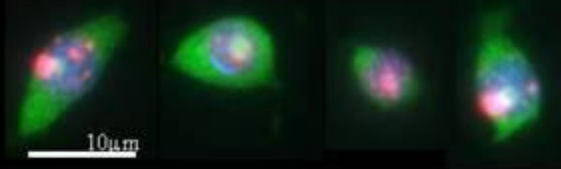
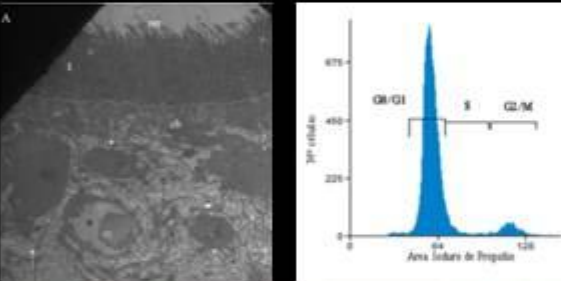


Aislamiento, cultivo y caracterización de células proliferativas de *Mesocestoides corti*

Lic. María Fernanda Domínguez de León



Tribunal:
Dra. Nibia Berois
Dra. Jenny Saldaña
Dra. Mara Rosenzvit

Orientación:
Dra. Estela Castillo
Co-Orientación:
Dr. José Tort

ÍNDICE

Resumen	6
INTRODUCCIÓN	9
1. Platelminos	¡Error! Marcador no definido.
1.1. Características generales	10
1.2. Clasificación y relaciones filogenéticas	11
2. <i>Mesocestoides corti</i> Cestodo modelo	12
2.1. Ciclo de vida	12
2.2. Morfología Tetratiridio y reproducción asexual	14
2.3. Gusano adulto y estrobilización	16
2.4. 17	
2.5. Etapas del cultivo <i>in vitro</i> alcanzadas en el laboratorio	17
3. Estudio de neoblastos en platelmintos	18
3.1. Neoblastos en Platelminos de vida libre	18
3.2. Células germinativas de Cestodos	20
3.2.1. Proliferación en <i>Mesocestoides corti</i>	23
4. Marcadores Moleculares	26
4.1. pL10, DEAD-box RNA helicasa ATP dependiente	33
4.2. Genes pumilio	37
1. Hipótesis de Trabajo	42
2. Objetivo	42
2.1. Objetivo general	42
2.2. Objetivos específicos	42
3. Estrategia Experimental	44
MATERIALES Y MÉTODOS	45
1. Obtención de Material Parasitario	46
1.1. Cultivo de <i>Mesocestoides corti</i>	46
1.2. Extracción de ARN	47
1.3. Retrotranscripción de ARN	48
1.4. Preparación de material para estudios histológicos	48
1.4.1. Preparación de organismos para Hibridación <i>in toto</i> de ARN	48
1.4.2. Preparación de organismos para inmunohistoquímica	48
2. Electroforesis de Ácidos nucleicos	49
2.1. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa	49
3. Suspensiones celulares	49
3.1. Células Fijadas: Glicerol Acético Agua	49
3.2. Células Viables : Tripsina- EDTA	49
4. Identificación de tipos celulares en <i>M. corti</i>	50
4.1. Ensayo de Proliferación celular utilizando Click-iT® EdU Alexa Fluor® 594 (Thermo Cientific)	51

4.2.	Tinción de suspensiones celulares con <i>Whole Cellomic Stain</i> (WCS, Thermo Scientific).....51
4.3.	Tinción de suspensiones celulares con IP52
4.4.	Tinción de suspensiones celulares con Rojo Nilo (RN, Sigma-Aldrich)52
4.5.	Inmunohistoquímica en cortes y suspensiones celulares53
4.6.	Microscopia electrónica de transmisión.....54
5.	Citometría de Flujo y sorting celular54
5.1.	Análisis de ciclo celular por citometría de flujo.....54
5.2.	Tinción de suspensiones celulares para separación celular por citometria de Flujo 55
5.3.	Análisis de ciclo celular y <i>sorting</i> de células vivas56
6.	Cultivo de células de <i>M. corti</i>56
7.	Estudio marcadores moleculares de <i>M. corti</i>57
7.1.	Aislamiento del gen pL1057
7.2.	Estudios <i>in silico</i> de genes marcadores.....59
7.2.1.	Búsqueda de genes ortólogos de pL10 y genes pumilio en genomas de Cestodos.....59
7.2.2.	Búsqueda de miembros de la familia de DEAD en genomas de Cestodos. ..60
7.2.3.	Identificación de isoformas de genes marcadores pL10 y pumilio.....60
7.3.	Análisis de expresión por PCR a tiempo final de genes pumilio y pL1060
7.4.	Análisis de expresión por RT- PCR en tiempo real de genes pumilio y pL10 61
7.5.	Análisis de la expresión espacial del gen pL10.....63
7.5.1.	Transcripción in vitro de sondas marcadas con Digoxigenina-UTP (DIG-UTP) 63
7.5.2.	Hibridación <i>in situ</i> sobre organismos enteros63
7.5.3.	Hibridación <i>in situ</i> sobre suspensiones celulares.64
8.	Interferencia de ARN65
8.1.	Síntesis de Mensajero de Luciferasa65
8.2.	Obtención plásmido pActinaSm_LUC66
8.3.	Síntesis de moléculas de ARN doble cadena66
8.4.	Electroporación de moléculas exógenas66
8.5.	Detección de moléculas exógenas por PCR a tiempo final67
8.6.	Ensayo de Actividad de Luciferasa68
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN69
1.1.	Suspensión celular con Glicerol acético y agua70
1.2.	Identificación de tipos celulares en <i>M. corti</i>71
1.2.1.	Tinción con colorantes celulares71
1.2.2.	Identificación de tipos celulares por Inmunohistoquímica con anticuerpos específicos.....75
1.2.3.	Identificación por Microscopia Electrónica de Transmisión80
2.	Aislamiento de células proliferativas de <i>M. corti</i>88
2.1.	Optimización de protocolo para suspensiones celulares de <i>M. corti</i>88

	0000	
2.2.	Aislamiento de células proliferativas por citometría de flujo.....	97
2.2.1.	Tinción de células viables para Citometría de flujo	97
2.2.2.	Determinación de porcentaje de células en cada fase del ciclo celular a lo largo del desarrollo estrobilar de <i>M. corti</i>	98
2.2.3.	Aislamiento de células mediante <i>sorting</i> celular	101
3.	Cultivo <i>in vitro</i> de suspensiones celulares de <i>M. corti</i>	106
4.00	Estudio de Marcadores Moleculares de <i>M. corti</i>	111
4.10	Aislamiento del gen pL10	111
4.2.	Estudios <i>in silico</i> de genes marcadores.....	115
4.2.1.	Búsqueda de genes ortólogos de pL10 en genomas de Cestodos.	115
4.2.2.	Búsqueda de genes pertenecientes a la familia de DEAD helicasas	117
4.2.3.	Búsqueda de genes ortólogos de pumilio en genomas de Cestodos.	119
4.2.4.	Identificación de isoformas de genes marcadores pL10 y pumilio.....	123
4.3.	Análisis de la expresión de genes Marcadores de células proliferativas	126
4.3.1.	Análisis de la expresión espacial por hibridación <i>in toto</i> del gen pL10 de <i>M. corti</i>	126
4.3.2.	Análisis de la expresión espacial por hibridación <i>in situ</i> de los genes pL10 y pumilio de <i>M. corti</i> sobre suspensiones celulares.	129
4.3.3.	Determinación de la expresión de genes pumilio y pL10 mediante PCR a tiempo final.	130
4.3.4.	Determinación de la expresión de genes pumilio y pL10 mediante PCR en tiempo real.....	¡Error! Marcador no definido.
5.00	ARN interferencia	133
5.10	Tratamiento de tegumento.....	134
5.20	Introducción de moléculas “delivery”	136
5.3.	Moléculas incorporadas.....	139
	BIBLIOGRAFIA	152
	APÉNDICES.....	165
	0000	
5.4.	Hibridación <i>in situ</i> sobre suspensiones celulares	168

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxiribonucleico

ADNc: ADN copia

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ARNi: ARN interferencia

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

DEAD helicasas: Familia de helicasas de ARN con motivo DEAD

dig-11-dUTP: Digoxigenina-11-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato

dNTP: Desoxinucleosidos-5'-trifosfato

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

IPTG: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

IP: Ioduro de propidio

KCl: Cloruro de potasio

KH₂PO₄: fosfato de potasio monobásico

LB: Luria-Bertani

MPM: Marcador de peso molecular

NaCl: Cloruro de sodio

mQ: agua ultra pura (18.2MΩ)

NaHCO₃: Bicarbonato de sodio

Na₂HPO₄: Fosfato de sodio dibásico

NBT: NitroBlueTetrazolium

pb: pares de bases

PBS: *buffer* fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RPMI mod. : Medio RPMI modificado

SDS: Dodecilsulfato de sodio

TAE: *Buffer* tris-acetato-EDTA

Tris: tris(hidroximetil)aminometano

X-gal :Bromo-cloro-indolil-galactopiranosido

WCS: *Whole Cellomic Stain*

RESUMEN

En platelmintos de vida libre, las células somáticas diferenciadas no se dividen, siendo las responsables de la renovación celular, homeostasis y la regeneración, las células madre indiferenciadas denominadas neoblastos. En platelmintos parásitos se ha descrito un mecanismo similar, donde las células con capacidad proliferativa se denominan germinativas. Estas células conservadas han sido descritas en muchos modelos de parásitos y en particular en *Mesocestoides corti*, nuestro modelo de estudio.

En este trabajo se realizó la caracterización morfológica de los distintos tipos celulares presentes en *M. corti* mediante estrategias complementarias, tinción con colorantes, inmunohistoquímicas con anticuerpos específicos y microscopía electrónica de transmisión. La utilización conjunta de estas técnicas permitió describir distintos tipos celulares presentes en este organismo.

La identificación y caracterización morfológica de las células proliferativas hace importante la implementación de herramientas que permitan continuar y mejorar la caracterización de estas células. Es por ello que parte de este trabajo se centró en el aislamiento de estas células por citometría de flujo. Se trabajó en la optimización y puesta a punto de un protocolo para la obtención de suspensiones celulares, posterior tinción y análisis por citometría de flujo para separar las poblaciones en las diferentes fases del ciclo celular.

Además, como primera aproximación a la generación de líneas celulares que permitan realizar estudios de ARN de interferencia, transfección y trasplante celular en este modelo, se realizaron cultivos *in vitro* de células de *M. corti*, donde fue posible obtener células capaces de proliferar durante periodos breves de tiempo.

A nivel molecular, existen genes marcadores considerados específicos de estas células proliferativas. Durante el desarrollo de esta tesis se aisló y caracterizó el gen pL10, miembro de las DEAD helicasas. La determinación de los patrones de expresión espacio-temporal de este gen, indican que este gen está siendo expresado preferencialmente en células de la línea germinal, y su expresión al igual que la de los genes pumilio no parece variar a lo largo del desarrollo estrobilar de *M. corti*.

Por otra, la búsquedas *in silico* de los genomas de Platelminotos parásitos permitieron identificar genes pL10 y pumilio; y genes miembros de la familia DEAD en el genoma de *M. corti*.

Se comenzó a trabajar en la puesta a punto de la metodología de ARN interferencia logrando resultados prometedores en cuanto a optimización de entrada de moléculas exógenas y la detección de las mismas en el interior celular.

INTRODUCCIÓN

1. Platelmintos

o o o o

1.1. Características generales

Los platelmintos son invertebrados acelomados, los cuales presentan el cuerpo aplanado dorso-ventralmente. El mismo, es macizo relleno de tejido parenquimático laxo. En el interior de este parenquima se encuentran los órganos genitales, tubo digestivo incompleto (cuando éste está presente), y los sistemas nervioso y excretor.

En cuanto al epitelio externo, las formas libres están cubiertas por un epitelio ciliado, mientras que las formas parasitas carecen de ellos, a pesar de que pueden estar presentes en algunas de sus formas larvarias. El tegumento en las formas parásitas se encuentra constituido por un sincicio celular, que contiene mitocondrias, vacuolas, cuerpos de inclusión, enzimas y otras sustancias con propiedades antigénicas, además puede presentar escamas y órganos de fijación. La función del tegumento es brindar protección al parásito frente a la acción de los jugos digestivos y de otras sustancias nocivas para él, que puedan estar presentes en el huésped. Este tegumento se encuentra conectado en su límite interno (membrana basal) a células situadas en el parénquima. La zona subyacente a él se encuentra formada por fibras musculares y el resto del cuerpo por una red de células y fibras interconectadas que constituyen el parénquima. No existe cavidad general como en el caso de los nematodos y las estructuras intraparenquimatosas corresponden a los órganos genitales. [1] . En la mayoría de los casos la organización del sistema genital es hermafrodita.

El sistema digestivo, si está presente, es siempre ciego y comunica con el exterior por un único orificio que oficia de boca y de ano. Cuando el sistema digestivo no está presente, como en algunas formas de vida parásitas, el tegumento permite la absorción de los nutrientes provenientes del hospedador.

En general, dentro del ciclo biológico de las formas parásitas se presentan uno o más huéspedes intermediarios, pudiendo llegar a ser bastante complejo. A veces ocurre la reproducción asexual en la forma larvaria del parásito ya sea como etapa natural dentro del ciclo o como una eventualidad dentro del mismo. Cuando esta etapa se da en el hombre como huésped, puede causar cuadros graves.

o o o o

1.2. Clasificación y relaciones filogenéticas

Tradicionalmente se admitían cuatro clases de Platelminos de acuerdo a los caracteres de los gusanos adultos: Turbelarios de vida libre, Monogeneos, Trematodos, y Cestodos todos ellos de vida parásita, pero la filogenia interna de los platelmintos ha sido objeto de varios estudios moleculares y morfológicos. Sin embargo, solo existe un consenso limitado acerca de la posición de los diferentes grupos (Figura 1). Recientemente, Egger y colaboradores, (2015) ha demostrado que entre los platelmintos parásitos, los Cestodos están más cerca de los Trematodos que de los Mongeneos [2].

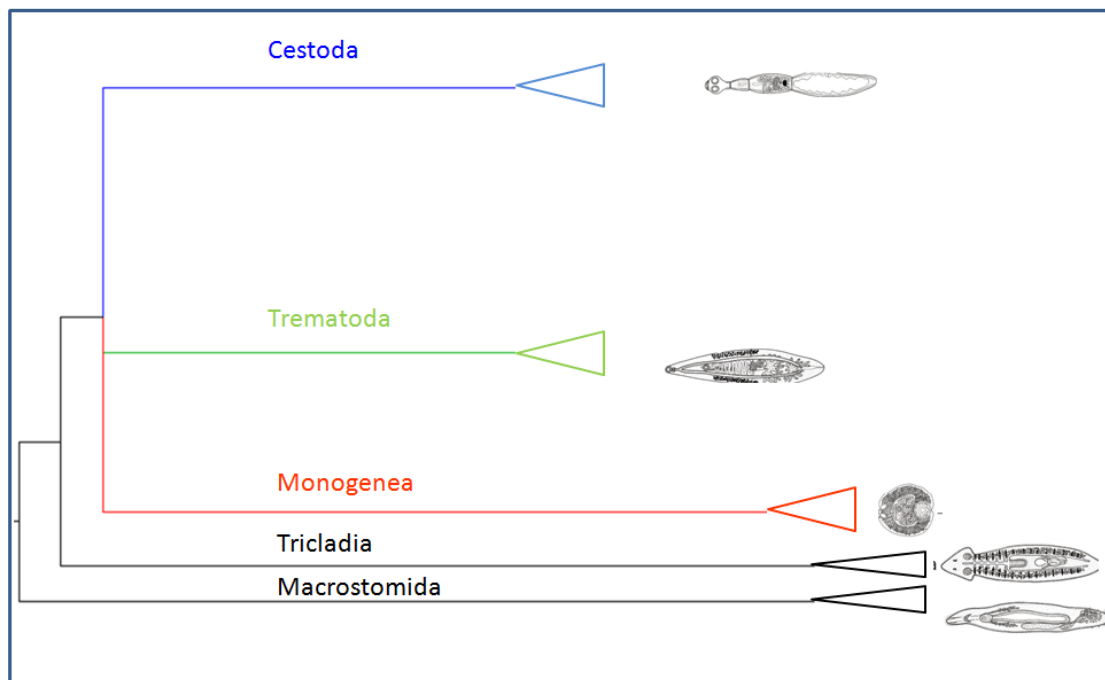


Figura 1- Esquema sobre las relaciones filogenéticas internas de los platelmintos.

2. *Mesocestoides corti* Cestodo modelo

Las infecciones parasitarias son un problema de salud animal y humana alrededor del mundo. En particular los cestodos, como *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis*, *Taenia saginata* y *Taenia solium*, son agentes causantes de enfermedades de relevancia sanitaria tanto en países en vías de desarrollo como en países desarrollados[3]. Para desarrollar estrategias de control y/o erradicación de estas enfermedades, es importante conocer los aspectos moleculares del desarrollo de éstos parásitos.

M. corti es un cestodo que se ha instaurado como modelo de estudio para profundizar en el conocimiento de la biología de los cestodos debido a sus múltiples ventajas para reproducir su ciclo de vida en cultivo *in vitro* desde oncósferas obtenidas *in vivo* hasta el estadio adulto sexualmente maduro [4–7]

En nuestro laboratorio se han optimizado las condiciones para su cultivo desde la fase larvaria hasta el estadio adulto [8] y es utilizado desde hace un tiempo para el estudio de genes potencialmente involucrados en los eventos de su ciclo de vida y desarrollo [9–13]

Tradicionalmente se clasifica a *M. corti* dentro del Filo Platyhelminthes, dentro de la Clase Cestodos en el Orden de los Ciclofilídeos [revisado por 8,14] . En estudios filogenéticos, se ha visto que la familia *Mesocestoididae* aparece como una rama muy basal dentro de los Ciclofilídeos al considerar caracteres morfológicos, o incluso por fuera del orden cuando se analizaron caracteres morfológicos y moleculares,[revisado por 15] El desconocimiento de la totalidad de su ciclo de vida dificulta una clasificación taxonómica definitiva [16].

o o o o

2.1. Ciclo de vida

El ciclo de vida es complejo y posee 3 hospedadores. El gusano adulto segmentado presenta cuatro ventosas y carece de róstelo. Este produce huevos con oncósferas que infectan al primer hospedador intermediario, aún desconocido, y algunos autores proponen que sea un artrópodo [17]. Luego de esto, este primer intermediario es ingerido por un segundo, que pueden ser cánidos, lagartijas y serpientes, en donde la larva infectante, tetratiridio, se desarrolla en la cavidad

peritoneal. En estos huéspedes *M. corti* es capaz de replicarse por fisión longitudinal. Al ser ingeridos por el huésped definitivo se desarrollan al estadio adulto en el intestino del mismo (Figura 2).

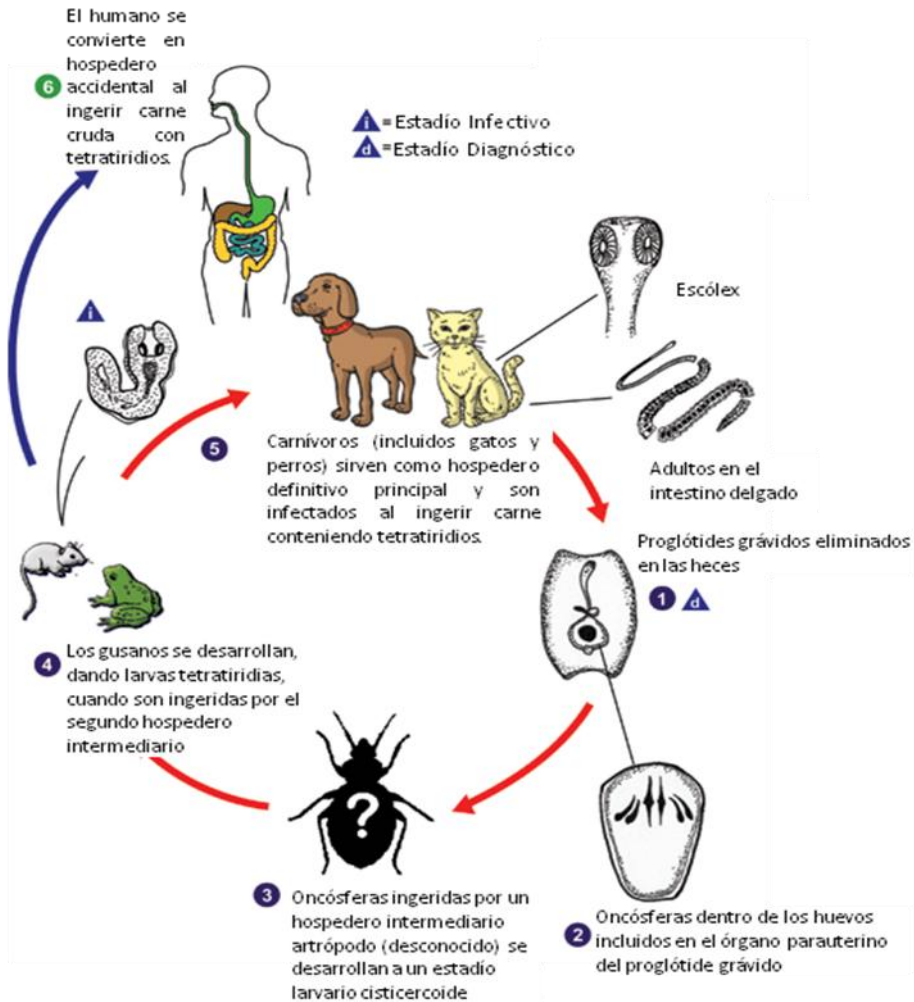


Figura 2- Ciclo de vida de *M. corti*. Requiere tres hospederos para completar su ciclo de vida. 1: Los proglótidos gravidos son eliminados en las heces del hospedero definitivo (principalmente carnívoros, incluyendo cánidos, félidos y mustélidos). 2: Dentro de cada proglótide grávido, cientos de oncosferas están contenidas en el órgano parauterino. 3: El primer hospedero intermediario es presuntamente un artrópodo (de identidad desconocida), que es infectado al ingerir los proglótidos gravidos o las oncosferas. En este se cree que las oncosferas se desarrollan a un segundo estadio larvario (cisticercoide o procercoide). 4: Cuando el primer hospedero intermediario es ingerido por el segundo hospedero intermediario (pequeños mamíferos, aves, reptiles y anfibios) el segundo estadio larvario se desarrolla al tercer estadio larvario infeccioso (tetra iridio). 5: Los hospederos definitivos se infectan al ingerir carne contaminada con tetratiridios. En este hospedero, el cestodo se establece en el intestino delgado, donde madura. Pueden observarse proglótidos gravidos en las heces a las dos semanas de infección. 6: Los humanos no son los hospederos definitivos usuales, pero pueden infectarse al ingerir carne poco cocida de animales infectados con tetratiridios. Adaptado de <http://www.dpd.cdc.gov/HTML/Mesocestoidiasis.htm>.

2.2. Morfología Tetratiridio y reproducción asexual

Los tetratiridios son los estadios larvarios que infectan al segundo hospedero intermediario y su morfología es relativamente sencilla. Está comprendido por un cuerpo macizo, parenquimatoso, en el cual existe un sistema excretor (similar, a grandes rasgos, al del adulto) y donde se extienden dos cordones nerviosos laterales principales y otros ocho cordones accesorios, con conectivos entre ellos, desde un cerebro bipartito anterior, convergiendo en un plexo posterior alrededor del poro excretor [18–20]. A nivel del parénquima no existen otros órganos, dado que el sistema reproductor no se encuentra aún esbozado. En el extremo anterior posee un escólex con cuatro ventosas musculares; entre las ventosas, existe un surco apical, a partir del cual se forma el surco de fisión longitudinal durante la reproducción asexual. En esa misma zona, existe una masa celular poli-nucleada conectada mediante puentes citoplasmáticos al sincicio tegumentario, llamada el macizo apical, (Figura 3A) [21]

Exteriormente, se encuentra rodeado por el tegumento, un sincicio celular que en su superficie está provisto de microvellosidades especializadas (microtricos). Los núcleos de este sincicio se encuentran hundidos en el parénquima, en cuerpos perinucleares, que se conectan con el tegumento a través de delgados puentes citoplasmáticos. Bajo el tegumento existe una capa fibrosa, y luego se encuentra el sistema muscular sub-tegumentario, compuesto de fibras circulares (externas) y longitudinales (internas) (Figura 3B y B'). El parénquima se encuentra dividido en parénquima cortical (externo) y parénquima medular (laxo e interno). Este parénquima presenta células especializadas, como las células parenquimáticas de almacenamiento de glucógeno, y las células calcáreas, que forman cada una un corpúsculo calcáreo (cuya función tal vez sea el almacenaje de desechos). Entre ambos tipos de parénquima se encuentra una capa de musculatura longitudinal interna. Junto a esta capa de musculatura discurren los cordones nerviosos laterales [21,22].

En el hospedero intermediario, los tetratiridios son capaces de multiplicarse asexualmente en la cavidad del cuerpo y el hígado [23].

Típicamente, al comienzo de la división asexual, se duplican las estructuras anteriores. Sin embargo en ciertos casos la división puede comenzar en forma previa a la duplicación de las estructuras, resultando en tetratiridios con únicamente dos o incluso una sola ventosa [24,25]. Tras proseguir la fisión, los individuos se separan. Identificándose al individuo parental debido a la formación de un segundo poro excretor lateral, en el último punto de división entre ambos [18,25]. Este poro puede observarse como una protrusión lateral. A medida que se suceden ciclos de reproducción asexual, todas las divisiones culminan de un mismo lado del cuerpo (el lado proliferativo), acumulándose estos crecimientos laterales en ese mismo lado. Eventualmente, estos crecimientos laterales pueden separarse individualmente, o varios juntos, como extremos acéfalos [18,25,26], incapaces de regenerar el escólex y por lo tanto estériles (Figura 4C) [26].

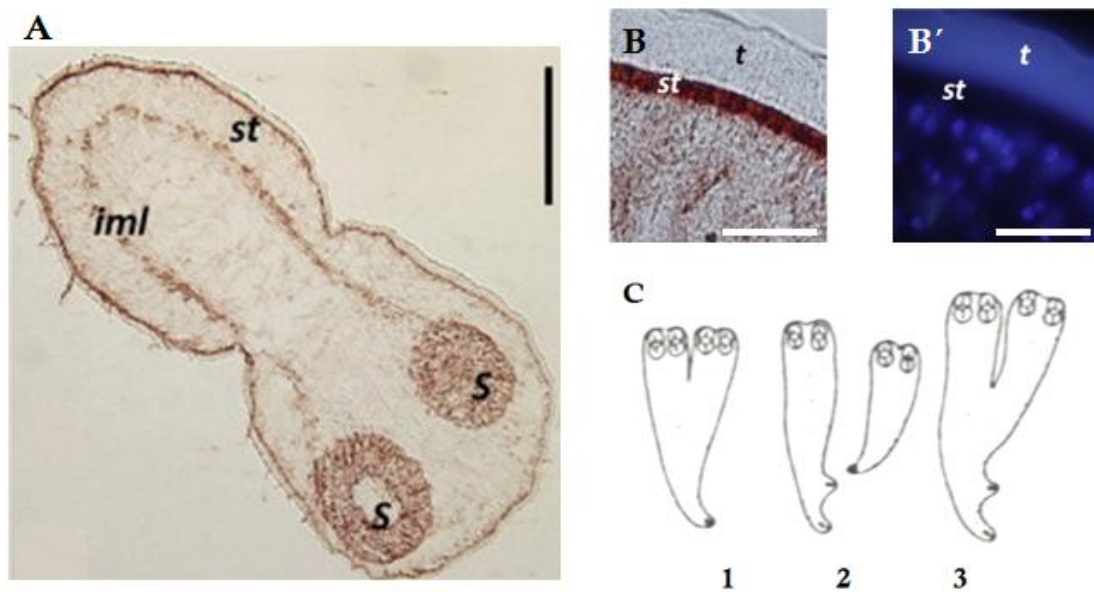


Figura 3- Larva tetratiridia de *M.corti*. A) Inmnohistoquímica con anticuerpo anti Tropomiosina de *E. granulosus* (anti-TrpEg), en corte longitudinal de tetratiridio; B) y B') Detalle de tinción con anticuerpo anti - TrpE.g y DAPI respectivamente, de la capa muscular interna en el subtegumento; C) División asexual del tetratiridio por fisión longitudinal. 1) Comienzo de la división tras la duplicación de estructuras anteriores. 2) Separación de dos individuos, dejando un crecimiento lateral con un poro excretor en el progenitor. 3) Nuevo ciclo de división desde el mismo lado (proliferativo) del individuo progenitor. Abreviaturas: iml, capa muscular interna; s, ventosas; st, subtegumento; t, tegumento. A,B,B' Modificado de [27]; C, Modificado de [25]. En A, B y B' la barra representa 50 μ m

2.3. Gusano adulto y estrobilización

El gusano adulto es un típico cestodo segmentado (Figura 4A), compuesto por un escólex anterior con cuatro ventosas y una estróbila formada por varios segmentos o proglótides en distintos estadios de maduración, siendo los segmentos anteriores inmaduros (en general más anchos que largos) y los posteriores maduros (en general más largos que anchos) (Figura 4B,C).

En la Figura 4D, se muestra un esquema de del gradiente de maduración antero posterior a lo largo de las proglotides. Al ingresar al hospedador definitivo, los tetratiridios se elongan y adquieren una forma vermiforme. Suelen aparecer varios segmentos simultáneamente, siendo el desarrollo más acelerado en los posteriores. En paralelo con el desarrollo de los proglótides aparecen nuevos segmentos en la región anterior. Al tiempo que aparecen los segmentos, se observa el rudimento del sistema reproductor masculino (Figura 4D, Estadio 1) que se diferenciará en el saco del cirro y los testículos. El sistema reproductor femenino se desarrolla levemente después que el masculino, y comienza por la aparición del rudimento femenino (Figura 4D, Estadio 4). Cuando los testículos están maduros, el ovario aún está en desarrollo, aunque el útero se desarrolla simultáneamente. Para el momento que maduran los ovarios y las glándulas vitelinas, los testículos comienzan a degenerar. El segmento maduro (Figura 4D, Estadios 5 y 6,) incluye dos canales excretorios laterales, conectados por una comisura transversal, y los sistemas reproductores masculino y femenino. El sistema reproductor masculino está compuesto por los testículos ubicados lateralmente, conectados a vasos deferentes que desaparecen una vez que el testículo vació su contenido; y el saco del cirro, que contiene un cirro enrollado. El sistema reproductor femenino está compuesto por un ovario bilobular, con dos glándulas vitelinas pequeñas, el cual se conecta con el útero ubicado en la línea media. En el extremo posterior del útero existe una masa oscura de células que darán lugar al órgano parauterino, claramente visible en los segmentos más posteriores. Éste comienza a desarrollarse cuando los ovarios y glándulas parauterinas degeneran, una vez que el útero está lleno de óvulos y células vitelinas. Surge por la proliferación de las células de la región posterior del útero, diferenciándose en una cápsula fibrosa de paredes delgadas. En estos segmentos ya no se observan los canales excretorios. En los

segmentos grávidos (Figura 4, Estadio 9) se observan en el órgano parauterino las oncósferas, que se identifican por los 6 ganchos y la cubierta fina protectora del huevo [6,28].

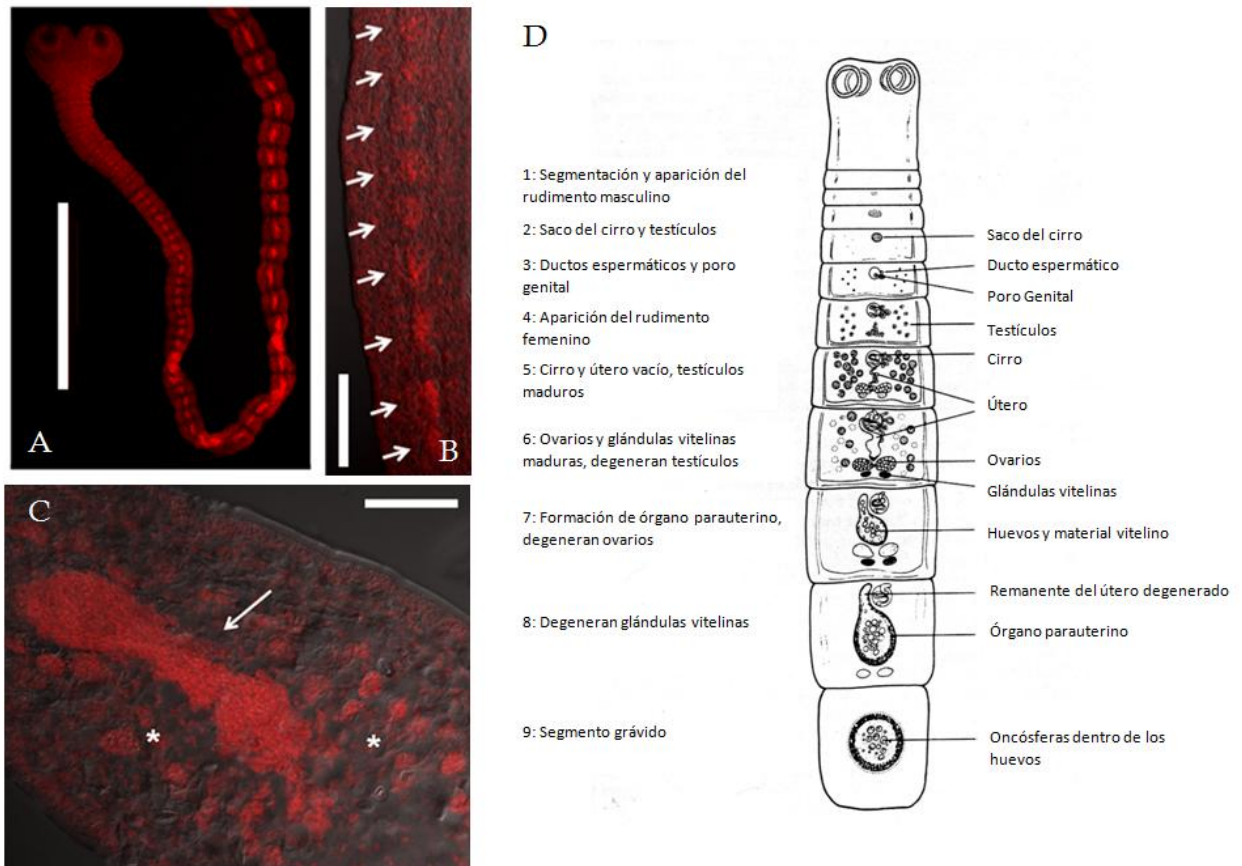


Figura 4- Estadio adulto segmentado de *M. corti*. De A a C organismos teñidos con TO-PRO-3 para visualizar etapas de desarrollo estrobilar de *M. corti*. A) Visión general de ejemplar segmentado, donde es posible observar región del escólex, cuello y región anterior de la estrobila con segmentos progresivamente más desarrollados; B) Visualización de segmentos tempranos del desarrollo estrobilar, primordios tempranos (flechas); C) D) Esquema del gusano adulto mostrando el gradiente de maduración antero-posterior a lo largo de los proglótidos. A, B, C, Modificado [29]. D, Modificado de [28]. En A barra representa 1000µm, en B 50µm y en C 100µm.

2.4. Etapas del cultivo *in vitro* alcanzadas en el laboratorio

Se ha logrado reproducir la mayor parte del ciclo de vida *in vitro*. Es posible el desarrollo desde oncósferas obtenidas a partir de gusanos segmentados de infecciones naturales a tetratiridios [7] y la multiplicación asexual de éstos en la cavidad peritoneal de ratones infectados [30]. También se puede lograr el desarrollo estrobilar y maduración partiendo del tetratiridio hasta alcanzar el estadio adulto [4,6]. Esto, sumado a la facilidad de obtener material parasitario (tetratiridio) en grandes cantidades a partir de ratones infectados experimentalmente,

constituyen importantes ventajas para la adopción de este organismo como modelo de estudio de cestodos.

3. Estudio de neoblastos en platelmintos

Los platelmintos, como se mencionó anteriormente, son un filo altamente diverso en términos de morfología, desarrollo y ciclos de vida. Sin embargo, tienen en común una población única de células indiferenciadas denominadas “neoblastos”.

Todas las células somáticas diferenciadas no se dividen, mientras que estas células (neoblastos) son las únicas con capacidad proliferativa, siendo éstas la fuente de nuevas células responsables de la renovación celular, crecimiento y regeneración [31–34]. Este mecanismo particular de renovación celular es bastante inusual, ya que la mayoría de los animales presenta células madre tejido específicas capaces de proliferar para cumplir esta función. En cestodos también se ha descrito esta población de células indiferenciadas similar a los neoblastos, denominadas células germinativas [33,35,36]

◦ ◦ ◦ ◦

3.1. Neoblastos en Platelmintos de vida libre

Como se mencionó, estudios sobre poblaciones de células proliferativas en platelmintos de vida libre, demostraron la existencia de un set de células indiferenciadas, responsables de la renovación celular durante el mantenimiento, crecimiento y regeneración de tejidos. Mientras que las células somáticas diferenciadas no proliferan, ni se desdiferencian. [32,33]

Estas células han sido estudiadas en profundidad en platelmintos de vida libre. Los estudios se han centrado especialmente en planarias, las que presentan una gran capacidad regenerativa. Particularmente, estos estudios se han centrado en las especies *Schmidtea mediterránea* y *Dugesia japónica*[37–39]. Además se han realizado estudios en linajes más basales, como en especies del género *Macrostomum* [32,40–44].

Las planarias tienen la capacidad de regenerar completamente sus organismos desde casi cualquier parte del cuerpo [37] y renovar sus tejidos a una tasa muy alta[39]. Los tejidos y órganos de las planarias carecen de células somáticas con capacidad proliferativa, y por lo tanto son mantenidas por la incorporación de

neoblastos que residen en el parénquima alrededor de los órganos[38,39]. Los estudios originales realizados en planaria se vieron limitados por la incapacidad técnica de marcar las células proliferantes con timidina tritiada ($^3\text{H-T}$) o el análogo de timidina, 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU). Newmark y Sánchez Alvarado (2000) resuelven dicho inconveniente mediante la micro-inyección y la alimentación de planarias con BrdU. Estos ensayos permitieron determinar la localización de estas células en el organismo.

Los neoblastos en planaria, se distribuyen por toda la región interna del parénquima, exceptuando la región anterior, delante de los fotoreceptores y la faringe, siendo estas las únicas regiones incapaces de regenerarse luego de una amputación [37,39,45]. Durante la regeneración, estas células se acumulan detrás del blastema, más específicamente el post-blastema, zona donde ocurre la proliferación celular. El blastema es post-mitótico, mientras que los neoblastos se encuentran inmediatamente en la región adyacente a él (Figura 5). En experimentos de pulso y caza utilizando BrdU, se evidencia la migración de las células que incorporaron BrdU desde el parénquima hasta las regiones exteriores, incluso por delante de los fotoreceptores, y a nivel de la epidermis donde se diferencian. [37,46].

La caracterización morfológica de los neoblastos de planaria muestra que son células indiferenciadas basofílicas pequeñas, con un gran núcleo y nucléolo y escaso citoplasma. A nivel ultraestructural, presentan abundancia de ribosomas libres, mitocondrias pequeñas, escasez de RER y Golgi.[47,48] En la región perinuclear, presentan gránulos de Ribonucleoproteína (RNP) denominados cuerpos cromatoides, que son estructural y molecularmente similar a los gránulos presentes en las células germinales de muchos animales (Figura 5B –C) [47–50].

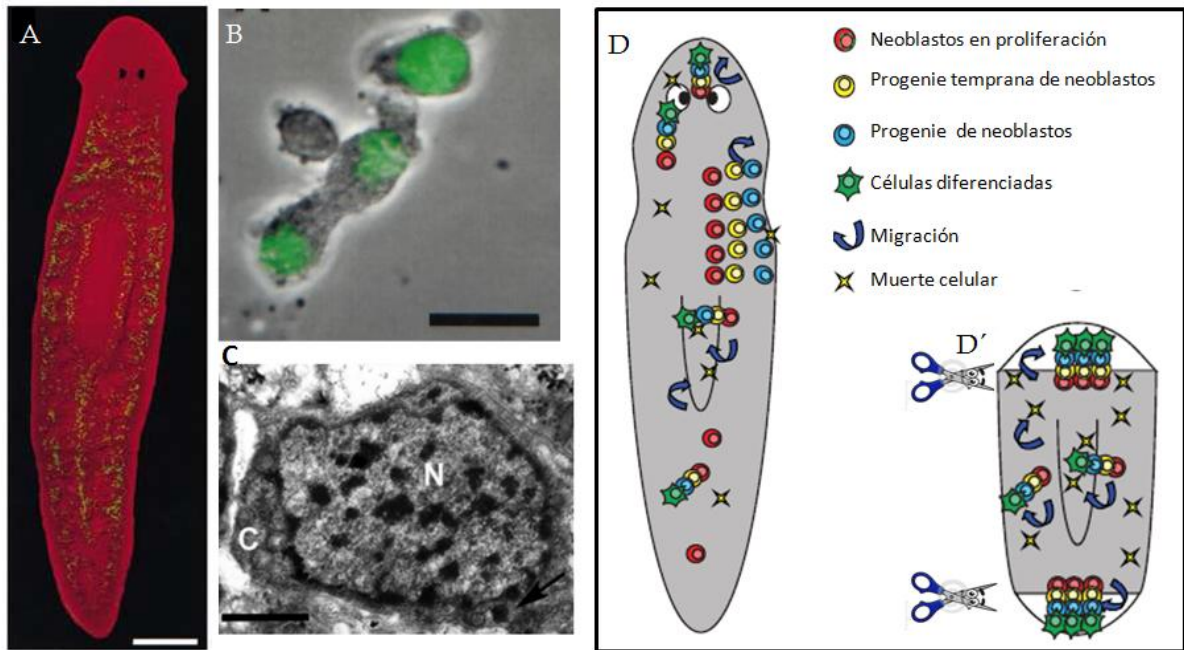


Figura 5- Neoblastos de Planaria A) Distribución de células proliferativas en la planaria *Giardia dorotocephala*. Barra representa 450 μm .; B) Morfología de Neoblastos identificados en macerados celulares de *Giardia dorotocephala*. (verde BrdU) Barra representa 10 μm .; C) Imagen de microscopía electrónica de Transmisión de Neoblasto de planaria. En esta imagen las flechas indican presencia de cuerpos cromatoides; D) Esquema de distribución de neoblastos de planaria. En la imagen se ejemplifica el proceso requerido para mantener la homeostasis y renovación natural de tejidos. Este proceso requiere que la población de *stem cells* se diferencie y migre a la locación correspondiente, incluyendo la región de la faringe y los fotorreceptores que se encuentran libres de neoblastos mitóticos.; D') Esquema proceso de regeneración. Se observan los característicos pulsos de proliferación y muerte celular. La progenie de neoblastos derivada de los blastemas regenerativos dentro de los cuales se diferencian para regenerar las estructuras distales. A y B Tomada de [45], C -tomada de [51], D - D' modificada de [52]

En la última década, el desarrollo de avances tecnológicos como interferencia mediada por ARN, citometría de flujo y aislamiento de las células por *sorting* celular, secuenciación masiva de ARN, han revolucionado el estudio de estos tipos celulares a nivel celular y molecular [39,53].

Como se mencionaba en el párrafo anterior, un importante punto de inicio en la investigación referente al estudio de neoblastos, es la identificación de genes expresados activamente en estos. Los genes identificados son candidatos para regular importantes aspectos de la biología de los neoblastos, además de funcionar como marcadores de estos neoblastos y su progenie indiferenciada (ver más adelante).

3.2. Células germinativas de Cestodos

En cestodos las células indiferenciadas se denominan células germinativas, estas son las equivalentes a los neoblastos de planaria [31,33,34].

Mediante técnicas de histología clásicas, estas células han sido caracterizadas, como células con forma redondeada u ovalada con un citoplasma altamente basofílico debido a la presencia de ribosomas libres, con pocas extensiones citoplasmáticas y un gran núcleo con un nucléolo predominante (Figura 6B- C) [13,54–59].

Más de un linaje de células germinativas, morfológicamente similares, puede existir, y en algunos modelos, se ha propuesto la existencia de varios subtipos de células germinativas basados en su relación núcleo-citoplasma, su tamaño y sus características de tinción [54,57]. A nivel ultraestructural, estas células han sido descritas en oncosferas y en cestodos adultos [55,56,60–63].

Estas células presentan características similares a las descritas para neoblastos de planarias. Alta relación núcleo citoplasma, poca heterocromatina presente en el núcleo, citoplasma electrón-denso con abundancia de ribosomas libres y escaso Retículo endoplásmico y aparato de Golgi. La única excepción es que en cestodos nunca se ha descrito la presencia de cuerpos cromatoides. (Figura 6)

En cestodos adultos y durante las etapas tempranas de la segmentación, se han descrito patrones conservados para la distribución de células germinativas en proceso de proliferación. En varias especies éstas se localizan en la región del cuello, a partir de donde se forman los segmentos. Las células se encuentran mayormente o casi exclusivamente en la región externa del parénquima, cercana a la capa muscular en *Diphyllobothrium spp.* [56], *Cylindrotaenia diana* [54], *Hymenolepis diminuta* y *Hymenolepis nana* [55,64], *T. solium* [35] y *M. corti* [13] (Figura 6A). En el parénquima cortical la proliferación se encuentra ausente o restringida a la región más interna.

La conservación en la “relación” o la proximidad que existe entre las células germinativas y la capa muscular interna, sugiere que las células musculares y /o los cordones nerviosos cercanos, puedan estar generando señales para estas células germinativas.

En contraste, en los estadios de metacestode de *H. diminuta* and *T. solium*, las células germinativas proliferantes no se encuentran restringidas al parénquima medular, sugiriendo que existe una gran variabilidad en los estadios larvarios [35,55]. En *E. granulosus* se ha descrito la existencia de parches de células proliferativas en la capa germinal del quiste hidático, a partir de los cuales se desarrollarían los protoescólices y la proliferación celular disminuiría una vez que comienza la diferenciación de los mismos [36].

Recientemente, Koziol et al (2014) ha caracterizado las células germinativas de *E. multilocularis* y ha demostrado que son las únicas con capacidad proliferativa en el metacestode, siendo estas responsables del crecimiento de la vesícula larval. Esta población de células, nuevamente presentan morfología similar a los neblastos de planaria y contienen altos niveles de expresión de una nueva familia de transposones no autónoma (ta-TRIMs). Estas células germinativas presentan heterogeneidad a nivel molecular, dado que solo algunas expresan genes homólogos conservados de fgfr, nanos y argonauta, sugiriendo la presencia de distintas sub-poblaciones [65,66].

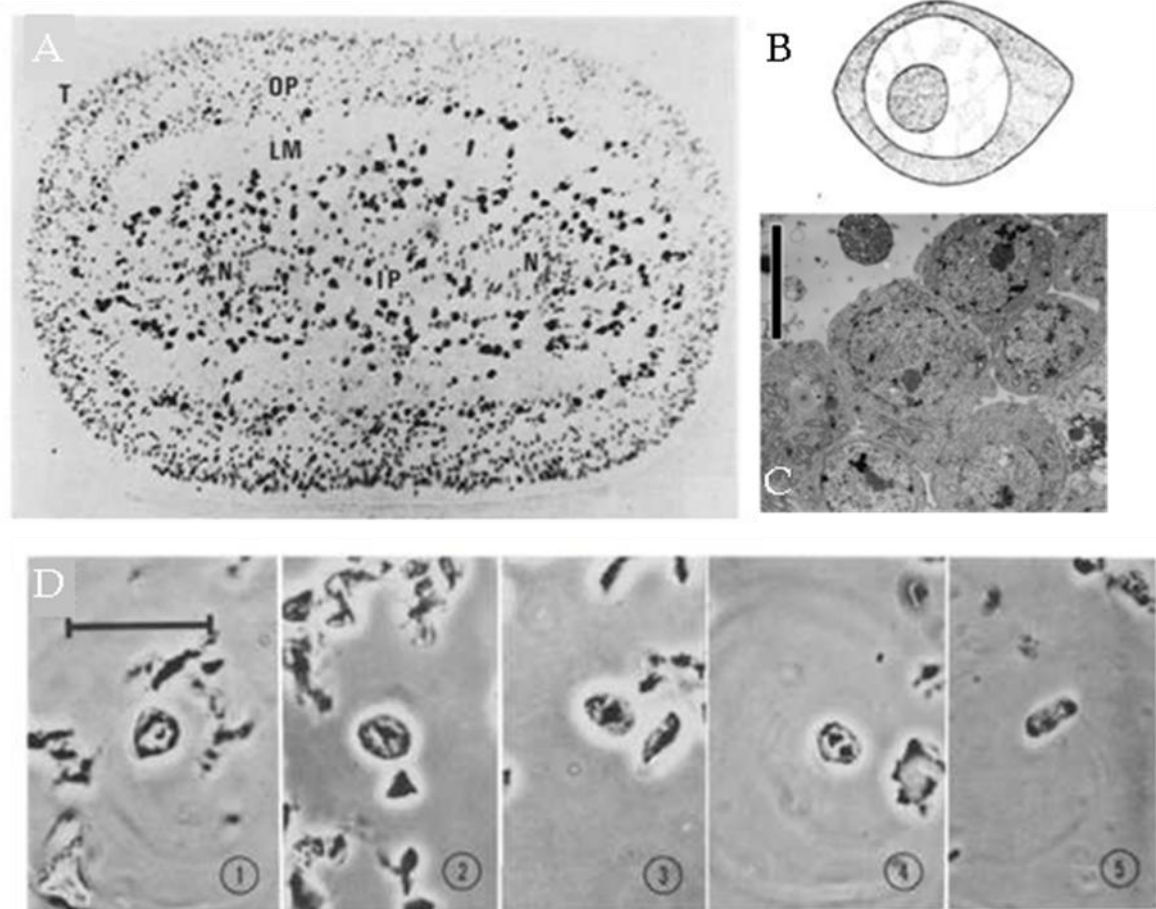


Figura 6- Células germinativas de cestodos. A) Distribución de células germinativas de *D. dendriticum* mediante ensayos de timidina tritiada.; B) Modelo esquemático de las células germinativas de la región del cuello en un segmento de *Diphyllobothrium dendriticum*. C) Microscopia electrónica de célula de *E. multilocularis*; D) Célula germinativa de región del cuello del adulto *H. citelli* encontrada en suspensiones celulares, Imagen en panel 1 – interfase, 2-4 diversas fases de mitosis. Imagen modificada [65]-C tomada de artículo de [66]

3.2.1. Proliferación en *Mesocestoides corti*

Originalmente, Hess (1975) describe células grandes basofílicas con grandes nucléolos como posibles células germinativas, en preparados de formas larvianas (tetratiridios) *in toto* con verde de metilo / pironina Y. Estas son generalmente encontradas en mitosis (índice mitótico de hasta 4 %), mientras que en las células parenquimáticas, pequeñas, poco basofílicas, sólo observa proliferación excepcionalmente.

La distribución de estas células es en todo el parénquima, formando un gradiente antero-posterior: su abundancia es máxima en la región del escólex tras las ventosas, y disminuye hacia la región posterior. Las células basofílicas se acumulan además en las regiones de regeneración naturales y tras la amputación experimental

de dos ventosas. Estudios con timidina tritiada, que demuestran la existencia de células proliferantes indiferenciadas en el parénquima, pero además, en la estructura mitótica sincitial denominada macizo apical [21], ubicada en el extremo apical, sitio donde se inicia la fisión longitudinal durante la reproducción asexual. Desde este sincicio se desprenden células migrantes que luego se diferenciarían en una variedad de células somáticas.

Estudios subsecuentes de autoradiografía [67] o utilizando bromodeoxiuridina [68] han confirmado la abundancia de mitosis en esta región, pero además se observa una distribución diferente de las células marcadas respecto a la descrita por Hess [21,22]. Esta distribución muestra una abundancia preferencial en la región de los cordones nerviosos, y en células diferenciadas del tegumento. Estas discrepancias probablemente pueden ser atribuidas a diferentes tiempos de incubación (24 horas en los estudios más recientes, en un único pulso sin caza), que según los parámetros de duración del ciclo celular y de velocidad de migración en otros organismos relacionados [41,45,56], y a los tiempos observados por Hess (1980), podrían permitir la migración y diferenciación de las células marcadas en esta ventana temporal.

En el marco de la Tesis de Maestría del Dr. Uriel Koziol, se realizó la caracterización de las células proliferantes durante el desarrollo de *M. corti*, y la posterior migración de su progenie utilizando bromodeoxiuridina [13]. Los resultados obtenidos demuestran que las células proliferantes en *M. corti* se encuentran en el parénquima interior, en particular en proximidad con la capa muscular interna. Es posible observarlas a nivel de las ventosas, órganos predominantemente musculares. Las células proliferantes están ausentes en el parénquima cortical exterior y de la región sub-tegumentaria. La renovación y crecimiento en estas regiones proviene a partir de las células que proliferan en el parénquima medular, desde donde migran. Interesantemente, durante el desarrollo estrobilar el número de células que llegan a estas regiones es menor, y el destino de la mayor parte de las células proliferantes se encuentra en las estructuras reproductoras.

En la larva, son más abundantes en las regiones anteriores (escólex y cuello) disminuyendo su número en las regiones posteriores que no segmentan. Sin

embargo, en forma similar a lo descrito por Smith y McKerr, no se encontró que el macizo apical fuese una región especialmente proliferante en relación a otras regiones del escólex. Tras proliferar, la progenie celular migra al parénquima exterior y tejido sub-tegmentario donde se diferencian para contribuir a estos tejidos en los que no existen células proliferantes. Durante el desarrollo a la forma adulta se observan en el cuello acumulaciones periódicas de células proliferantes, incluyendo una masa central en cada primordio de segmento. Esta masa indiferenciada es el primordio genital, que generará los órganos reproductores masculinos y femeninos en cada segmento (Figura 7).

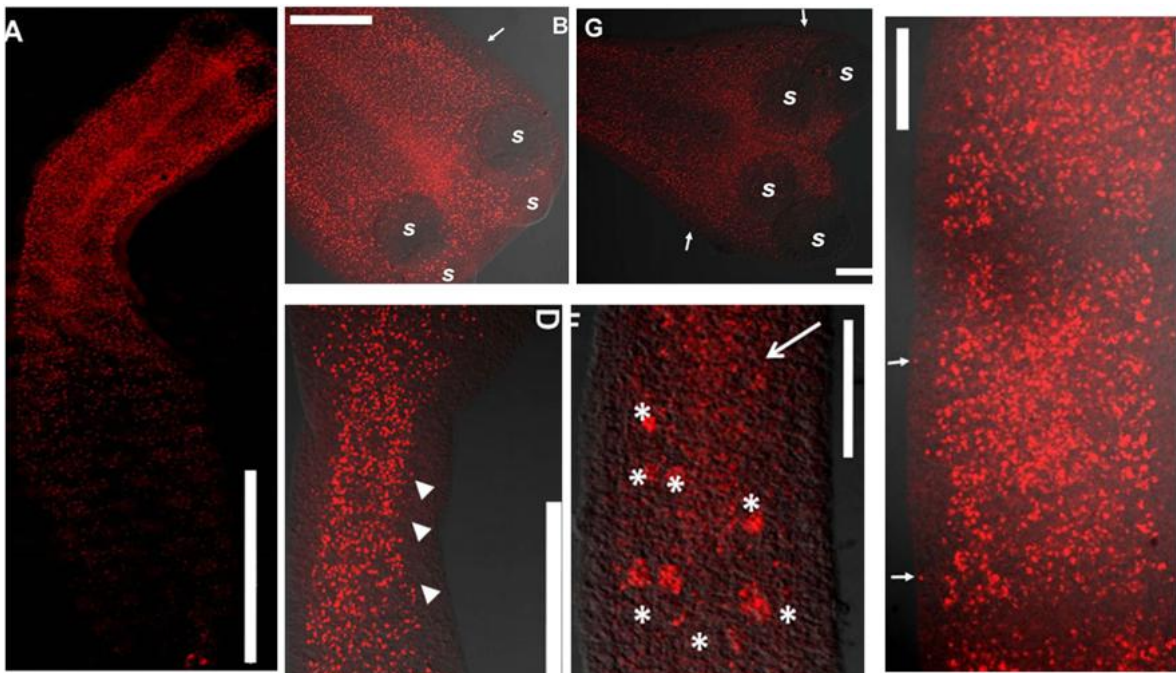


Figura 7- Caracterización de células proliferantes durante el desarrollo de *M. corti* A) Distribución de células proliferativas en la larva tetratridia de *M. corti*. La barra representa 100um; B) Escólex representante del ejemplar presentada en A. La flecha indica un núcleo BrdU positivo presente en el parénquima cortical. Barra representa en B y C.; C) Región cercana al cuello del tetratridio iniciando la segmentación, flechas indican acumulaciones periódicas de células BrdU en el parénquima medular. D) Escólex; E) Inicio de la estrobila Las flechas indican núcleos BrdU en la región subtegumentaria.; F) Segmentos posteriores Las flechas indican los primordios genitales y los asteriscos indican primordio de los testes. Figuras tomadas de [29]

Histológicamente, células con características similares a las células germinativas descritas de otros cestodos se encuentran presentes en el parénquima medular de *M. corti*. Las características de las células germinativas en *M. corti* son similares a las de otros cestodos [54–56,59], en cuanto a su núcleo voluminoso, nucléolo prominente, forma oval e intensa basofilia debida a la abundancia de ARN.

4. Marcadores Moleculares

Las *stem cell* juegan roles críticos en diversos procesos, tales como renovación, crecimiento, reparación y regeneración de tejidos (Figura 8) [69]. El uso de diferentes técnicas, hibridación *in situ*, depleción de neoblastos por irradiación, ARNi, etc; ha permitido la identificación de diversos marcadores de neoblastos.

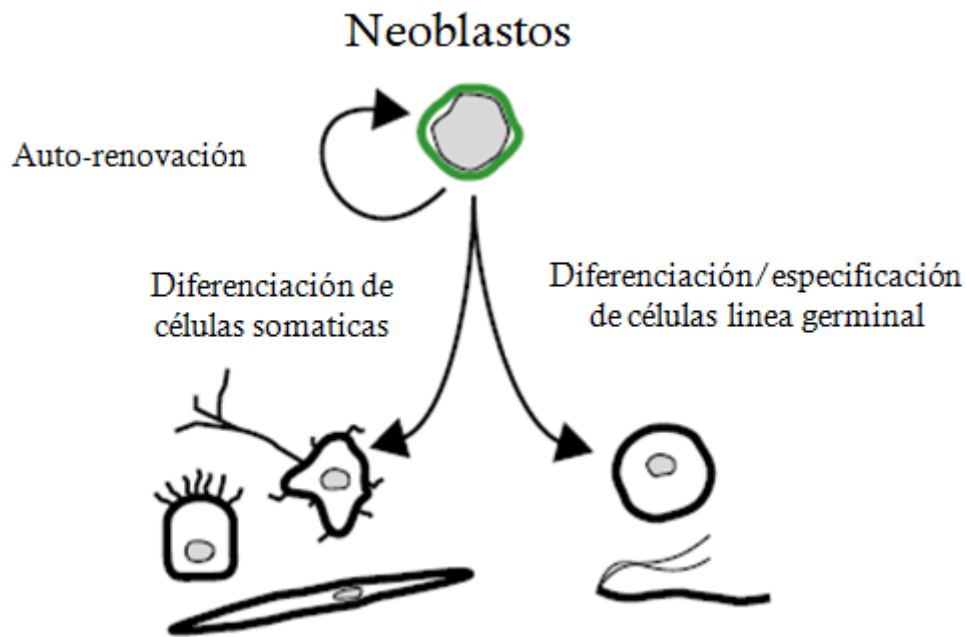


Figura 8- Esquema de los procesos en los que se encuentran involucrados los neoblastos. Los neoblastos pueden “auto-mantenerse” para mantener el número suficiente de estas células en el organismo, diferenciarse en células somáticas durante la regeneración y renovación de tejidos o producir células de la línea germinal. Modificado de[69]

Estos genes, inicialmente han sido descritos por análisis de genes candidatos, o por datos de transcriptoma de planarias depletadas de neoblastos por irradiación y de neoblastos purificados por Citometría de flujo [38,39,46,70–82].

Para la identificación de estos genes potenciales, se ha utilizado la irradiación gamma para la depleción de neoblastos. Los neoblastos de planaria son sensibles a la irradiación ionizante debido a que son las únicas células con capacidad proliferativa.[46,74,83–85]. Análisis de expresión basados en *microarray* en dos especies diferentes, comparando planarias normales e irradiadas ha permitido identificar una serie de genes potencialmente involucrados en la biología de los neoblastos [46,74] El estudio del transcriptoma de planarias depletadas de

neoblastos por irradiación (*S. mediterránea*) ha permitido la identificación de genes *downregulated* bajo esta condición [86].

Como es de esperar, ya que los neoblastos son únicas células con capacidad proliferativa, entre estos genes encuentran genes involucrados en la regulación del ciclo celular, pero también se genes que regulan mecanismos de desarrollo en otros animales [52] Estos genes marcadores característicos de estas células o de subpoblaciones de las mismas, han mostrando la heterogenicidad de los neoblastos.

Estudios de RNAi, han permitido encontrar posibles funciones para estos genes, relacionándolos con el mantenimiento, proliferación y diferenciación de estos neoblastos. Estos estudios han mostrado que, los neoblastos expresan específicamente componentes de GMP (del inglés *Germline Multipotency Program*, y de manera más general, proteínas relacionadas a regulación de expresión de genes [77,87].

Muchos de estos genes parecen tener una función importante en el mantenimiento de los neoblastos o en la diferenciación, incluyendo ortólogos de *vasa* o *piwi* [73,81]. Varios genes *piwi* son expresados en neoblastos de planaria, particularmente *smedwi-1* de *S. mediterranea* y su ortólogo en otras especies de planarias es el marcador molecular más utilizado[73,88].

Aunque no es muy claro el fenotipo observado para *smedwi-1* en RNAi, otros genes *piwi* (*smedwi-1* y *smedwi-3*) han mostrado, por RNAi, ser importantes para la diferenciación y auto renovación de los neoblastos.

Otros tipos de genes se encuentran expresados en neoblastos, entre ellos reguladores epigenéticos y factores de transcripción, así como también componentes de vías de señalización, incluyendo receptor FGF [39,79,81,89].

Recientemente, Onal y colaboradores (2012), describieron en planarias ortólogos de los reguladores ESC de mamíferos Oct4, Sox2 y Nanog. Los transcriptomas de *stem cell* de mamíferos y planarias están muy correlacionados. Esto puede indicar la conservación de los reguladores responsables de la pluripotencia entre ambos modelos, y más aún, la conservación entre todos los metazoarios.

En la Tabla 1 se resumen parte de los marcadores moleculares que han sido estudiados. La misma se elaboró basada en las revisiones de los trabajos de Koziol, 2009, Önal et al, 2012 y Rodríguez-Esteban et al ,2015 [29,79,82]

Tabla 1- Genes marcadores de neoblastos, basada en los trabajos [29,79,82]

Función	Gen *	Familia génica	Patrón de expresión	Fenotipo de RNAi	Referencia
Procesamiento, metabolismo y transporte de ARN	<i>DjPum</i>	Pumilio (unión al ARN, regulación post-transcripcional)	Neoblastos, ganglio cerebral.	Inhibición de la regeneración y homeostasis de renovación celular (neoblastos no mantenidos).	Salveti et al., 2005 [75]
	<i>smedwi-1, smedwi-2, smedwi-3</i>	<i>PIWI</i> (Argonauta)	Todos expresados en neoblastos. <i>Smedwi-1</i> : neoblastos y progenie indiferenciada post-mitótica.	<i>smedwi-1</i> : casi sin efecto. <i>smedwi-2</i> : inhibición de la regeneración y proliferación; neoblastos incapaces de diferenciarse.	Reddien, Oviedo et al. 2005; Guo et al., 2006; Palakodeti et al., 2008 [73,76,88]
	<i>DjPiwi-1</i>	<i>PIWI</i> (Argonauta)	Subpoblación de neoblastos en la línea media del organismo.	Efectos menores en la regeneración.	Rossi et al., 2006.[38]
	<i>smed-bruli</i>	Bruno (unión al ARN, regulación traduccional)	Neoblastos, ganglio cerebral.	Inhibición de la regeneración y homeostasis de renovación celular (neoblastos no mantenidos).	Guo et al., 2006 [76]
	<i>Dj-nos</i>	Nanos (co-represores post-transcripcionales)	Células de la línea germinal (neoblastos acumulados en cordones laterales).	Sin efecto apreciable.	Sato et al., 2006 [90]
	<i>smed-nos</i>	Nanos (co-represores post-transcripcionales)	Células de la línea germinal (neoblastos acumulados en cordones laterales), probables células precursoras de los ojos durante el desarrollo.	Eliminación de las gónadas masculinas.	Handberg-Thorsager y Saló, 2007; Wang et al., 2007 [91,92]
	<i>Smed-sam68L1</i>	SML-1 (proteína de unión a ARN)	Neoblastos	Reducción de número de progenie de neoblastos. Defectos en la regeneración	Rossie et al.,2007 ; Eisenhoffer et al., 2008[46,74]
	<i>DjCBC-1</i>	DEAD ARN helicasa	Neoblastos, línea germinal, neuronas.	Sin fenotipo aparente	Yoshida-Kashikawa et al., 2007 [50]
	<i>Smed-THOCA</i>	subunidad 4 de factor de exportación ARNm THO	Neoblastos	Reducción de número de progenie de neoblastos. Defectos en la regeneración	Eisenhoffer et al., 2008[46]

	<i>Smed-tud1</i>	proteínas con dominio TUDOR	Neoblastos, línea germinal, sistema nervioso central	Reducción en el número de neoblastos.	Solana et al. 2009[93]
Procesamiento, metabolismo y transporte de ARN	<i>Smed-tud2</i>	proteínas con dominio TUDOR	Línea germinal	No estudiado	Solana et al. 2009 [93]
	<i>DjvlgA</i>	<i>Vasa</i> / PL10 (DEAD ARN helicasas)	Neoblastos y progenie; células de la línea germinal	Sin fenotipo aparente	Shibata et al.,1999; Rouhana et al., 2010 [70,77]
	<i>Smed-SmB</i>	Lsm (proteína de unión al ARN)	Neoblastos, ganglio cefálico	Reducción en el número de neoblastos. Pérdida de la organización estructural de cuerpos cromatoides. En planarias en regeneración no generación de blastema	Fernandez-Taborda et al., 2010 [94]
	<i>Smed-nf-YB</i>	Factor de transcripción	células de línea germinal	Degeneración de testes	Wang et al., 2010 [95]
	<i>Smed-dlx</i>	Distal-less (Factor de transcripción con homeodominio)	En ojo durante regeneración	Inhibición de la Regeneración	Lapan et al. , 2011 [96]
	<i>Smed-sp6-9</i>	Sp6-9 (factor de transcripción con dedos de zinc)	En ojo durante regeneración	Inhibición de la Regeneración (copa de los ojos)	Lapan et al. , 2011[96]
	<i>Smed-soxP-1</i>	Proteínas que contienen SRY-box (Factor de transcripción)	Distribución parenquimática (neoblastos)	Reducción en el número de neoblastos.	Wagner et al., 2012 [81]
	<i>Smed-ncoa5</i>	Receptor nuclear	Neoblastos	Neoblastos incapaces de repoblar hospedador irradiado (reducción en el número de neoblastos) En regeneración, imposibilidad de generar Blastemas	Böser et al., 2013 [97]
	<i>Smed-pbx</i>	Factor de transcripción con homeodominio tipo TALE	Neoblastos y progenie; ganglio cefálico.	Defectos en la regeneración	Blassberg et al., 2013 [98]

	<i>Smed-foxA</i>	Familia <i>Forkhead</i> (Factor de transcripción)	Subtipo de neoblastos	Inhibición de regeneración de faringe	Adler et al. , 2014 [99]
Ciclo celular y replicación	<i>DjMCM2</i>	MCM (factores de replicación)	Neoblastos	No estudiado	Rossi et al., 2000[71]
	<i>DjPCNA</i>	PCNA (abrazadera de la ADN polimerasa)	Neoblastos	No estudiado	Orii et al., 2005 [72]
	<i>Smed-cyclinB</i>	Ciclina B	Neoblastos	No estudiado	Reddien et al., 2005, Eisenhoffer et al 2008 [46,73]
	<i>Smed-RRM2-1</i>	Subunidad de ribonucleotido difosfato reductasa	Neoblastos	Reducción de número de progenie de neoblastos. Defectos en la regeneración	Eisenhoffer et al., 2008 [46]
	<i>Smed-pp32a</i>	pp32 (fosfoproteína nuclear)	Neoblastos	Sin efecto apreciable.	Eisenhoffer et al., 2008 [46]
	<i>Smed-CYCD</i>	CDK4/6 (Ciclina D)	No detectado	Reducción de número de progenie de neoblastos . Defectos en la regeneración	Zhu et al., 2013 [100]
Modificación de la Cromatina	<i>Smed-H2AZ</i>	Histona (variante de Histona H2A)	Neoblastos	No estudiado	Rossi et al.,2007 [74]
	<i>Smed-cdh4</i>	CHD4/Mi (remodelador de cromatina)	Neoblastos, cerebro y cordones nerviosos ventrales	Reducción de número de progenie de neoblastos . Inhibición de Regeneración	Scimone et al., 2010 [101]
	<i>Smed-hdac-1</i>	Histona deacetilasa (Remodeladores de cromatina)	Neoblastos, nervioso	Reducción de número de progenie de neoblastos . Defectos en la regeneración	Zhu et al., 2013 [100]
	<i>Smed-cbx-1</i>	Proteína con cromobox	Neoblastos	Reducción de número de progenie de neoblastos . Defectos en la regeneración	Eisenhoffer et al., 2008; Bonucelli et al., 2010 [46,102]
Unión a ácido nucleico	<i>Smed-HMGs</i>	<i>high mobility group</i>	Neoblastos	No estudiado	Eisenhoffer et al., 2008 [46]

Chaperonas	<i>Smed-Hsp60</i>	Proteínas de <i>Shock</i> térmico	No detectable en organismos intactos. En regeneración se dispara expresión en blastema	Inhibición de regeneración	Fernandez-Taborda et al., 2011[103]
	<i>Smed-Hsp70</i>	Proteínas de <i>Shock</i> térmico	Neoblastos. Regeneración en blastema y post-blastema	Inhibición de regeneración	Fernandez-Taborda et al., 2011 [103]
Comunicación celular	<i>DjFGFR-1</i>	Receptor de FGF (<i>Fibroblast Growth Factor</i>).	ARNm: neoblastos, ganglio cerebral.	Sin fenotipo aparente	Ogawa et al., 2002 [89].
	<i>smedinx-11</i>	Innexinas (forman uniones comunicantes entre células)	ARNm: neoblastos, y progenie post-mitótica	Inhibición de la regeneración y homeostasis de renovación celular (neoblastos no mantenidos).	Guo et al., 2006 [76]
	<i>Smed-egfr-3</i>	Receptor de factor de crecimiento epidérmico	Cabeza, faringe y menor expresión en ganglio cefálico. Durante regeneración en blastemas	Defectos en la formación de blastemas	Fraguas et al., 2011[104]
Otras	<i>Smed-msh-2</i>	MMR (Reparación de <i>Mismatch</i> en el ADN)	Neoblastos y progenie	Ventaja de supervivencia de la población de neoblastos en presencia de daño de ADN	Hollenbach et al., 2011 [105]
	<i>Smed-lst-8</i>	Componente de mTORC1	Neoblastos	Defectos en la formación de blastemas	Gonzalez -Esteves et al., 2012 [106]
	<i>Smed -smg-1</i>	PIKK (kinasa)	Expresado en células del parénquima (incluyendo neoblastos) ,ganglio cefálico,	En organismos intactos, acumulación de neoblastos y progenie e invasión espacial de estos neoblastos. En planarias en regeneración, acumulación descontrolada de neoblastos y progenie en blastemas	González-Estévez et al. , 2012 [106]
	<i>Smed-jnk</i>	MAPKs kinasas	Subtipo de neoblastos	Inhibición de regeneración	Almuedo-Castillo et al., 2014 [107]

	<i>Smed-tert</i>	TERT (subunidad enzimática de la telomerasa)	Neoblastos, línea germinal	Reducción de actividad telomerasa (en planarias sexuales)	Tan et al., 2011 [108]
	<i>Smed-tor</i>	TOR (proteín kinasa)	Expresión ubicua en neoblastos y tejidos diferenciados	Reducción de actividad mitótica. Disminución de la expresión de neoblastos y progenie. EN planarias en regeneración, imposibilidad de generar blastemas	González-Estévez et al., 2012 [106]

*

*Dj (Dugesia japónica)**Smed (Schmidtea mediterranea)*

Poco se sabe sobre la expresión génica de células germinativas en cestodos, pero el análisis de los genomas de Cestodos y Trematodos han mostrado que importantes componentes de GMP, como ortólogos de *piwi*, *vasa* y tudor (grupo 9) han sido perdidas en estos linajes [109]. Esto sumado a la falta de cuerpos cromatoides en cestodos, implica la existencia de diferencias importantes con los neoblastos de planaria.[110]. Es posible que, en las células germinativas de Cestodos y Trematodos, otros genes paralogos de Argonauta, DEAD box helicasa junto con proteínas de la familia de genes 9, pueden realizar funciones similares a *piwi*, *vasa* u genes tudor.

En trematodos, la existencia de neoblastos-*like* ha sido demostrada, en células del parénquima de adulto y de la larva en *S. mansoni*. Parálogos de *piwi* (*sm-ago2-1*) y *vasa* (*sm-vlg-3*), son expresados específicamente en estas células tipo neoblasto y tienen roles importantes en su mantenimiento [80,111]. Además, al menos un receptor FGF es expresado específicamente neoblastos y es esencial para su mantenimiento indicando relaciones comunes ente planaria y *S. mansoni* [80].

o o o o

4.1. pL10, DEAD-box RNA helicasa ATP dependiente

Las DEAD box helicasa pertenecen a la superfamilia 2 de helicasa (SF2), esta superfamilia representa la mayor familia de helicasa en eucariotas y consiste en muchas familias de proteínas bien definidas. El gen pL10, pertenece a la familia de DEAD box helicasa.

Esta familia se encuentra caracterizada por la presencia de 12 motivos conservados que permiten su clasificación [112,113]. De acuerdo a esta, las proteínas DEAD box y familias relacionadas DEAH, DExHy DExD se refieren comúnmente como familia de helicasa DExD/H. Estas familias relacionadas pueden ser distinguidas de las DEAD box por variaciones en estos motivos conservados. Estos motivos se agrupan en un core central de 350-400pb, con extremos amino y carboxy terminales variables [114]. Estos motivos se encuentran involucrados en la unión e hidrolisis del ATP (actividad ATPasa), actividad helicasa y su regulación [114,115].

La familia DEAD lleva el nombre derivado de la secuencia DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) presente en el motivo Walker B.

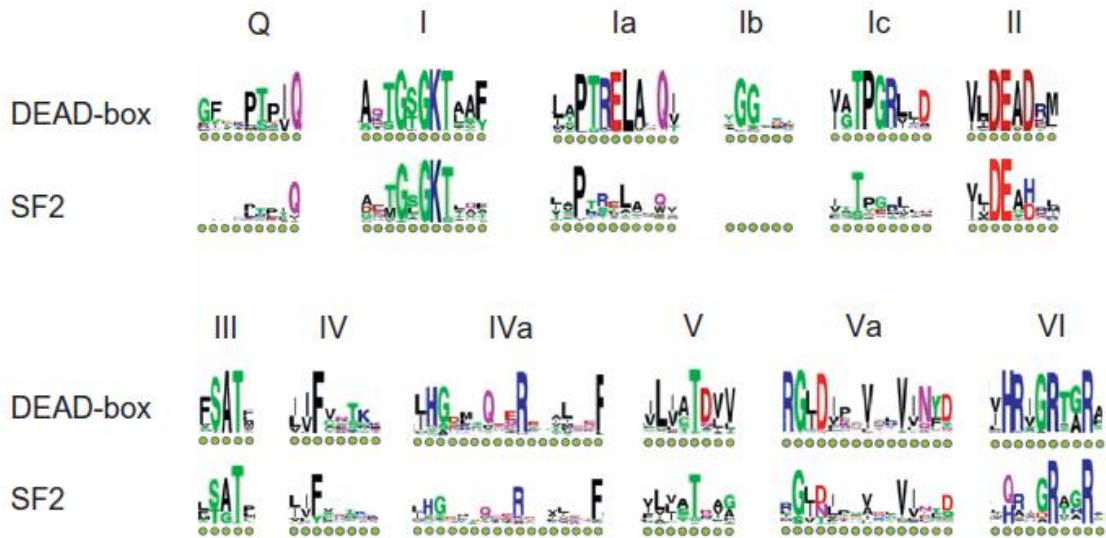


Figura 9- Motivos característicos en proteínas *DEAD-box*. En la figura se muestra la secuencia conservada de los motivos característicos de proteínas *DEAD-box*, comparados con la secuencia consenso de *SF2*. Figura tomada de [116]

Estructuralmente presentan un plegamiento similar al de proteínas con dominio tipo α - β -RecA. La determinación de estructura cristalográfica, muestra que presentan dos dominios globulares unidos, conteniendo generalmente 5 hojas β y 5 hélices α (Figura 10). El dominio amino terminal, contiene los motivos de unión al ATP (Q, cuando está presente; I y II); los motivos de hidrolisis del ATP (mot III) y motivos de unión al ARN (Ia y Ib). El carboxy terminal contiene los motivos de unión al ARN (IV y V) y el VI que puede coordinar la actividad de desenrollamiento y la actividad ATPasa. Las secuencias que flanquean la región del core son las más variables, permitiendo interacciones adicionales con los sustratos o cofactores; o bien confieren actividades adicionales [114].

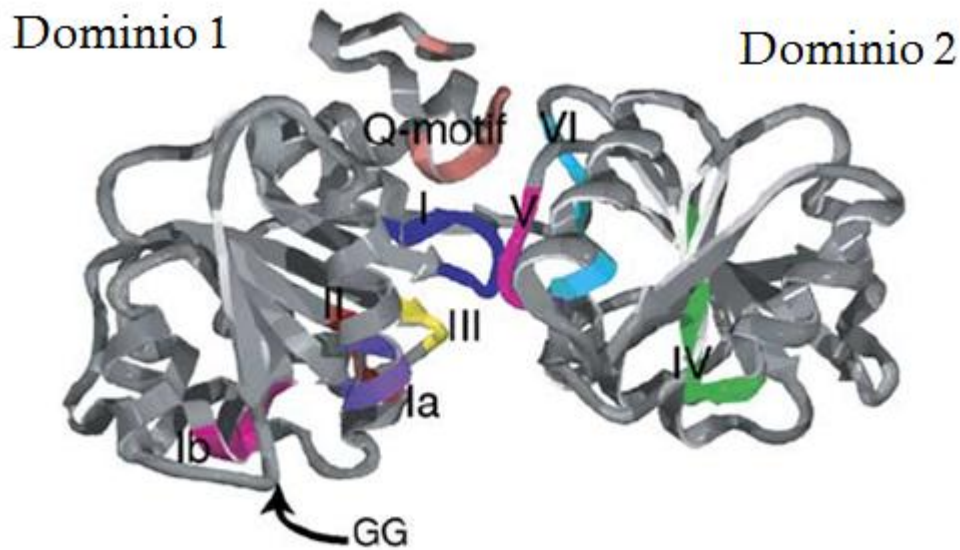


Figura 10- Estructura cristalográfica de proteína DEAD box *Mj* DEAD. En la figura se señalan los dos dominios. Los distintos motivos se señalan de la siguiente manera: motivo Q en salmón, el motivo I en azul, motivo Ia en violeta, motivo Ib en rosa, motivo II en rojo, motivo III en amarillo, motivo IV en verde, motivo V en violeta claro, motivo VI en turquesa. Modificado de [114].

Las proteínas DEAD se encuentran presentes en casi todos los organismos y en muchos de ellos cumplen importantes funciones. En eucariotas, están involucradas en todos los procesos que tienen que ver con el ARN, incluyendo *splicing*, exportación nuclear, degradación y traducción. Además se cree que juegan un rol en la regulación del desarrollo. En procariontes están involucradas con la biogénesis del ribosoma, iniciación de la traducción y el decaimiento del ARN. Haciendo de estas proteínas jugadores cruciales en las adaptaciones y respuestas al estrés del ambiente [115,117].

Entre las proteínas DEAD box, las proteínas *Vasa* y pL10 son muy similares entre ellas. La secuencia de aminoácidos de las proteínas pL10 se encuentra altamente conservada desde levaduras a humanos [118].

El gen DED1 de levadura, es requerido para la iniciación de la traducción en casi todos los ARN mensajeros, y proteína pL10 de ratón puede rescatar el fenotipo de una levadura con una delección *ded1* [119]. Estos resultados indican que DED1 y pL10 son homólogos funcionales y que la función de genes pL10-like se encuentra conservada entre los eucariotas. Pese a que pL10 se expresa durante la espermatogénesis en ratón [120], otros pL10 relacionados como *DEAD2* and

DEAD3 en ratón, y pL10 en zebrafish, son expresados en una variedad de tejidos [121–124]. Por lo que genes relacionados con pL10 pueden presentar diversas funciones.

Los genes *vasa* solo han sido reportados en metazoarios [95,124–138]. Se ha visto que el ARN mensajero de los productos de los genes relacionados con *vasa* se localiza en las células de la línea germinal. En algunos casos, por ejemplo *vasa* de *Drosophila*, *glh-1*, *glh-2* and *glh-4* en *Caenorhabditis elegans*, y la proteína XVLG-1 de *Xenopus* se ha visto que se encuentran involucradas en la formación y mantenimiento de la línea germinal. [126,135,139].

La similitud de la secuencia de las proteínas relacionadas a *vasa* y pL10 y la existencia restringida de *vasa* a los metazoarios sugiere que el antecesor de los genes *vasa* es derivado de un gen antecesor relacionado con pL10 adquiriendo una especificidad en la línea germinal. Sin embargo, no se sabe si los genes relacionados con *vasas* están involucrados en la formación de la línea germinal en metazoarios inferiores [140]. Recientemente, Tsai et al. (2013), ha reportado que Trematodos y Cestodos carecen de marcadores moleculares característicos de células madre, como lo genes *piwi* y *vasa*. En lugar del gen *vasa*, presentan al menos dos copias de pL10, y estos autores proponen que estos genes estarían cumpliendo la función de genes *vasa* en estos organismos [109].

Los trematodos *S. mansoni* and *Clonorchis sinensis*, y el Monogeneo, *Neobenedenia girellae*, codifican para una helicasa DEAD –box que puede ser asignada a la familia de pL10 [109,141,142]. Los análisis de expresión de los genes helicasa *Smvlg2* de *S.mansoni* y *Ngvlg2* de *N. girellae*, revelan que éstos presentan expresión específica de la línea germinal. [142,143]. El silenciamiento por ARN interferencia (ARNi) del gen *Ngvlg2*, lleva a la pérdida de células de la línea germinal, indicando que estos genes juegan un rol durante el desarrollo de la línea germinal [110,142]. Estos hallazgos sugieren que las vías asociadas a células madre en platelmintos parásitos puede estar altamente modificada [109].

o o o o

4.2. Genes pumilio.

Las proteínas pumilio son miembro de la familia de proteínas de unión al ARN conocidas como familia PUF. Las proteínas PUF constituyen una familia conservada evolutivamente de represores post-transcripcionales, presentes desde levaduras hasta humanos y plantas. Se encuentran caracterizadas por la presencia de un dominio C-terminal altamente conservado, denominado PUM-HD (del inglés *Pum Homology Domain*);[144,145]. Las proteínas PUF se unen a motivos de secuencia en la región 3'UTR de blancos de ARNm específicos y reprimen su traducción.

El dominio PUM-HD consiste en ocho repetidos imperfectos colocados en tándem de 36 aminoácidos más regiones N y C- terminales flanqueantes, llamadas Csp-1 y Csp-2 respectivamente. Estas regiones flanqueantes también muestran similitud menor con los repetidos por lo que también se les llama repetido 1 y 8 (Figura 11). Típicamente, el dominio PUM –HD se ubica en la región C- terminal de la proteína, existiendo grandes regiones de secuencias repetitivas poco conservadas en la región N- terminal [144,146,147].

Estructuralmente, cada uno de los repetidos del PUM-HD conforma una unidad estructural compacta, y los diferentes repetidos tienen un plegamiento muy similar entre sí, conformado por tres alfa-hélices. La cara cóncava, interactúa con el ARN [148] y está conformada por la sucesión paralela de las hélices número 2 de todos los repetidos. La hélice 2 es la más conservada evolutivamente [144,148], y mutaciones en la región N-terminal de la misma afectan la unión al ARN blanco[149]. La cara convexa está conformada por la hélice 3 de cada repetido, e interacciona con varios factores proteicos requeridos para la función de proteínas Pum. Es relativamente lisa, excepto por la protrusión de un pequeño *loop* entre los repetidos R7 y R8 (Figura 11). revisado por [29]

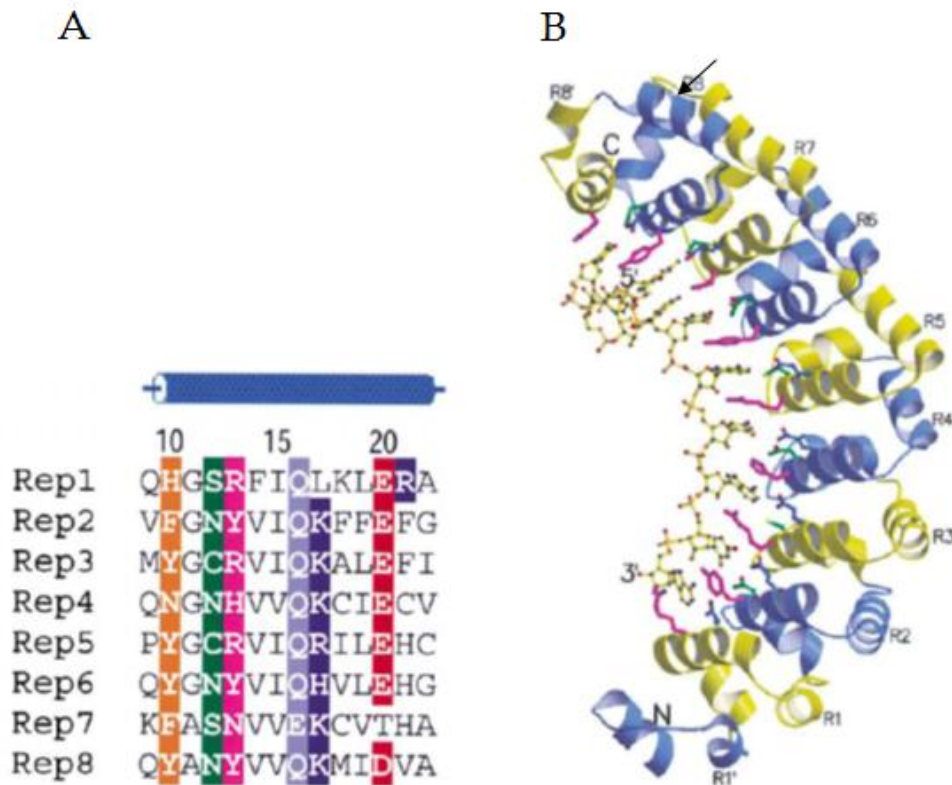


Figura 11- Dominio PUM- HD. A) Alineamiento de los residuos de la hélice 2 de cada repetido PUF. B) Estructura del dominio PUM-HD de la proteína *HsPum 1* en complejo con el ARN NRE. R1 a R8 indican los repetidos sucesivos, y R1' y R8' los motivos Csp-1 y Csp-2 respectivamente. Los repetidos están coloreados en forma alternada de azul y amarillo. Además, se encuentran representadas las cadenas laterales de los residuos en las hélices número 2 de cada repetido que interaccionan directamente con el ARN. La flecha indica el *loop* que protruye entre R7 y R8. Modificado de [29]

Las proteínas PUF reconocen secuencias específicas, conocidas como elemento de reconocimiento NRE (*nanos response element*) presente en el 3'UTR de mensajeros blanco. El primer NRE descrito fue identificado en el 3'UTR del factor de transcripción *hunchback* (*hb*) compuesto por la secuencia 5'UGUANAUA 3' [150].

La conservación de las características bioquímicas y genéticas de la función de los miembros de la familia PUF han sido reveladas a partir de estudios de organismos modelo. Las proteínas Pumilio de todos los eucariotas investigados son capaces de unir el NRE del 3'UTR de *hunchback* de *D. melanogaster*, demostrando la alta conservación en la especificidad de unión [151–158].

La interacción de varios factores proteicos con Pum se encuentra conservada en diferentes modelos. La interacción entre Pum y homólogos de Nanos de *D. melanogaster* es una de las más caracterizadas. Nanos es una proteína con una región C-terminal conservada, compuesta por dos dedos de Zinc, a través de la cual interacciona en forma inespecífica con el ARN [145] y con Pumilio [159].

La proteína pumilio de *Drosophila* Pum es requerida para la segmentación apropiada de la parte posterior y la formación del abdomen en embriones tempranos. Además es necesaria para el establecimiento de un gradiente antero-posterior de la transcripción del factor hb, el cual se encuentra ausente en la región del polo posterior del organismo, permitiendo la formación de los 8 segmentos abdominales. Pumilio se une a NRE dentro de la región 3' UTR del ARNm de hb, y causa el arresto traduccional, reprimiendo la traducción de ARNm de hb, solo en la región posterior del embrión, dado su asociación con la proteína dedos de zinc, Nanos (nos) junto con la interacción de Bruno (Brat) Nos es reclutada por PUM/NRE para formar un complejo cuaternario consistente con PUM, ARNm de hb, nos y Brat [159]. Este complejo promueve la deadenilación del mensajero del gen hb e inhibe la síntesis de la proteína. Pum también puede reprimir la traducción de hb por un mecanismo secundario independiente de polyA, probablemente por interferencia con factores de iniciación de la traducción. Interesantemente, el dominio de unión al ARN, PUM-HD, es suficiente para cumplir la función de PUM y el solo es capaz de unir ARN.

Otros factores proteicos con los que interactúa Pum en diferentes animales suelen ser también proteínas de unión al ARN (en muchos casos con funciones de regulación traduccional conocida), como ser Brat y Ccr4 en *D. melanogaster* [160–162], DAZ y DAZL en humanos [163] y CPEB en *C. elegans* y en oocitos de *Xenopus* [155,164].

Si bien las funciones biológicas de las proteínas PUF son muy variadas, incluso para una única proteína, se ha planteado que su función ancestral en los metazoos es el mantenimiento de la proliferación y pluripotencialidad en células madre [144]. En *D. melanogaster*, Pumilio es requerido para mantener la proliferación y evitar la diferenciación anticipada de las células de la línea germinal, así como para su desarrollo y migración [165–168]. El desarrollo correcto de las células germinales

en *D. melanogaster* depende, al menos en parte, de la represión del ARNm de la ciclina B en las células germinales primordiales mediada por Pumilio y Nanos, que evita divisiones prematuras de las mismas [161]. Pumilio interactúa también con el ARNm de la ciclina B de *Xenopus laevis* [155]. Roles similares han sido encontrados para PUF-8 y FBF-1/2 de *C. elegans* [169–172], y para DjPum de *Dugesia japonica*.

La expresión de proteínas Pumilio no suele ser exclusiva de células madre, dada la gran variedad de funciones que cumplen. Sin embargo, una expresión preferencial en células germinales y otros tipos de células madre, y en el sistema nervioso, ha sido caracterizada para algunos organismos [75,163,173]. La expresión en células germinales ha sido confirmada en otros modelos como *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* (ver los párrafos anteriores).

Otras funciones de proteínas PUF son muy variadas, e incluyen la regulación de la excitabilidad, dendritogénesis y otros detalles de la fisiología neuronal en mamíferos y en *Drosophila* [174–180]. En *C. elegans*, que posee una gran cantidad de proteínas PUF, se han descrito otros roles como el cambio en la línea germinal de *C. elegans* entre la producción de espermatozoides y la producción de oocitos [181], y el desarrollo de la vulva [182] y de la hipodermis [183]. En *Drosophila*, *pumilio* fue caracterizado originalmente por su efecto maternal en la represión de los ARNm de *hunchback* y *bicoid* durante el establecimiento del gradiente morfogénico antero-posterior en embriones [184–187]. Estudios de la asociación de proteínas PUF con ARNm a gran escala muestran el gran número de ARNm con los que cada proteína interactúa, sugiriendo un número aún mayor de funciones [188,189]. Por ejemplo, en el caso de Puf3p de *S. cerevisiae*, este tipo de estudios demostró la asociación de la proteína principalmente con ARNm codificantes para proteínas mitocondriales, lo que llevó a la caracterización del rol principal de esta proteína como un regulador de la biogénesis y actividad mitocondrial [188,190,191].

En el caso particular de *M.corti*, Koziol et al, (2008) describen dos secuencias parciales correspondientes al dominio PUM-HD en este organismo Pum 1 y Pum 2. La expresión de estos genes se da a lo largo de todo el desarrollo entre el estadio larval y el estadio adulto. La expresión se observa en varios tejidos pero preferencialmente en los primordios de los testes y genitales y en las células

proliferantes. Estos resultados obtenidos durante la realización de la Tesis de Maestría del Dr. Uriel Koziol, sugieren que existe una expresión preferencial de los genes pumilio en las células proliferantes, pero no serían marcadores moleculares exclusivos de las mismas (Figura 12) [29]

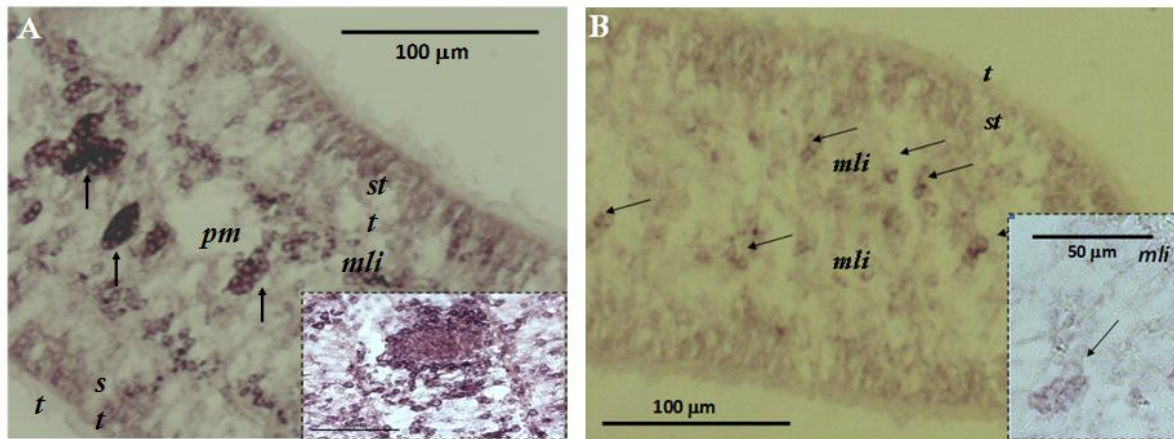


Figura 12- Patrones de Expresión de Pumilio de *M. corti*. A) Hibridación *in situ* con sonda *antisense* para McPum1. Corte longitudinal de tetratiridio iniciando la segmentación en la región del cuerpo. Las flechas indican los primordios de los testes. En el inserto de la figura, se muestra la expresión en el primordio genital tardío. B) Hibridación *in situ* con una sonda *antisense* para McPum2. Corte longitudinal de tetratiridio iniciando la segmentación en la región del cuerpo. En la figura se observa la expresión de McPum2 en otros tejidos; es importante notar las células fuertemente positivas en la región de los cordones musculares internos, indicadas por flechas Figuras modificadas de [29]

Durante el desarrollo de la Tesis de Maestría del Dr. Koziol, aún no se disponía con la cantidad de genomas con los que contamos actualmente. Koziol realizó una búsqueda para determinar la presencia de estos genes. Para ello, realizó una búsqueda por RT-PCR en varias especies de platelmintos incluyendo secuencias de Cestodos, Trematodos y Tricladias y una búsqueda *in silico*, en bases de datos de EST y en los genomas que sí se encontraban disponibles (*E. multilocularis*, *S. mansoni*, *S. mediterranea*) Sus resultados muestran que, en las especies de Tricladia estudiadas existe únicamente un gen con dominio PUM-HD, mientras que en las especies de platelmintos parásitos hay dos genes con dominio PUM-HD [29]. Estas secuencias forman dos clados completamente separados, PlathPum1, con secuencias de todas las especies y PlatyPum2, compuesto exclusivamente por secuencias de especies parásitas [11].

1. Hipótesis de Trabajo

En *M.corti* y otros Cestodos existen las células proliferativas, siendo estas las únicas con capacidad de dividirse o proliferar, por lo que creemos que van existir genes que se expresen específicamente en estas células que servirían como marcadores de las mismas.

La hipótesis en la cual se basa este trabajo, es que los mecanismos celulares y moleculares del desarrollo se conservan evolutivamente, lo que hace probable que se encuentren mecanismos similares a otros organismos en parásitos.

La caracterización de estas células puede aportar en la comprensión de la biología parasitaria y su eventual control.

2. Objetivo

◦ ◦ ◦ ◦

2.1. Objetivo general

Contribuir al conocimiento y la caracterización de las células germinativas de cestodos mediante su aislamiento y cultivo. Evaluar el rol funcional de los marcadores moleculares en estas células.

◦ ◦ ◦ ◦

2.2. Objetivos específicos

- 1.- Identificar y aislar las células proliferativas para su caracterización.
- 2.- Investigar si pL10 y pumilio son marcadores moleculares de las células proliferativas de *M. corti*.
- 3.- Estudiar su rol en el mantenimiento y diferenciación de las células proliferativas utilizando interferencia de ARN.

Para cumplir con estos objetivos específicos, nos planteamos las siguientes actividades:

1. Realizar la caracterización morfológica y molecular de los distintos tipos celulares, utilizando microscopía confocal, electrónica de transmisión, técnicas moleculares, histoquímica e inmunohistoquímica.

2. Aislar células proliferantes o germinativas de *M. corti*
3. Optimización del cultivo de células germinativas de *M. corti*
4. Aislar el gen pL10 de *M. corti*.
5. Determinar la expresión los marcadores moleculares de las células germinativas.
6. Realizar análisis bioinformáticos para determinar la estructura de los genes marcadores de estas células y análisis filogenéticos de los mismos, utilizando la información disponible en los genomas de parásitos recientemente secuenciados.
7. Realizar estudios funcionales mediante ARN interferencia para inferir el rol de los genes pumilio y pL10.

3. Estrategia Experimental

En la Figura 13 se ilustra el esquema experimental empleado en el transcurso de esta tesis.

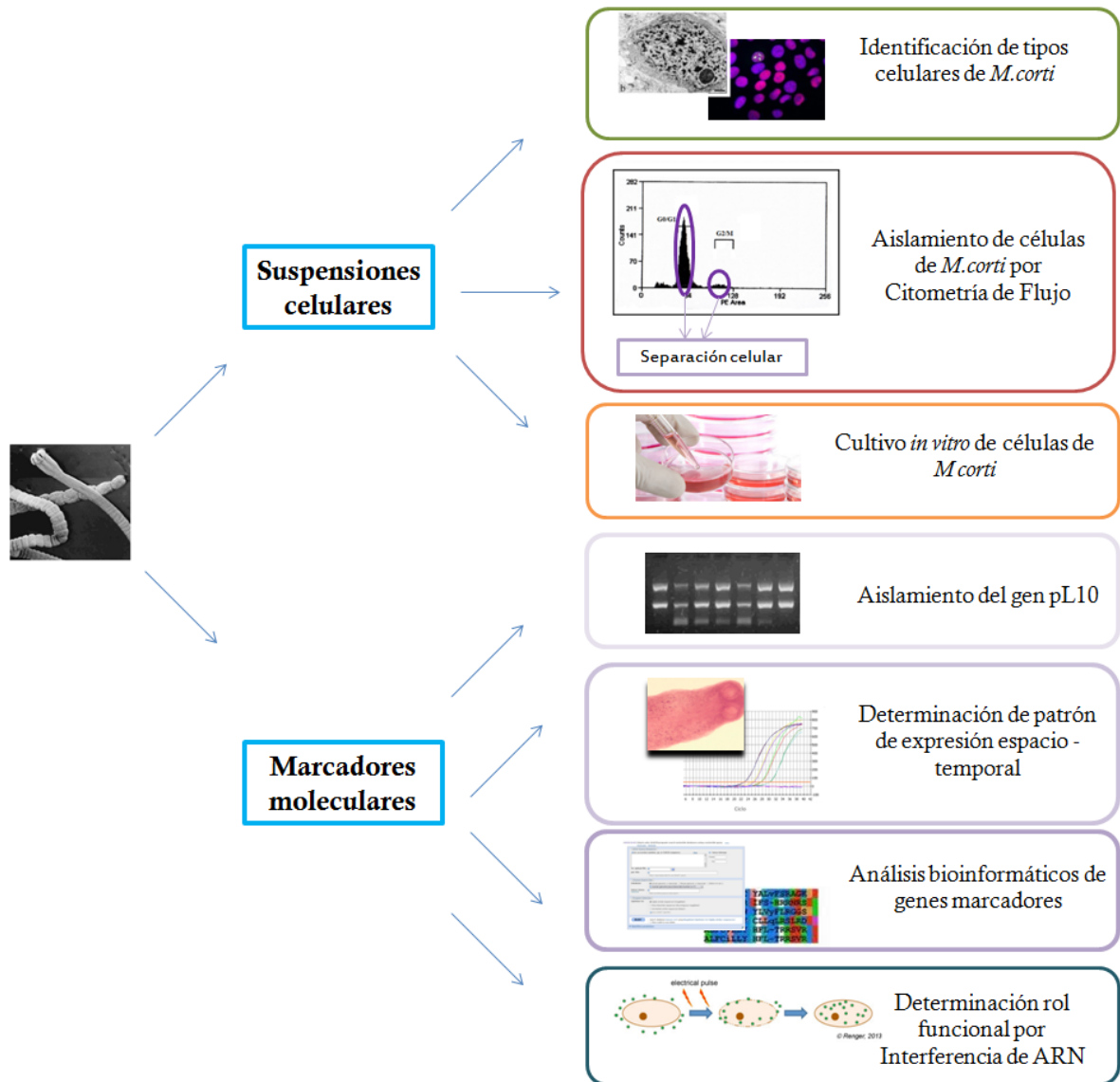


Figura 13- Esquema de estrategia experimental empleada en esta Tesis.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención de Material Parasitario.

o o o o

1.1. Cultivo de *M. corti*

La cepa de *M. corti* estudiada fue obtenida originalmente por Specht y Voge (1965). Los tetratiridios de *M. corti* fueron mantenidos mediante pasajes sucesivos en la cavidad peritoneal de ratones por Jenny Saldaña y colaboradores en el Laboratorio de Experimentación Animal de la Facultad de Química- Universidad de la Republica.

Para el cultivo *in vitro* de *M. corti*, los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical en acuerdo con la reglamentación vigente por la CHEA. Se extrajeron los tetratiridios en condiciones de esterilidad mediante el lavado de la cavidad peritoneal con solución de Hanks (Apéndice 1). Los tetratiridios recogidos fueron lavados cinco veces con solución de Hanks estéril, y cultivados en placas con medio RPMI 1640 modificado (RPMI mod; Apéndice 1) con 10 % de suero fetal bovino (SFB; *PAA pantech*) en estufa incubadora a 37 ° C en una atmósfera con 5 % CO₂. En ocasiones los tetratiridios fueron almacenados en solución de Hanks a 4 ° C por hasta 2 semanas antes de iniciar su cultivo. Se cultivaron aproximadamente 400 a 500 µl de tetratiridios por cada 15 ml de medio. Se cambiaron dos tercios del medio de cultivo cada 48 a 72 horas.

Para inducir el desarrollo estrobilar, se añadió al medio, tras dos días de cultivo, Taurocolato de Sodio (TC; *Sigma-Aldrich*; 1 mg/ml concentración final), manteniendo la concentración de TC durante los cambios de medio. Esto es una modificación del método reportado por Britos (2000). En estas condiciones, el desarrollo estrobilar es aparente a los 7 -10 días de cultivo tras la inducción con TC. Los cultivos fueron realizados con la colaboración del Dr. Uriel Koziol, la Mag. Alicia Costáble y la Lic. Serrana Estrade.

o o o o

1.2. Extracción de ARN

Los organismos obtenidos de los cultivos *in vitro* se lavaron 3 veces en PBS (Apéndice1) y se congelaron a -80°C en *Trizol* (*Sigma – Aldrich*). Se utilizó 1ml de *Trizol* por cada 100 μl de parásitos. Los mismos se disgregaron mecánicamente con homogeneizador y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se agregaron 0.2ml de cloroformo y se incubaron a temperatura ambiente 5 minutos. Se centrifugó 15 minutos a 12000xg a 4°C y se recuperó la fase acuosa en un nuevo tubo. Se precipitó el ARN con 0.5 volúmenes de isopropanol incubando 5 minutos a temperatura ambiente y centrifugando durante 15 minutos a 12000xg a 4°C . El ARN se resuspendió en 30 μl de agua mQ fresca. Se almacenó a -80°C hasta el momento de su uso.

Se eliminó el ADN remanente por digestión con *DNAsa RQ1* (*Promega*). Se realizó en una reacción de 100 μl de volumen final conteniendo 15 μl de ARN (aproximadamente 5 μg), *buffer* 1X, 10 unidades de enzima y 100 unidades de inhibidor de RNAsas (*Ribolock RNase inhibitor, Fermentas* o *RNase Inhibitor, Applied Biosystems*). Se incubó 60 minutos a 37°C y a continuación a 65°C durante 10 minutos con *Stop Solution*. Se agregó un volumen de cloroformo y se recuperó la fase acuosa. Se precipitó el ARN durante toda la noche a -80°C con 0.1 volúmenes de LiCl 4M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Se centrifugó 20 minutos a 12000xg a 4°C y se resuspendió en 15 μl de agua mQ fresca y se almacenó a -80°C hasta el momento de su uso.

Se verificó la integridad del ARN mediante análisis en gel de agarosa (ver punto 2.1) y se cuantificó mediante espectrofotometría a 260nm.

Todo el material utilizado fue tratado con DEPC 0.1% y se utilizaron reactivos libres de RNAsas.

o o o o

1.3. Retrotranscripción de ARN

La síntesis de ADNc se realizó a partir de 1µg de ARN total utilizando 400 unidades de SuperScript II ® RT (*Invitrogen*), en presencia de 40 unidades de inhibidor de RNAsas (*RNAsa out, Invitrogen*), utilizando 500 ng de Oligo dT (*Fermentas*), según indicaciones del fabricante. Se utilizaron muestras de ARN provenientes de diferentes etapas del desarrollo estrobilar de *M.corti*.

o o o o

1.4. Preparación de material para estudios histológicos

1.4.1. Preparación de organismos para Hibridación *in toto* de ARN

Se fijaron ejemplares de *M. corti* en distintos estadios del desarrollo estrobilar durante 30 minutos en PFA 4% diluido en PBS, a temperatura ambiente, y se lavaron durante 5 minutos con PBSTx (Apéndice 1). Se incubaron en solución reductora (Apéndice 1) durante 10 minutos a 37°C y se lavaron durante 5 minutos en PBSTx. Se deshidrataron incubando a temperatura ambiente en metanol 50% diluido en PBSTx y metanol 100% durante 10 minutos cada uno. Se almacenaron a -20°C hasta el momento de su uso.

1.4.2. Preparación de organismos para inmunohistoquímica

Se fijaron ejemplares con 5 días de cultivo toda la noche a 4°C en PFA 4% diluidos en PBS y se lavaron 3 veces con PBS durante 15 minutos con agitación. A continuación se deshidrataron por incubación en soluciones de concentración creciente de etanol diluido en PBS (30%, 50%, 75% y 100%) durante 15 minutos con agitación.

Luego se procesaron para inclusión en bloque de parafina. Para ello, se incubaron 2 veces con isopropanol durante 15 minutos y se realizó un pasaje por Paraplast:isopropanol 1:1 durante 40 min a 60°C. Para finalizar, se incluyeron en Paraplast puro y se realizaron cortes con micrótopo de 10µm de espesor. Se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

2. Electroforesis de Ácidos nucleicos

o o o o

2.1. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

Para el análisis de ácidos nucleicos se realizaron geles de agarosa al 1% en *buffer* TAE 1X (Apéndice 1). Para la siembra de las muestras se utilizó el *buffer* de carga 6X descrito en el Apéndice 1.

En el caso de geles para el análisis de ARN se utilizaron reactivos libres de RNasas y soluciones preparadas con agua tratada con DEPC.

La visualización se realizó mediante exposición a luz ultravioleta junto a la adición al gel de distintos agentes intercalantes: Bromuro de Etidio (*Sigma-Aldrich*), *GelRed™* (*Biotium*) o *SYBR® Safe*. Los geles fueron fotografiados con una cámara fotográfica acoplada a un transiluminador de luz ultravioleta.

3. Suspensiones celulares

o o o o

3.1. Células Fijadas: Glicerol Acético Agua

Este protocolo se utilizó en los experimentos para determinar las características morfológicas de los distintos tipos celulares de *M. corti*.

Los especímenes fueron cultivados durante 6 días según el protocolo descrito en la sección 1.1. Los especímenes se lavaron 3 veces en PBS y se colocaron en una solución de macerado que contiene Glicerol, ácido acético y agua en una proporción 1:1:13 respectivamente, durante toda la noche a 4°C (protocolo modificado de [192]). Al día siguiente los ejemplares, se disgregan totalmente con pipeta pasteur, las células fueron diluidas 1/10 en solución de macerado y adheridas en portaobjetos silanizados (*SilanePrep slides, Sigma-Aldrich*).

o o o o

3.2. Células Viables : Tripsina- EDTA

Las suspensiones celulares se llevaron a cabo a partir del cultivo *in vitro* de 200µl de larvas, durante 6 días en 6ml de RPMI modificado según lo descrito en la sección 1.1.

Las larvas se lavaron 2 veces en PBS suplementado con 2 mM EDTA (PBS-EDTA). Posteriormente los tetratiridios se cortaron con bisturí en placa de Petri en un volumen mínimo de PBS -EDTA. A continuación fueron incubados en horno de hibridación con agitación (45 strokes/minutos) con una solución 0.1% de Tripsina en PBS -EDTA a 37 ° C durante 10 minutos. Con el mazo de un mortero las larvas fueron disgregadas suavemente sobre una placa de Petri y colocadas en agitación 5 minutos con una barra magnética a mínima velocidad a temperatura ambiente. La disgregación completa de las suspensiones se logró utilizando pipeta pasteur y posteriormente se agregó suero fetal bovino al 1% para inactivar la tripsina.

Los restos celulares se dejaron sedimentar y las células se colocaron en otro tubo. Finalmente, las células se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron a la densidad celular adecuada (10^6 células /ml).

El PBS-EDTA puede ser sustituido por RPMI suplementado con 2mM de EDTA para la preparación de células vivas que son utilizadas para el aislamiento de las células por citometría de flujo y cultivo *in vitro*.

4. Identificación de tipos celulares en *M.corti*

En esta sección se describen los tipos de tinción con diferentes colorantes con el fin de identificar los tipos celulares de *M.corti*.

En todos los casos las suspensiones celulares fueron obtenidas según el siguiente esquema:



◦ ◦ ◦ ◦

4.1. Ensayo de Proliferación celular utilizando *Click-iT® EdU Alexa Fluor® 594 (Thermo Cientific)*

En este ensayo, el análogo de timidina EdU es incorporado al ADN recién sintetizado y luego puede ser revelado y detectado por microscopia de fluorescencia. Para ello, los tetratiridios fueron incubados con 20µM de EdU durante 4hs.

Posteriormente se procede a realizar el revelado según instrucciones del fabricante. Brevemente, los ejemplares se fijaron en PFA 4% durante 20 minutos, se lavaron 3 veces con 3% BSA en PBS durante 5 minutos. Se permeabilizaron con 0.5% tritón-X100 en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. En paralelo se prepara el cocktail de reacción (volumen final 500µl) según instrucciones del fabricante, utilizando 430µl de 1X Buffer de reacción Click-iT® EdU, 20 µl de CuSO₄, 1,2 µl Azida Alexa Fluor® 594 (590/615nm), 50µl de Buffer aditivo 1X Click-iT® EdU.

Una vez finalizado el tiempo de permeabilización, los preparados son lavados 2 veces con 3% BSA en PBS durante 5 minutos y se agrega el cocktail de reacción, el cual se incuba durante 30 minutos en la oscuridad. Nuevamente son lavados con 3% BSA en PBS durante 5 minutos.

En este punto se realiza la tinción con dilactato de DAPI (1µg/ml) durante 15 minutos en la oscuridad. Las láminas son lavadas 3 veces con PBS por 5 minutos y montadas en *Anti Fade Prolong (Invitrogen)*. Los preparados se analizaron mediante microscopia de fluorescencia con microscopio Olympus, utilizando el filtro U-MNUA2 (UV, Excitación 360-370nm) para DAPI y el U-MWIG3 (rodamina, Excitación 530-550nm) para EdU.

◦ ◦ ◦ ◦

4.2. Tinción de suspensiones celulares con *Whole Cellomic Stain (WCS, Thermo Scientific)*

WCS, es un colorante que se une a la superficie celular y componentes de células fijadas de manera uniforme, lo que permite la identificación de los límites y forma de las células mediante microscopía de fluorescencia.

Las células son obtenidas según el esquema descrito anteriormente y el protocolo de tinción se detalla a continuación: Inicialmente se realizó el protocolo de revelado de EdU, sin realizar la tinción con DAPI (sección 4.1). A continuación, se lavaron los preparados 2 veces con PBS por 5 minutos y se cubrieron con la solución de WCS (según instrucciones de fabricante) e incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. Se lavaron 3 veces con PBS por 5 minutos y se realiza la tinción con DAPI (ver sección 4.1). El resultado se analizó con microscopia de epifluorescencia utilizando microscopio Zeiss Axio Imager. Filtro UV para DAPI, FITC para WCS y Rodamina para EdU.

o o o o

4.3. Tinción de suspensiones celulares con IP

El IP es un colorante que se une a los ácidos nucleicos, impermeable a la membrana plasmática, por lo que por general se utiliza para analizar viabilidad celular, pero además puede ser utilizado para teñir células y visualizar la forma de las mismas.

En el caso de la tinción con IP no se realizó el revelado de EdU ya que se superponen los espectros de emisión y por lo tanto no es posible la detección de ambas tinciones.

Para teñir con este colorante, las células fueron permeabilizadas con 2 pasajes en 0.05 % tritón en PBS durante 5 minutos e incubadas durante 15 minutos con una solución de IP 2,5µg/ml protegido de la luz. Finalmente, fueron lavadas 3 veces con PBS por 5 minutos y se realizó la tinción con DAPI según lo descrito anteriormente. Se analizó el resultado con microscopia de epifluorescencia en microscopio Olympus utilizando los filtros de UV para DAPI y rodamina para IP.

o o o o

4.4. Tinción de suspensiones celulares con Rojo Nilo (RN, Sigma-Aldrich)

RN es una tinción lipofílica, que permite detectar la presencia de gotas lipídicas intracelulares por microscopia de fluorescencia.

Las muestras se lavaron 2 veces con PBS por 5 minutos, se incubaron con una solución de RN 100ng/ml, y posteriormente se realizó la tinción con DAPI

(sección 4.1). Se analizó los resultados con Microscopia de epifluorescencia en el microscopio Zeiss Axio Imager. Z1, utilizando el filtro UV para DAPI y el de rodamina para RN.

o o o o

4.5. Inmunohistoquímica en cortes y suspensiones celulares

Los preparados se fijaron en PFA 4% durante 15 minutos, se lavaron 3 veces con PBS durante 5 minutos. Las células se permeabilizaron utilizando 2 lavados en 0.05% Tritón diluido en PBS durante 5 minutos. Los preparados se bloquearon en 3% BSA en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente y se incubaron con la dilución adecuada del anticuerpo primario de interés durante toda la noche a 4°C. En la Tabla 2 se resumen los anticuerpos utilizados para inmunohistoquímica en este trabajo.

Después de remover el anticuerpo primario, se lavaron 4 veces en PBS durante 10 minutos y se incubaron con anticuerpo secundario correspondiente (ver Tabla 2) durante 2 horas a temperatura ambiente. Nuevamente se repite el paso de lavado y se realiza la tinción con DAPI (sección 4.1). Se analizaron los resultados con Microscopia de epifluorescencia en el microscopio Zeiss Axio Imager. Z1.

Tabla 2-Anticuerpos utilizados para inmunohistoquímica.

Anticuerpo	Especie de origen	Dilución utilizada	Fuente
Anti tubulina acetilada	Ratón	1/50	Santa Cruz
Anti ribosoma	Conejo	1/500	Kun et al., 2007 [193]
Anti ratón conjugado FITC (anticuerpo secundario)	Conejo	1/100	Jackson Immunoresearch (115-095-003)
Anti conejo conjugado TRITC (anticuerpo secundario)	Burro	1/100	Jackson Immunoresearch (711-025-152)
Anti conejo conjugado FITC (anticuerpo secundario)	Cabra	1/1000	Invitrogen (A11034)

Las suspensiones celulares preparadas se realizaron según lo descrito en la sección 3.1, y se continúa con el protocolo descrito en los párrafos anteriores.

o o o o

4.6. Microscopia electrónica de transmisión

Organismos con 4 días de cultivo se lavaron 3 veces en buffer PHEM (Apéndice 1) durante 5 minutos y fueron fijados con Glutaraldehído (GA) al 2,5% diluido en PHEM por 1 hora a 4°C con agitación. Los organismos fueron lavados 6 veces en PHEM y se realizó la descalcificación de los corpúsculos calcáreos utilizando EDTA 0,5M pH 7.2 toda la noche a 4°C con agitación. Los ejemplares fueron lavados 3 veces durante 5 minutos con PHEM y se realiza la tinción con tetróxido de osmio al 1 % en PHEM durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Nuevamente fueron lavados 6 veces durante 5 minutos con PHEM y se procedió a deshidratar la muestra con pasajes sucesivos en solución de Alcohol 25,50, 70, 95, % durante 15 minutos cada vez, con agitación. Luego fueron lavados 2 veces durante 30 minutos en alcohol 100% sin agua (alcohol con arcilla). Para realizar el proceso de infiltración en resina epoxy (Apéndice 1), la muestra fue sumergida en pasajes sucesivos de resina 25, 50, 75 y 100 % durante 60 minutos. Finalmente, la muestra quedó toda la noche en campana de extracción en resina pura. Al día siguiente se cambió la resina y los ejemplares se colocaron en moldes para armado de los bloques. Para la polimerización se colocaron 1 día a 40°C y otro a 60°C.

Cuando se trabajó con suspensiones celulares, el protocolo seguido fue el mismo con las siguientes modificaciones:

Las suspensiones fueron utilizadas siguiendo el protocolo glicerol –ácetico y agua (sección 3.1), entre cada punto se agregó un paso de centrifugación a 4000rpm durante 3 minutos para colectar las células en el fondo del tubo y se trabajó en eppendorf tipo *beem* para generar bloques que contenga las células en la punta del mismo.

5. Citometría de Flujo y *sorting* celular

o o o o

5.1. Análisis de ciclo celular por citometría de flujo

Las suspensiones celulares se prepararon según el protocolo Tripsina- EDTA descrito en la sección 3.2.

Las mismas se fijaron en etanol 70% toda la noche a 4°C, se lavaron en PBS-EDTA y se resuspendieron a la densidad celular apropiada (10⁶ células /ml). Aproximadamente 300.000 células fueron tratadas con 50 µg/ml de Ribonucleasa A (Sigma – Aldrich) durante 15 minutos a 37°C y teñidas durante 15 minutos a temperatura ambiente, protegidas de la luz, con 50 µg/ml de Ioduro de Propidio (IP). El análisis de ciclo celular por citometría de flujo se realizó utilizando el citómetro de flujo CyAn (Beckman Coulter) o BD Accuri C6 (BD Biociencias).

o o o o

5.2. Tinción de suspensiones celulares para separación celular por citometría de Flujo

Las suspensiones celulares monodispersas de ejemplares de *M. corti* fueron realizadas según el protocolo descrito en la sección 3.2

Las células viables se identificaron utilizando una tinción selectiva con Calceina AM (*Sigma-Aldrich*; excitación 485 nm; emisión 530 nm), substrato de una estearasa intracelular, útil para determinar el volumen celular de células viables. Las células muertas se identificaron por su incapacidad de excluir el Ioduro de propidio (*Sigma-Aldrich*, excitación 535, emisión 560–720 nm). El análisis de ciclo celular se realizó utilizando la tinción nuclear de ADN con Hoechst 33342 (*Invitrogen*; excitación 360 nm, emisión 400–550 nm).

La utilización conjunta de estos colorantes permite la identificación de aquellas células que se encuentran en fase G₀/G₁ del ciclo celular, las cuales consistirán en una mezcla compleja de células diferenciadas no proliferantes y de células proliferantes en G₁, y aquellas células que se encuentran proliferando en fases S y G₂/M del ciclo celular.

Para la realización de la tinción, las suspensiones se incubaron a 20°C durante 90 minutos en RPMI –EDTA conteniendo 0,02 µg/ml de Calceina AM. Las células se lavaron en PBS-EDTA y se resuspendieron a una densidad celular adecuada (10⁶ células/ml). El colorante Hoechst se agregó a una concentración final de 5 µg/ml y se incubó a 37°C durante 20 minutos. El IP se agregó a una concentración de 2 µg/ml inmediatamente antes de realizar el ensayo de citometría.

o o o o

5.3. Análisis de ciclo celular y *sorting* de células vivas

El análisis citométrico y *sorting* celular se realiza utilizando *High-Speed cell sorter MoFlo (Beckman Coulter)*. El análisis de los siguientes parámetros se realiza en el *software Summit 4.3 (Beckman Coulter)*: *forward-angle light scatter, sideward scatter*, canal FL 1 (530/40 *band pass*) para la detección de Calceina AM, canal FL 2 (580/30 *band pass*) para IP y canales FL 7/FL 8 para determinación de Hoechst 33342 y análisis de pulso para discriminación de dobletes (pulso-área/pulso altura en un rango de 450/65 nm).

Las células se separaron utilizando boquilla de 70nm a una tasa de 500-1500 eventos por segundo. El modo de *sorting* seleccionado es *Sort purify 1-2 drops* y la decisión de *sorting* fue realizada según la siguiente estrategia de *gates*: Plots FL1/FL2 para determinación de células viables (Calceina AM positivas /IP negativas), FL7/FL8 para análisis de pulso para discriminación de dobletes y selección de G2/M y G0/G1.

Los ensayos de citometría de flujo fueron realizados en colaboración con la Dra. Valentina Porro y Mag. Sabina Victoria en la Unidad de Biología Celular del Instituto Pasteur de Montevideo.

6. Cultivo de células de *M.corti*

Las células fueron preparadas según lo descrito en la sección 3.2, con las siguientes modificaciones:

Las suspensiones se prepararon a partir de 2,5ml de tetratiridios, la incubación con la solución de Tripsina 0.1% se realizó durante 20 minutos. Después de la disgregación con pipeta pasteur, se agregó un paso de filtración de restos celulares a través de una malla de 30 μm . Antes de recuperar las células, éstas se centrifugaron a 1000rpm durante 1 minuto para eliminar los corpúsculos calcáreos. Finalmente, una vez recuperadas fueron resuspendidas a una densidad celular adecuada y se filtraron por filtro estéril *Easy streiner* de 40 μm .

Debido a que las células de *M. corti* son muy pequeñas y difíciles de distinguir de los restos celulares se vuelve muy difícil la cuantificación directamente por

microscopia. Por ello, se realizó una cuantificación por medición de la turbidez con un espectrofotómetro, donde 1 unidad de células del parásito, se define como la cantidad de células que incrementan la turbidez (Abs_{600nm}) en 0.02 unidades luego de ser diluidas 125: 10.000 en PBS. En los ensayos realizados se plaquearon 500U totales de células.

Las condiciones que se utilizaron para cultivar las células se detallan en la Tabla 3, donde las condiciones reductoras hacen referencia a suplementar los medios con L-Cisteína, β -mercaptoetanol y *bathocuproine disulfonic acid*.

Tabla 3- Condiciones de cultivo testeadas para cultivo de células.

Medio	Condiciones Reductoras	CO2	N2	Temperatura
DMEM	-	+	+	37°C
	'+			
Líquido Hidático	-	+	+	37°C
	'+			
Medio condicionado por Hepatocitos	-	+	+	37°C
	'+			

Para evaluar la capacidad de proliferación de las células *in vitro*, fue realizado un ensayo de incorporación de EdU, previo a ser retiradas de cultivo, durante 4 hs. Se retiraron alícuotas de las distintas condiciones de cultivo a las 20 y 72hs, se centrifugaron y resuspendieron en volumen mínimo de solución de macerado. Posteriormente, las células fueron adheridas y se revela el ensayo de EdU según indicaciones del fabricante (ver sección 4.1).

Los ensayos de cultivo *in vitro* fueron realizados en el laboratorio del Dr. Klaus Brehm Institut für Hygiene und Mikrobiologie. Würzburg-Alemania, con la colaboración del Dr. Uriel Koziol.

7. Estudio marcadores moleculares de *M. corti*

o o o o

7.1. Aislamiento del gen pL10

Para el aislamiento del gen pL10 se utilizaron los cebadores degenerados descritos en la Tabla 4, utilizados previamente en la literatura para lograr la amplificación del gen *vasa* en otros organismos [142]. Los mismos permiten la

amplificación de una región de 400 pares de bases correspondiente a los motivos MACAQT y DRMLDMG.

Tabla 4-Primer degenerados utilizados para amplificar gen pL10

Nombre	Secuencia	Codifica
FwVasa	5'-ATGGCNTGYGCNCARACNGGN-3'	MACAQTG
RvVasa	5'-NCCCATRRTCNCARCATNCKRTC-3'	DRMLDMG

La amplificación del fragmento de interés se realizó a partir de 2 µl de ADNc de segmentados de *M.corti*, *F.hepatica* y *E.granulosus*, en 25 µl de reacción, bajo las siguientes condiciones de reacción: 1X de buffer de reacción, 2mM de MgCl₂, 0.4 mM de dNTPs, 0.8µM de cada cebador, 1 unidad de taq polimerasa (*Invitrogen*) por reacción. Las condiciones de ciclado utilizadas para la amplificación se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5- Condiciones de amplificación para amplificación gen pL10.

Etapas	Temperatura °C	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	5 min
Desnaturalización	94	30 seg
<i>Annealing</i>	50	30 seg
Extensión	72	1 min
Extensión final	72	10 min
Ciclos	35	

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa 1% en buffer TAE y visualizado por tinción con Bromuro de Etidio para la amplificación de *M. corti*, mientras que para *E. granulosus* y *F. hepatica* los productos de amplificación se visualizaron utilizando SYBR® Safe.

Los fragmentos de interés fueron purificados utilizando *Isolate PCR and Gel kit* (*Bioline*) y clonados en vector pGEM- T- Easy (Promega) según instrucciones del fabricante.

Células competentes de *Escherichia coli XL-1 Blue* (Stratgene), fueron transformadas con las mezclas de ligación y plaqueadas en LB –ampicilina (100µg/ml), X-gal (30µg/ml) e IPTG (0.16mM).

El rastreo de clones recombinantes, se realizó por purificación de ADN plasmídico mediante el método de lisis alcalina seguida de digestión con EcoRI o PCR utilizando los cebadores *Fw vasa* y *Rv vasa*. El protocolo de PCR se realizó en 15 µl de reacción, bajo las siguientes condiciones: 1X de buffer de reacción, 2mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.2µM de cada cebador, 0.5 µl de plásmido y 0.5 unidades de U-Taq polimerasa (SBS) por reacción. Las condiciones de ciclado utilizadas son las mismas utilizadas para la amplificación.

Se secuenciaron clones recombinantes para cada muestra hasta obtener un clon correspondiente a la secuencia del gen de interés para cada especie. Las reacciones de secuenciación fueron realizadas por el servicio de secuenciación de MACROGEN Korea o por la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo.

Para determinar la identidad de las secuencias obtenidas se realizó en primer lugar una búsqueda en la base de datos del *NCBI (National Center for Biotechnology Information)* mediante la herramienta *BLAST* [194].

Los alineamientos se realizaron con el programa *ClustalX* [195] y se visualizaron mediante el programa *BioEdit* [196]. Los análisis filogenéticos se realizaron con el programa *MEGA5* [197]

o o o o

7.2. Estudios *in silico* de genes marcadores

7.2.1. Búsqueda de genes ortólogos de pL10 y genes pumilio en genomas de Cestodos.

La búsqueda de secuencias homólogas de los genes pL10 en los genomas de los Cestodos: *E. multilocularis*, *E. granulosus*, *T. solium* y *H. micostoma* se realizó mediante *BLAST* en la base de datos disponible en *WormBase ParaSite* (<http://parasite.wormbase.org/>).

Los alineamientos se realizaron con el programa *ClustalX* [195] y se visualizaron mediante el programa *BioEdit* [196]. Las estructuras génicas analizadas en el programa *Artemis* (<http://www.sanger.ac.uk/science/tools/artemis>).

7.2.2. Búsqueda de miembros de la familia de DEAD en genomas de Cestodos.

La búsqueda de secuencias de genes pertenecientes a los miembros de la familia DEAD en los genomas de Cestodos: *E. multilocularis*, *E. granulosus*, *M.corti*, *T. solium* y *H. micostoma*, se realizó buscando genes que contengan el término DEAD en las anotaciones automáticas de los genomas disponibles en *WormBase ParaSite* (<http://parasite.wormbase.org/>).

Los alineamientos de las secuencias obtenidas fueron alineadas con MUSCLE v3.8.31 [198], utilizando los parámetros por defecto. Los análisis filogenéticos se realizaron con FastTree version 2.1.7 SSE3 [199], con los parámetros por defecto.

7.2.3. Identificación de isoformas de genes marcadores pL10 y pumilio

Los datos obtenidos del transcriptoma del estadio larval de *M. corti* fueron ensamblados por la Mag. Alicia Costábile utilizando el *pipeline* TUXEDO. El mismo asigna dos identificadores a un transcripto, Nombre del gen y nombre de la isoforma correspondiente. Si hay existencia de *reads* que apoyen una isoforma diferente al modelo génico se ensambla un nuevo transcripto.

Para realizar la búsqueda de las isoformas, se realiza una búsqueda de los genes en base a su nombre de gen asignado y se interroga la cantidad de transcriptos que fueron ensamblados.

o o o o

7.3. Análisis de expresión por PCR a tiempo final de genes pumilio y pL10

Para estudiar cómo se expresan los genes pumilio y pL10 durante el desarrollo estrobilar se realizaron reacciones de PCR utilizando como molde ADNc de *M.corti*, obtenido según lo descrito en sección 1.3, a diferentes etapas del desarrollo (0, 2, 4, 6, 8, 10 días de cultivo).

Las reacciones de PCR fueron realizadas con Taq polimerasa (*Invitrogen*) en las condiciones descritas anteriormente (sección 7.1), utilizando 1µg de ADNc para

cada caso. Los cebadores y las condiciones de amplificación se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6- Cebadores y condiciones de amplificación utilizadas para PCR semicuantitativa durante desarrollo de *M.corti*

	Fw (5' → 3')		Rv (5' → 3')	
Pum1	ATCATATGCCAGAACGGAGTCGCCTAC		ATGGATCCTCACTCAAGTAGTATTTCTCCATCTTGC	
Pum2	ATCATATGGGGTTCTCTGTAGCAGAAGCCAG		ATGGATCCTCAACCACCTGTTAGCAGAAGCCAG	
pL10	ATGCGGTCGGCTTCATC		TTAATACGACTCACTATAGCGCCTTCTTGATACCGTTCT	
Programa amplificación	Pum 1 y Pum 2		pL10	
Etapas	Temperatura °C	Tiempo	Temperatura °C	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	5 min	94	5 min
Desnaturalización	94	30 seg	94	30 seg
Annealing	58	30 seg	50	30 seg
Extensión	72	1min	72	1min
Extensión final	72	10 min	72	10 min
Ciclos	35		35	

o o o o

7.4. Análisis de expresión por RT- PCR en tiempo real de genes pumilio y pL10

Los ADNc utilizados para las reacciones de RT- PCR fueron obtenidos por la Mag. Alicia Costáble [200]. Brevemente, se realizaron cultivos, a diferentes días de desarrollo de *M.corti* entre tetratiridio (0 y 2 días de cultivo) y gusano adulto segmentado (10 días de cultivo), incluyendo gusanos alargados (4 días de cultivo), gusanos con principio de segmentación (6 días de cultivo) y gusanos segmentados no adultos (8 días de cultivo). Incluyendo a su vez, replicas técnicas de las mismas y selección de organismos para obtener poblaciones homogéneas. Posteriormente, se extrajo el ARN como se describió en la sección 1.2, realizando el tratamiento con DNasa de la mitad del volumen obtenido. Los ARNs generados fueron retrotranscritos con la enzima *SuperScript™ III (Invitrogen)* utilizando 500ng de ARN total, 250ng de cebadores al azar (*Invitrogen*), 0.5mM de cada dNTP, 40 unidades de inhibidor de RNasas (*Ribolock RNase Inhibitor – Fermentas*), y 200 unidades de enzima en un volumen final de 20µl. Se incubó la reacción durante 60

minutos a 50°C y a continuación 15 minutos a 70°C para inactivar la enzima. Para la retrotranscripción se eligió una estrategia de cebado al azar (*random priming*), que permite obtener una representación de todos los tipos de ARN presentes. Además evita los sesgos debido al enriquecimiento de mensajeros cortos o la pérdida de mensajeros con el extremo 3' degradado que se producirían al sintetizar el ADNc con un cebador oligo-dT.

Se diseñaron cebadores específicos para los genes de interés pumilio y pL10 (Tabla 7) y se utilizaron como genes control Tropomiosina y GAPDH (diseñados y validados por Mag. Alicia Costáble).

Tabla 7- Primers diseñados para ensayo qPCR

	Fw	Rv
Pum 1	5'AGGAAAAGAGCCGCATAATCG 3'	5'GTACCTCGTTGATCAGAGCTTG 3'
Pum2	5' GGCTGTAGAGTGATCCAACG 3'	5' GTGCTGGACAACGTAATTTCC 3'
pL10	5'CAGCACAAGAAAGCGAACATG 3'	5' TTATGGCGGTGCGGATATG 3'
GAPDH	5'CGTACTGCCGCACAAAATATTATT 3'	5'CCGTTAAGCTCAGGAATGACCTT3'
TPM	5'CAAGTGGTCTGCTCTAACTGAAACGT 3'	5'ACGGTTCCTCTCGCTCTCTTC 3'

Para las reacciones de PCR se utilizó el termociclador en tiempo real *Rotor GeneTM 6000* (Corbett Life Science). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 10µl utilizando el *kit QuantiTect SYBR Green PCR (QIAGEN)* con 0.9µM de cada cebador y una dilución 1/4 de cada ADNc generado.

El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 15 minutos a 95°C, 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 60°C por 1 minuto y una curva de *melting* desde 60°C a 95°C para determinar la especificidad de la reacción. El análisis de los datos se realizó utilizando el programa *Rotor GeneTM 6000 Series Software* (Corbett Life Science) y el cálculo de los niveles de cambio en la expresión se realizó mediante el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [201].

Los experimentos y análisis de resultados de qPCR fueron supervisados por la Mag. Alicia Costáble.

o o o o

7.5. Análisis de la expresión espacial del gen pL10

7.5.1. Transcripción *in vitro* de sondas marcadas con Digoxigenina-UTP (DIG-UTP)

Para la obtención de la sonda marcada, se utilizó como molde la región clonada en el plásmido pGEM-T-Easy. El inserto se encuentra clonado de forma tal que la transcripción utilizando el promotor T7 genera transcritos *sense*.

Se realizaron preparaciones de ADN plasmídico con el *kit ISOLATE Plasmid Mini kit (Bioline)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos se incubaron toda la noche a 37°C con 5 unidades de la enzima de restricción *ApaI (Fermentas)* en un volumen final de 25µl conteniendo el *buffer* recomendado por el fabricante. Esta enzima digiere el vector entre el promotor T7 y el sitio de inserción del gen de interés y no corta los insertos ligados al vector.

El producto de digestión fue utilizado como molde para la síntesis de la sonda anti-sentido utilizando la ARN polimerasa *SP6*. Las reacciones de marcado se realizaron en 20µl de volumen final, en las siguientes condiciones: 1X *buffer* de transcripción, mezcla de rNTPs con DIG-UTP (concentraciones finales 0.35mM DIG-UTP (*Roche*), 0.65mM UTP, 1mM ATP, 1mM CTP, 1mM GTP,), 40 unidades de inhibidor de RNasa (*Rnasa out, Invitrogen*), aproximadamente 1µg de ADN molde y 20 unidades de ARN polimerasa *SP6 (Promega)*. Se incubaron durante 60 min a 37°C y se trataron con 2 unidades de *DNasa RQ1 (Promega)* durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente se precipitaron con 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 0.1 volúmenes de LiCl 4M y se disuelven en 50 % formamida, calentando 10 minutos a 65°C.

7.5.2. Hibridación *in situ* sobre organismos enteros

Se rehidrataron los organismos almacenados en metanol 100% (sección 1.4) por incubación a temperatura ambiente en metanol 50% y PBSTx (Apéndice 1) durante 10 minutos cada uno. Se trataron con Proteinasa K (Apéndice 1) para permeabilizar los organismos y se fijaron 10 minutos a temperatura ambiente en PFA 4% en PBS. Se lavaron 2 veces durante 5 minutos cada vez en PBSTx y durante 10 minutos en

solución de prehibridación (Apéndice 1) diluida 1/2 en PBSTx. Se prehibridaron los organismos durante 10 minutos a 60°C para inactivar la fosfatasa endógena y 2 horas a 56°C en solución de prehibridación.

Se desnaturalizó la sonda durante 5 minutos a 80°C y se enfrió rápidamente en hielo. Para la hibridación se incubaron los organismos toda la noche a 56°C en solución de hibridación precalentada conteniendo 0.1 ng/μl de sonda (Apéndice 1). A continuación se realizaron 2 lavados de rigurosidad decreciente durante 30 minutos a 56°C con cada una de las soluciones de lavado precalentadas descritas en el apéndice 1 (Soluciones 1 a 3). A continuación se lavaron 2 veces en MABT (Apéndice 1) durante 10 minutos cada vez a temperatura ambiente y se bloquearon durante 2 horas en solución de bloqueo (Apéndice 1) a temperatura ambiente. Se incubaron con anticuerpo anti-Digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (*Roche*) diluido 1/4000 en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda.

Se lavaron 6 veces con MABT durante 20 minutos a temperatura ambiente y se incubaron 10 minutos en *buffer* AP (Apéndice 1) a temperatura ambiente. Se revelaron con reactivo NBT/BCIP (Apéndice 1) siguiendo el desarrollo de color bajo lupa y se fijaron en PFA 4% diluido en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de un lavado en PBSTx. Se montaron en glicerol 80% en PBS y se fotografiaron un microscopio *Olympus* modelo BHA con una cámara adaptada (*USB Eye-Piece Digital Microscope Camera – Dino-Lite*).

7.5.3. Hibridación *in situ* sobre suspensiones celulares.

Los preparados celulares fueron obtenidos según el método de glicerol, acético y agua según se describió previamente en la sección 3.1 de esta sección.

Los mismos fueron refijados en PFA 4% durante 15 minutos y lavados 3 veces durante 5 minutos. Se deshidrataron por incubación en soluciones de concentración creciente de etanol diluido en PBS (25%, 50%, 75% y 100%) durante 1 minuto. Se prehibridaron en un solución de prehibridación (Apéndice 1) durante 5 minutos a 56°C. Se desnaturalizó la sonda durante 5 minutos a 80°C y se enfrió rápidamente en hielo. Para la hibridación se incubaron los organismos toda la noche a 50°C en solución de hibridación precalentada conteniendo 2 ng/ml de sonda (Apéndice 1).

A continuación se realizaron 2 lavados en SSC 2X durante 20 minutos a 50°C con cada una de las soluciones de lavado precalentadas (apéndice 1, solución 1). A continuación se lavaron 2 veces en MABT (Apéndice 1) durante 10 minutos cada vez a temperatura ambiente y se bloquearon durante 2 horas en solución de bloqueo (Apéndice 1) a temperatura ambiente. Se incubaron con anticuerpo anti-Digoxigenina conjugado a peroxidasa (*Roche*) diluido 1/50 en solución de bloqueo durante 1 hora.

Se lavaron 3 veces con MABT durante 5 minutos a temperatura ambiente y se incubaron 10 minutos en *buffer* Imidazol 0.1 M pH 7.6 diluido en PBS a temperatura ambiente.

En paralelo se preparó la solución de revelado de tiramida. La misma es utilizada diluida 1/100 en buffer Imidazol 0.1 M pH 7.6 conteniendo 0.001% de peróxido de hidrogeno.

Los preparados se incubaron con la solución de revelado durante 5 minutos en la oscuridad. Se lavaron 5 veces en PBS durante 5 minutos. A continuación se realizó el protocolo de tinción con DAPI (sección 4.1). Se analizó el resultado con microscopia de epifluorescencia en microscopio Olympus utilizando los filtros de UV para DAPI y FITC para Tiramida.

8. Interferencia de ARN

o o o o

8.1. Síntesis de Mensajero de Luciferasa

Para sintetizar ARN mensajero de Luciferasa de luciérnaga, el ADN molde es preparado por PCR a partir de p-GL3-Basic (Promega, Madison, WI, USA).

La transcripción *in vitro* del ARN con caperuza a partir del producto de PCR se realizó utilizando *mMessage mMachine T7 Ultra kit* (*Ambion, Austin, TX, USA*) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

El ARN resultante es precipitado con cloruro de litio, resuspendido en agua nucleasa free y cuantificado por espectrofotómetro (ND-1000, *NanoDrop Technologies, Wilmington, DE*).

◦ ◦ ◦ ◦

8.2. Obtención plásmido pActinaSm_LUC

El plásmido pActinaSm_LUC contiene el gen de la luciferasa bajo el control del promotor de actina de *S. mansoni* fue cedido por el Dr. Gabriel Rinaldi.

A partir del stock de bacterias *E.coli* transformadas con el plásmido, se realizaron *midipreps* utilizando el *Kit Plasmid Midi Kit* (QIAGEN) o *AxyPrep™ Plasmid Midiprep Kit* (Axygen®) según las instrucciones del fabricante.

◦ ◦ ◦ ◦

8.3. Síntesis de moléculas de ARN doble cadena

Las moléculas de ARN doble cadena (ARNdc) fueron generados a partir de transcripción *in vitro* a partir de productos de PCR generados a partir de *primers* específicos conteniendo colas con la secuencia del promotor T7.

Los ARNdc se sintetizaron y purificaron utilizando *Megascript RNAi kit* (Ambion) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La integridad de las moléculas fue verificada como se describió en la sección 2 de materiales y métodos, y la pureza de las mismas fue verificada midiendo la relación ADN_{260}/ADN_{280} . La concentración de las mismas fue determinada mediante espectrofotometría (ND-1000, *NanoDrop Technologies, Wilmington, DE*).

◦ ◦ ◦ ◦

8.4. Electroporación de moléculas exógenas

Organismos cultivados por 9 días como se describió anteriormente (sección 1.1 de materiales y métodos) fueron colocados en medio RPMI modificado sin SFB, suplementado con una solución 335 µg/ml de Tripsina durante 24 horas previas a la electroporación.

Los organismos fueron lavados en medio libre de tripsina en *Somule Wash* (adecuado para la electroporación, ver apéndice1) y resuspendidos 100 µl de medio *Somule* conteniendo las moléculas a electroporar. Estos fueron colocados en la cuba de electroporación (*Electroporation cuvettes 0.4 cm, Invitrogen*) para ser sometidos a una onda cuadrada de electroporación (200V, 20mS, 1 pulso) en un electroporador BTX *ElectroSquarePorator™ ECM830* (BTX, San Diego, CA). Inmediatamente después de la electroporación, los parásitos fueron transferidos a un medio para ser cultivados como se describió anteriormente.

o o o o

8.5. Detección de moléculas exógenas por PCR a tiempo final

La expresión del mLUC fue determinada mediante RT-PCR. Los parásitos tratados fueron retirados del cultivo 3 horas post- electroporación ARNmLUC. El ARN y el ADNc fueron preparados según se detalló en sección 1.2 y 1.3 de materiales y métodos.

Para el caso de los organismos tratados con plásmido pActinaSm_LUC, los organismos se retiraron de cultivo 48hs post –electroporación se realizó tratamiento con DNAsa con el fin de eliminar plásmido molde remanente.

La amplificación por PCR del ARNmLUC fue realizada utilizando *primers* específicos (que generan un producto de 550pb). Como controles en los ensayos se utilizaron *primers* de Tropomiosina y CRISP, genes utilizados como controles en el laboratorio que amplifican fragmentos de 250 y 500 pb respectivamente (Tabla 8).

Tabla 8- Primers específicos para ARNmLUC, Tropomiosina y Crisp

Nombre	Secuencia (5' → 3')
LUC_Fw	GTGCCAGAGTCCTTCGATAG
LUC_Rv	ACAAC TTTACCGACCGCGCC
TPM_Fw	CTGAAGCTGAAGTTGCAGCCATGA
TPM_Rv	TCGTACTTACGTTCAGCATCCTCC
CRISP_Fw	CAAGTACCAACACGAGC
CRISP_Rv	GGGATGTGGTTTAGGCC

La amplificación de los fragmentos de interés se realizó a partir de 2 µl de ADNc, en 25 µl de reacción, bajo las siguientes condiciones de reacción: 1X de buffer de reacción, 2mM de MgCl₂, 0.4 mM de dNTPs, 0.8µM de cada cebador, 1 unidad de taq polimerasa (*Invitrogen*) por reacción. Las condiciones de ciclado utilizadas para la amplificación se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9- Condiciones de amplificación utilizadas para PCR para detección de incorporación de moléculas exógenas.

Etapas	Temperatura °C	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	5 min
Desnaturalización	94	30 seg
<i>Annealing</i>	55	30 seg
Extensión	72	1min
Extensión final	72	10min
Ciclos	35	

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa 1% en buffer TAE y visualizado por tinción con Bromuro de Etidio.

◦ ◦ ◦ ◦

8.6. Ensayo de Actividad de Luciferasa

Los parásitos fueron colectados, lavados 3 veces en PBS y almacenados a -80°C.

La determinación de la actividad Luciferasa en los extractos de parásitos fue determinada utilizando *Promega's luciferase assay reagent system* según las instrucciones del fabricante y se detectó la emisión lumínica en luminómetro *Sirius luminometer (Berthold, Pforzheim, Germany)*.

Para normalizar el ensayo se determinó la concentración de proteínas utilizando *Bicinchoninic acid assay (BCA kit, Pierce, Rockford, IL)* según las instrucciones del fabricante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Caracterización morfológica de células de *M. corti*.

Debido el pequeño tamaño de las células de cestodos resulta muy difícil la identificación de los diferentes tipos celulares *in situ* analizando su morfología mediante técnicas de rutina de la microscopía fotónica, excepto con la utilización de microscopía electrónica [58,61]. Por ello con el fin de identificar los tipos celulares presentes en este organismo, se emplearon metodologías complementarias. Se realizaron tinciones con diferentes colorantes a partir de suspensiones celulares, identificación por inmunohistoquímica con anticuerpos específicos y finalmente microscopía electrónica de transmisión.

o o o o

1.1. Suspensión celular con Glicerol acético y agua

Para realizar la caracterización celular a partir de macerados celulares, se seleccionó un protocolo que permitiera obtener células fijadas sin alterar la morfología celular. Basados en la literatura seleccionamos un método empleado para obtener macerados celulares en *Hydra* y en *Hymenolepis* [59,192]. El mismo involucra el uso de una solución que permite disgregar los tejidos a células individuales utilizando glicerol, ácido acético y agua en una proporción 1:1:13. Este protocolo fija las células manteniendo la morfología celular, y al mismo tiempo las dispersa. El inconveniente de este método es que genera mucho detrito celular y muchos agregados celulares al pasar las células a PBS, pero como se mencionó anteriormente mantiene muy bien la morfología celular.

Si realizamos un extendido del material obtenido (Figura 14), podemos observar claramente la morfología celular de las diferentes células presentes en la imagen (flechas verdes continuas), además de la presencia de detritos (flechas blancas continuas) y agregados celulares (flechas blancas discontinuas).

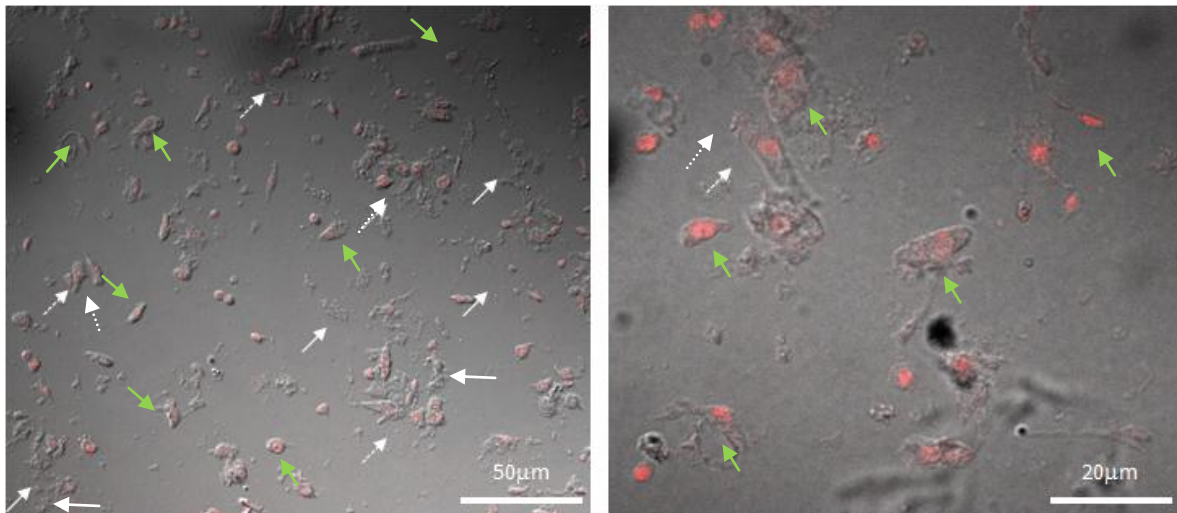


Figura 14-Microscopia de epifluorescencia de suspensiones celulares utilizando protocolo Glicerol, acético y agua. Imagen obtenidas en colaboración el Dr. Uriel Koziol. En rojo se representan los núcleos, tinción con IP. Las flechas continuas verdes indican distintos tipos celulares. Las flechas blancas continuas indican detritos celulares, flechas blancas discontinuas indican agregados celulares.

Este método resulta muy efectivo para realizar caracterización celular pero no tan adecuado para realizar métodos citométricos debido a que las suspensiones celulares presentan mayor cantidad de detrito y agregados celulares pudiendo interferir en la lectura del equipo. Es por ello que se seleccionó para la identificación y caracterización de los tipos celulares presentes en *M. corti* y no para citometría.

o o o o

1.2. Identificación de tipos celulares en *M.corti*

1.2.1. Tinción con colorantes celulares

Con el fin de identificar los diferentes tipos celulares presentes en macerados celulares realizamos tinciones con diferentes colorantes.

Para identificar células proliferativas realizamos un marcado utilizando el análogo de timina EdU en macerados celulares, según se describió en sección 4.1 de materiales y métodos. A su vez, teñimos los macerados con DAPI combinado con IP o WCS que tiñen todos los ácidos nucleicos, análogo a la tinción para células basofílicas ricas en ARN con Pironina Y. En paralelo se realizó tinción de lípidos utilizando Rojo Nilo combinado con DAPI

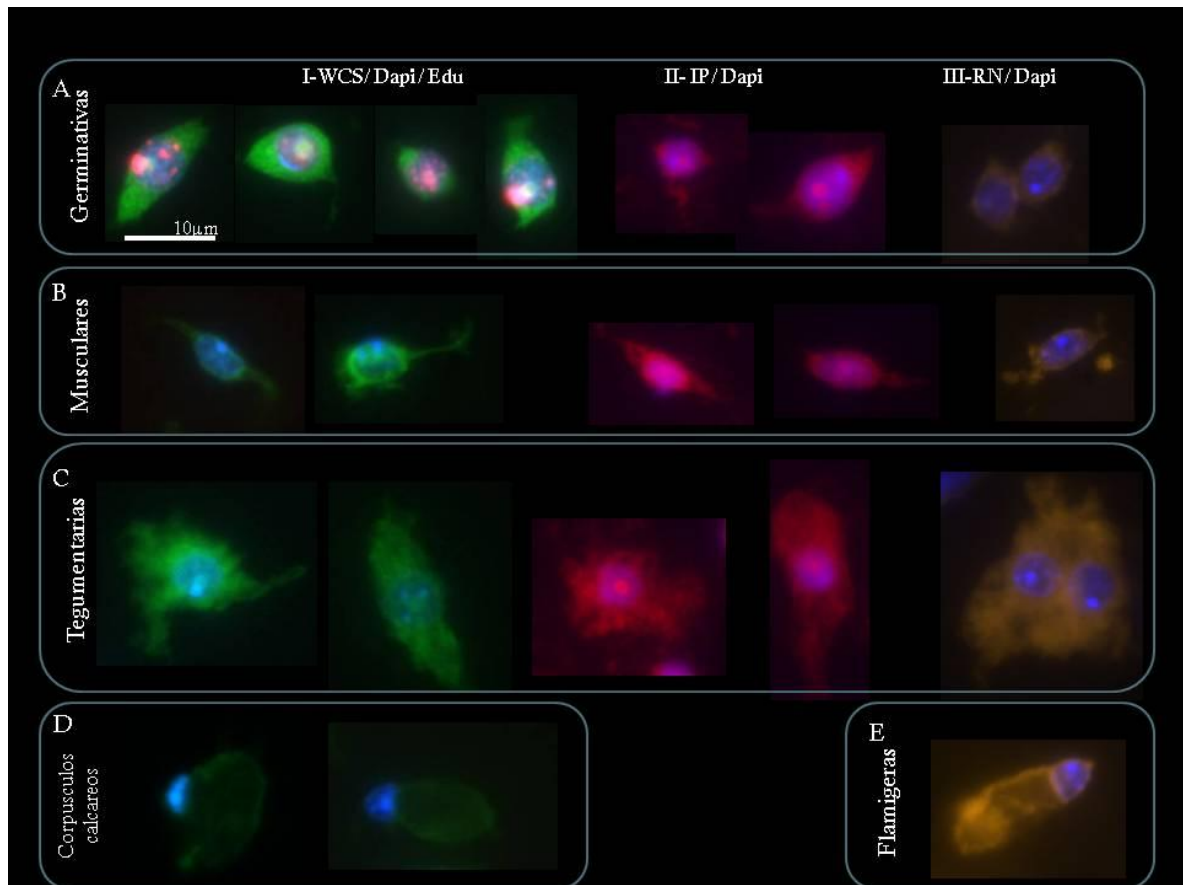


Figura 15- Macerado celular de *M. corti*. Resumen de los diferentes tipos celulares observados en suspensiones celulares después de teñir con diferentes tinciones. Los tipos celulares son indicados a la izquierda de la imagen A- Células germinativas, B-musculares, C-tegumentarias, D- Corpúsculos calcáreos, E- flamígeras y las tinciones en la parte superior. I- WCS, *Whole Cell Staining*, visualizado en verde; DAPI visualizado en azul; EdU, visualizado en rojo; II-IP, Ioduro de propidio, visualizado en rojo; III-RN, Rojo Nilo, visualizado en naranja. Barra representativa para todas las imágenes.

Comparando los resultados obtenidos con los obtenidos por Koziol, et al. (2015), fue posible la identificación de diferentes tipos celulares. Entre ellos las células germinativas. Estas células presentan pequeño tamaño (5- 10 μm a lo largo del eje), una forma fusiforme, alargada “símil ojo” característica de estas células, teñidas intensamente con IP o WCS y en algunos casos se puede identificar la presencia de prolongaciones citoplasmáticas desde los polos de los cuerpos celulares. El núcleo es grande y redondeado, con la presencia, por lo general, de un nucléolo prominente y fina cromatina granular, que da como resultado una tinción brillante con DAPI; la presencia de gotas de lípidos citoplasmáticas son raras (Figura 15 A).

Todas las células morfológicamente diferenciadas son consistentemente EdU negativas (Figura 15 columna I) indicando que son generadas por diferenciación de

las células madre indiferenciadas. Estos resultados son consistentes con lo descrito previamente por nuestro grupo de trabajo en organismos enteros [13].

Entre las células diferenciadas es posible reconocer diferentes tipos celulares a través de la comparación con estudios de histología clásica en otros cestodos [58,59,61,66,202].

Entre ellas, las células musculares, que son de pequeño tamaño con núcleo rico en heterocromatina, donde en algunos casos es posible observar parte de las prolongaciones celulares porque sufren rupturas durante el procedimiento de preparación del macerado, o las células tegumentarias que presentan una forma irregular con un citoplasma fuertemente teñidas con IP o WCS y uniformemente teñidas con RN. Las células formadoras de corpúsculos calcáreos, con un núcleo pequeño localizado en la periferia celular con un citoplasma grande que presenta poca tinción con IP, WCS o RN, células flamígeras correspondientes al sistema excretor dada su forma característica (Figura 15 B-E).

En resumen, podemos concluir que se logró la identificación de las células proliferativas de *M. corti* en macerados celulares. Podemos afirmar que las mismas presentan morfología conservada, similar a las descritas por nuestro grupo [13] y a las células de otros cestodos descritos en la bibliografía [54–56,59]. Estas son células pequeñas con una alta relación núcleo –citoplasma, con forma fusiforme que presenta un nucléolo prominente y se tiñen intensamente con colorante de células basofílicas, ricas en ribosomas.

Además se logró identificar diferentes tipos celulares presentes en macerados de *M. corti* utilizando diferentes tinciones celulares, entre ellas células musculares, tegumentarias y células formadoras de corpúsculos calcáreos y flamígeras. Estas células diferenciadas no se dividen (todas células EdU negativas), confirmando los datos obtenidos por nuestro laboratorio (Figura 16)

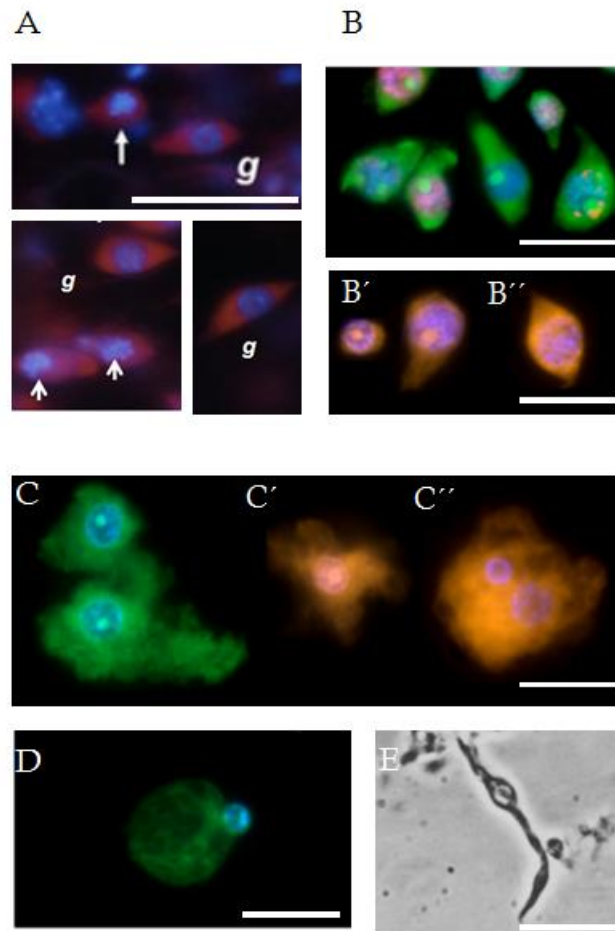


Figura 16-Tipos celulares presentes en Cestodos. A) Células proliferativas en el cuerpo de la larva de *M.corti*, células teñidas con Bromuro de etidio (color rojo) y DAPI (color azul); B, B', B'') Células germinativas presentes en suspensiones celulares de *E. multilocularis*, B) células teñidas con WCS (verde), EdU (rojo) y DAPI. B') Igual que en B pero tinción realizada con IP (naranja). B'') tinción con Rojo nilo (naranja). C, C', C'') Células tegumentarias presentes en suspensiones celulares de *E.multilocularis*; C) células teñidas con WCS (verde), EdU (rojo) y DAPI. C') Igual que en B pero tinción realizada con IP (naranja); C'') tinción con Rojo nilo (naranja). D) Célula asociada al corpúsculo calcáreo presente en suspensiones celulares de *E.multilocularis*. D) Célula muscular identificada en suspensiones celulares de *H. citelli* Abreviaturas g- celulas germinativas. Flechas blancas indican mitosis.. Imágenes de A modificadas de [29]; B-D imágenes modificadas de [66]. E modificada de [59]. Las barras representan en A-D 10 μ m y en E 20 μ m

Logros:

1. Identificación de distintos tipos celulares utilizando diferentes colorantes, WSC, IP, RN.
2. Identificación de células germinativas con morfología conservada con las de otros Cestodos.

1.2.2. Identificación de tipos celulares por Inmunohistoquímica con anticuerpos específicos.

Una estrategia complementaria para intentar clasificar los tipos celulares presentes en *M. corti* fue la utilización de anticuerpos específicos. En el laboratorio se disponía de marcadores del sistema muscular (tropomiosina) y sistema nervioso (tubulina acetilada). A su vez, la Dra. Alejandra Kun, contaba con un anticuerpo anti-ribosomas lo que permitiría identificar si efectivamente las células proliferativas de *M. corti* presentan un citoplasma basófilo, rico en ribosomas.

Los resultados obtenidos para el marcador del sistema muscular sobre suspensiones celulares no fueron muy exitosos, ya que la tropomiosina se encuentra principalmente en los haces musculares que se pierden durante el método de disgregación celular.

En cambio para el marcador de sistema nervioso los resultados obtenidos fueron más alentadores. La tubulina acetilada es un marcador de sistema nervioso y además marca de manera muy intensa las células de los protonefridios del sistema excretor. Esto hace que para lograr la identificación de células nerviosas (positivas para tubulina acetilada) se deba saturar la imagen que se está observando para lograr la detección. Las inmunohistoquímicas realizadas con este anticuerpo fueron realizadas tanto en cortes de organismos enteros como en suspensiones celulares (según se describió en la sección 4.5 de Materiales y Métodos). Esta estrategia se realizó con el fin de lograr identificar *in situ* y en suspensiones celulares las neuronas del sistema nervioso de este organismo.

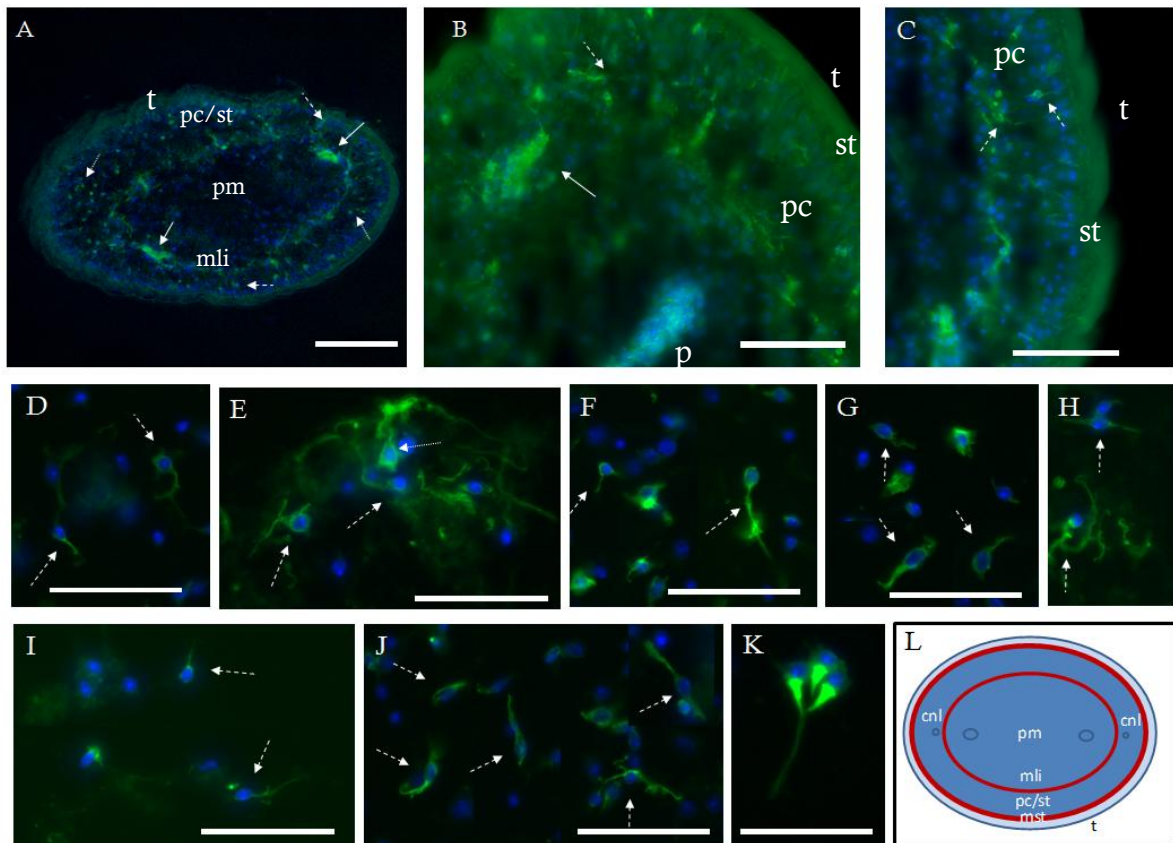


Figura 17- Inmunohistoquímica de sistema nervioso utilizando anticuerpo anti- tubulina acetilada A) corte transversal de *M. corti*; B) Detalle de cordón nervioso y primordio genital; C) Detalle de corte transversal; D-K) Suspensiones celulares de *M. corti*; L) Esquema de la organización general en un corte transversal en la región posterior al escólex. En la figura las flechas continuas señalan cordones nerviosos principales, flechas discontinuas neuronas y flechas punteadas protonefridios. En Azul se visualiza DAPI y en verde anti-tubulina acetilada. Abreviaturas: *cnl*: cordón nervioso lateral, *pm*: parénquima medular, *mli*: musculatura longitudinal interna, *st/pc*: subtegumento/parénquima cortical, *t*: tegumento. L tomada de [13]. El espesor de los cortes es de 10µm, las barras representan en A) 100 µm, B) - C) 50 µm; D-K) 20 µm.

En la Figura 17 se puede observar el resultado obtenido, tanto para cortes como para suspensiones celulares, de dicha tinción. En la misma es posible identificar tanto células del sistema nervioso como protonefridios del sistema excretor.

En las inmunohistoquímicas realizadas en cortes, es posible identificar claramente los componentes del sistema nervioso, entre ellos los cordones nerviosos principales que se encuentran fuertemente marcados con el anticuerpo anti-tubulina acetilada (Figura 17A, B indicados con flecha continua). A su vez, es posible detectar la presencia de neuronas en la región del parénquima cortical (Figura 17 A-C, indicadas con flechas discontinuas) y la presencia de neuronas que conectan la región interna con el tegumento, tal vez funcionando como neuronas de señalización (Figura 17C, flecha discontinua). Un detalle a destacar, es que fue

posible detectar las células del sistema excretor (protonefridios), porque la tubulina acetilada se une a las cilias de dichas células. En la figura es posible apreciar la presencia de estas células como una región puntillada indicada con flecha punteada (Figura 17A).

En cuanto a las suspensiones celulares, las células identificadas como posibles integrantes del sistema nervioso aparecen como células con núcleos muy pequeños con prolongaciones y proyecciones del soma celular que pudieran corresponder a neuritas celulares (Figura 17D-J), generalmente estas prolongaciones se ven afectadas por el proceso de preparación de la suspensión por lo que a veces hay restos de las mismas en las preparaciones. En este tipo de preparación, nuevamente es posible identificar células correspondientes al sistema excretor (Figura 17K).

Está reportado en la bibliografía que las células germinativas presentan características morfológicas conservadas [54–56,59], entre ellas citoplasma basófilo debido a la presencia de abundantes ribosomas libres en su citoplasma. Como se disponía de un anticuerpo anti-ribosoma se quiso evaluar, sobre suspensiones celulares particularmente en células germinativas, si el citoplasma de éstas se encontraba enriquecido en ribosomas y si presentaban alguna diferencia respecto a los demás tipos celulares presentes en la muestra. Como estrategia para identificar claramente las células germinativas, se utilizó el marcador de proliferación EdU de manera de señalar aquellas células que se encontraban sintetizando ADN en el momento de la incubación, como doble marcación junto con la inmunohistoquímica.

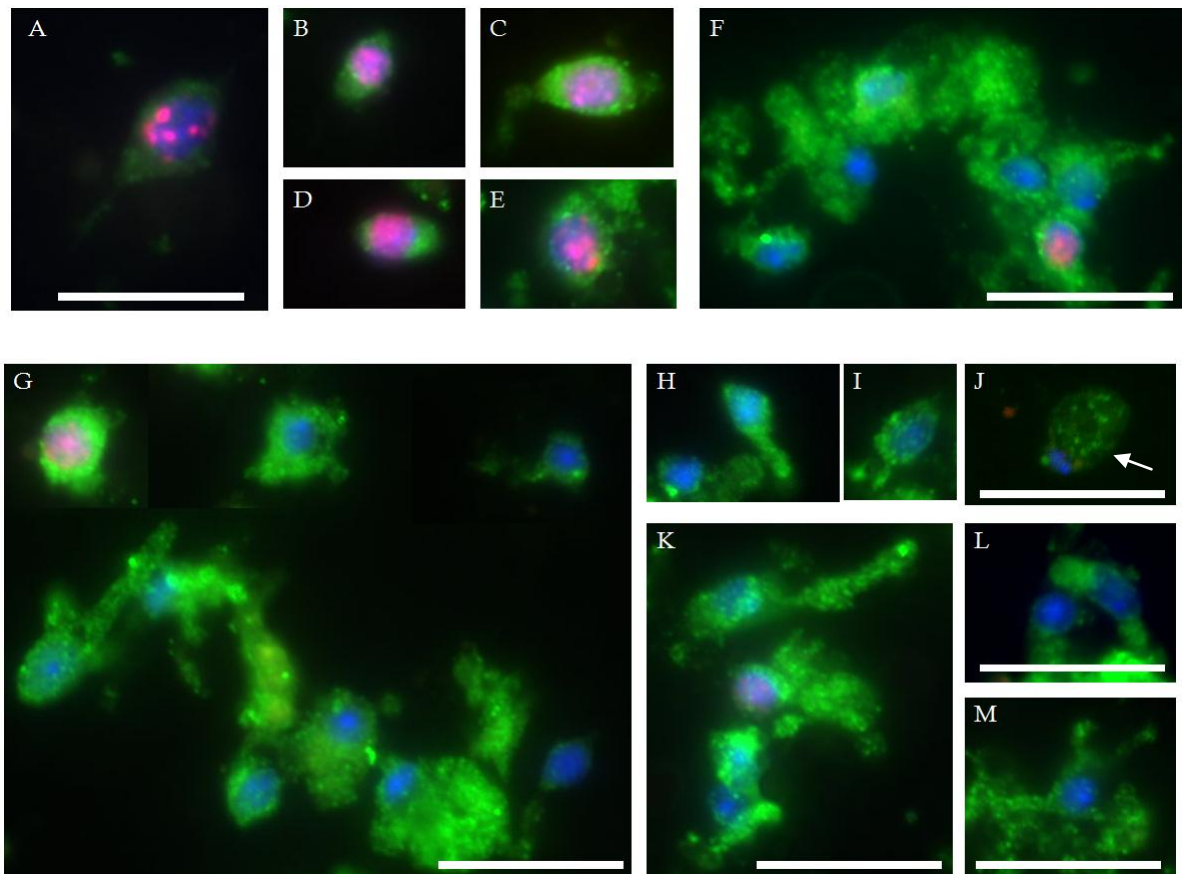


Figura 18- Inmunohistoquímica sobre suspensiones celulares de *M. corti* utilizando anticuerpo anti ribosoma. A-M-Suspensiones celulares de *M. corti*. La flecha continua indica un corpúsculo calcáreo. En Azul se visualiza DAPI, en rojo EdU y en verde anti-ribosoma. La barra representa 10 μm en todos los casos, excepto en J que representa 20 μm .

La Figura 18 resume parte de los resultados obtenidos en este ensayo. Las células identificadas como proliferativas (EdU positivas, marcación roja en el núcleo) presentan una señal puntillada en el citoplasma celular, indicando la presencia de posibles ribosomas en dicho citoplasma. En algunas células germinativas la señal parece ser menos intensa que en otras pero por lo general las células presentan buena intensidad de señal, indicando que tal vez esta característica de citoplasma basófilo pueda estar conservada en las células de *M. corti*. Respecto a los otros tipos celulares presentes en la preparación, en todos los casos hay una señal citoplasmática del anticuerpo anti-ribosoma. En algunos tipos celulares como los corpúsculos calcáreos la señal parece localizarse puntualmente en determinados puntos del citoplasma (Figura 18, flecha continua), mientras que en los otros tipos celulares hay una distribución más homogénea de la señal.

En conclusión la utilización de tubulina acetilada permitió la identificación de células perteneciente al sistema nervioso de *M. corti*, tanto en cortes como en suspensiones celulares del parásito.

La primera descripción del sistema nervioso en *M.corti* fue realizada por Hart (1967), mostrando que este organismo presenta un cerebro bipartita y dos ganglios asociados a cada ventosa (un ganglio medio y otro lateral). Varios cordones nerviosos surgen de la región anterior y se extienden a lo largo del cuerpo convergiendo en plexo posterior alrededor del poro excretor. Los principales troncos surgen de la base del cerebro y se ubican en el cuerpo. Dos cordones secundarios surgen de cada par de ganglios de las ventosas, uno lateral y otro medio. Los cuatro ganglios laterales de las ventosas emiten cuerdas laterales que corren junto a las del cerebro. Los troncos de los ganglios mediales corren más centralmente. En total en un tetratiridio hay 10 cordones atravesando el cuerpo [18,203].

Yaegashi y colaboradores (1993) estimaron el número de neuronas del escólex y mostraron que los animales poseen una cabeza angosta con cuatro ventosas tiene 250 neuronas. Cuando el escólex se ensancha previo a la fisión, el número de neuronas aumenta hasta cinco veces. Cuando se producen las cuatro ventosas adicionales, las neuronas se reducen a alrededor de 500. Finalmente, cuando los animales tienen dos cabezas angostas, con cuatro ventosas en cada cabeza el número total de neuronas retornan a alrededor de 250 en cada una. Por lo tanto, en la multiplicación asexual de *M. corti* ocurre una superproducción y subsiguiente eliminación de neuronas[revisado por 203,204] (Figura 19).

Los resultados obtenidos en esta tesis coinciden con los reportados anteriormente en la bibliografía.

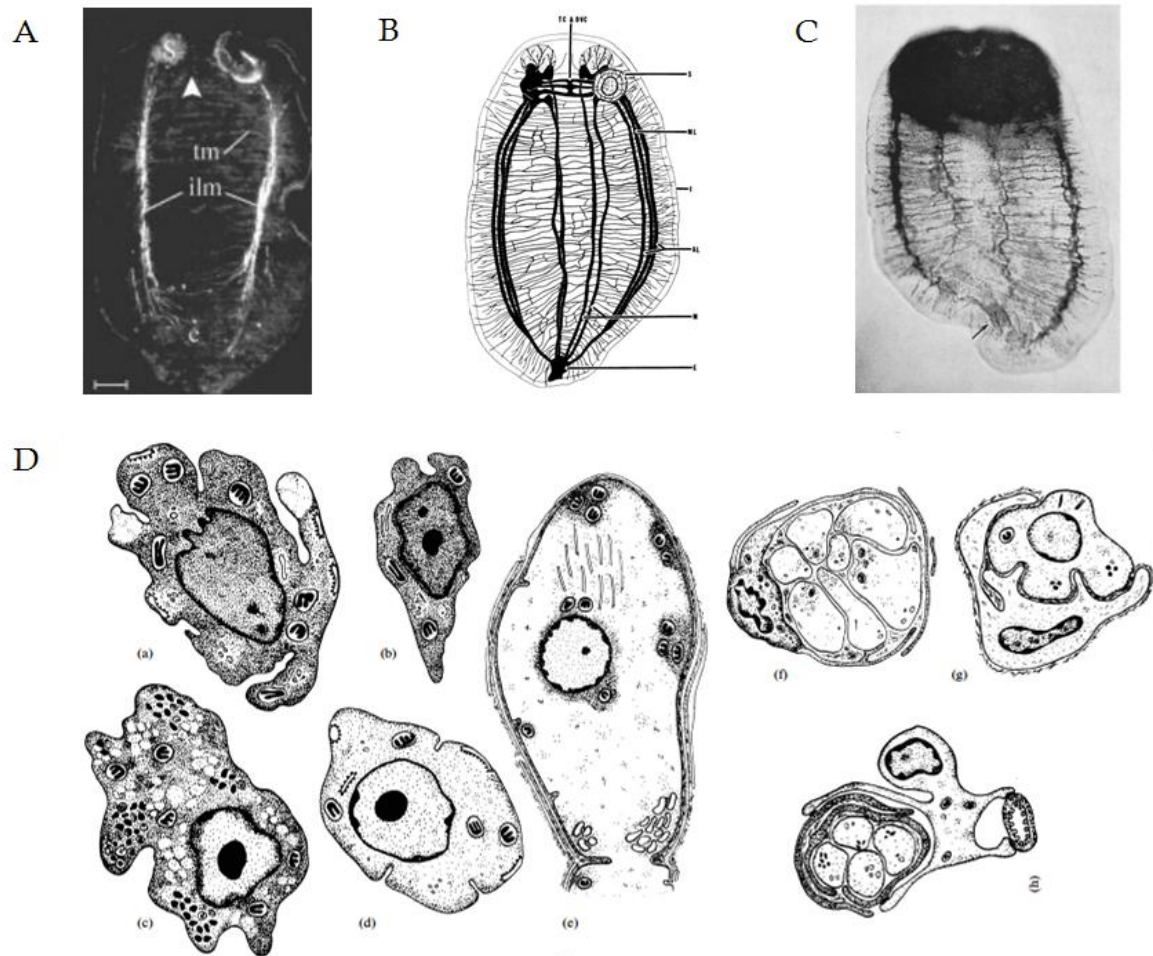


Figura 19- Sistema nervioso del tetratridio *M.corti*. A- Individuo teñido con anticuerpo anti serotonina mostrando cuerpos celulares y fibras inmunoreactivas en el cerebro, los cordones nerviosos principales (mc) y los menores, alrededor de las ventosas (S) y las comisuras, B- Esquema de sistema nervioso del tetratridio, C- Especimen teñido con el método de tricolina, mostrando una gran acumulación de células y fibras en el escólex, D- Esquema de células nerviosas y gliales, a-neurona multipolar, b-neurona unipolar, c- célula neurosecretoria, d- neurona XX, e-axón gigante, f- glia asociada a fibras gigantes, g-célula tipo fibroblasto, h- célula sandwich, . A modificado de [205], B-C modificado de [18], D- tomado de [206]

El uso de anticuerpo anti- ribosoma permitió identificar la presencia de ribosomas en el citoplasma tanto de células germinativas como en otros tipos celulares. En algunos tipos celulares la señal presenta una localización más restringida (CC) mientras que en otros es una señal intensa dispersa en toda la región citoplasmática.

1.2.3. Identificación por Microscopia Electrónica de Transmisión

El uso de la microscopia electrónica de transmisión (MET) para la caracterización de las células proliferativas y de los diferentes tipos celulares, es fundamental para lograr dilucidar la ultraestructura morfológica de las células.

Se decidió trabajar realizando una caracterización general del organismo entero con el fin de intentar evaluar a estas células en su contexto tisular, y poder comparar estos resultados con los pocos disponibles en la literatura. Por otro lado, se trabajó con suspensiones celulares buscando identificar y caracterizar diferentes tipos celulares.

Es importante destacar que la MET es una técnica demandante, siendo todos los pasos, desde la inclusión de la muestra, la obtención de grillas con cortes adecuados hasta la tinción de los mismos con metales pesados, claves para una buena visualización en el microscopio electrónico.

Sin haber optimizado completamente esta técnica, los resultados obtenidos permiten la identificación de algunos tipos celulares.

Hay autores que definen al tetratiridio anatómicamente como tegumento, parénquima, músculos internos, sistema excretor y nervioso, y un pool de células germinativas [21].

En cortes hay regiones espaciales del organismo que son claramente distinguibles, como es la región del tegumento, pero en otras más internas es muy difícil la identificación de lo que se está observando. La baja complejidad estructural de *M.corti* hace difícil la ubicación en el análisis a gran aumento de estructuras internas.

Esto hace que sea muy difícil saber en qué región del ejemplar se está trabajando, por lo que se intentó realizar grillas seriadas de un ejemplar que se sabía exactamente cuál era su posición inicial al momento de realizar los cortes por lo que era en principio más factible identificar en qué región del ejemplar estábamos. Lamentablemente este enfoque tampoco contribuyó a resolver el problema.

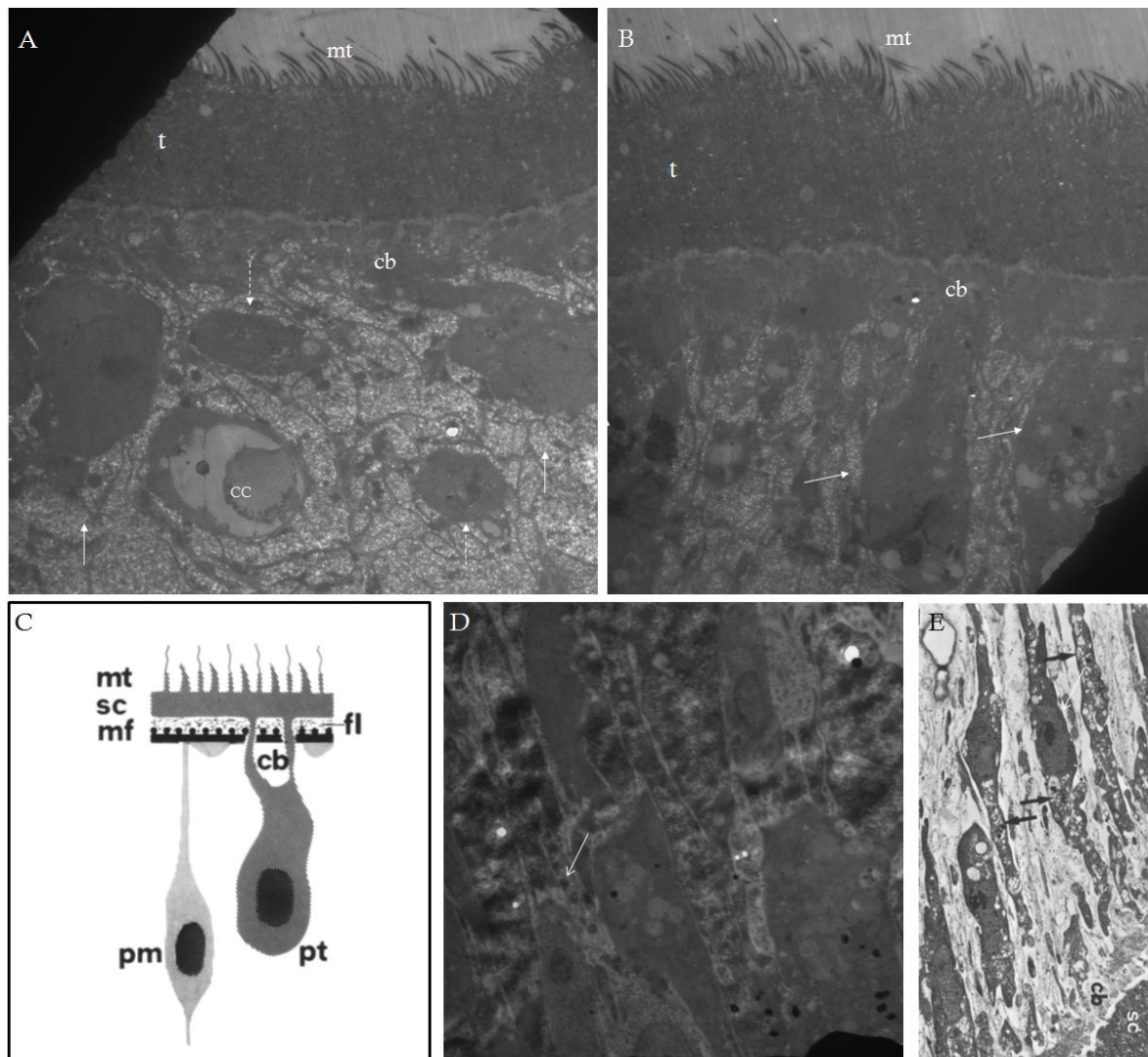


Figura 20- Microscopia electrónica de transmisión de organismos enteros de *M.corti*. A-B) Corte a nivel de región de tegumento. C) Esquema detallado de la región tegumentaria D) Corte del organismo E) Micrografía de cuerpos celulares en región subtegumentaria. Las flechas blancas continuas indican células tegumentarias, flechas discontinuas células musculares. Abreviaciones *cb*, puentes citoplasmáticos; *CC*, corpúsculo calcáreo; *fl*, capa fibrosa; *mf*, fibras musculares subtegumentarias circulares (externas) y longitudinales (internas); *mt*, Microtriquias; *pm*, cuerpo celular de sistema muscular subtegumentario; *pt*, cuerpo perinuclear del tegumento (citón tegumentario); *sc*, citoplasma superficial (tegumento) ; *t*, tegumento. C tomado de[13], E Modificada de[21]. Magnificación: A, B- 5800X, D-10000X.

Los resultados obtenidos se resumen en la Figura 20. En las imágenes A y B es posible identificar la región del tegumento. Hess (1980), describe esta región como un sincicio tegumentario, con un sistema muscular subtegumentario y una capa fibrosa que separa a ambos (Figura 20C) [21]. El sincicio tegumentario está compuesto por un citoplasma superficial no nucleado cuyos cuerpos celulares yacen debajo en el parénquima cortical. Los músculos subtegumentarios consisten en una

densa red de fibras musculares longitudinales y circulares, cuyos cuerpos celulares se encuentran en el parénquima cortical.

Los resultados obtenidos, muestran claramente que el tegumento está formado por un sincicio celular (indicado con una t en la imagen), cuyos cuerpos celulares se localizan en la región del parénquima (Figura 20 , flechas blancas continuas). En la superficie del tegumento, se aprecia la presencia de microtriquias, también descritas por Hess. Estas estructuras se encuentran presentes en todos los cestodos, y son consideradas análogos a las microvellosidades del epitelio intestinal, ayudando a aumentar a la capacidad de absorción del tegumento.

Es posible identificar los puentes celulares que unen los cuerpos celulares al sincicio. También es posible la identificación de los cuerpos celulares, correspondientes a las fibras musculares situadas en el parénquima medular (Figura 20, flechas dicontinuas).

La imagen D muestra una región en donde no es posible determinar exactamente su ubicación en el organismo dado que no existe en la grilla ningún aspecto morfológico característico que permita su localización, aunque en esta región encontramos células con las características estructurales a los cuerpos celulares de las células del sincicio celular. Las imágenes descritas de los cuerpos celulares del sincicio tegumentario son semejantes a las reportadas por Hess (Figura 20E) [21]

Observando más micrografías, es posible ver células con diferentes características electrondensas, como las mostradas en la Figura 21. En este caso, no se distinguen características anatómicas o ultraestructurales que permitan identificar o afirmar a que tipo celular corresponden. Esto probablemente se deba a que el grosor de los cortes no permite una visualización ultraestructural adecuada.

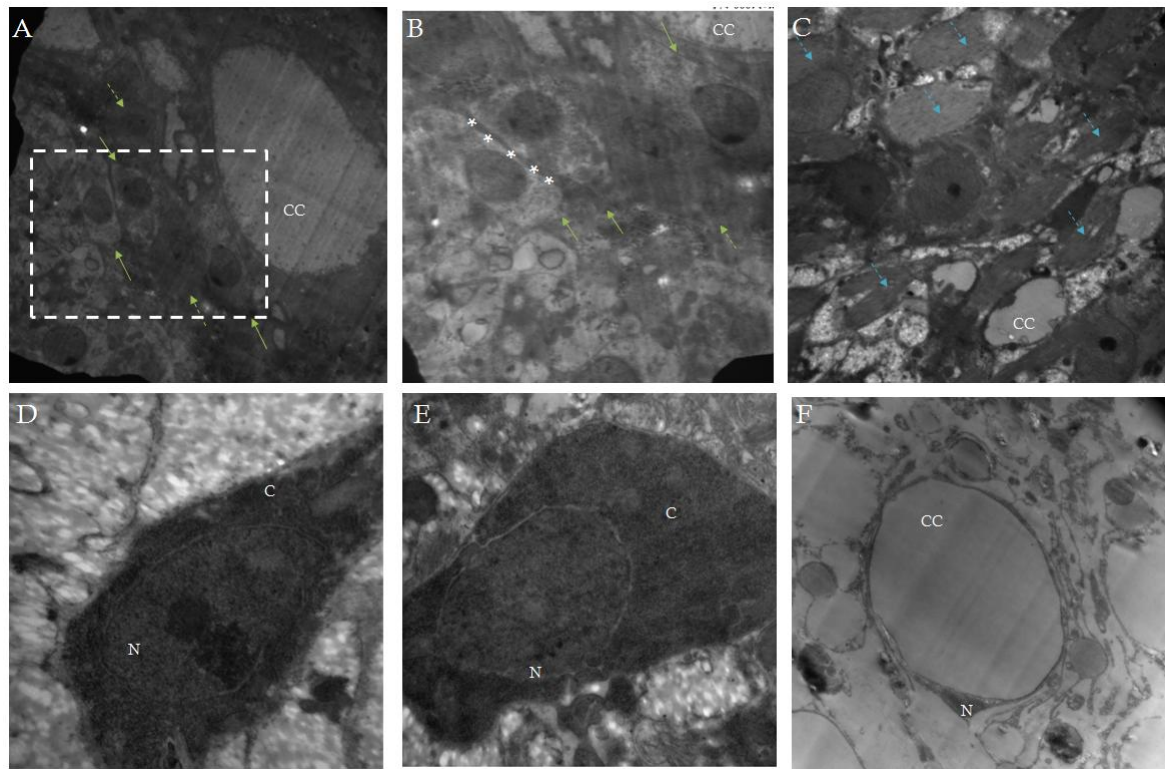


Figura 21- Microscopia electrónica de transmisión sobre organismos enteros de *M.corti*. A-G- Diferentes tipos celulares presentes en los cortes realizados. B es una ampliación de la región señalada en A. Las flechas de colores en las imágenes muestran células con diferentes características, los asteriscos indican posibles uniones celulares. Abreviaciones: C, citoplasma; CC, corpúsculo calcáreo; N, núcleo. Magnificación: A- 8000X;B,G- 10000X C-7200X, E,F- 29000X

La imagen en el panel A, muestra la presencia de un grupo de células con características similares (flechas verdes continuas), citoplasma grande electrón lúcido y un núcleo prominente y la presencia de otro tipo celular metabólicamente diferente debido a la coloración de su citoplasma (flechas verdes discontinuas). A su vez, es posible observar la presencia de células con inclusiones intracelulares con aspecto de los corpúsculos calcáreos. En el panel B, se observa una ampliación únicamente la región que contiene al grupo celular descrito anteriormente. Aquí observando las células de la derecha, podemos sugerir que puede existir una comunicación celular entre estos tipos celulares (asteriscos), aunque nos encontramos trabajando a una baja resolución para poder confirmar esta hipótesis. En el panel C, las células señaladas con flechas azules discontinuas, presentan características de fibras musculares longitudinales. Tal vez, esta región pueda corresponder al sistema muscular subtegumentario, presente en la zona debajo del sincicio del tegumento. La célula mostrada en el panel D podría ser una de tipo muscular, dadas las características de célula alargadas con prolongaciones y núcleo

rico en heterocromatina. Mientras que la observada en el panel E tiene aspecto de tipo tegumentario caracterizado por una forma irregular.

De todas formas es muy difícil afirmar que sea así, ya que no es posible definir características ultraestructurales que permitan confirmar esta hipótesis. Para poder mejorar estos inconvenientes sería necesaria la obtención de secciones de espesores más finos que permitan obtener mayor resolución ultraestructural de los preparados, para poder clasificar correctamente los tipos celulares presentes.

La única excepción en este caso, es la imagen mostrada en F, donde es posible identificar un corpúsculo calcáreo. Este tipo celular es claramente identificable ya que presenta características que hacen muy fácil su identificación. Entre ellas, la presencia de un núcleo periférico desplazado debido al crecimiento durante la biogénesis del corpúsculo, sumado a la presencia de matriz orgánica [207].

Los resultados obtenidos de MET con suspensiones celulares, se ejemplifican en la Figura 22.

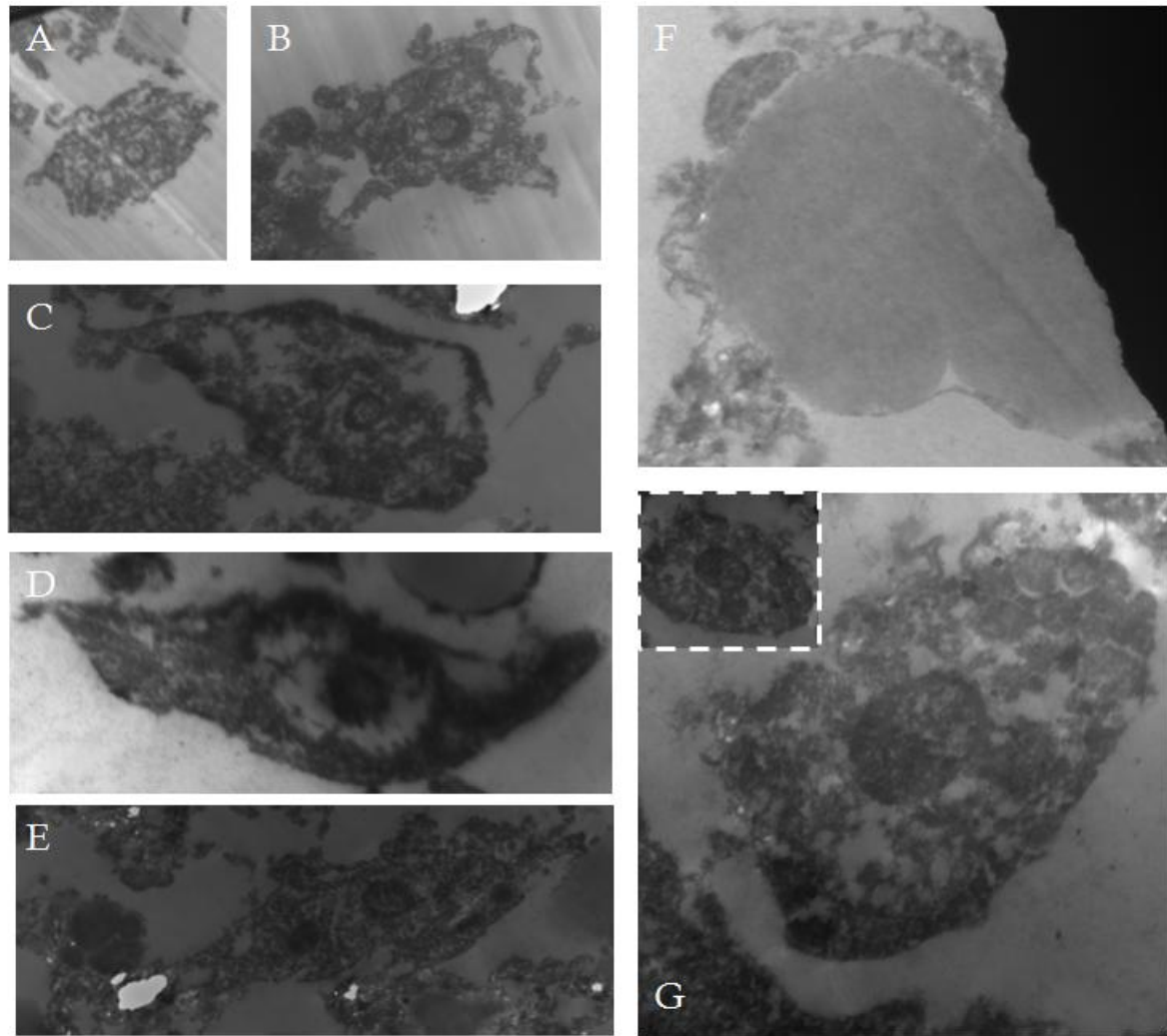


Figura 22- Microscopia electrónica de suspensiones celulares de *M.corti*. A-G- Diferentes tipos celulares presentes en los cortes realizados. G es una ampliación de la imagen mostrada en el inserto. Magnificación: A-5800X, B-7200X, C, E, inserto G-10000X, D-14000X, F, G- 29000X.

Estos resultados no son muy satisfactorios, ya que no es posible apreciar características ultraestructurales. Claramente los tipos celulares mostrados en la figura presentan el contenido celular dañado. Esto puede deberse al proceso de preparación de las suspensiones celulares y/o el método de fijación, más que al grosor de los cortes. Probablemente el protocolo que se empleó para la preparación, no permitió una fijación adecuada de la muestra lo que llevó a una mala definición ultraestructural. Las células ejemplificadas en los paneles del A al E, posiblemente sean células del tipo muscular y tegumentario. Las mostradas en los paneles A, C y E tal vez sean del tipo tegumentario ya que muestran una morfología similar a la descrita para estas células. La célula mostrada en el panel en el panel B puede ser del tipo nervioso o muscular pero es muy difícil poder definir, ya que presenta

protuberancias que bien puedan ser derivadas de prolongaciones dendríticas o derivadas de fibras musculares. En el panel D, probablemente pueda ser del tipo muscular, dada su forma alargada.

La célula presentada en el panel F, como en el caso de las micrografías obtenidas para organismos enteros, es claramente identificable ya que presenta la morfología clara del CC, con un núcleo desplazado a la periferia y la presencia de la matriz orgánica. En el panel G de la figura, se muestra lo que presenta características de una célula germinativa, con esa forma alargada “simil ojo”, con un núcleo grande y un nucléolo prominente.

Obviamente estas clasificaciones no pueden considerarse certeras, ya que no se cuenta con los elementos estructurales claros que permitan la identificación real de los diferentes tipos celulares. Para comprobar y confirmar estas hipótesis, necesariamente se debe buscar otro método ya sea de preparación de las suspensiones que no fije la preparación, tal vez el utilizado para los ensayos de citometría, de manera que obtener un mejor resultado al momento del proceso de fijación con glutaraldeído, u otro método que mejore los resultados ultraestructurales.

Resumiendo los resultados obtenidos por MET, fue posible la identificación de distintos tipos celulares, por ejemplo los tegumentarios y los musculares obtenidos en las secciones de organismos enteros. También logramos la identificación de células asociadas al corpúsculo, tanto con organismos enteros como en suspensiones celulares dada sus características conservadas. Además en suspensiones celulares, observamos células que posiblemente puedan corresponder a células de tipo germinativo, ya que presentan la forma característica y conservada entre los cestodos en general, aunque es muy difícil de afirmar esta propuesta ya que no se cuentan con elementos ultraestructurales que puedan verificarlo.

Es importante recordar, que realizar técnica de histología clásica o MET, para poder identificar los tipos celulares presentes en este tipo de organismos y en cestodos en general es muy complicado ya que este tipo de células son muy pequeñas y difíciles de identificar.

Hace muchos años ya, hay autores que proponían que “..los Cestodos, son objetos desfavorables para estudios histológicos (...), las verdaderas relaciones de varios elementos celulares (por ejemplo, el musculo y elementos del tejido conectivo; nervios y sistema excretor) son difíciles de distinguir y son fácilmente distorsionables debido a los fijadores empleados, llevando a la generación de artefactos”... [208]. Años más tarde, Lumsden y Specian (1980), plantean que aún en esa época hay aspectos de la citoarquitectura de los Cestodos, permanecen desconcertantemente enigmáticos [209]. Por lo que, el conocimiento de los tipos celulares y su ultraestructura es algo fundamental a estudiar y a mejorar, pero claramente no es un proceso fácil de llevar a cabo. Esto lleva a la necesidad de identificar y separar los distintos tipos de células y la búsqueda de marcadores moleculares característicos que permitan identificar los diferentes tipos celulares.

Logros:

- 1. Identificación de células tegumentarias, musculares, corpúsculos calcáreos.**
- 2. Identificación de células germinativas con morfología similar a células germinativas de otros Cestodos.**

2. Aislamiento de células proliferativas de *M. corti*

La identificación y caracterización morfológica de las células proliferativas nos conduce a la implementación de herramientas que permitan continuar y mejorar la caracterización de estas células. Es por ello que parte de este trabajo se centró en el aislamiento de estas células por citometría de flujo.

o o o o

2.1. Optimización de protocolo para suspensiones celulares de *M.corti*

Para poder realizar el aislamiento de las células proliferativas de *M. corti*, fue necesario generar un protocolo de disgregación celular a partir de los organismos enteros. El método empleado para la caracterización morfológica no es adecuado para utilizar para citometría de flujo, ya que la fijación de las células interfiere en la coloración posterior.

Como no se disponía de un protocolo para obtención de suspensiones celulares específico para *Mesocestoides*, fue necesaria la implementación un protocolo adecuado que permitiera la obtención de una preparación celular monodispersa, sin agregados celulares y factible de ser analizada por citometría de flujo.

Basados en los trabajos de Higuchi et al. (2007) y Spilliotis et al. (2008), se seleccionó un método que permitiera el aislamiento de células. Este protocolo combina disgregación mecánica y química. Para lograr la disgregación se testaron el uso de protocolos que incluían únicamente tripsina o una combinación de tripsina y colagenasa. En la Tabla 10 se resumen las condiciones ensayadas para cada método.

Tabla 10-Condiciónes de disgregación enzimática evaluadas.

Condición	Concentración	Analizado por Citometría	Coefficiente de variación
Tripsina	0.10%	SI	7.5
Tripsina	0.05%	SI	9.82
Tripsina	0.025%	SI	10.6
Colagenasa-Tripsina	0,20mg/ml	SI	16.6
Colagenasa-Tripsina	0,18mg/ml	No	-

Una vez obtenidas las preparaciones, éstas fueron analizadas por citometría de flujo. Este análisis permitió determinar cual protocolo era el más adecuado para generar una suspensión celular monodispersa, en la que era posible definir adecuadamente las diferentes fases del ciclo celular, con la menor cantidad de dobletes y de detrito celular.

Para este análisis, utilizamos suspensiones celulares fijadas en EtOH 70% y teñidas con yoduro de propidio (IP) (sección 5.1, Materiales y métodos). Este colorante permite determinar el contenido de ADN para analizar ciclo celular, ya que es un agente intercalante que se une estequiometricamente al ADN aumentando su fluorescencia, permitiendo relacionar la intensidad de fluorescencia con el contenido celular de ADN.

En la Figura 23 se muestra el análisis de los resultados obtenidos por citometría de flujo para cada uno de los protocolos evaluados.

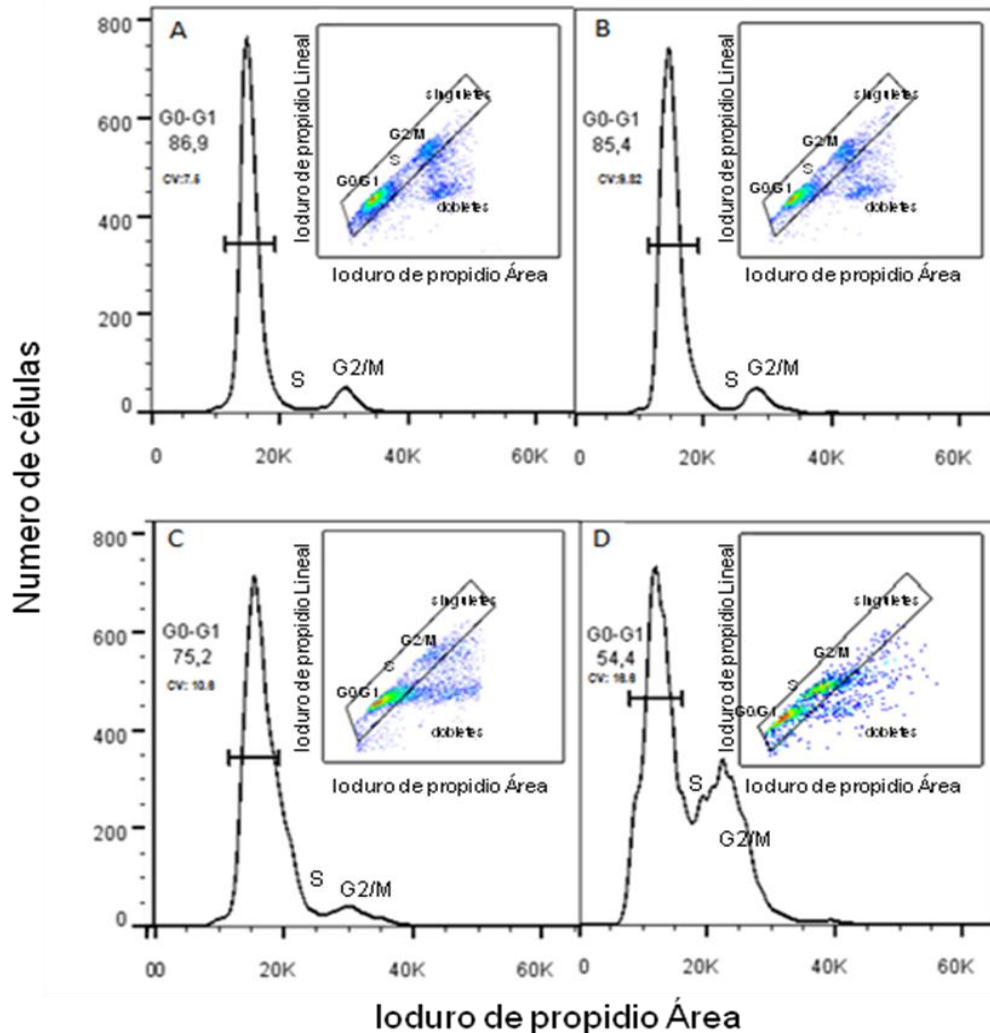


Figura 23- Evaluación de protocolos de disgregación por Citometría de Flujo. El análisis de ciclo celular se realizó utilizando Ioduro de propidio (50mg/ml). A- 0.1% Tripsina. B- 0.05% Tripsina. C- 0.025% Tripsina. D- 0,2 mg/ml Colagenasa- 0.1% Tripsina . Insertos –Distribución de las poblaciones en cada fase del ciclo celular, y eliminación de dobles. Modificada de [210]

Los resultados obtenidos muestran que la utilización combinada de tripsina y colagenasa no genera una preparación celular adecuada. En el histograma (Figura 23D), se puede observar que no es posible identificar las diferentes poblaciones en cada fase del ciclo celular, y además no es posible visualizar picos estrechos ni con un coeficiente de variación adecuado. El coeficiente de variación (CV) nos permite determinar la calidad de los histogramas, dado que nos brinda información sobre la reproducibilidad de la señal producida por las células individuales. Un CV < al 5%

refleja una calidad alta y uno entre 5-10% representa una calidad buena. Idealmente se debería trabajar con CV <5%, pero un CV < 8% también es aceptable (comunicación personal Dra. Valentina Porro).

Según lo expresado anteriormente, con el valor de CV obtenido en el tratamiento de tripsina y colagenasa (16.6%), se debe descartar este tratamiento.

El análisis de los tratamientos que incluían únicamente Tripsina, permitieron identificar en todos los casos las diferentes poblaciones celulares que corresponden a cada fase del ciclo celular (Figura 23A- C). Si se realiza una comparación entre los histogramas de los tres ensayos, es posible observar picos estrechos en todos los casos, si bien en el uso de 0.1 % de tripsina los picos son más definidos (Figura 23A) lo cual se ve reflejado en el CV correspondiente. Además si se observa la eliminación de dobletes, inserto de la figura, podemos observar que el tratamiento de 0.1 % de tripsina es uno de los que produce la menor cantidad de dobletes. Un doblete es generado cuando dos células unidas, cada una de ellas con contenido de ADN equivalente a fase G0/G1 del ciclo celular, es analizada por el citómetro como un evento único cuyo contenido de ADN se correspondería a G2/M.

En base a los resultados anteriormente expuestos, el protocolo optimizado resultó en la combinación de una disrupción mecánica y química en donde inicialmente los gusanos son cortados en pequeños fragmentos, colocados en una solución 0.1% de tripsina con agitación moderada. Luego son rotos suavemente con el mazo de un mortero para ser colocados en un agitador magnético a mínima velocidad. Las muestras son completamente disociadas a células únicas cuando son aspiradas a través de una pipeta pasteur (Figura 24).

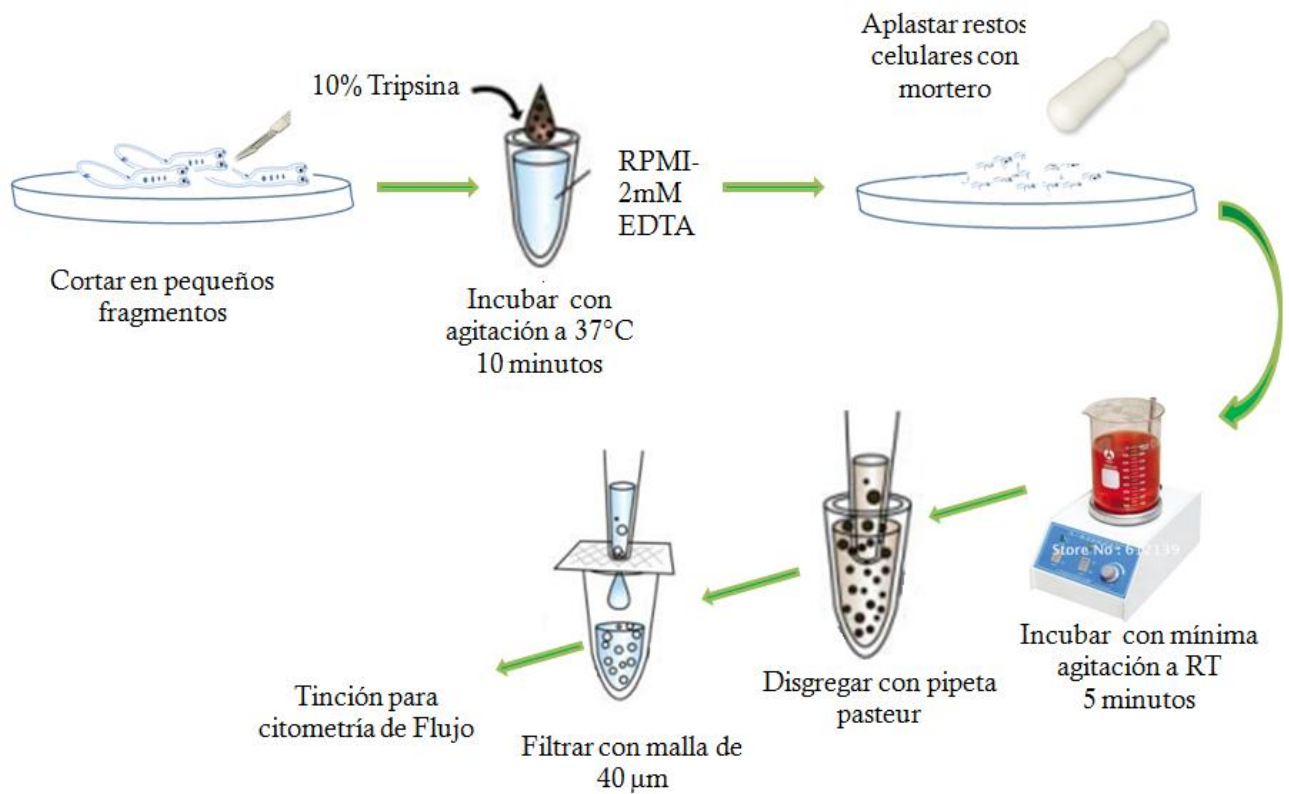


Figura 24- Esquema de protocolo experimental para obtención de suspensiones celulares de *M. corti*.

Para evaluar la morfología de las células una vez finalizado el proceso, se realizó un extendido de las células (Figura 25). En esta figura es posible observar una suspensión celular, con la presencia de núcleos evidenciados por la tinción con DAPI, sin la presencia de agregados celulares y con diferente morfología celular.

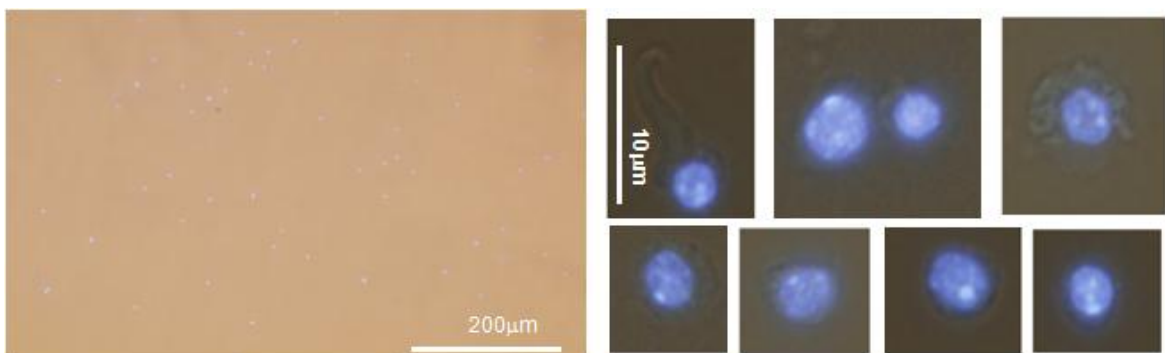


Figura 25 – Microscopía de epifluorescencia de suspensiones celulares utilizando protocolo con tripsina 0.1%. Imagen obtenida en colaboración con el Dr. Uriel Koziol. En azul se representan los núcleos, tinción con DAPI

El análisis de las imágenes obtenidas de las preparaciones de microscopía de epifluorescencia, muestra que efectivamente el uso de este protocolo de preparación celular es adecuado para la generación de suspensiones celulares monodispersas, donde es posible observar células con diferentes tipos de morfología.

El uso de la citometría de flujo utilizando suspensiones de células fijadas, obtenidas a partir del protocolo descrito anteriormente, permitió además realizar una evaluación del contenido de ADN celular, para estimar las cantidades de células obtenidas en las diferentes fases del ciclo celular.

Para hacer el análisis del histograma como el representado en la Figura 26 y reconocer las poblaciones celulares, es necesario ver que las células que se encuentran en fase G₀/G₁ (antes de la síntesis de ADN) tienen una cantidad X definida de ADN. Las células en fase G₂ o M contienen una cantidad de ADN de 2X y durante la fase S (síntesis de ADN) las células en esta fase contienen niveles de ADN entre X y 2X. [211]

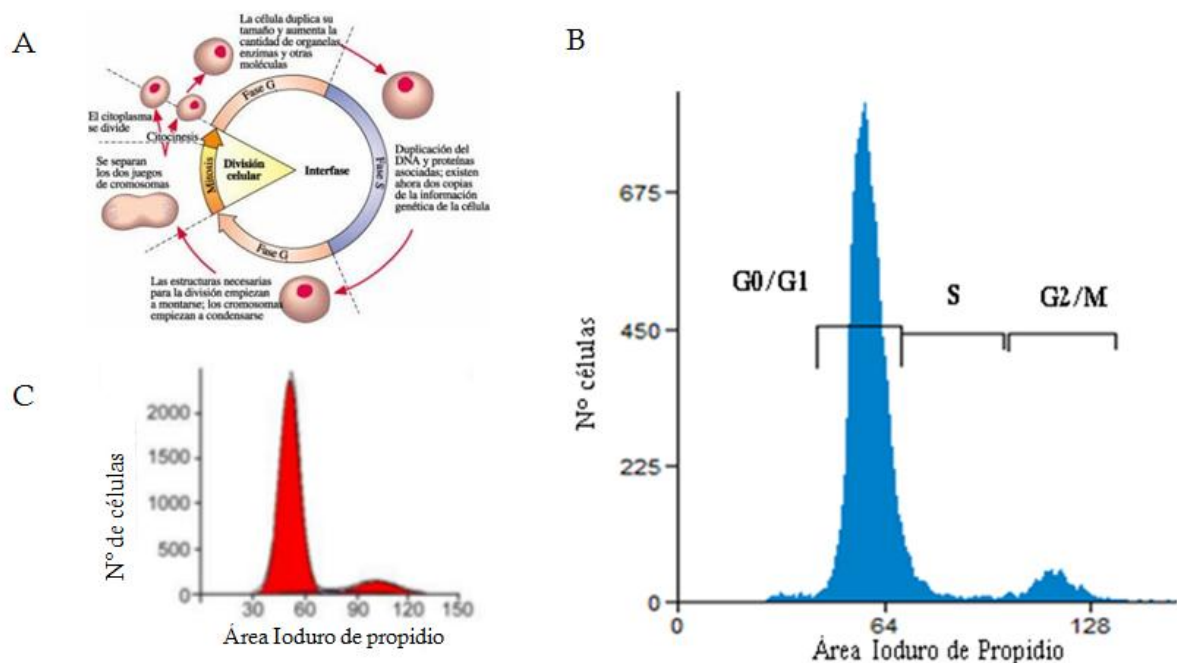


Figura 26- A) Esquema de ciclo celular; B) Histograma representativo del perfil de ciclo celular obtenido del análisis de suspensiones celulares fijadas en EtOH 70% teñidas con IP de *M. corti*. La distribución del ciclo celular fue realizada contando todas las células en la muestra y representando su contenido celular. C) Histograma representativo del perfil de ciclo celular obtenido suspensiones celulares de *S. mediterranea* (planaria)

teñidas con IP. Figura A tomada de http://www.profesorenlinea.cl/Ciencias/Celular_Ciclo.html; B, modificado de [210]; C modificado de [212]

En la Figura 26b se muestra un histograma representativo de la distribución de las células a lo largo del ciclo celular. Analizando la distribución de las células a lo largo del ciclo celular, en una preparación de células fijadas, teñidas con IP y con un CV apropiado de 7.92, estimamos que el 92% de las células se encuentran en G0/G1, 3.7% en fase S y el 3.3% en fase G2/M. Esta distribución de células en cada fase del ciclo celular parece mantenerse a lo largo de experimentos independientes. Y más aún, esta distribución celular es comparable a la que se observan en otros platelmintos [212], indicando que el método es lo suficientemente sensible para detectar células proliferativas a partir de los macerados celulares del parásito.

Para determinar si el método que se desarrolló era sensible para detectar cambios reproducibles en la variación del porcentaje de células poliferativas (S o G2/M), luego de realizar tratamientos experimentales a los ejemplares en cultivo y utilizados luego en el macerado celular, testamos diferentes condiciones. Inicialmente, seleccionamos dos tratamientos que causaran efectos opuestos en la proliferación celular. Por un lado, un tratamiento con colchicina, agente citostático que bloquea la salida de las células en fase M del ciclo celular, llevando a un aumento en la proporción de células en fase G2/M. Mientras que por otro lado, testamos un tratamiento con hidroxurea (HU), agente inhibidor de la ribonucleotido reductasa que es tóxico para aquellas células sintetizando ADN en fase S, llevando a una disminución de células proliferativas. Este tratamiento ya había sido utilizado previamente para la eliminación de las células proliferativas en otros invertebrados [66,213,214].

Los resultados obtenidos para el caso de organismos tratados con 0.018% de colchicina luego de 12hs de tratamiento, mostraron una tendencia al incremento del número de células en G2/M (Figura 27A-B). En el caso del tratamiento con HU no fue posible la detección de una disminución significativa en el número de células proliferativas (datos no mostrados).

Posteriormente, se testó el protocolo de activación con pepsina de larvas en cultivo empleado para *E. granulosus*, pensando que tal vez la activación de las larvas pueda inducir a un aumento en la proliferación celular. Los resultados obtenidos en este caso no mostraron diferencias significativas respecto al protocolo original (Figura 27C-D).

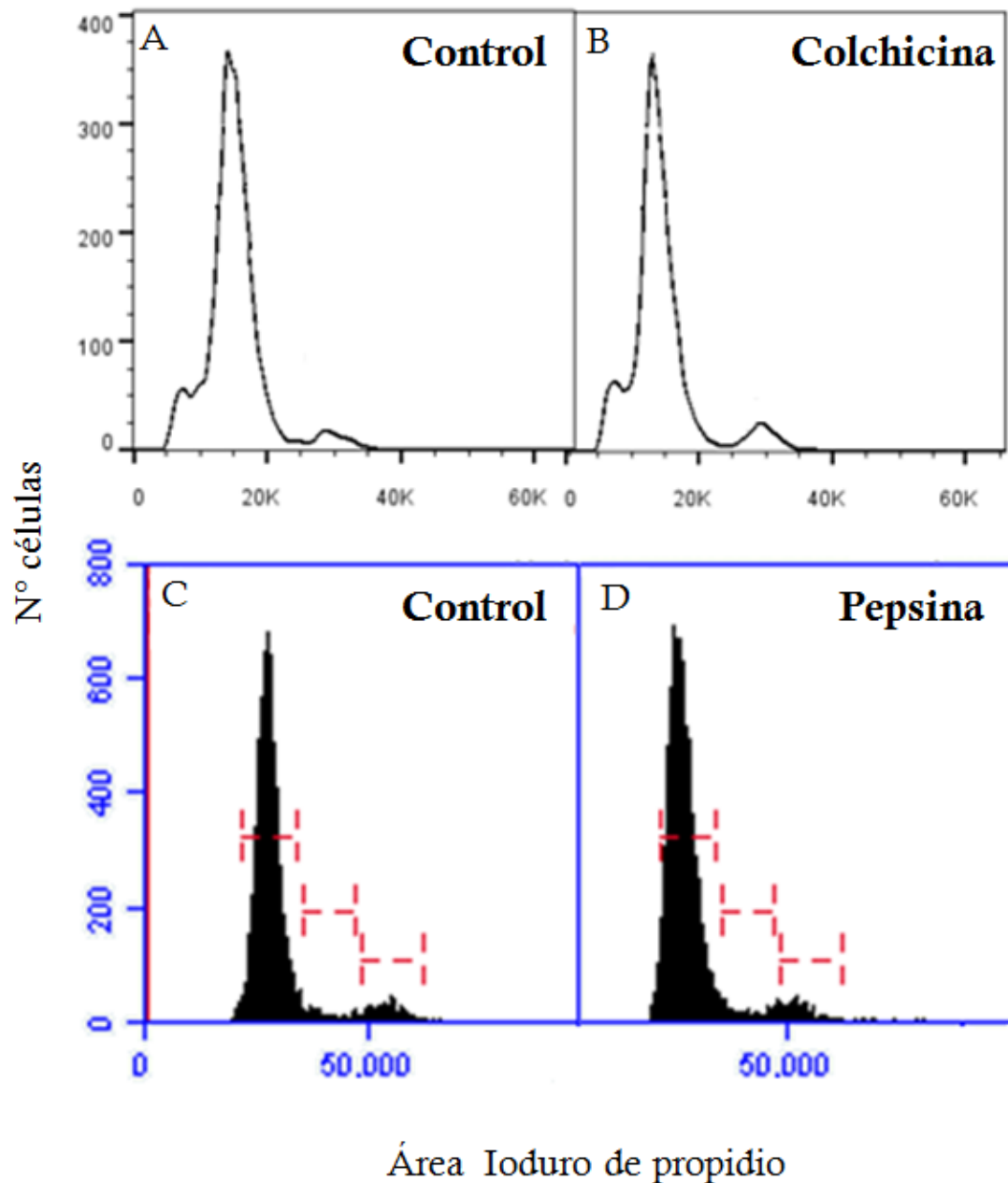


Figura 27-Tratamientos realizados en suspensiones celulares de *M. corti* para testar variación del porcentaje de células proliferativas. A) Control; B) Tratamiento con colchicina; C) Control; D) Pepsina.

Todos los resultados expuestos hasta aquí muestran qué se generó un método efectivo para evaluar suspensiones celulares por citometría de flujo (Figura 24). Esto nos permite evaluar rápidamente los efectos sobre la capacidad proliferativa de diferentes tratamientos mediante el estudio de cambios en el número de células en las diferentes etapas del ciclo celular utilizando marcación con IP.

Recientemente en el laboratorio se cuenta con un nuevo modelo de cestodo, *Hymenolepis microstoma*. Por esta razón, se planteó evaluar si el protocolo puesto a punto para *M. corti* era adecuado para este cestodo. Estos experimentos permitirían validar nuestro protocolo de preparación de suspensiones. Para ello se realizó una disección a nivel de las primeras proglotides del gusano adulto de *H. microstoma* de forma de obtener la región del cuello, zona más rica en células proliferativas. Esta región fue tratada utilizando el protocolo descrito anteriormente y en paralelo se trabajaron con ejemplares de *M. corti* como control del ensayo.

En la Figura 28 podemos observar una comparación de los ciclos celulares de *H.microstoma* y *M. corti*.

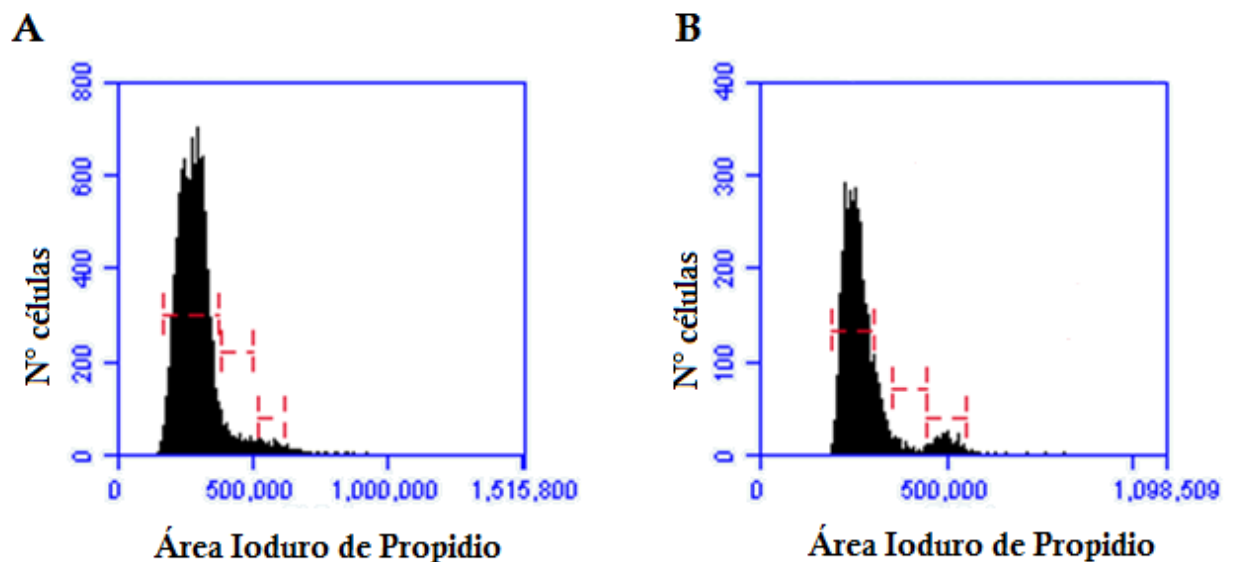


Figura 28-Histogramas de Ciclo celular de suspensiones celulares fijadas en EtOH 70% de A) *Hymenolepis microstoma*; B) *Mesocostoides corti*. La distribución del ciclo celular fue realizada contando todas las células en la muestra y representando su contenido celular.

En las condiciones del ensayo, se puede observar que si bien existe un patrón similar en la distribución de las células en cada fase del ciclo celular, en este caso particular, en *Hymenolepis* existe una mayor proporción de células en fase S y menor proporción de células en fase G2/M.

Estos resultados demuestran que el método de disgregación es efectivo en otros cestodos, lo que permitiría realizar tratamientos que afecten la capacidad proliferativa y determinar cómo afecta la distribución de las células en cada fase del ciclo celular.

Logros:

- 1. Protocolo optimizado para obtener suspensiones celulares monodispersas, sin agregados celulares y factibles de ser analizados por citometría de flujo.**

Este protocolo permite definir adecuadamente las diferentes fases del ciclo celular, con la menor cantidad de dobletes y de detrito celular.

- 2. Método sensible para detectar cambios reproducibles en la variación de porcentajes de células proliferativas luego de realizar tratamientos experimentales.**
- 3. Método adecuado para ser aplicado a otros modelos de Cestodos.**

o o o o

2.2. Aislamiento de células proliferativas por citometría de flujo

2.2.1. Tinción de células viables para Citometría de flujo

Cuando se contó con un protocolo para la preparación de suspensiones celulares apto para citometría de flujo, fue necesario trabajar en la puesta a punto de los diferentes colorantes a utilizar para su identificación.

Se comenzó trabajando con Hoechst 33342 e IP. El primer colorante se une al surco menor del ADN en forma estequiométrica. El mismo es considerado vital por su capacidad de ser permeable a las membranas de células vivas y el segundo se utilizó para analizar viabilidad celular. Dado que los resultados obtenidos con estos colorantes fueron infructuosos en cuanto al análisis de las poblaciones celulares, se

resolvió la incorporación de un tercer colorante, calceina AM. El ensayo realizado con esta molécula se basa en la conversión del colorante no- fluorescente a fluorescente por la actividad de esterasas intracelulares en células vivas. La incorporación de este colorante permitió el análisis y la identificación de las poblaciones celulares en las diferentes fases del ciclo celular.

La optimización del protocolo de tinción implicó un arduo trabajo ya que se debió seleccionar la concentración adecuada para cada colorante individualmente y evaluar posteriormente la triple coloración. En la Tabla 11 se resume las concentraciones que fueron testeadas para cada colorante.

Tabla 11- Concentraciones evaluadas para los colorantes Hoechst y Calceina. En negrita se señalan las concentraciones utilizadas finalmente.

Hoechst		Calceina
[$\mu\text{g/ml}$]		[$\mu\text{g/ml}$]
0.2		0.01
2		0.02
3		0.2
4		0.25
5		0.35
20		

A partir de los resultados obtenidos de los análisis citométricos de estos experimentos, se seleccionó un protocolo de coloración en el que se utiliza una combinación de de 5 $\mu\text{g/ml}$ de Hoechst y 0.02 $\mu\text{g/ml}$ de Calceina. En el momento previo a introducir la muestra en el citómetro se incorpora la coloración con IP a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$.

2.2.2. Determinación de porcentaje de células en cada fase del ciclo celular a lo largo del desarrollo estrobilar de *M. corti*

Previo a realizar el aislamiento de las células por citometría de flujo, se realizó un ensayo donde se evaluó el porcentaje de células en cada fase de ciclo celular a lo largo del desarrollo en cultivo de *M. corti* (Tabla 12, Figura 29). Este ensayo permitió determinar la cantidad de días de cultivo adecuados para obtener la mejor relación entre la cantidad de células proliferativas y una buena definición de las poblaciones celulares. En la Figura 29 se representan los *plots* y la tabla resume la

proporción de células en cada fase del ciclo celular correspondientes a 2, 4, 6, 8, 10 y 13 días de cultivo.

Tabla 12- Porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular durante el desarrollo estrobilar de *M. corti* en cultivo.

	%G0/G1	% S	% G2/M
2 días de cultivo	75.5	16.3	4.5
4 días de cultivo	72	18.5	4
6 días de cultivo	81.7	10.1	5.2
8 días de cultivo	77.3	14.4	4
10 días de cultivo	77	13.7	4.7
13 días de cultivo	72.7	17.5	5.9

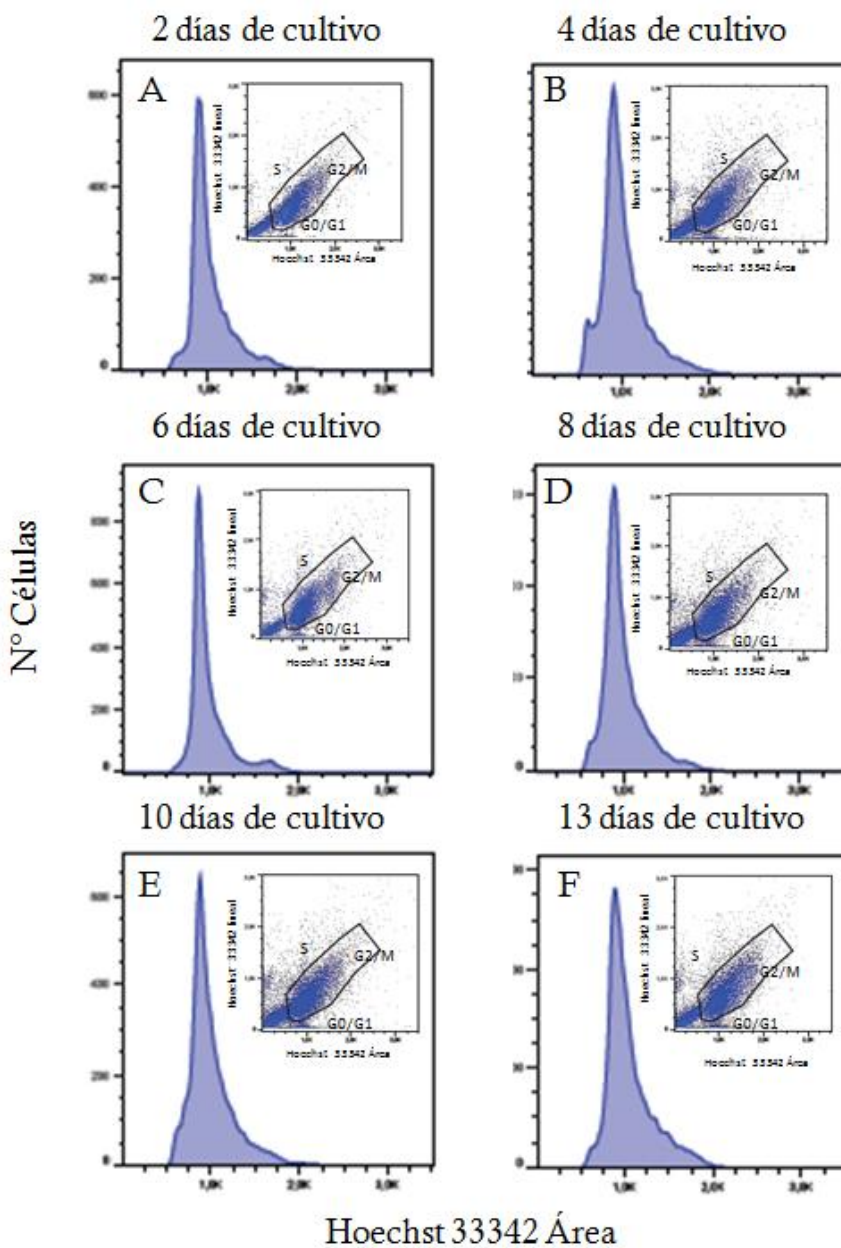


Figura 29- Evaluación de los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular a lo largo del desarrollo estrobilar de *M. corti*. Se visualizan los histogramas del ciclo celular, el análisis de ciclo celular se realizó utilizando Hoechst 33342. A-2 días de cultivo, B-4 días de cultivo, C-6 días de cultivo, D-8 días de cultivo, E-10 días de cultivo, F-13 días de cultivo. Insertos- Distribución de las poblaciones en cada fase del ciclo celular, y eliminación de dobletes respectivos para cada día de cultivo

Basados en el porcentaje absoluto de células en fase G2/M (Tabla 12) y la buena separación de los picos entre las fases G0/G1 y G2/M, (Figura 29), se definió trabajar con organismos con 6 días de cultivo.

Si se analizaron los porcentajes de células en cada experimento, se observa que es muy similar para todos los ensayos. Si bien los ejemplares con 6 días no presentan los porcentajes de células proliferativas más altos en total (incluyendo fase S), si presentan una muy buena definición de las poblaciones celulares en las distintas fases del ciclo celular. Esto hace que se puedan definir mejor las poblaciones y las estimaciones de las proporciones de células sean más adecuadas. Si comparamos el caso de organismos con 13 días de cultivo con el de 6 días es posible ver que limitar las poblaciones en el primer caso es mucho más difícil porque las nubes de las diferentes fases de ciclo se vuelven más anchas y por lo tanto más difícil de delimitar llevando a una estimación inadecuada de las cantidades de células.

Una vez finalizada la etapa de identificación de las diferentes poblaciones celulares, y la determinación de días de cultivo óptimos, proseguimos con el aislamiento por citometría de flujo de las fracciones celulares presentes en G0/G1 y S, G2/M para su caracterización.

2.2.3. Aislamiento de células mediante *sorting* celular

Para poder realizar separación celular, las poblaciones a separar deben ser identificadas mediante una estrategia de selección de poblaciones (*con gates*) y uso de diferentes parámetros que permitan seleccionar exclusivamente aquellas células que sean de interés. Particularmente en este trabajo, suspensiones celulares obtenidas a partir de organismos con 6 días de cultivo fueron preparadas y teñidas según lo descrito en los apartados anteriores, para ser sometidas a análisis por Citometría de flujo y *sorting* celular. Las muestras ingresadas en el citómetro primero son seleccionadas por los parámetros *Forward light scatter (FSC)* y *Side light scatter (SSC)*; (Figura 30A). El parámetro *FSC* es proporcional al área de la superficie celular o al tamaño, mientras que *SSC* es proporcional a la granulosidad o complejidad interna de la partícula que se está analizando. Este análisis permite seleccionar la población de interés en cuanto a tamaño y granulosidad y a su vez

eliminar del análisis restos celulares. Posteriormente, se realiza una exclusión de dobletes para seleccionar únicamente las células *singuletes* para el análisis (Figura 30B). Como se explicó en la sección 2.1 de resultados, los dobletes son generados cuando por el citómetro pasan dos células unidas, cuyo contenido de ADN es equivalente a la fase G0/G1, y son registradas como un único evento. Es por esto que la exclusión de dobletes es fundamental para no llevar a un error en el número relativo de células en fase G2/M.

La población celular seleccionada es entonces analizada en base a su intensidad de tinción con colorantes vitales y contenido de ADN. Para la identificación de aquellas células viables contenidas en la población seleccionada, se grafica la intensidad de fluorescencia relativa de IP contra la de calceina AM (Figura 30C). El corte en la delimitación de cada población se realiza utilizando un control sin teñir y *single staining* para cada colorante (datos no mostrados). Una vez seleccionada la población de células viables (calceina positivas/ IP negativas), las muestras son seleccionadas para análisis de ciclo celular (tinción con Hoechst 33242, Figura 30E) para determinar en qué fases del ciclo celular se encuentran y realizar la decisión de *sorting* (Figura 30D).

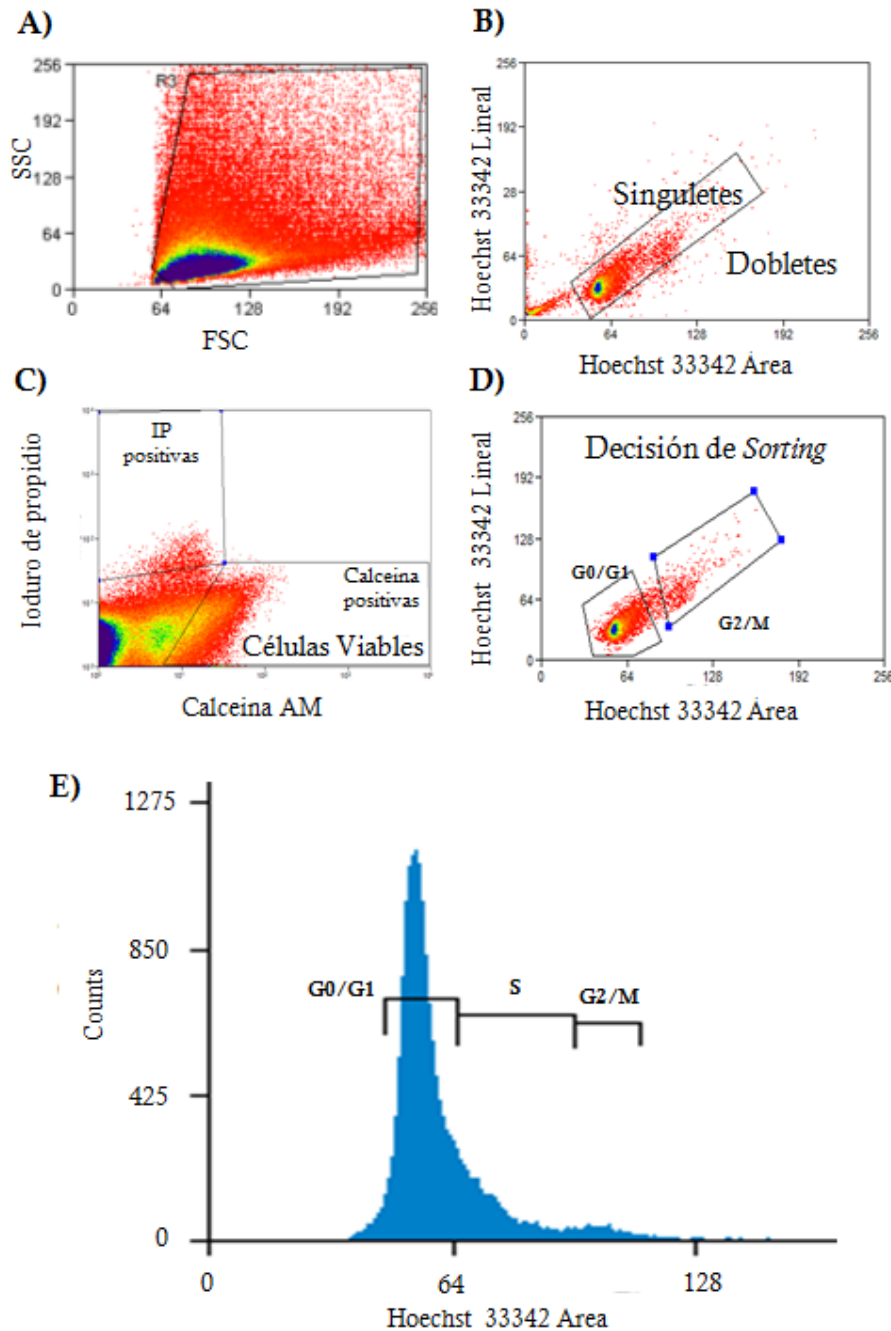


Figura 30-Aislamiento de células por citometría de flujo. Separación utilizando triple tinción Hoechst 33342/CalceinaAM/Ioduro de propidio. A) *Dot plot* Forward light scatter (FSC) contra Side light scatter (SSC) para seleccionar la población por tamaño y granulosidad; B) *Dot plot* de células individuales Hoechst 33342 Área vs Hoechst 33342 lineal. Este dot plot permite la exclusión de dobletes ya que presentan el doble de señal de tinción Hoechst 33342 lineal; C) *Dot plot* de Intensidad de fluorescencia de calceina AM vs Ioduro de propidio que permite la selección de células viables (calceina positivas/Ioduro propidio negativas); D) *Dot plot* de células individuales (Hoechst 33342 Área vs Hoechst 33342 lineal). Este dot plot permite la selección de la población para *sorting* basados en su contenido de ADN, en esta imagen se observa la selección de gates de las poblaciones a separar. E) Histograma de tinción con Hoechst 33342 de células viables (de células en el *plot* Figura 30D), el mismo muestra diferentes contenidos de ADN para las células del parásito que se corresponden a diferentes fases del ciclo celular. Figura modificada de [210].

Luego de realizado el *sorting* celular la morfología de las células en cada fracción es analizada microscópicamente (Figura 31).

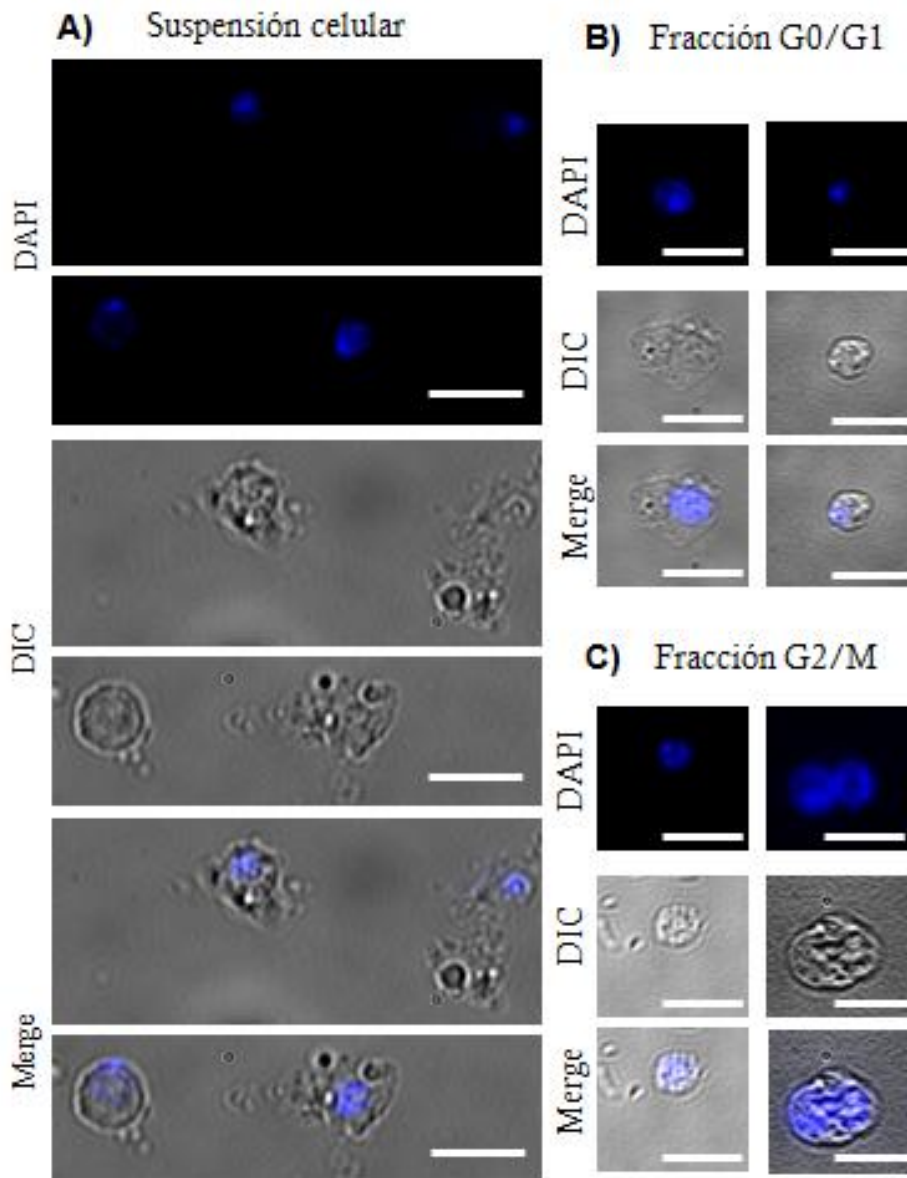


Figura 31- Morfología de células en A) suspensión celular; B) fracción G0/G1; C) fracción G2/M. La barra representa 5μm. Figura modificada de [210]

En esta figura es posible observar las características morfológicas de las células antes y después de la separación celular. Tanto en la suspensión celular como en la fracción obtenida para células en fase G0/G1 la población celular que se observa es diversa, donde es posible encontrar células de distintos tamaños y formas (Figura 31 A-B). Mientras que en la fracción G2/M se observa una población celular homogénea en cuanto a forma y tamaño de las células (aproximadamente 5μm de

diámetro). Las células presentan una morfología esférica con un núcleo grande y escaso citoplasma, característico de células germinativas (Figura 31C).

Concluyendo, desarrollamos un método que permite el aislamiento de las células proliferativas de *M.corti* por Citometría de flujo y *sorting* celular. Las células aisladas correspondientes a la fracción G2/M presentan características morfológicas de células germinativas conservadas, igual a la de otros platelmintos [45,54–56,59,80], pequeño tamaño, forma esférica con una alta relación núcleo/citoplasma.

Estos resultados no solo abren las puertas a la realización de otros proyectos que están siendo actualmente desarrollados en el laboratorio, dada la posibilidad de obtener las células proliferativas *M. corti*, sino que también pueden contribuir para facilitar la caracterización de las células proliferativas de *M.corti* y de otros modelos de Cestodos.

De los resultados descritos en las secciones anteriores se publicó un artículo en la revista *Experimental Parasitology*, en la cual junto con Dr. Uriel Koziol soy primera autora. El mismo se adjunta en el apéndice 2.

Logros:

- 1. Identificación de poblaciones celulares en el Citómetro de flujo, mediante triple marcado.**
- 2. Determinación de tiempo óptimo de cultivo *in vitro***
- 3. Aislamiento de poblaciones celulares de *M.corti* mediante *sorting* celular.**

3. Cultivo *in vitro* de suspensiones celulares de *M. corti*.

La generación de una línea celular de *M. corti* abriría las puertas para mejorar la caracterización morfológica de estas células proliferativas e incluso ensayos funcionales de ARN interferencia. Esto permitiría la identificación de blancos específicos que lleven a largo plazo a generar herramientas para lograr la erradicación de estos y otros parásitos.

Inicialmente se propuso que los experimentos de cultivo *in vitro* se realizarían a partir de células aisladas por citometría de flujo. Esto sería lógicamente lo ideal dado que se parte de células purificadas donde la mayor cantidad de células son neoblastos. Sin embargo, los resultados obtenidos por citometría de flujo muestran que las proporciones celulares obtenidas son bajas, y además se suma el inconveniente de que las preparaciones pueden quedar con algunos detritos celulares por lo que muchas veces los eventos registrados por el citómetro no son siempre la cantidad real. Es por ello que se optó por trabajar con suspensiones celulares sin purificar. Esto lógicamente genera el inconveniente de que las células con capacidad proliferativa se ven diluidas en la preparación y tampoco se pierden los detritos celulares, pero la ventaja es que se puede partir de mucho material inicial fácilmente por lo que puede ser una buena primera aproximación.

Los experimentos de cultivo *in vitro* se realizaron en el laboratorio del Dr. Klaus Brehm durante una pasantía de investigación. Estos experimentos se basaron en el protocolo que se emplea en dicho laboratorio para la realización de cultivos primarios de *Echinococcus multilocularis* [215–217], y modificaciones de nuestro protocolo de preparación de las suspensiones celulares. Para obtener la cantidad de material equivalente, se aumentó la cantidad de material de partida, se implementó el uso de una malla de 30 μm de forma de retener la mayor cantidad de restos celulares, la eliminación de corpúsculos calcáreos mediante centrifugación y la filtración final de la preparación con un filtro estéril de 40 μm .

En la Figura 32 se muestra un esquema de la estrategia utilizada para realizar el cultivo de las células.

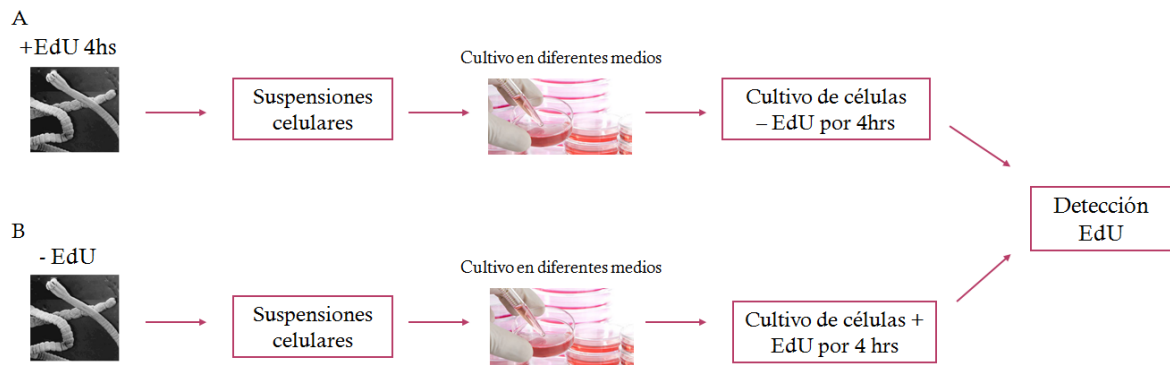


Figura 32- Esquema de estrategia utilizada para realizar el cultivo de células de *M.corti* A) Estrategia empleada para el control positivo, B) Estrategia empleada para las muestras problema.

Para testar la capacidad proliferativa de las células en cultivo se utilizó la incorporación del análogo de timina EdU que se incorpora a las moléculas de ADN recién sintetizado, como se describió en la sección 4.1.

En estos ensayos se trabajó utilizando dos condiciones, una donde se expone a los organismos a una incubación con EdU previa a la preparación de la suspensión (control positivo). El control positivo, permite validar la detección de EdU que se utilizó para controlar la proliferación *in vitro* de las células puestas en cultivo.

La otra condición trabajada es la que los organismos son expuestos a EdU posterior a la preparación de la suspensión para determinar su capacidad de proliferación en cultivo.

Las células preparadas son testadas en diferentes medios de cultivo, en condiciones no reductoras y reductoras, siempre en un ambiente conteniendo N_2 y CO_2 . Los medios testados fueron DMEM, líquido hidático y medio condicionado por hepatocitos, según se describió en la sección 6 de materiales y métodos.

El análisis de los resultados utilizando la técnica de EdU puede ser visualizado con microscopia de fluorescencia, donde es muy importante determinar la co-localización derivada de la incorporación de la molécula junto con la tinción del colorante DAPI.

En la Figura 33 se muestran los resultados para los experimentos de cultivo *in vitro* en los diferentes medios de cultivo retirados a las 20 horas. En estos experimentos es posible encontrarse dos posibles resultados (que pueden coexistir), uno en el que

existan células que proliferan y otro en el cual hay células que se mantienen en cultivo sin proliferar.

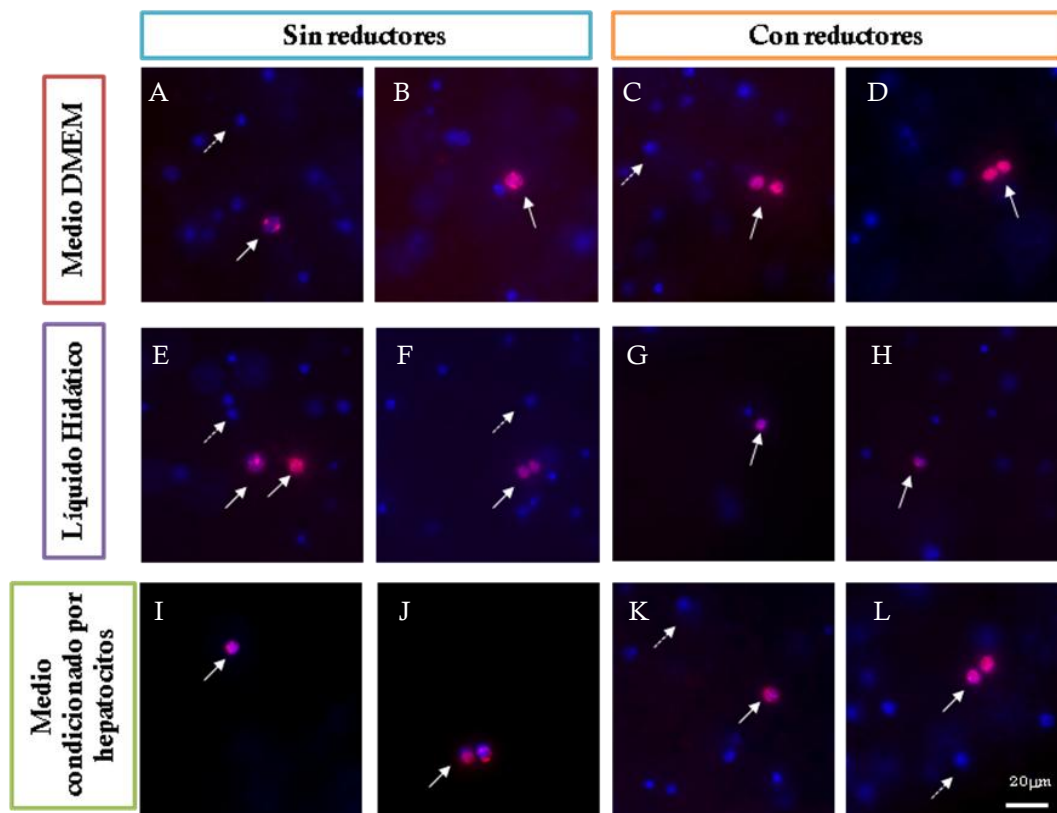


Figura 33- Cultivo *in vitro* de células de *M. corti*. A-B, Células en cultivo en medio DMEM sin agentes reductores, C-D, Células en cultivo en medio DMEM con agentes reductores, E-F, Células en cultivo en líquido hidático sin agentes reductores, G-H, Células en cultivo en líquido hidático con agentes reductores, I-J, Células en cultivo en medio condicionado por hepatocitos sin agentes reductores, K-L, Células en cultivo en medio condicionado por hepatocitos con agentes reductores. En azul se visualiza DAPI, en rojo EdU. Las flechas continuas indican núcleos positivos para EdU, flechas discontinuas indican presencia de núcleos dada su tinción con DAPI.

Los resultados de la figura muestran que para todos los medios y condiciones testadas, es posible detectar la presencia de células proliferativas capaces de incorporar EdU mientras están en cultivo (flechas continuas, núcleos rojos). A su vez, es importante remarcar que se observa la presencia de células que no han sido capaces de incorporar la molécula estando en cultivo (flechas discontinuas, núcleos azules), lo cual es esperable habiendo partido de suspensiones celulares totales, no de células purificadas.

Para el caso del control positivo, los datos no son presentados pero también fue posible detectar núcleos positivos para EdU, validando la técnica utilizada.

La inclusión de este control fue muy importante. Porque si los ensayos con las células hubieran arrojado resultados negativos, los mismos no se podrían relacionar

con un error en la técnica del ensayo de proliferación o directamente con la incapacidad de las células de proliferar en cultivo.

Las suspensiones celulares fueron mantenidas en cultivo hasta 72 horas después de iniciado el mismo (Figura 34). Este ensayo se continuó para todos los medios testeados, pero durante el procesamiento de las muestras (detección de EdU), parte de las muestras se perdió debido a que las mismas se desprendieron del portaobjeto.

En las condiciones que pudieron ser interrogadas, los resultados muestran que, existen células capaces de proliferar en cultivo. Esta capacidad fue evidenciada por la detección de la molécula EdU, lo que muestra que parte de las células fueron capaces de dividirse.

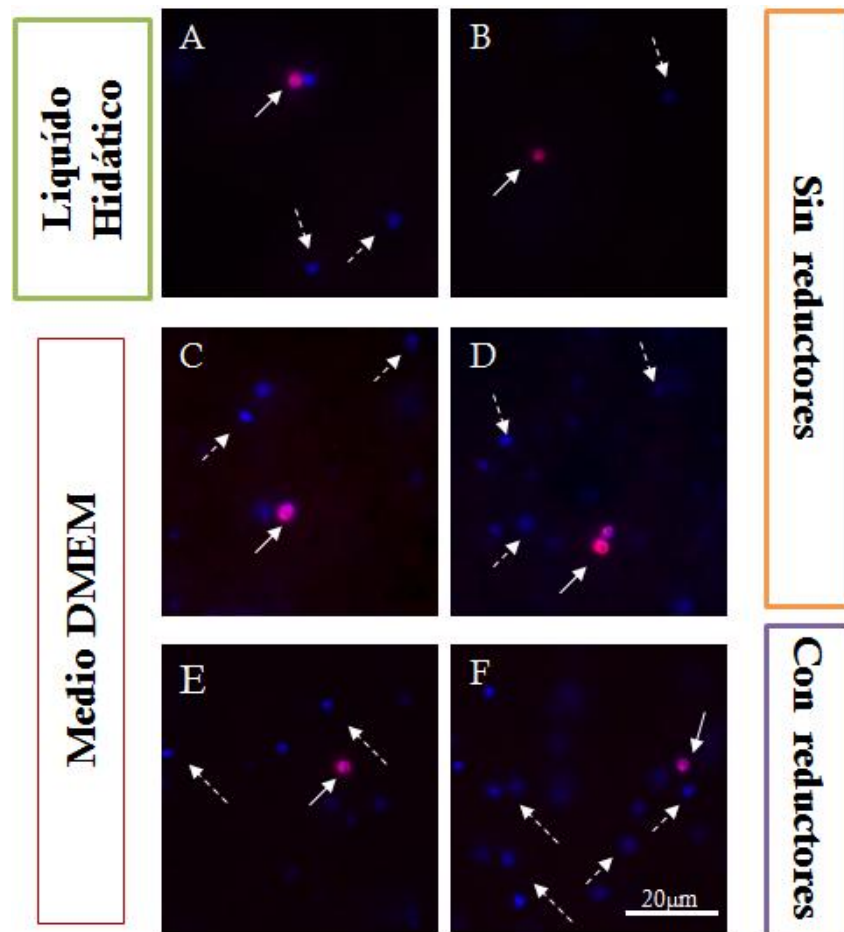


Figura 34- Cultivo *in vitro* de células de *M. corti*. A-B, Células en cultivo en líquido hidático sin agentes reductores, C-D, Células en cultivo en medio DMEM sin agentes reductores, E-F, Células en cultivo en líquido hidático con agentes reductores. En azul se visualiza DAPI, en rojo EdU. Las flechas continuas indican núcleos positivos para EdU, flechas discontinuas indican presencia de núcleos dada su tinción con DAPI.

Durante el tiempo que las células se mantuvieron en cultivo, se realizó un seguimiento por microscopía óptica convencional para evaluar el estado de las mismas. Claramente la visualización de las células en el cultivo es muy difícil debido al tamaño pequeño de las mismas. En todos los casos se apreciaba la presencia de mucho detrito celular, y además era posible observar pequeñas esferas restringentes (transparentes), probablemente las células. Estas células en cultivo no parecen asociarse entre ellas, ni tampoco adherirse al material plástico que las contiene, parecen crecer libres en suspensión sin asociación ninguna a diferencia de lo que sucede con los cultivos primarios de *E. multilocularis*, que después de 24hs en cultivo las mismas comienzan a asociarse [216].

Evaluando los resultados generales de estos ensayos es importante destacar que se logró obtener células de *M. corti* capaces de proliferar en cultivo, en todas las condiciones ensayadas. Las mismas fueron capaces de sobrevivir en cultivo manteniéndose viables y con capacidad de proliferar hasta 72hs. Esto habla de la capacidad de las mismas de resistir en condiciones de anoxia, tal vez debido a ambiente natural en el interior del huésped y también es posible pensar que en principio son capaces de crecer en cualquiera de los medios ensayados sin preferencia por ninguno dado que no existe mayor proporción de células en uno u otro medio.

El agregado de condiciones reductoras al medio de cultivo tampoco parecería indicar que se mejoren las condiciones para volverlas más propicias a inducir una mayor tasa de proliferación. Más aún, se testaron algunos suplementos (heparina e insulina) que se sabe que tienen la capacidad de aumentar la proliferación celular en cultivo y tampoco se obtuvieron resultados diferentes a los mostrados previamente.

Una alternativa planteada, es realizar co-cultivo de células de *E. multilocularis* junto con las células de *M. corti*. Este ensayo puede ser favorable, ya que las células de *Echinococcus* en cultivo tal vez puedan generar factores de crecimiento más adecuados que puedan promover la proliferación celular de las células de *Mesocestoides*. (Comunicación personal Dr. Brehm)

Estos resultados, muestran que las células derivadas de *M. corti* son capaces de proliferar en cultivo *in vitro*, algo que hasta el momento no se había testado ni reportado. Además de las células proliferativas, existe una población capaz de

mantenerse en cultivo sin proliferar. Esto hace que este trabajo contribuya de forma importante al avance del estudio de genómica funcional en cestodos, ya que nos permitirá generar una herramienta para poder evaluar roles funcionales de diferentes de marcadores moleculares por lo menos en cultivos de corta duración.

Logros:

1. **Demostrar que existen células de *M. corti* capaces de proliferar en cultivo.**
2. **La proliferación celular es independiente de los diferentes medios de cultivo.**
3. **Fue posible el mantenimiento de cultivo de corta duración.**

4. Estudio de Marcadores Moleculares de *M. corti*.

Dada las dificultades que presenta la identificación de diferentes tipos celulares por métodos de histología clásica o bien MET, surge la necesidad de identificar marcadores moleculares específicos para cada tipo celular. La existencia de marcadores moleculares conservados en este tipo de células, brinda la posibilidad de caracterizar estas poblaciones celulares desde un perfil molecular. Debido a que poco se conoce sobre estos organismos, todo conocimiento es importante para intentar elucidar si este patrón se conserva entre los platelmintos, más precisamente en los cestodos.

o o o o

4.1. Aislamiento del gen pL10

Se propuso el aislamiento y caracterización de un gen perteneciente a la familia de las DEAD helicasas. Inicialmente planificamos el aislamiento del gen *vasa*, altamente conservado en este tipo de células. Este gen se encuentra asociado también al desarrollo de la línea germinal.

Es importante recalcar que, en el momento que se comenzó a trabajar en el aislamiento de este marcador, no se disponía de la gran cantidad de genomas

disponibles actualmente. Es por ello que inicialmente, realizamos una búsqueda bioinformática en el genoma de *Echinococcus multilocularis*, especie altamente relacionada cuyo genoma estaba disponible, y esto nos reveló la ausencia de este gen en esa especie. La utilización de este tipo de estrategia ya había sido utilizada en el laboratorio para la búsqueda de genes, obteniéndose resultados satisfactorios. Es por ello que se decidió aislar el gen pL10. El mismo también pertenece a la familia de las DEAD helicasas y se encuentra asociado a una expresión conservada en las células de la línea germinal, y por lo tanto considerado un marcador molecular de las mismas.

El aislamiento de este gen fue realizado utilizando *primers* degenerados descritos en la bibliografía [142], los cuales reconocen dos de los motivos conservados en la familia de las DEAD helicasas. El *primer* Fw reconoce el motivo MACAQ T y el Rv amplifica la secuencia proteica DRMLDM y el producto de amplificación es de 400 pb aproximadamente. En la Figura 35 podemos observar los productos de amplificación obtenidos mediante RT-PCR, utilizando como molde ADNc de *M. corti*, *F. hepatica*, *E. granulosus* según lo descrito en la sección 7.1 de materiales y métodos.

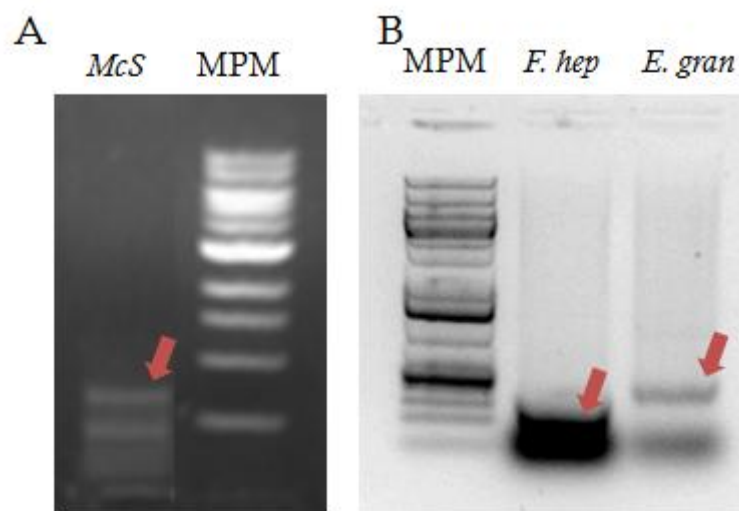


Figura 35-Resultados de amplificación por PCR con primers degenerados para el gen pL10. A) RT-PCR con ADNc de organismos segmentados de *M. corti* B) *F. hepatica* y *E. granulosus*. La flecha roja indica el fragmento de interés amplificado correspondiente a 400pb aproximadamente. Abreviaciones: *McS*, *M. corti* segmentado; *F. hep*, *F. hepatica*; *E. gran*, *E. granulosus*; MPM, Marcador de peso molecular.

Como es posible observar en la Figura 35, la utilización de los *primers* degenerados, permite la amplificación de la banda de interés en todas las especies, pero además existe amplificación inespecífica. Esto probablemente se deba al uso de bajas temperaturas de *annealing* debido al uso de *primers* degenerados que puedan producir el pegado inespecífico de los mismos.

Una vez purificados los fragmentos de interés, los mismos fueron clonados y secuenciados para confirmar que efectivamente se contaba con las secuencias de interés.

En el caso de *M. corti*, se intentó completar la secuencia del gen amplificado mediante ensayos de RACE 3' una técnica que ya se encontraba implementada en el laboratorio con resultados satisfactorios. En este caso, reiterados intentos para completar la secuencia fueron infructuosos.

Mediante estudios filogenéticos se evaluaron las relaciones de ortología entre los genes amplificados, los de otros platelmintos y animales para confirmar que se trataba del gen del interés y no otro miembro de la misma familia.

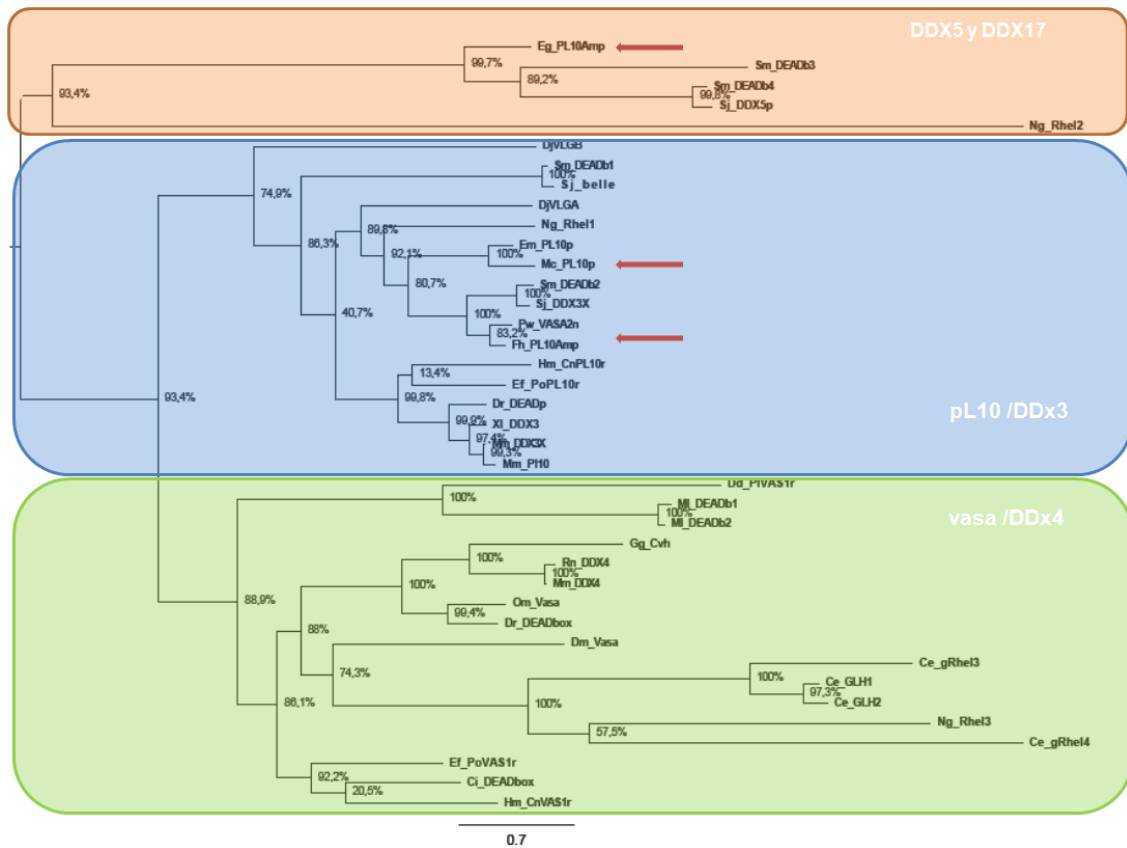


Figura 36- Relaciones filogenéticas de las secuencias amplificadas para los genes pertenecientes a la familia de las DEAD helicasas de *M. corti*, *E. granulosus* y *F. hepatica*. El árbol fue construido utilizando *Neighbor-Joining* bajo el modelo JTT con un *bootstrap* de 1000 replicas. Para poder verificar las relaciones de ortología entre estos genes en el árbol se incluyen, secuencias correspondientes a las subfamilias pL10 y *vasa*; se incluyen como grupo externo secuencias pertenecientes a las subfamilias DDX5 y DDX17. Las flechas de color rojo indican las secuencias amplificadas en este trabajo. Los códigos de acceso se incluyen en una tabla en el apéndice 3.

Estos análisis muestran que las secuencias aisladas para *M. corti* y *F. hepatica*, agrupan con los genes pertenecientes a los miembros de la familia pL10. La secuencia amplificada correspondiente a pL10 de *M.corti*, presenta una asociación con su ortólogo en el cestodo *E. multilocularis*. La secuencia amplificada para *F. hepatica* presenta relaciones de ortología con su ortólogo en *P. destorman* un parásito trematodo. Sin embargo, la secuencia amplificada para *E. graulosus* presenta una asociación con una ARN helicasa dependiente de ATP, clasificada como DDX5 miembro de esta familia del trematodo de *S. mansoni*. Más aún, un *blast* realizado con esta secuencia amplificada en el genoma de *E. granulosus* disponible (ver sección 4.2 de resultados) revela que el mismo se encuentra clasificado como una DDX5, confirmando los resultados obtenidos a partir de las relaciones filogenéticas.

◦ ◦ ◦ ◦

4.2. Estudios *in silico* de genes marcadores

Mientras se desarrollaba esta tesis se secuenciaron varios genomas de helmintos, incluido *M.corti*, los cuales están disponibles públicamente en *WormBase ParaSite*. La disponibilidad de estos genomas, abre las puertas al desarrollo de herramientas que permite el estudio global de diferentes genes.

4.2.1. Búsqueda de genes ortólogos de pL10 en genomas de Cestodos.

Se realizó una búsqueda de la secuencia *in silico* del gen pL10 a partir de la aislada experimentalmente, permitiendo completar la secuencia de interés. Para ello, se utilizó la secuencia amplificada previamente y esta fue utilizada para realizar un `tblastn` en el genoma de *M. corti*. De los resultados obtenidos se seleccionó el hit que presentaba mejor *e-value* y con el programa Artemis se determinó el modelo génico completo, identificando los sitios de *splicing* y la presencia de los motivos característicos. A su vez, siguiendo esta misma estrategia, se realizó la misma búsqueda en los genomas de Cestodos relacionados: *E.granulosus*, *E. multilocularis*, *H. microstoma* y *T. solium*, utilizando como secuencia *query* la de *M. corti*. Esta búsqueda permitió la identificación de las secuencias correspondientes a pL10 de estos parásitos.

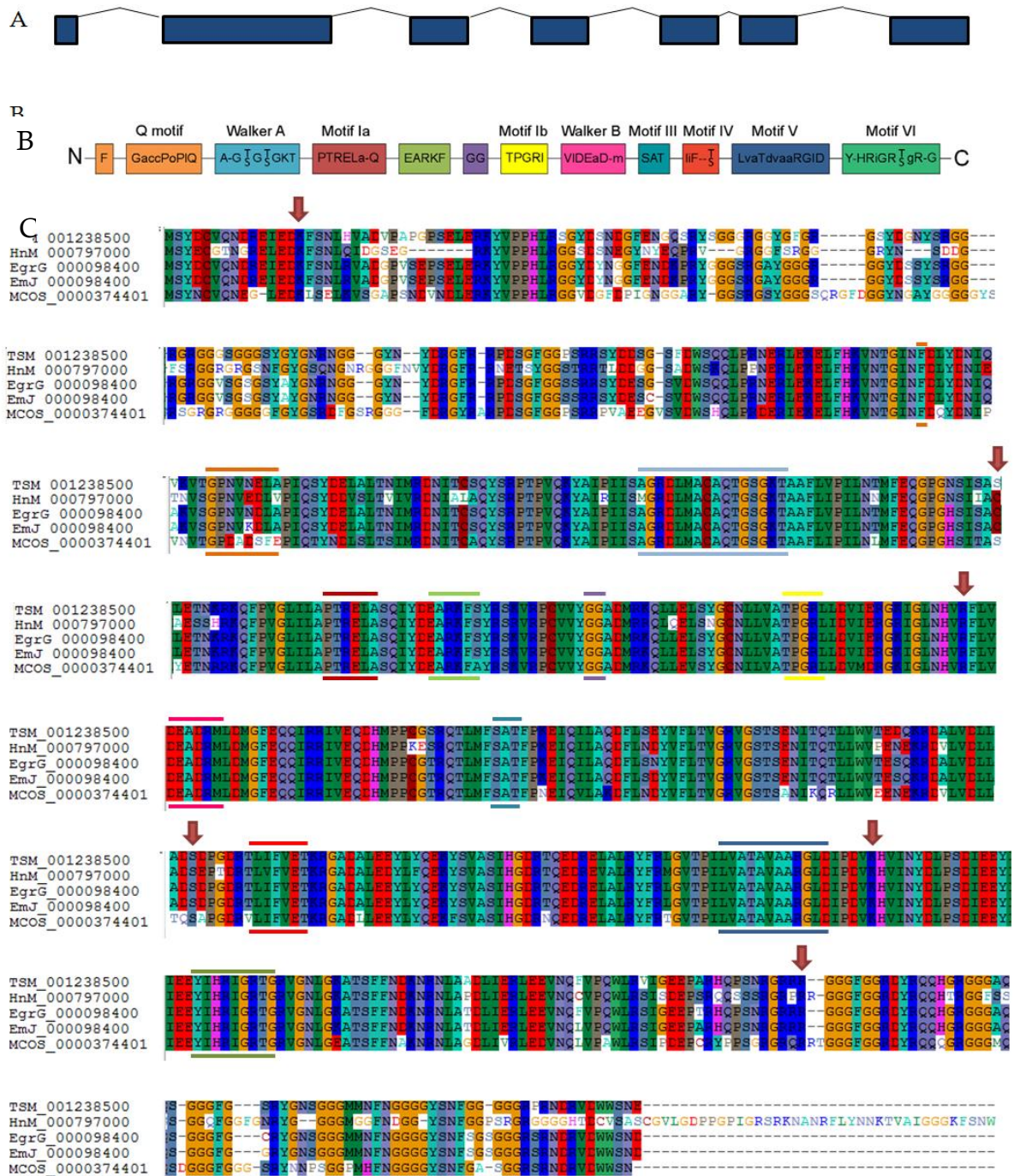


Figura 37- Alineamiento de las secuencias de pL10 resultante de la búsqueda *in silico* en genoma de Cestodos. A) Estructura génica consenso del gen pL10 para los cestodos estudiados. B) Esquema representativo de los motivos pertenecientes a la familia de DEAD helicasas. C) Alineamiento resultante de las secuencias obtenidas para *T. solium*, *H. microstoma*, *E. granulosus*, *E. multilocularis* y *M. corti*. En el alineamiento se señalan los motivos característicos de la familia DEAD. Las flechas rojas indican los límites de los exones. Esquema en B tomado de [143]

En la Figura 37 se representa el alineamiento de las secuencias proteicas obtenidas de la búsqueda *in silico* del gen pL10 en los genomas de Cestodos. A partir de los modelos génicos, obtenidos en dicha búsqueda y su análisis en el programa

Artemis, es posible inferir que la estructura génica de este gen se encuentra conservada. El gen pL10 en estos Cestodos presenta 7 exones en todos los casos y los límites de los mismos se encuentran altamente conservados, con la excepción del final del exón 2 donde hay una diferencia tanto para *M.corti* como para *T. solium* respecto a *H. microstoma* y *Echinococcus spp.* Analizando el alineamiento es posible observar que las secuencias entre los diferentes organismos se encuentran muy conservadas, presentando diferencias más marcadas en el inicio del exón 2 y la región final del último exón. Las relaciones de ortología para estos genes fueron evaluadas en un árbol, comprobando que efectivamente estábamos frente a los genes ortólogos de *M. corti* (datos no mostrados).

4.2.2. Búsqueda de genes pertenecientes a la familia de DEAD helicasas

Con el fin de evaluar cual y cuántos de los miembros de la familia DEAD se encuentran presentes en Cestodos, se realizó con la colaboración de la Mag. Alicia Costábile una búsqueda en los genomas de los Cestodos.

Se evaluaron aquellos genes que se encontraban anotados automáticamente, la búsqueda se realizó utilizando la palabra DEAD. Este análisis reveló la presencia de un número enorme de secuencias para cada especie evaluada (61 *E. granulosus*, 60 *E. multilocularis*, 62 *H. microstoma*, 59 *T. solium* y 53 *M. corti*). Con estas secuencias se realizó un análisis filogenético para evaluar cual eran las relaciones filogenéticas entre ellas. (datos no mostrados). Una vez inspeccionado el árbol, se comprobó que para todos, menos para algún caso particular de *M.corti*, existía un ortólogo representante de *E. multilocularis*, por lo que se decidió eliminar del análisis las secuencias correspondientes a los genomas de *E. granulosus*, *H. microstoma* y *T. solium*, debido a la cantidad inmanejable de secuencias. Una segunda depuración de los datos fue realizada cuando se incorporaron al análisis secuencias de referencia para cada miembros de la familia. El cruce de esta información junto con la de los genomas seleccionados permitió eliminar aquellas secuencias correspondientes a miembros de la familia emparentada DEAH. Finalmente el árbol resultante se muestra en la Figura 38.

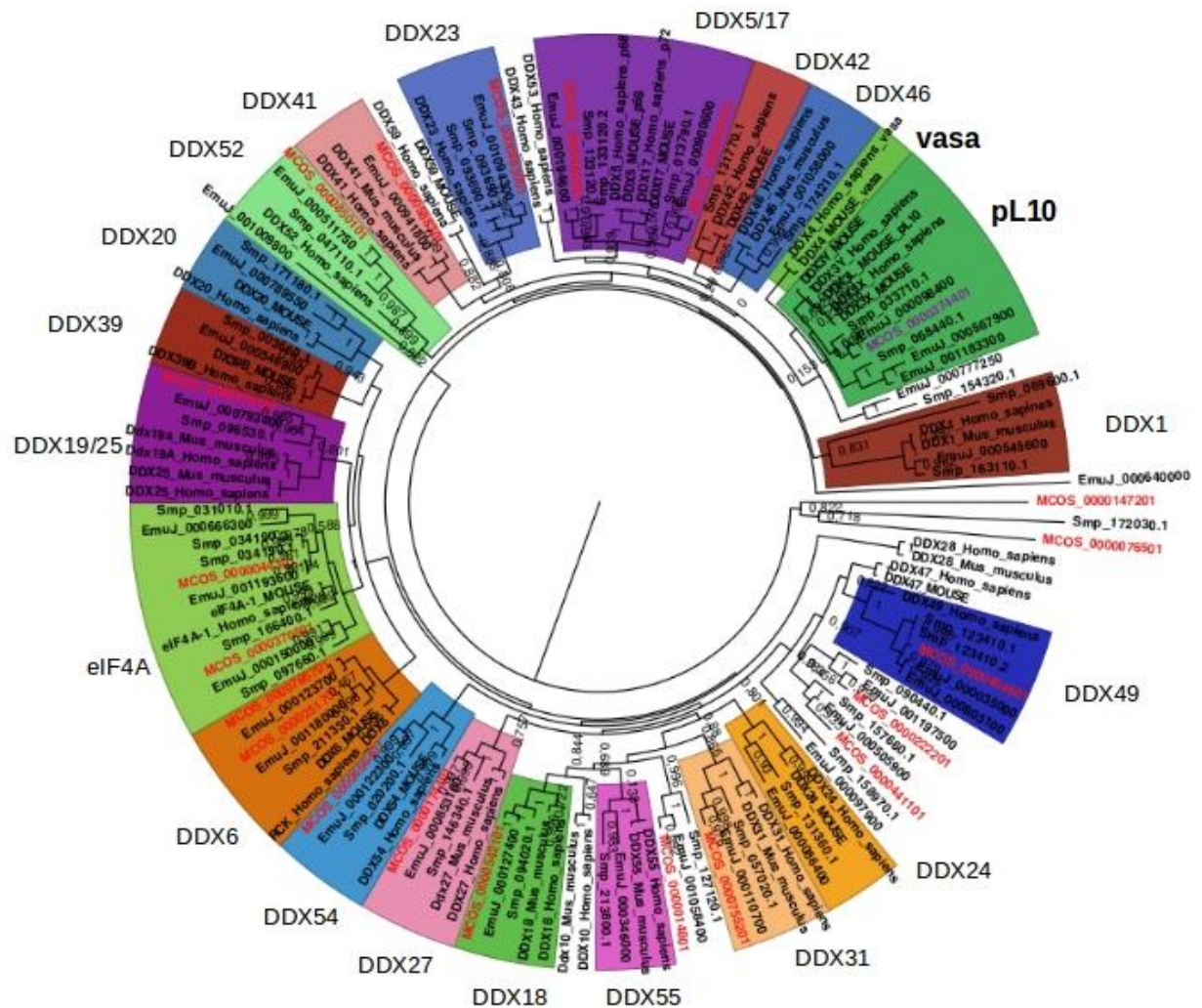


Figura 38- Relaciones filogenéticas de proteínas de la familia DEAD. En el análisis se incluyen las secuencias obtenidas *in silico* en los genomas de *E.multilocularis*, *M.corti*, *S.mansoni*. El árbol fue construido utilizando el método de *Maximum likelihood* utilizando el programa 2.1.7 *FastTree*. Para poder verificar las relaciones de ortología entre estos genes en el árbol se incluyen, secuencias de referencia correspondientes a miembros de la familia DEAD. Las flechas de color rojo indican las proteínas presentes en genoma de *M. corti*, la flecha de color violeta indica la secuencia de pL10 de *M. corti* amplificada en este trabajo. Los códigos de acceso se incluyen en una tabla en el apéndice 3.

Los resultados muestran que entre las proteínas anotadas en los genomas de Cestodos se encuentran presentes casi todos los miembros de la familia DEAD, con la excepción de los miembros DDX4, DDX10, DDX25, DDX28, DDX43, DDX47, DDX59. No es posible afirmar que estos miembros no se encuentren en el genoma de Cestodos, ya que es probable que los genes mencionados no se encuentren anotados. Para verificar esta hipótesis es necesario interrogar mediante

blast los genomas de interés utilizando como *query* las secuencias de referencia correspondiente.

Recientemente se ha reportado en la literatura que los genes *vasa* se encuentran ausentes en los genomas de cestodos y trematodos [109,110]. Es importante destacar que no se encontraron genes *vasa* (DDX4) para ninguno de los Cestodos analizados, confirmando los resultados obtenidos por estos autores.

En relación a los genes presentes en *M. corti*, fue posible la identificación de varios miembros de la familia (indicados con flechas de color rojo en la figura). Sin embargo muchos genes no se encuentran identificados en el análisis. Para corroborar que los genes faltantes efectivamente no se encontraban en el genoma y que no fuera error de anotación, se realizó un blast sobre el genoma de *Mesocestoides* utilizando como *query* las secuencias de *E.multilocularis* anotadas. Estos resultados, si bien son preliminares, indican que estos genes se encuentran presentes en el genoma de este Cestodo, pero no se encuentran anotados. Para confirmar que los genes que se encuentran sin anotar son efectivamente los correspondientes ortólogos de *E. multilocularis*, es necesario el ensamblado manual de cada una de las secuencias y posterior análisis de relaciones filogenéticas.

4.2.3. Búsqueda de genes ortólogos de pumilio en genomas de Cestodos.

Se realizó una búsqueda *in silico* de los genes pumilio en los genomas de Cestodos *E.granulosus*, *E. multilocularis*, *M.corti*, *H.microstoma* y *Taenia solium*. Para ello, se realizó una búsqueda de estos genes en las anotaciones automáticas que se encuentran disponibles en *WormBase Parasite*. Los resultados obtenidos de esta búsqueda son coincidentes con los encontrados por Koziol et al. (2008), en donde se describe la presencia de dos genes pumilio para especies parasitas. En la Figura 39 se muestran los resultados obtenidos del alineamiento de las secuencias correspondientes para Pum1.

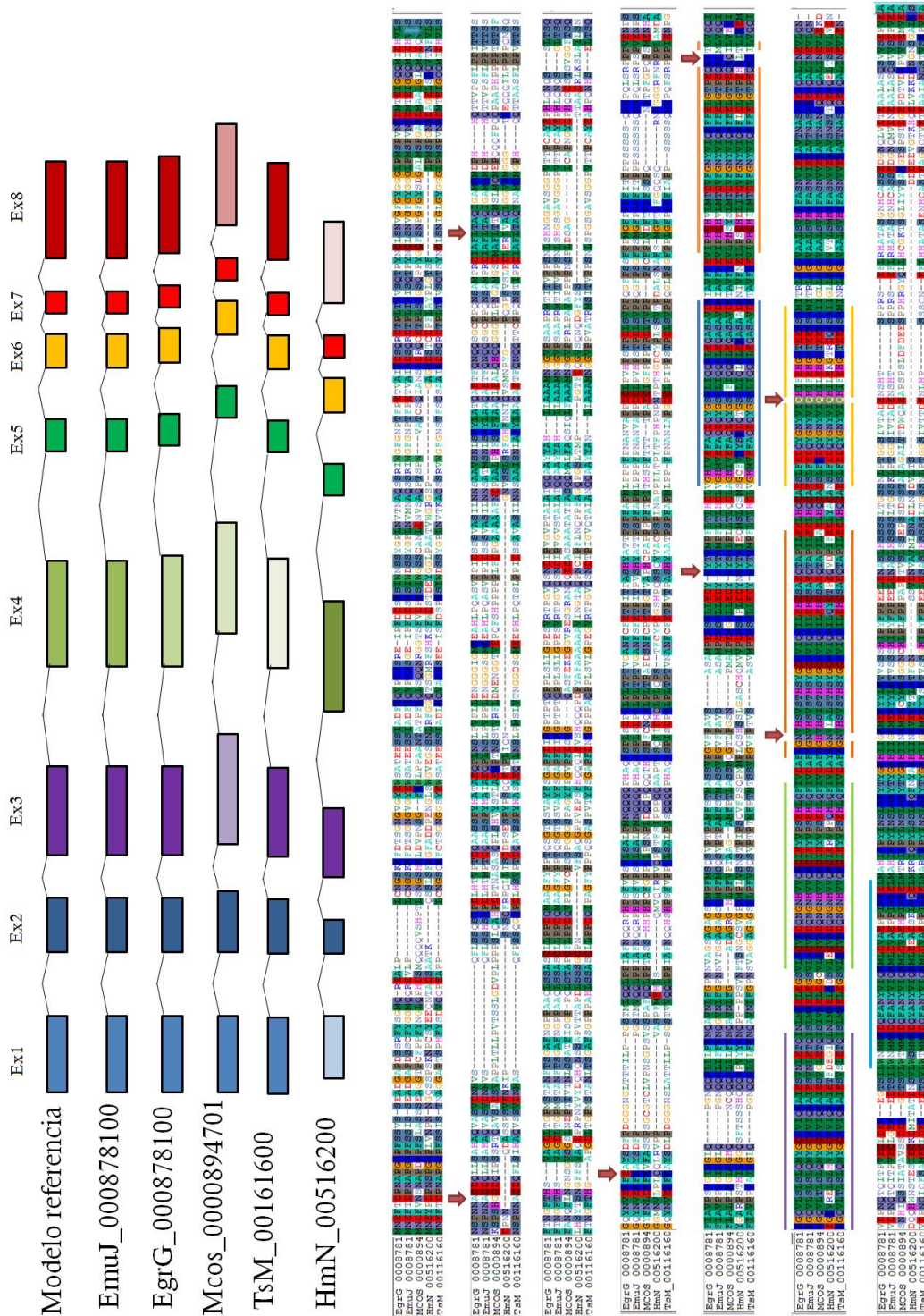


Figura 39-Alineamiento de las secuencias de PUM1 de la búsqueda *in silico* en los genomas de Cestodos. A) Estructuras génicas para cada gen identificado para los cestodos estudiados. B) Alineamiento resultante de las secuencias obtenidas para *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *M. corti*, *T. solium*, *H. microstoma*. En el alineamiento se señalan con líneas de colores los repetidos del dominio PUM-HD. Las flechas rojas indican límites de los exones, las flechas naranjas indican límites de exones diferentes para *H. microstoma*.

El alineamiento de las secuencias, junto con su análisis en el programa Artemis, permitió evaluar la calidad de la anotación. Para pumilio1 la anotación predicha de los genes encontrados en los Cestodos estudiados es adecuada.

Todos los genes pum1 presentan la misma cantidad de exones predichos. La longitud de dichos exones es variable. Los aminoácidos definidos como límites de los exones se encuentran bien conservados a excepción de algún caso particular. Para el exón1 de *H.mirostoma*, este AA se encuentra ubicado en una región anterior al límite consenso (indicado con flecha naranja en Figura 39). El análisis de la secuencia en el programa Artemis no permite identificar una secuencia similar en la región a la del “límite consenso” para este caso, por lo que no parecería ser un error en la anotación la diferencia en cuanto al límite de los exones. En la parte A de la Figura 39 se resumen los modelos génicos obtenidos. Como es posible apreciar en el esquema, se identificaron los diferentes exones y los tamaños respectivos. Utilizando variaciones en los diferentes colores se intentó señalar las diferencias en relación al tamaño de cada exón.

La parte B de la figura se muestra los alineamientos de las secuencias respectivos. El análisis de los alineamientos muestra que las regiones fuera de dominio PUM-HD son variables, coincidente con lo indicado por Koziol et al. (2008). Mientras que, la región del dominio PUM-HD es fácilmente reconocible debido a su alta conservación. Con las secuencias obtenidas para cada especie, se realizó una búsqueda de regiones conservadas en PFAM y a partir de los resultados se identificaron 7 repetidos en la región del PUM-HD, indicados con líneas de colores en el alineamiento.

En relación a los genes pumilio 2, se realizaron las mismas búsquedas descritas en los párrafos anteriores y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 40.

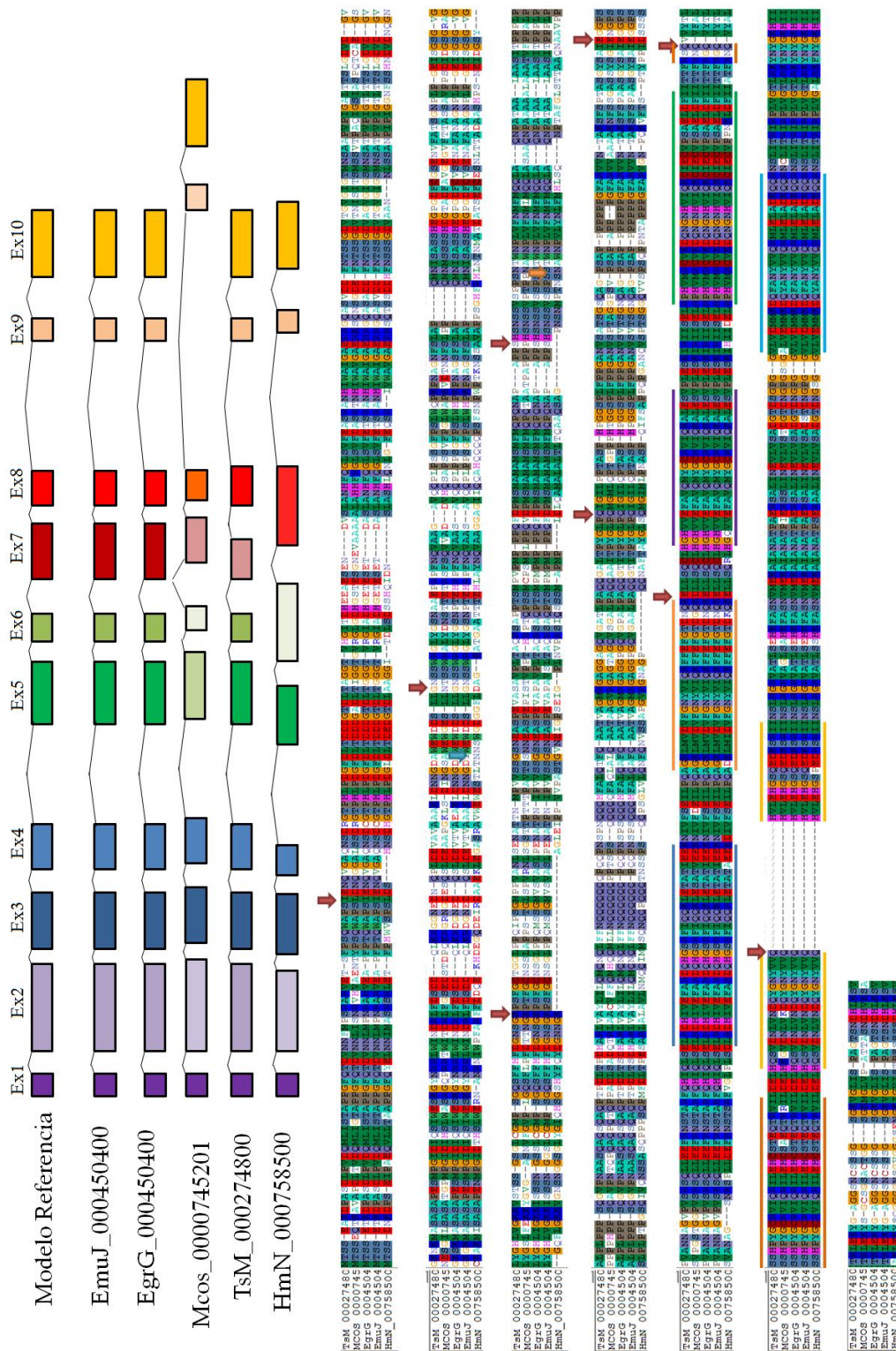


Figura 40- Alineamiento de las secuencias de PUM2 de la búsqueda *in silico* en los genomas de Cestodos. A) Estructuras génicas para cada gen identificado para los cestodos estudiados. B) Alineamiento resultantes de las secuencias obtenidas para *E. granulosus*, *E.multilocularis*, *M.corti*, *T.solium*, *H.microstoma* En el alineamiento se señalan con líneas de colores los repetidos del dominio PUM-HD. Las flechas rojas indican límites de los exones, las flechas naranjas indican límites de exones diferentes para *H.microstoma*.

Los resultados del análisis de la búsqueda de genes pumilio 2, muestran que este gen presenta 10 exones en todos los organismos evaluados, a excepción de *H.*

microstoma que presenta 9 exones. El análisis manual de la secuencia correspondiente al gen *pum2* de *H.microstoma*, muestra que el exón 7 de *H.microstoma*, contiene las secuencias correspondientes al exón 7 faltante, y este exón predicho no contiene sitios canónicos de *splicing* en la región que correspondería al límite del mismo. En el caso del gen correspondiente a *T.solium*, se realizó un curado manual de la secuencia ya que el análisis de la secuencia evidenció un error la predicción de exones, suprimiendo un exón e incorporado uno extra.

El análisis del alineamiento de las secuencias nuevamente evidencia la conservación del dominio PUM-HD, y la variabilidad de la región fuera de la misma. En cuanto a los límites de exones, en este caso, los AA en el límite de los mismos se conservan (flechas rojas) con algunas excepciones para el caso de *H.microstoma* (indicado con flecha azul), en el exón 1.

4.2.4. Identificación de isoformas de genes marcadores *pL10* y *pumilio*

Recientemente, utilizamos datos de transcriptoma del tetratiridio de *M. corti* [218], para realizar comparación con los genes anotados automáticamente en el genoma. Esto permitiría identificar la presencia de nuevas isoformas en los distintos genes evaluados, que no estuvieran contempladas en la anotación automática y evidenciar posibles errores de anotación.

Los resultados, mostraron la presencia de 2 posibles isoformas del gen *pL10* de *M. corti*, 3 isoformas para *pum1*, y una única isoforma para *pum2*. En la Figura 41, es posible observar un esquema de los modelos génicos y las isoformas obtenidas para el estadio larval tetratiridio de *M.corti*.

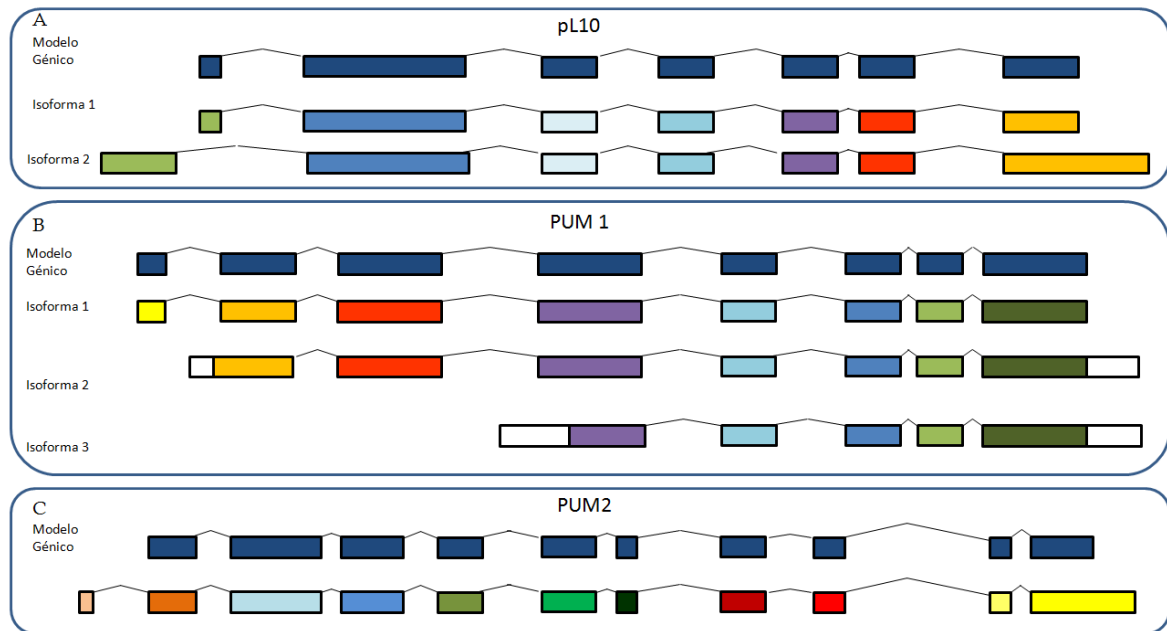


Figura 41-Esquema representativo modelos génicos e isoformas encontradas para genes pL10 y pumilios. A) Modelo génico anotado e isoformas correspondiente al gen pL10; B) Modelo génico anotado e isoformas correspondiente al gen pum1; C) Modelo génico anotado e isoforma correspondiente al gen pum2.

Para el caso del gen pL10, la isoforma representada como isoforma 1, es idéntica no solo al modelo génico anotado, sino que también coincide con la anotada manualmente (realizado previo a la anotación). La segunda isoforma identificada comparte la mayor parte de los exones (2-7) difiriendo en el primero y el último (Figura 41A).

En el caso del gen pum1, las isoformas identificadas son 3, donde la isoforma 1 es idéntica al modelo génico anotado, mientras que la isoforma 2 no contiene el primer exón, y el correspondiente exón 2 de esta isoforma es un poco más largo que el de la 1. En el caso de la isoforma 3, esta carece de los 2 primeros exones y su tercer exón es más corto que su correspondiente en las demás isoformas (Figura 41B). La búsqueda de promotores alternativos en la región entre el exón 1 y el exón 2 utilizando el programa *Promoter scan*, no evidenció la presencia de un promotor en la región entre ambos exones. Por lo que, si la existencia y expresión de estas isoformas es verdadera, se estarían expresando mediante un promotor único, 5' *upstream*. El gen pum 2 sin embargo no reveló la presencia de nuevas isoformas.

Para poder verificar experimentalmente la expresión de estas isoformas, se realizaron *primers* de forma de poder amplificar completas cada una de las

isoformas. Para cada gen, se diseñó un primer que permita la amplificación a partir del exón 1 de cada isoforma, mientras que el reverse se diseñó en base a una secuencia compartida por todas las isoformas. Los PCRs se realizaron utilizando un *pool* de ADNc de diferentes días de cultivo, para poder analizar todos los estadios juntos, evitando la posibilidad de obtener un resultado negativo debido a que no se exprese en un estadio particular.

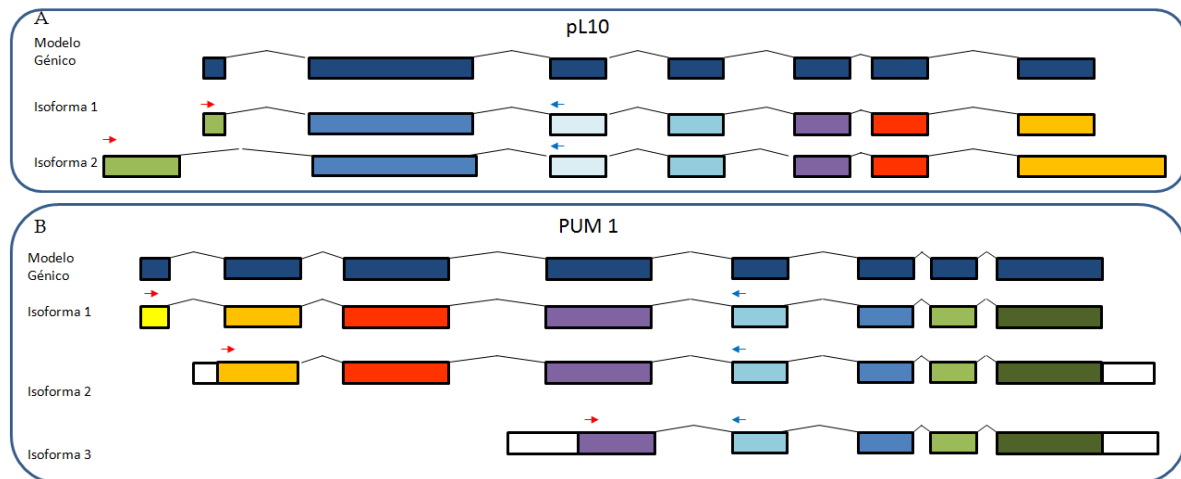


Figura 42- Diseño de *primers* para comprobar existencia de isoformas de genes pL10 y pum1. A) *Primers* diseñados para isoformas del gen pL10. B) *Primers* diseñados para isoformas del gen pum1. Flechas rojas indican *primers forward*, flechas azules *primers reverse*.

Para el gen pL10, se logró la amplificación de productos que podrían corresponder con las posibles isoformas de pL10, por lo que los productos de amplificación fueron purificados y enviados para su secuenciación. Los resultados preliminares obtenidos de dicha secuenciación no fueron concluyentes, por lo que los mismos deben ser repetidos.

Para el gen pum1 directamente no se logró la amplificación de ninguna de las isoformas. Tal vez, una posible explicación de estos resultados, es que los tamaños de los productos a amplificar sean muy grandes (2000pb la isoforma más grande), a pesar de haber utilizado una Taq polimerasa capaz de levantar productos de ese tamaño, o bien que los niveles de expresión de estas isoformas sean muy bajos impidiendo la amplificación de los mismos.

Es importante destacar que, los resultados obtenidos de la predicción de modelos génicos en el transcriptoma tal vez puedan ser un artefacto de los mismos y por tanto la existencia de estas isoformas no sea real. El ensamblaje de los datos

transcriptómicos de *M.corti* se realizó con un único método, en el cual el programa utiliza un algoritmo que mapea los *reads* y de ese mapeo surgen los transcritos ensamblados. El programa genera predicciones que pueden contener errores. Una alternativa que puede plantearse, es probar con otro programa que permita el ensamblado de transcritos y comprar los resultados obtenidos.

Por este motivo es importante destacar que los resultados son preliminares, y que la bioinformática permite la generación de hipótesis que deben ser corroboradas y validadas con ensayos experimentales.

Logros:

1. Aislamiento de parte de secuencia codificante del gen pL10 de *M.corti*
2. Identificación *in silico* de pL10 de *E.granulosus*, *E.multilocularis*, *T.solium* y *H.microstoma*. Determinación de estructura génica de estos genes.
3. Identificación de algunos miembros de la familia DEAD en genoma de *M.corti*
4. Búsqueda *in silico* de genes pumilio en genoma de *E.granulosus*, *E.multilocularis*, *M.corti*, *T.solium* y *H.microstoma*. Determinación de la estructura génica de los mismos.

o o o o

4.3. Análisis de la expresión de genes Marcadores de células proliferativas

4.3.1. Análisis de la expresión espacial por hibridación *in toto* del gen pL10 de *M. corti*

Para el análisis de la expresión espacial del ARNm se realizaron hibridaciones *in situ* en organismos enteros (*in toto* de 4 y 11 días de cultivo). Para ello se utilizó una sonda antisentido complementaria a la región codificante amplificada para el gen pL10. En la Figura 43 se resumen los resultados obtenidos.

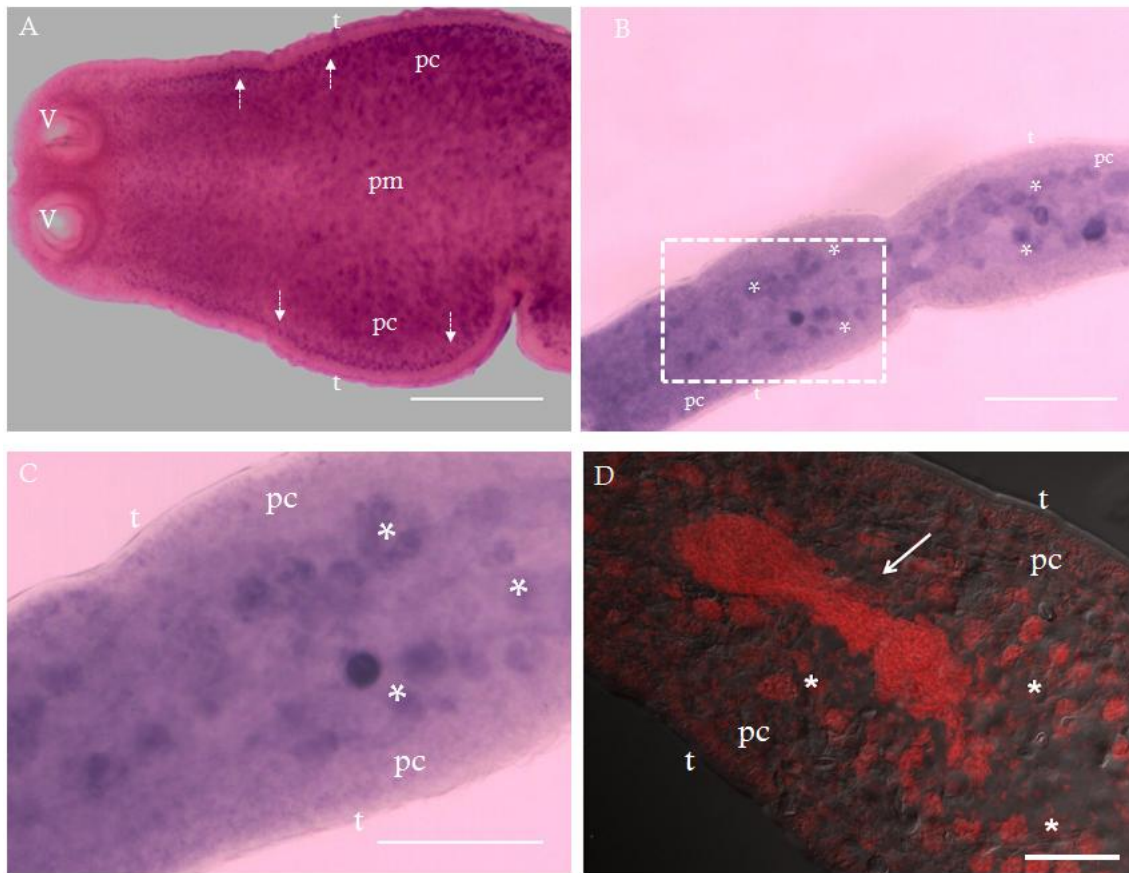


Figura 43-Hibridación *in toto* sobre ejemplares de *M. corti*. Incubación con 0.1ng/ μ l de sonda antisentido pL10 marcada con Digoxigenina. Revelado con anticuerpo anti-Digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina y detección con NBT-BCIP. A) Ejemplares con 4 días de cultivo; B) Ejemplares con 11 días de cultivo; C) Región ampliada de ejemplar mostrado en B. D) corte de segmento desarrollado tomado de [29]. En todos los casos los asteriscos señalan los primordios de los testes, la flecha continua el primordio genital y la discontinua la región subtegumentaria. Abreviaturas: pc, parénquima cortical; pm, parénquima medular; t, tegumento. Barra representa en A- B 200 μ m, en C-D 100 μ m.

Los resultados muestran que la expresión del gen parece dispararse tempranamente (4 días de cultivo, Figura 43A), no presentando diferencias significativas de expresión, una vez que es iniciado el cultivo de los organismos. En organismos poco desarrollados parece existir una expresión baja distribuida a lo largo de todo el organismo, mostrándose una expresión más intensa a nivel de la región subtegumentaria (Figura 43 A flecha discontinua).

En organismos más desarrollados (11 días de cultivo) se observa expresión discreta a nivel de los proglótides, en la región del parénquima cortical (Figura 43 B-C). En estos parece existir una expresión diferencial o mayor en los primordios de los

testes, compatible con una posible expresión del gen en células germinales (Figura 43 B-C asteriscos). Estos resultados son similares a los resultados descritos previamente en la bibliografía de otros platelmintos [142,143]. Para ejemplificar el desarrollo del aparato reproductor de *M. corti* se incluye una imagen (Figura 43D) donde es posible identificar los primordios de los testes (asteriscos) y el primordio genital. Si comparamos las imágenes obtenidas para el gen pL10 (B-C) y la imagen en D es que podemos inferir que parece existir una señal preferencial en los primordios de los testes. Es importante destacar que en controles negativos de rutina realizados durante la técnica, en los que se incuban los organismos sin sonda o sin anticuerpo, la reacción es negativa, como es de esperar (datos no mostrados).

Finalmente, debemos confirmar estos resultados preliminares mediante co-localización de marcadores específicos de cada tejido para asegurarnos en qué sistema del organismo se expresan estos genes. Tal vez, se podría realizar un experimento en donde los organismos sean incubados con EdU en cultivo, para luego intentar determinar si existe una co-localización de la expresión de este gen junto con las células positivas para EdU. Además se podrían realizar ensayos de co-marcación con los marcadores de tejido nervioso y tejido muscular, disponibles en el laboratorio, de manera de recabar más información acerca de la localización celular de esta señal.

4.3.2. Análisis de la expresión espacial por hibridación *in situ* de los genes pL10 y pumilio de *M. corti* sobre suspensiones celulares.

Para continuar con la caracterización del gen pL10 realizamos ensayos de hibridación *in situ* sobre suspensiones celulares de *M.corti*.

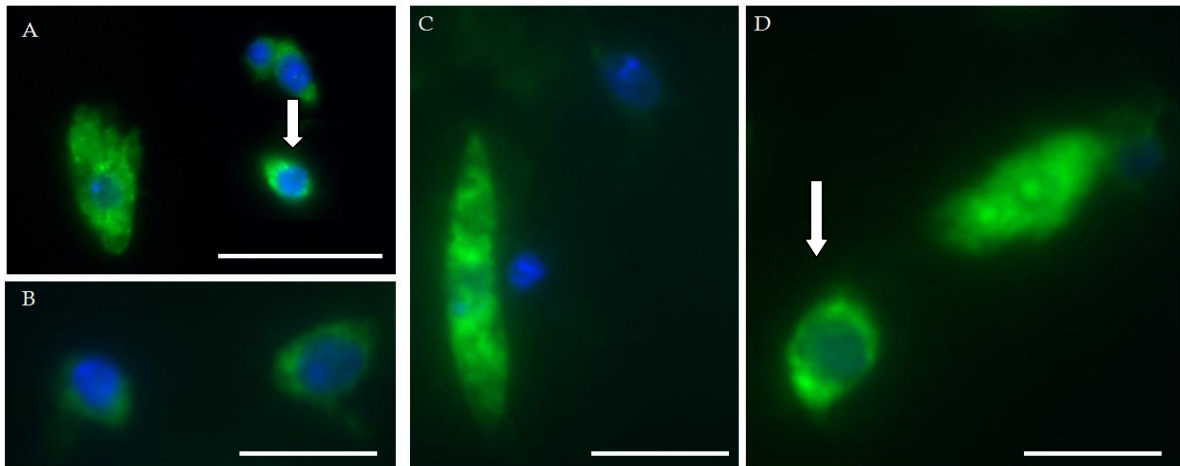


Figura 44- Hibridación *in situ* del gen pL10 sobre suspensiones celulares de *M. corti* A-D – Suspensiones celulares de *M.corti*. La flecha blanca indica células con morfología de células germinativas. La barra en A representa 20 μ m y B-D- representa 10 μ m

Los resultados presentados en Figura 44 muestran que es posible detectar expresión del mensajero del gen pL10. Estos muestran que se observa expresión del gen tanto en células de tipo germinativas (señalizadas con flechas blancas), como también expresión en otros tipos celulares que no presentan las características morfológicas de este tipo celular mencionado. Estos resultados estarían indicando que la expresión de este gen no es exclusiva de las células con capacidad proliferativa, sino que también estaría existiendo expresión a nivel de las células diferenciadas. Los controles negativos de rutina realizados durante la técnica, en los que se incuban los organismos sin sonda, la reacción es negativa (datos no mostrados).

Si analizamos la región utilizada para el diseño de la sonda empleada en este ensayo, es posible ver que la misma contiene una parte del dominio conservado para esta familia multigénica. Tal vez la expresión generalizada a los distintos tipos celulares se deba a que la sonda utilizada esté reconociendo las 2 posibles isoformas identificadas por comparación con el transcriptoma (descrito anteriormente,

sección 4.2.4 de resultados) o a más de un gen perteneciente a la familia y no exclusivamente al gen pL10 (Figura 45).

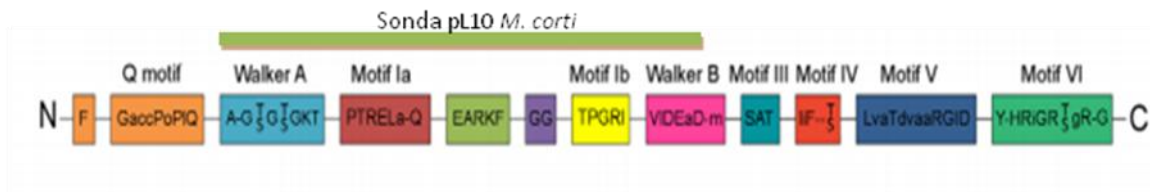


Figura 45- Esquema representativo de los motivos pertenecientes a la familia de DEAD helicasas. En la región superior del esquema en verde se representa la sonda utilizada para la hibridación in situ de *M.corti* en suspensiones celulares. Esquema modificado de [143]

Como se observa en el esquema, estas hipótesis podrían ser factibles ya que la región reconocida por la sonda contiene a los motivos característicos que hace que sean clasificados como miembros de la familia de las helicasas. A su vez, las isoformas identificadas se encuentran contenidas en esta región. Esto hace que no sea posible determinar si la expresión detectada es únicamente del gen pL10 y sus isoformas, o de otros genes pertenecientes a la familia de las DEAD helicasas. Para resolver este inconveniente, sería importante identificar regiones que no se encuentren tan conservadas entre todos los miembros de forma de intentar estudiar únicamente la expresión del gen pL10 y de sus isoformas.

4.3.3. Determinación de la expresión de genes pumilio y pL10 mediante PCR.

Se realizaron ensayos para evaluar la expresión temporal a lo largo del desarrollo estrobilar de *M. corti*.

Para ello, se diseñaron *primers* específicos para pL10 en base a la secuencia aislada previamente, mientras que para los genes pumilio se utilizaron *primers* disponibles en el laboratorio. Los ensayos de RT-PCR fueron realizados utilizando ADNc de organismos en distintos días de desarrollo.

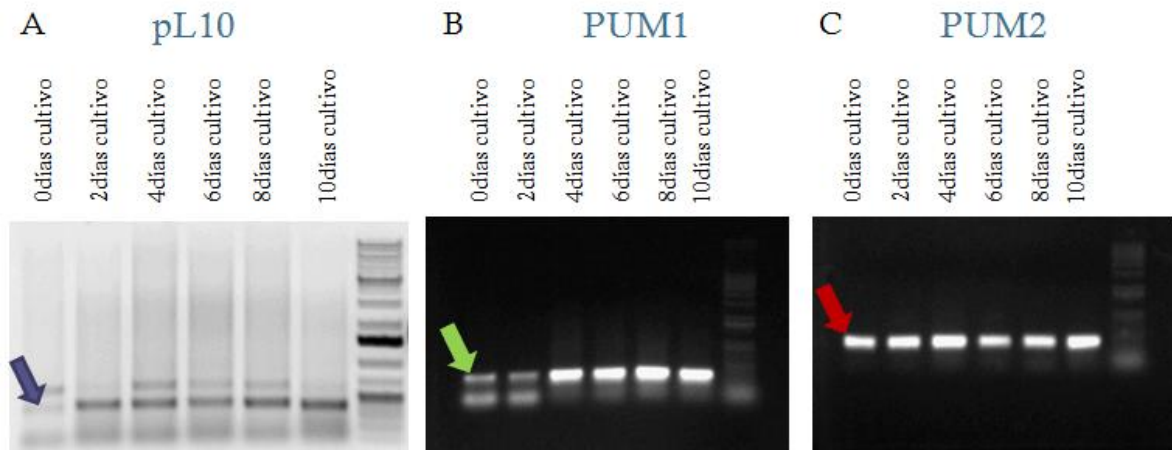


Figura 46-Expresión de los genes pL10 y pumilio 1 y 2. Productos de PCR con *primers* específicos para cada gen, tras 35 ciclos de amplificación utilizando como molde ADNc de diferentes días de desarrollo de *M. corti*. A) RT-PCR del gen pL10. B) RT-PCR del gen pum 1. C) RT-PCR semicuantitativa del gen pum 2. Las flechas indican la banda amplificada al correspondiente al gen de interés. Azul, amplificación gen pL10; Verde, amplificación gen pum1; Rojo, amplificación gen pum2. En la parte superior de los geles se indica que está sembrado en cada carril.

Los resultados ejemplificados en la Figura 46 muestran que existe expresión de los genes evaluados en los distintos estadios del desarrollo estrobilar testados.

Como existe expresión en todas las condiciones analizadas, se decidió evaluar por PCR en tiempo real si existen variaciones en los niveles de expresión. Para esto, se extrajo ARN de organismos que presentaban distintos niveles de desarrollo, entre tetratiridio (0 y 2 días de cultivo) y gusano adulto segmentado (10 días de cultivo), incluyendo gusanos alargados (4 días de cultivo), gusanos con principio de segmentación (6 días de cultivo) y gusanos segmentados no adultos (8 días de cultivo).

Finalmente, una vez obtenidas las curvas de amplificación (para cada gen), se corrigieron por el ruido de fondo y se determinó un valor de fluorescencia arbitrario en la región exponencial de la curva para determinar el valor de ciclo umbral (Ct: ciclo fraccional donde se alcanza un cierto valor arbitrario de fluorescencia).

Para analizar si estos genes presentaban variación en su nivel de expresión en las condiciones ensayadas se utilizó el método $2^{-\Delta Ct}$ [201], siendo $\Delta Ct' = Ct_{\text{gen A, tiempo x}} - Ct_{\text{gen A, tiempo 0}}$.

Una vez verificadas las condiciones de reacción y que los controles funcionaron como era esperado, se procedió a realizar el cálculo de la razón de cambio en la

expresión de los genes de interés a lo largo del desarrollo estrobilar. Para ello se calculó la razón de cambio de la cantidad de pL10 y de los genes pumilio normalizada a dos genes de referencia (*GAPDH* y *TPM*) en relación a tetratiridios (2d de cultivo). En la Figura 47 se muestran gráficamente los resultados obtenidos para los genes de interés respecto a los genes de referencia (*GAPDH* y *TPM*).

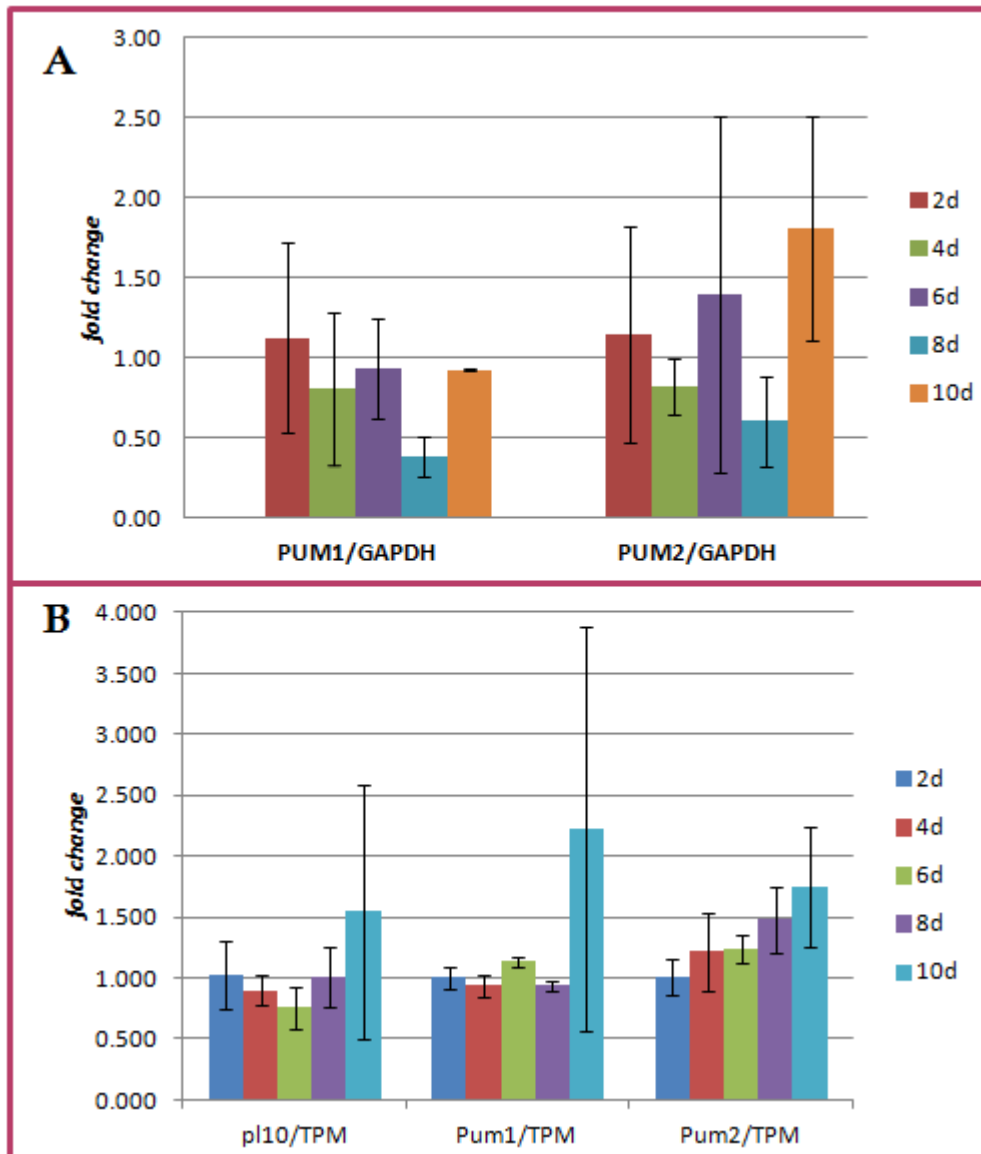


Figura 47- Razón de cambio de los genes de interés respecto a los distintos genes de referencia. Se muestran los valores promedio de la variación para cada estadio de desarrollo. A) Ensayo realizado para los genes pumilio respecto al gen referencia *GAPDH*; B) Ensayo realizado para el gen pL10 y los genes pumilio, respecto al gen referencia *TPM*. Las barras de error representan la desviación estándar.

Para determinar si existe una diferencia de expresión significativa a lo largo del desarrollo de *M. corti* para los genes estudiados, se realizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, para cada set de los datos. Los resultados de este test muestran que no existen diferencias significativas de expresión para ningunos de los genes estudiados.

Si bien las diferencias no son significativas, se puede visualizar cierta tendencia que apunta a pensar en una diferencia en los niveles de expresión de los genes estudiados. Sin embargo, las desviaciones estandar observadas son grandes, por lo que se deberían realizar los ensayos nuevamente, con un mayor número de réplicas tanto técnicas como biológicas, para disminuir esta desviación y poder determinar si esa tendencia es efecto de los datos o consecuencia de una diferencia en los niveles de expresión durante el desarrollo estrobilar.

Es importante destacar que para confirmar estos ensayos de RT-qPCR se deben realizar ensayos de curvas de *melting*, control sin RT, corrida en electroforesis de los productos obtenidos para determinar los tamaños amplificados y determinar la eficiencia de los *primers* utilizados.

Logros:

- 1. Determinación de patrón de expresión espacial, del gen pL10 de *M.corti*. Los resultados en su conjunto parecen indicar que no existe una expresión exclusiva del gen pL10 en las células germinativas de *M.corti*.**
- 2. Determinación de expresión temporal de genes marcadores, pL10 y pumilio. No parece existir diferencia de expresión a lo largo del desarrollo estrobilar de *M.corti* para ninguno de los genes estudiados.**

5. ARN interferencia

La disponibilidad de herramientas genéticas es muy limitada en helmintos en general. La interferencia de ARN (ARNi) es una técnica en la que se suprime a nivel postranscripcional la expresión de un gen blanco mediante el uso de moléculas de ARN doble cadena. Esta es prácticamente la única herramienta de

genética reversa disponible para el análisis de la función génica en helmintos. La heterogeneidad de estos parásitos no hace sencilla la transferencia de esta tecnología y se requiere la estandarización de cada modelo parasitario. Otras **herramientas** como mutagénesis dirigida, transgénesis, inactivación génica *knock out* han sido difíciles de instrumentar en parásitos.

Son varias las características de estos organismos que hacen que se presenten dificultades para aplicar esta herramienta: ciclos de vida complejos, tegumentos robustos, incapacidad de permanecer (para algunos estadios del ciclo) por tiempos prolongados en cultivo, ausencia de líneas celulares estables.

Solamente en trematodos y particularmente en *S.mansoni* se han logrado avances en la transgénesis[219].

Con la intención de generar una herramienta de genética reversa que nos permita identificar y confirmar funciones de los genes presuntos marcadores moleculares de células proliferativas y de otros genes de interés, trabajamos en la puesta a punto de la técnica de interferencia de ARN en *M. corti*. Este trabajo comenzó en el marco de un proyecto de beca de iniciación ANII al iniciar mi posgrado. En este proyecto se trabajó en la optimización de un protocolo que permita la incorporación de moléculas exógenas dentro del organismo. En los párrafos siguientes se evaluarán los puntos focalizados durante esta optimización.

o o o o

5.1. Tratamiento de tegumento

El problema principal que se debe sortear con este organismo es intentar penetrar la barrera que supone el grueso y complejo tegumento de Cestodos (Figura 48A). Además se suma la complejidad de que el tegumento cambia en los diferentes estadios y en los distintos momentos de un mismo estadio (Figura 48B) [220,221].

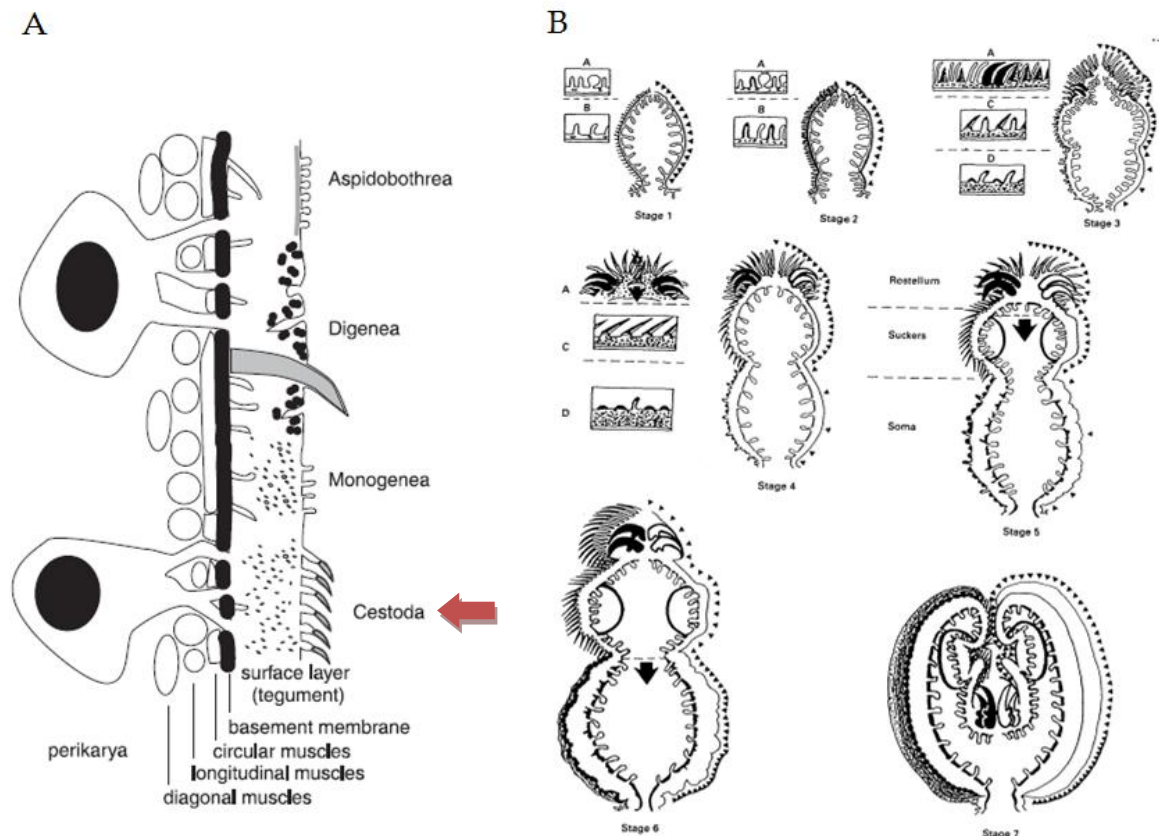


Figura 48- Tegumento A) Representación esquemática de la pared corporal de neodermata, donde es posible observar la composición y grosor del Tegumento de Cestodos. B) Transformación del tegumento de los protoescolex durante su diferenciación. A) Tomado y modificado de [220]; B) Tomado y modificado de [221]. La flecha de color indica el tegumento de cestodos.

Para esto se ensayaron diferentes tratamientos para poder penetrar la barrera que presenta el grueso tegumento:

- ✚ **Tripsina.** La tripsina en determinadas condiciones tiene la capacidad de generar aberturas u agujeros sobre el tegumento [67]. Para ello, se probaron diferentes concentraciones de tripsina, intentando lograr un equilibrio entre la concentración de tripsina utilizada y la viabilidad de los parásitos en el ensayo. Para medir la viabilidad de los organismos, se analizó la movilidad y el estado general de los parásitos luego del tratamiento de 24 horas.
- ✚ **Albendazole.** El *albendazole* es un carbamato benzoimidazólico con efectos antihelmínticos y antiprotozoarios frente a los parásitos tisulares e intestinales. Se testó el albendazole durante una pasantía realizada en Laboratorio de Genômica Estructural e Funcional de Cestoideos en el

Centro de Biotecnología de UFRGS junto al Dr. Martin Cancela. Este grupo había comprobado la presencia de agujeros en el tegumento a concentraciones bajas que mantuvieran los organismos vivos [222].

En la Tabla 13 se resumen las condiciones ensayadas para ambos casos.

Tabla 13- Condiciones de tratamiento testadas para albendazol y Tripsina

Tratamiento	Días en tratamiento
Albendazol (50ng/ml)	1
	2
Tripsina (335µg/ml)	1
	2
Tripsina(670 µg/ml)	1
	2

Los resultados de estos ensayos mostraron que el uso de tripsina es más adecuado para intentar traspasar la barrera del tegumento del organismo comparado con el albendazole.

o o o o

5.2. Introducción de moléculas “*delivery*”

El suministro de moléculas interferentes puede ser por distintas formas y el silenciamiento es diferente según el método de *delivery* utilizado. El uso de diferentes métodos de *delivery* permite testar cual método es el más adecuado como método de incorporación de las moléculas.

Los métodos más usados son (Figura 49):

- ✚ Biolística: bombardeo de partículas recubiertas de ADN.
- ✚ Electroporación: Someter al parásito a un pulso eléctrico que genera poros transitorios en las membranas celulares permitiendo la entrada de partículas.
- ✚ Microinyección: Introducción de moléculas dentro de una población determinada de células del organismo
- ✚ *Soaking*: Sumergir los parásitos en un solución de moléculas interferentes

- ✚ *Feeding*: Alimentar los ejemplares con bacterias que expresan moléculas interferentes
- ✚ Transgénesis: utilización de vectores virales

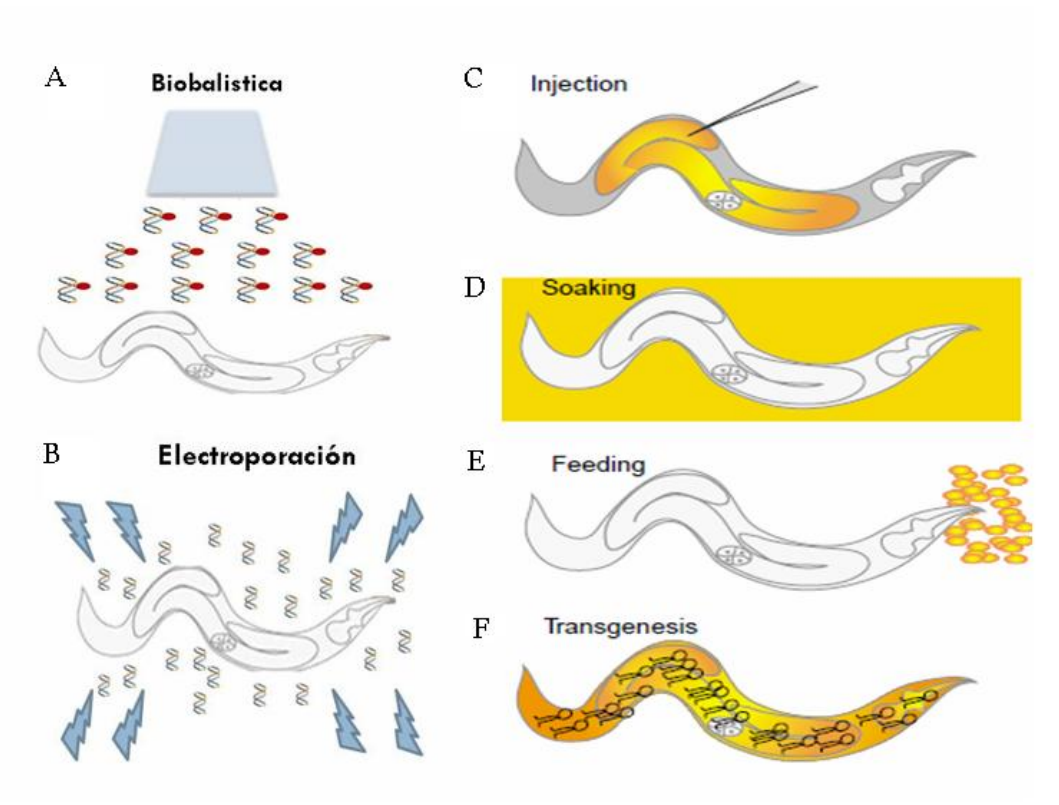


Figura 49 - Métodos de incorporación de moléculas. A) Biobalística. B) Electroporación. C) Microinyección. D) Soaking. E) Feeding. F) Transgénesis. Imagen modificada de [223].

En este trabajo, se testaron como métodos de entrada de las moléculas al interior del organismo, la microinyección, la utilización de moléculas liposolubles como la lipofectamina y la electroporación.

Con el fin de evitar el uso de tratamientos enzimáticos o químicos que puedan comprometer la viabilidad de los organismos, se decidió probar la **microinyección** como método de incorporación de moléculas. Este método presenta la ventaja adicional de poder dirigir la introducción de la molécula específicamente a una zona particular. El ensayo fue realizado en el laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Ciencias, utilizando Rojo fenol como molécula a microinyectar, ya que la coloración de la molécula permitía la evaluación visual del resultado de la

microinyección. Afortunadamente, se logró la inyección de este colorante, pero se presentaron varios inconvenientes experimentales que llevaron a descartar esta técnica como método de incorporación de moléculas. El principal inconveniente es la movilidad que presentan los parásitos dificultando introducir la punta de una fina pipeta dentro del organismo (sin atravesarlo completamente), lo que requiere de un tiempo elevado, reduciendo el número de organismos a transfectar en un margen finito de tiempo.

El otro método probado fue la transfección usando **lipofectamina**, molécula liposoluble, empleada para la introducción de ácidos nucleicos en cultivos celulares a través de la formación de un complejo con el ácido nucleico a transfectar. Luego de múltiples ensayos, los resultados obtenidos no eran concluyentes ya que existían problemas de contaminación entre las muestras. En estos ensayos se utilizó como molécula transfectante ARNmLUC, que normalmente no se expresa en cestodos. Los resultados obtenidos con estos ensayos quedaban invalidados debido a la presencia de luciferasa tanto en los controles como en las muestras tratadas.

Finalmente, se probaron diferentes condiciones de **electroporación**: variación de voltaje, cantidad de pulsos y tiempo de duración del mismo, intentando determinar cuál era la más adecuada para estos organismos. En estos experimentos se trató de buscar un equilibrio entre el tratamiento realizado y la viabilidad de los organismos. Los resultados se evaluaron en relación a la viabilidad obtenida 24 horas post electroporación y la misma fue medida utilizando la tinción con eosina, en donde el colorante ingresa al interior de organismos muertos. Los resultados obtenidos de estos experimentos se resumen en la Tabla 14.

Tabla 14- Condiciones de electroporación testada para *M. corti* y evaluación de la vitalidad

Voltaje	Nº de pulsos	Duración pulso (mS)	Vitalidad
200	1	20	100%
200	1	30	61%
300	1	20	92%
125	2	20	100%
200	2	20	100%
200	2	30	7%
300	2	20	0%

Estos ensayos permitieron la selección de la condición de electroporación más adecuada para *M. corti* que sería utilizarla posteriormente en los ensayos de incorporación de moléculas. Observando los resultados mostrados en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, más de una condición podría ser seleccionada, ya que hay varias que presentan una buena evaluación de la viabilidad. Sin embargo, se seleccionó la condición en la que se utiliza un voltaje de 100V, un único pulso y un tiempo de duración de 20mS. La realidad es que cualquiera de las condiciones puede ser utilizada, pero dado que esta presenta un único pulso, esta pareció ser la mejor para no someter a los organismos a un estrés extra generado por la emisión de un doble pulso.

Realizando una evaluación general de todos los resultados obtenidos entre los ensayos, la electroporación resultó ser el método más factible para introducir moléculas exógenas.

o o o o

5.3. Moléculas incorporadas

En relación al uso de moléculas exógenas a incorporar en el interior de los organismos, inicialmente se trabajó con la incorporación de moléculas de ARN (mensajero de Luciferasa) y luego con moléculas de ADN (incorporación de plásmidos con genes reporteros).

El laboratorio en el que se desarrolló la tesis, en colaboración con los laboratorios del Dr. José Tort y el del Dr. Paul Bridney, participó en la generación de un test sencillo para detectar la presencia de una vía de interferencia funcional en

helminthos. El mismo consiste en la electroporación del ARN mensajero de luciferasa como gen reportero, y el posterior silenciamiento del mismo, electroporando un ARN doble cadena contra la luciferasa. El sistema fue puesto a punto en *S. mansoni* y luego testado en *F. hepatica*. Aquí se reportó por primera vez la transfección y expresión de un reportero (mensajero de luciferasa) en *F. hepatica* [224]. Por lo cual, inicialmente se decidió ARNmLUC como molécula exógena, intentando generar un control con un gen reportero que permita testear la introducción de la molécula en el interior del organismo y a su vez, a posteriori poder utilizarlo como control en ensayos de interferencia.

Los ensayos fueron realizados utilizando una combinación de las condiciones descritas anteriormente. Se utilizó una incubación de los ejemplares con tripsina, durante 24 hs, electroporación de los mismos utilizando un único pulso de 20 mS con un voltaje de 200V y luego colocados en cultivo durante 3 horas previo a su procesamiento, para permitir la expresión de la enzima. Los ensayos realizados con mensajero de luciferasa se testaron a nivel de mensajero mediante RT-PCR y se realizó la medida de actividad de la enzima utilizando el kit *Luciferase Assay System*.

A su vez, también se testó como molécula reportera un plásmido que contiene el gen de la luciferasa bajo el control del promotor de actina de *S. mansoni* cedido por el Dr. Gabriel Rinaldi. En este caso, la transcripción del mensajero debe darse una vez que el plásmido es incorporado dentro de la célula, por lo que en estos experimentos los ejemplares son colocados en cultivo durante 24 hs post electroporación para permitir que el proceso pueda darse. Estas electroporaciones también fueron realizadas como se mencionó anteriormente y el proceso se evaluó únicamente por RT-PCR por no disponer del material suficiente para medir actividad. En la Figura 50 se muestran los resultados obtenidos para estos experimentos.

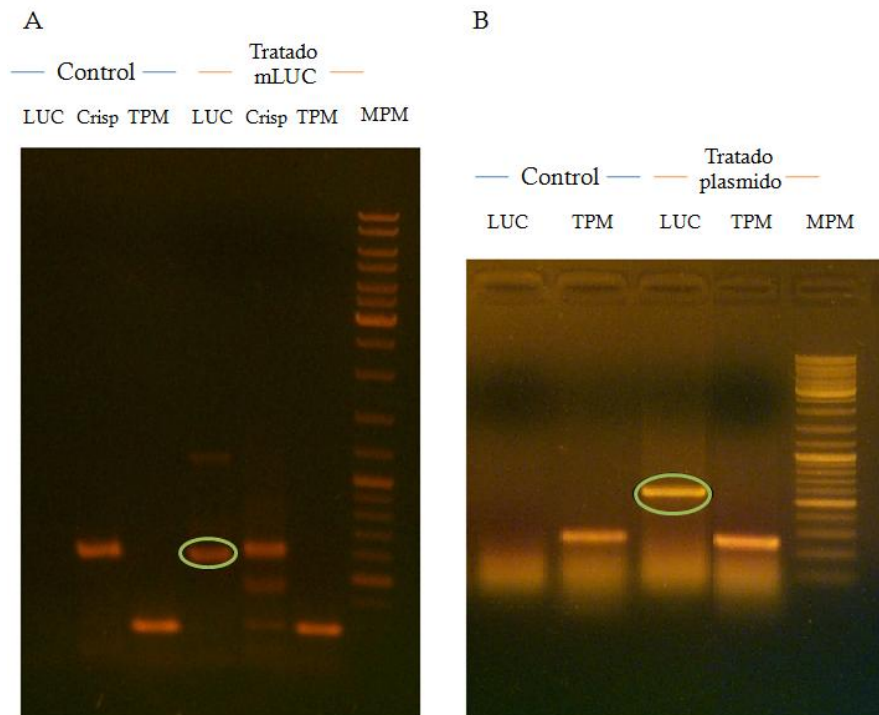


Figura 50- RT- PCR de los ejemplares de *M. corti* electroporados. A) Muestras electroporadas con mensajero de Luciferasa. Carril 1- 3 - RT-PCR de muestras control sin electroporar utilizando primers de LUC, Crisp y tropomiosina respectivamente. Carril 4-6, RT-PCR de muestras electroporadas con mensajero de Luciferasa utilizando primers de LUC, Crisp y tropomiosina respectivamente. Carril 7- MPM de 1Kb Fermentas. B) Muestras electroporadas con plásmido conteniendo gen de Luciferasa bajo control del promotor de actina de *S. mansoni*. Carril1-2- RT-PCR de muestras control sin electroporar utilizando primers de LUC y tropomiosina respectivamente. Carril 3-4- - RT-PCR de muestras electroporadas con plásmido utilizando primers de LUC y tropomiosina respectivamente. Carril 5- MPM. En la parte superior de la figura se indica a que corresponde cada muestra y que primers fueron utilizados, además se indica con un círculo de color verde el fragmento correspondiente a la amplificación del mensajero de la Luciferasa. Abreviaciones: LUC, luciferasa; TPM, tropomiosina; mLUC, mensajero de Luciferasa.

Los resultados obtenidos son muy alentadores ya que se logró la transfección del mensajero de la luciferasa, sin importar si la molécula electroporada es mensajero sintetizado o el plásmido conteniendo el gen de la luciferasa. Esto es evidenciado claramente por la presencia de fragmento correspondiente al producto generado por RT-PCR utilizando *primers* específicos que amplifican el mensajero (Figura 50, círculos de color verde). Por si el experimento arrojaba resultados negativos, se incluyeron como controles los genes tropomiosina y Crisp, para verificar que los ARN purificados y los ADNc generados a partir de los experimentos funcionaran correctamente. En el caso del ensayo realizado con el mensajero de la luciferasa, se realizó la medida de actividad de la enzima utilizando la luciferina como sustrato del ensayo. Para la muestra control no se detectó actividad, mientras que para la

muestra tratada con el mensajero fue posible la detección de 100 URL/seg/mg proteína total. Estos resultados refuerzan los obtenidos en el RT-PCR ya que únicamente en la muestra que se obtuvo amplificación del mensajero es en aquella que se logró detectar actividad.

Con estos resultados, se decidió intentar realizar un ensayo de interferencia. En este ensayo se utilizó tanto doble cadena de LUC, como doble cadena de los genes endógenos TROPOMIOSINA y de Crisp. En este ensayo, se realiza una doble electroporación para el caso del mensajero de LUC y de la molécula de doble cadena. Posteriormente, se deja en cultivo durante 3 horas. Para el caso de los genes endógenos se hace una única electroporación con el doble cadena correspondiente.

Estos experimentos no mostraron resultados exitosos, dado que no fue posible la detección de un efecto de interferencia del mensajero introducido, ni tampoco una disminución de los niveles de mensajeros endógenos testeados (datos no mostrados). Tal vez, en los ensayos de interferencia, donde se introducen las moléculas de doble cadena, no fue posible el *delivery* de las mismas al interior celular. Es importante tener presente, que las moléculas a transfectar deben traspasar el grueso tegumento de *Mesocostoides*. Otra posible explicación es que simplemente no funcionó el proceso de electroporación. Tal vez sería importante testear otras formas de generar rupturas en el tegumento, utilizando degradación enzimática por lipasa C por ejemplo, para probar si de esta forma se mejora la penetración del tegumento. O más aún, conjugar las moléculas que se quieren transfectar a compuestos como el colesterol, que son captados por el organismo de manera de disminuir los problemas de penetración de las moléculas.

En resumen, se logró optimizar las condiciones de entrada de moléculas exógenas capaces de atravesar el tegumento de estos organismos. A su vez, ha sido posible detectar moléculas exógenas dentro del parásito llevando a realizar ensayos de interferencia con moléculas de ARN doble cadena largas, tanto con moléculas exógenas como endógenas del parásito.

Hace algunos años el rápido avance del uso de la interferencia en *C. elegans* entusiasmó los científicos que estudian parásitos, a pensar en esta técnica como una

buena alternativa para estudiar la función génica en platelmintos. Si bien en estos últimos años se han logrado progresos importantes en platelmintos, solo fue posible estandarizarla como técnica de rutina en planarias.

En Platelminotos si bien han habido progresos con el uso de esta tecnología solo se ha establecido como técnica de rutina para la elucidación de la función génica en planarias, avanzándose en la caracterización de genes involucrados con la regeneración y el desarrollo [45]. En trematodos la ARNi ha sido probada y optimizada en varios organismos [223].

De cualquier manera, faltan conocimientos sobre su mecanismo de acción y presenta varios problemas que deben ser resueltos. Problemas que abarcan no solo a los organismos en sí, sino también al propio diseño experimental de la técnica. Entre ellos:

Los parásitos presentan varios estadios durante su ciclo de vida. Se ha observado que **hay estadios más susceptibles que otros al silenciamiento**. No solo en el estadio en si sino también en el momento dentro del mismo estadio.

- **La efectividad del silenciamiento depende de los genes blancos**. No todos los genes se afectan de igual manera. La eficiencia depende del gen seleccionado y de su expresión en el parásito. Genes que se expresan en intestino o tegumento tienen niveles de silenciamiento mayor. También son importantes la estructura del gen, vida media del ARNm y/o proteína.

Son muchos los pasos y las variantes a tener en cuenta en el uso de la técnica de ARN interferencia que se recomiendan al día de hoy:

1. Moléculas usadas y concentraciones

Hay una relación directa entre concentración y supresión alcanzada. Aunque concentraciones muy altas pueden resultar toxicas o hacer que ocurran efectos inespecíficos.

2. Controles

✚ Mock: control de método de entrada.

- ✚ Irrelevante: gen que no cause efecto.
- ✚ Positivo: gen expresado en el mismo tejido que el gen blanco y capaz de afectar la expresión.

3. Análisis del silenciamiento

En este punto son varios los controles que se deben realizar:

- ✚ Calcular la eficiencia de la transfección. Es necesario saber qué proporción de organismos incorporan la molécula y si la incorporación es homogénea
- ✚ Cuantificar la sobrevivencia luego de la transfección. Se pueden utilizar fluorocromos, moléculas que se incorporan de forma diferente a organismos vivos o muertos
- ✚ Cuantificación de la incorporación
- ✚ Determinar los efectos del silenciamiento.
- ✚ Detección del fenotipo- analizar morfológica y funcionalmente el organismo entero. Tamaño, movilidad, estructura, mortalidad
- ✚ Reducción del gen blanco y de su proteína
- ✚ Detección de efectos inespecíficos
- ✚ Realizar ensayos biológicos y funcionales

En definitiva es necesario ajustar para cada parásito métodos de *delivery*, concentraciones de moléculas utilizadas, persistencia del silenciamiento a lo largo del tiempo, evaluar la eficiencia del silenciamiento y estadios dentro del ciclo de vida a utilizar.

El grupo del co-tutor de esta tesis, ha trabajado en la estandarización de esta técnica en *F. hepatica* [223] llegando a algunas conclusiones importantes que pueden ser tenidas en cuenta para cestodos.

- ✚ Electroporación y *soaking* usados conjuntamente es un buen método de *delivery* (*Electro-soaking*)
- ✚ Se puede partir de una concentración de 50ng/ul, durante 4 horas y luego bajar a 2,5 ng para una incubación más larga.
- ✚ Las exposiciones largas favorecen una incorporación estable.
- ✚ La tinción con DAPI y FDA es un buen método para medir viabilidad y monitorear sobrevida.
- ✚ Los siRNA de menor tamaño son buenos para lograr una interferencia inmediata pero en el caso de querer que el efecto persista en el tiempo son los ARNs largos la mejor opción.

Si bien los resultados en *Mesocestoides* no han sido concluyentes, auguran buenas posibilidades para seguir trabajando e intentando la interferencia en este organismo. El uso de ARNs pequeños generados a partir de ARN doble cadena largos, puede ser una estrategia factible y exitosa y sin duda la aplicación de la técnica en células puede ser una alternativa válida.

Por otra parte, la disponibilidad de los genomas ha permitido analizar previamente la presencia de la vía de interferencia para ARN exógenos (Figura 51) lo que nos asegura que las moléculas existen por lo que el futuro trabajo aunque complejo es más promisorio.

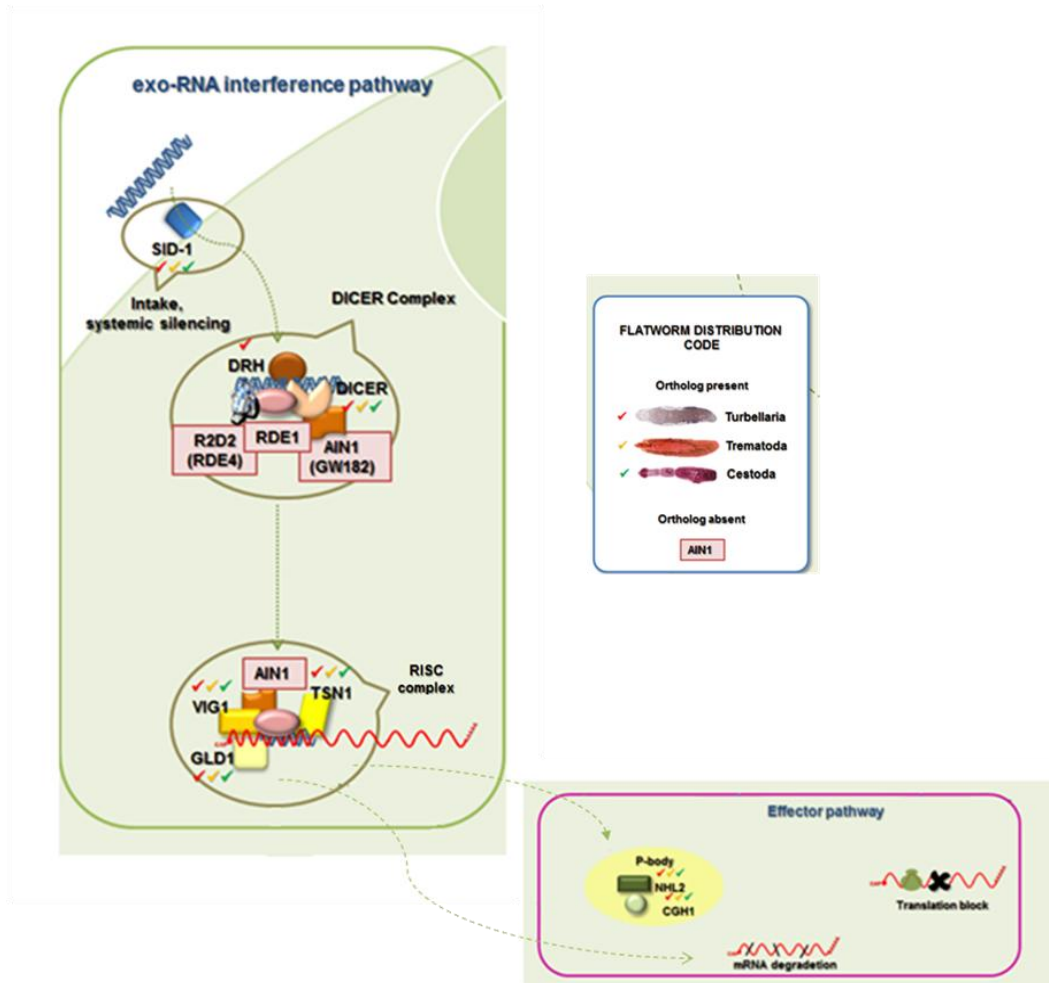


Figura 51- Esquema de componentes de vía de Interferencia Exógena. En la figura se identifican los miembros de la vía presentes en los platelmintos. Figura modificada a partir de la imagen original cedida por el Mag. Santiago Fontenla.

Logros:

1. Optimización de condiciones de entrada de moléculas exógenas.
2. Detección de moléculas incorporadas en el interior del parásito.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Con el fin de describir y caracterizar los diferentes tipos celulares presentes en *M. corti* se utilizaron diferentes estrategias: tinción con colorantes, inmunohistoquímicas y microscopía electrónica de transmisión. Los resultados obtenidos en esta etapa permitieron la identificación de las células proliferativas presentes en *M. corti*, además de la identificación de otros tipos celulares presentes en este organismo, entre ellas células musculares, tegumentarias, nerviosas, células formadoras de corpúsculos calcáreos y células flamígeras.

Las células proliferativas de *M. corti* presentan una morfología conservada similar a las descritas tanto por nuestro grupo de trabajo como también las de otros cestodos.

Fue posible el desarrollo de un método que permite el aislamiento de las células proliferativas de *M.corti* por citometría de flujo utilizando *sorting* celular. Este desarrollo fue posible gracias a la obtención y puesta a punto de un método de disgregación efectivo para la generación de suspensiones celulares, evaluación de la cantidad de días de cultivo necesarios y optimización de las tinciones empleadas en el *sorting* celular.

Uno de los puntos más importante a remarcar es que se desarrolló un método que permite analizar cambios en el número de células en cada etapa del ciclo celular, esto brinda la posibilidad de evaluar tratamientos experimentales que puedan afectar la capacidad proliferativas de estas células.

En este trabajo se reporta por primera vez el cultivo *in vitro* de células de *M. corti* a partir de suspensiones celulares totales. Los resultados obtenidos muestran que existen en cultivo células con la capacidad de proliferar *in vitro* durante periodos breves de tiempo. Los cultivos fueron testeados en diferentes medios y condiciones, en donde no se hallaron diferencias significativas.

En relación al estudio de marcadores moleculares de células germinativas, fue posible el aislamiento y caracterización del gen pL10 de *M. corti*.

La determinación de los patrones de expresión espacial de este gen, en cortes y en suspensiones celulares, indican que este gen puede estar siendo expresado preferencialmente en células de la línea germinal, pero su expresión no sería exclusiva de este tipo celular.

El estudio de la expresión temporal de este gen pL10 y de los genes pumilio (también considerados marcadores moleculares), muestra que no existirían cambios significativos en la expresión de ninguno de estos genes a lo largo del desarrollo estrobilar de *M. corti*

Utilizando herramientas informáticas *in silico*, fue posible la identificación de los genes pL10 y pumilio de los cestodos: *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *T. solium* y *H.microstoma*, y la determinación de estructura génica de los mismos. A su vez, se realizó la búsqueda de posibles isoformas en datos transcriptómicos de *M. corti* para estos genes. Esta búsqueda reveló la presencia de 2 posibles isoformas para gen pL10 de *M.corti*, 3 posibles isoformas para el gen pum1 de *M.corti* y ninguna para el gen pum2.

Analizando los genes predichos en el genoma de *M. corti* se logró identificar varios de los miembros de la familia de helicasas con motivo DEAD en genoma de *M. corti*. Un análisis preliminar, indica que los genes faltantes estarían presentes pero no contemplados en la anotación automática del genoma.

En relación a ARN interferencia, se logró optimizar las condiciones de entrada de moléculas exógenas capaces de atravesar el tegumento de estos organismos. A su vez, ha sido posible detectar moléculas exógenas dentro del parásito llevando a realizar ensayos de interferencia con moléculas de ARN doble cadena largas.

Los resultados de esta tesis son un aporte al conocimiento de la biología de los Cestodos. Estos permitirán el desarrollo de herramientas que contribuyan a avanzar tanto en el estudio de células proliferativas en particular, así como también en el desarrollo de herramientas de genómica funcional en cestodos.

Claramente la finalización de este trabajo propone la generación de varias perspectivas que permitan mejorar y avanzar en el estudio de los puntos estudiados en el transcurso de esta tesis.

El uso de la MET para el estudio de los distintos tipos celulares presentes en *M. corti*, es una herramienta muy valiosa y compleja, por lo que se podría trabajar para mejorar los tratamientos de fijación e inclusión de las muestras, sobre todo para suspensiones celulares, para poder continuar con la caracterización ultraestructural

no solo de las células proliferativas sino que también en los distintos tipos celulares presentes en este organismo.

En cuanto al *sorting* de células, se debería ahondar en el estudio de tratamientos que puedan estimular efectivamente la cantidad de células proliferativas presente en este organismo, de manera de poder aumentar la cantidad de células que son expuestas para la separación celular. Esto permitiría elevar el resultado final de la cantidad de células separadas y de esta forma poder realizar ensayos posteriores. Esto permitiría el cultivo celular de células purificadas, ensayos de extracción de ARN para obtener datos transcriptómicos, caracterización morfológica de fracciones purificadas, etc.

En relación al cultivo de células, sería muy interesante realizar ensayos de co-cultivo con células de *E. multilocularis* con el fin de determinar si bajo esta condición las células de *M. corti* son capaces de mejorar las condiciones de proliferación. Tal vez, aumentando el número de células que sean capaces de permanecer viables y además de proliferar en cultivo durante periodos más largos de tiempo.

Para profundizar en el estudio de los datos que se encuentran disponibles debido a la secuenciación de varios genomas de helmintos y ahondar en el estudio de la familia de las helicasas DEAD, sería bueno realizar el anotado manual de los genes faltantes pertenecientes a la familia de las DEAD helicasas y verificar las relaciones de ortología mediante estudios de filogenia de manera de poder afirmar cual y cuántos de los miembros de esta familia se encuentran presentes en el genoma de este organismo.

Para continuar con el estudio de marcadores moleculares es importante analizar más finamente otros posibles candidatos como marcadores moleculares que permitan caracterizar de forma molecular estas células. La generación de datos transcriptómicos de estas células germinativas (proyecto actualmente llevado a cabo en nuestro laboratorio) puede brindar candidatos más certeros para esta selección, que posteriormente también deberán ser confirmados experimentalmente.

En relación a los resultados obtenidos para pL10 en esta tesis, éste no parece ser un marcador exclusivo de células germinativas. Pero es importante destacar que se deberá profundizar en el estudio la determinación del patrón de expresión de este gen. Esto se debe a que es posible que con la sonda utilizada, se esté detectando otros miembros de la familia o bien, si la existencia de las isoformas es real, se pueda estar detectando algunas de las dos isoformas. Estas isoformas, tal vez no cumplan la misma función y es posible que una de ellas sea la que se encuentra expresada exclusivamente en las células germinativas, y de esta manera es imposible detectar si esto es así o no. Deberíamos buscar la manera de sintetizar una sonda que permita diferenciar a los diferentes miembros de la familia y a su vez entre las dos isoformas putativas.

Para poder comprobar que efectivamente se encuentran presentes estas isoformas y que las mismas son expresadas en los distintos estadios de *M. corti*, se deberían repetir los ensayos experimentales relacionados a las identificaciones de las isoformas de los genes marcadores.

En cuanto a la determinación del patrón de expresión temporal de los genes pL10 y pumilio a lo largo del desarrollo estrobilar de *M. corti*, es importante repetir los ensayos de qPCR introduciendo un mayor número de replicas técnicas y biológicas, para poder disminuir el error asociado a los datos y de esta forma poder confirmar las tendencias mostradas por los resultados presentados en esta tesis.

Los avances obtenidos para el desarrollo de ARN interferencia son el puntapié inicial para continuar avanzando en la implementación de esta técnica en *M. corti*. Una buena estrategia para continuar puede ser implementar el uso de ARNs pequeños generados a partir de ARN doble cadena largos sobre cultivos celulares de corta duración. Claramente que la utilización de la técnica de este modo conlleva a que es necesario ajustar nuevamente el método de *delivery*, determinar la concentración de las moléculas a utilizar, evaluar como es la persistencia del silenciamiento a lo largo del tiempo, y a su vez determinar cuál es la eficiencia del silenciamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Osimani, Parasitología Médica. Ed. Librería Médica. Montevideo, Uruguay, 1982.
- [2] B. Egger, F. Lapraz, B. Tomiczek, S. Müller, C. Dessimoz, J. Girstmair, et al., A Transcriptomic-Phylogenomic Analysis of the Evolutionary Relationships of Flatworms, *Curr. Biol.* 25 (2015) 1347–1353. doi:10.1016/j.cub.2015.03.034.
- [3] H.H. Garcia, P.L. Moro, P.M. Schantz, Zoonotic helminth infections of humans: echinococcosis, cysticercosis and fascioliasis., *Curr. Opin. Infect. Dis.* 20 (2007) 489–494. doi:10.1097/QCO.0b013e3282a95e39.
- [4] N.J. Barrett, J.D. Smyth, S.J. Ong, Spontaneous sexual differentiation of *Mesocestoides corti* tetrathyridia in vitro, *Int. J. Parasitol.* 12 (1982) 315–322. doi:10.1016/0020-7519(82)90034-0.
- [5] S.J. Ong, J.D. Smyth, Effects of some culture factors on sexual differentiation of *Mesocestoides corti* grown from tetrathyridia in vitro, *Int. J. Parasitol.* 16 (1986) 361–368. doi:10.1016/0020-7519(86)90115-3.
- [6] R.C.A. Thompson, L.P. Jue Sue, S.J. Buckley, In vitro development of the strobilar stage of *Mesocestoides corti*, *Int. J. Parasitol.* 12 (1982) 303–314. doi:10.1016/0020-7519(82)90033-9.
- [7] M. Voge, J.S. Seidel, Continuous growth in vitro of *Mesocestoides* (Cestoda) from oncosphere to fully developed tetrathyridium, *J. Parasitol.* 54 (1968) 269–271.
- [8] L. Britos, Estudios celulares y moleculares del desarrollo estrobilar de *Mesocestoides corti*., Tesis de Maestría. PEDECIBA. Fac. Ciencias - UdelaR. Montevideo - Uruguay., 2000.
- [9] A.I. Lalanne, L. Britos, R. Ehrlich, E. Castillo, *Mesocestoides corti*: A LIM-homeobox gene upregulated during strobilar development, *Exp. Parasitol.* 108 (2004) 169–175. doi:10.1016/j.exppara.2004.08.004.
- [10] L. Britos, A.I. Lalanne, E. Castillo, G. Cota, M. Señorale, M. Marin, *Mesocestoides corti* (syn. vogae, cestoda): Characterization of genes encoding cysteine-rich secreted proteins (CRISP), *Exp. Parasitol.* 116 (2007) 95–102. doi:10.1016/j.exppara.2006.11.008.
- [11] U. Koziol, M. Marin, E. Castillo, Pumilio genes from the Platyhelminthes, *Dev. Genes Evol.* 218 (2008) 47–53. doi:10.1007/s00427-007-0200-1.
- [12] U. Koziol, A.I. Lalanne, E. Castillo, Hox genes in the parasitic platyhelminthes *Mesocestoides corti*, *Echinococcus multilocularis*, and *Schistosoma mansoni*: evidence for a reduced Hox complement, *Biochem. Genet.* 47 (2009) 100–116. doi:10.1007/s10528-008-9210-6.
- [13] U. Koziol, M.F. Domínguez, M. Marin, A. Kun, E. Castillo, Stem cell proliferation during in vitro development of the model cestode *Mesocestoides corti* from larva to adult worm., *Front. Zool.* 7 (2010) 22. doi:10.1186/1742-9994-7-22.
- [14] R.L. Rausch, Family Mesocestoididae Fuhrmann, 1907, in: L.F. Khalil, A. Jones, R.A. Bray (Eds.), *Keys to Cestode Parasites Vertebr.*, CAB International, Wallingford, U.K., 1994: pp. 309–314.
- [15] U. Koziol, Estudio sobre genes HD en platelmintos. Tesina de graduación. Lic. en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias - UdelaR. Montevideo Uruguay, 2006.
- [16] B. Loos-Frank, One or two intermediate hosts in the life cycle of *Mesocestoides* (Cyclophyllidea, Mesocestoididae), *Parasitol. Res.* 77 (1991) 726–728.
- [17] J.D. Webster, Fragmentary studies in the life history of the cestode *Mesocestoides latus*., *J. Parasitol.* 35 (1949) 83–90.
- [18] J.L. Hart, Studies on the Nervous System of Tetrathyridia (Cestoda *Mesocestoides*), *J. Parasitol.* 53 (1967) 1032–1039.
- [19] A.J. Burns, J.M. Allen, G. McKerr, The spatial organisation of the central nervous system of *Mesocestoides corti* as revealed by microinjection of carbocyanine dye., *Int. J. Parasitol.* 28 (1998) 363–8.
- [20] U. Kemmerling, G. Cabrera, E.O. Campos, N.C. Inestrosa, N. Galanti, Localization, specific activity, and molecular forms of acetylcholinesterase in developmental stages of the cestode *Mesocestoides corti*.,

- J. Cell. Physiol. 206 (2006) 503–9. doi:10.1002/jcp.20495.
- [21] E. Hess, Ultrastructural study of the tetrathyridium of *Mesocestoides corti* Hoespli, 1925: Tegument and parenchyma, Zeitschrift Für Parasitenkd. Parasitol. Res. 61 (1980) 135–159. doi:10.1007/BF00925460.
- [22] E. Hess, Ultrastructural Study of the Tetrathyridium of *Mesocestoides corti* Hoespli, 1925 (Cestoda): Pool of Germinative Cells and Suckers., Rev Suisse Zool. 88 (1981) 661–674.
- [23] D. Specht, M. Voge, Asexual Multiplication of *Mesocestoides* Tetrathyridia in Laboratory Animals, J. Parasitol. 51 (1965) 268–272.
- [24] F. Kawamoto, H. Fujioka, S. Mizuno, N. Kumada, M. Voge, Studies on the post-larval development of cestodes of the genus *Mesocestoides*: shedding and further development of *M. lineatus* and *M. corti* tetrathyridia in vivo., Int. J. Parasitol. 16 (1986) 323–31.
- [25] M. Novak, Quantitative studies on the growth and multiplication of tetrathyridia of *Mesocestoides corti* Hoespli, 1925 (Cestoda: Cyclophyllidea) in rodents., Can. J. Zool. 50 (1972) 1189–96.
- [26] J.L. Hart, Regeneration of tetrathyridia of *Mesocestoides* (Cestoda: Cyclophyllidea) in vivo and in vitro., J. Parasitol. 54 (1968) 950–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5757680>.
- [27] U. Koziol, A. Costabile, M.F. Domínguez, A. Iriarte, G. Alvite, A. Kun, et al., Developmental expression of high molecular weight tropomyosin isoforms in *Mesocestoides corti*., Mol. Biochem. Parasitol. 175 (2011) 181–191.
- [28] N.J. Barrett, J.D. Smyth, S.J. Ong, Spontaneous sexual differentiation of *Mesocestoides corti* tetrathyridia in vitro, Int. J. Parasitol. 12 (1982) 315–322. doi:10.1016/0020-7519(82)90034-0.
- [29] U. Koziol, Caracterización de células proliferantes en *Mesocestoides corti* (Cestoda) , y de genes pumilio como posibles marcadores moleculares de las mismas., Tesis de Mestría en Ciencias Biológicas. PEDECIBA. Fac. Ciencias - UdelaR. Montevideo - Uruguay., 2009.
- [30] M. Voge, L.S. Coulombe, Growth and asexual multiplication in vitro of *Mesocestoides* tetrathyridia, Am. J. Trop. Med. Hyg. 15 (1966) 902–907.
- [31] M.K.S. Gustafsson, The cells of a cestode. *Diphyllobothrium dendriticum* as a model in cell biology., Acta Acad Abo Ser B. 50 (n.d.) 13–44.
- [32] R. Peter, R. Gschwenter, W. Schürmann, R.M. Rieger, P. Ladurner, The significance of stem cells in free-living flatworms: one common source for all cells in the adult, J. Appl. Biomed. 2 (2004) 21–35.
- [33] M. Reuter, N. Kreshchenko, Flatworm asexual multiplication implicates stem cells and regeneration, Can. J. Zool. 82 (2004) 334–356. doi:10.1139/z03-219.
- [34] U. and Koziol, E. Castillo, Cell proliferation and differentiation in cestodes. in A. Esteves, ed. Research in Helminths. Transworld Research Network, Kervala, India., 2011.
- [35] M.T. Merchant, C. Corella, K. Willms, Autoradiographic analysis of the germinative tissue in evaginated *Taenia solium* metacestodes, J Parasitol. 83 (1997) 363–367. doi:10.2307/3284395.
- [36] M. Galindo, R. Paredes, C. Marchant, V. Miño, N. Galanti, Regionalization of DNA and protein synthesis in developing stages of the parasitic platyhelminth *Echinococcus granulosus*, J. Cell. Biochem. 90 (2003) 294–303. doi:10.1002/jcb.10640.
- [37] P.W. Reddien, A.S. Alvarado, Fundamentals of Planarian Regeneration, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 20 (2004) 725–757. doi:10.1146/annurev.cellbio.20.010403.095114.
- [38] L. Rossi, A. Salvetti, R. Batistoni, P. Deri, V. Gremigni, Planarians, a tale of stem cells., Cell. Mol. Life Sci. 65 (2008) 16–23. doi:10.1007/s00018-007-7426-y.
- [39] J.C. Rink, Stem cell systems and regeneration in planaria, Dev. Genes Evol. 223 (2013) 67–84. doi:10.1007/s00427-012-0426-4.
- [40] I. Palmberg, Stem cells in microturbellarians, Protoplasma. 158 (1990) 109–120. doi:10.1007/BF01323123.
- [41] P. Ladurner, R. Rieger, J. Baguña, Spatial distribution and differentiation potential of stem cells in

- hatchlings and adults in the marine platyhelminth *macrostomum sp.*: a bromodeoxyuridine analysis., *Dev. Biol.* 226 (2000) 231–241. doi:10.1006/dbio.2000.9867.
- [42] A. Bode, W. Salvenmoser, K. Nimeth, M. Mahlknecht, Z. Adamski, R.M. Rieger, et al., Immunogold-labeled S-phase neoblasts, total neoblast number, their distribution, and evidence for arrested neoblasts in *Macrostomum lignano* (Platyhelminthes, Rhabditophora), *Cell Tissue Res.* 325 (2006) 577–587. doi:10.1007/s00441-006-0196-2.
- [43] D. Pfister, K. De Mulder, V. Hartenstein, G. Kuales, G. Borgonie, F. Marx, et al., Flatworm stem cells and the germ line: Developmental and evolutionary implications of macvasa expression in *Macrostomum lignano*, *Dev. Biol.* 319 (2008) 146–159. doi:10.1016/j.ydbio.2008.02.045.
- [44] K. De Mulder, D. Pfister, G. Kuales, B. Egger, W. Salvenmoser, M. Willems, et al., Stem cells are differentially regulated during development, regeneration and homeostasis in flatworms., *Dev. Biol.* 334 (2009) 198–212. doi:10.1016/j.ydbio.2009.07.019.
- [45] P. a Newmark, a Sánchez Alvarado, Bromodeoxyuridine specifically labels the regenerative stem cells of planarians., *Dev. Biol.* 220 (2000) 142–53. doi:10.1006/dbio.2000.9645.
- [46] G.T. Eisenhoffer, H. Kang, A.S. Alvarado, Molecular Analysis of Stem Cells and Their Descendants during Cell Turnover and Regeneration in the Planarian *Schmidtea mediterranea*, *Cell Stem Cell.* 3 (2008) 327–339. doi:10.1016/j.stem.2008.07.002.
- [47] M. Morita, J.B. Best, J. Noel, Electron microscopic studies of planarian regeneration. I. Fine structure of neoblasts in *Dugesia dorotocephala*., *J. Ultrastruct. Res.* 27 (1969) 7–23. doi:10.1002/jez.1401870305.
- [48] E.D. Hay, S.J. Coward, Fine structure studies on the planarian, *Dugesia*. I. Nature of the neoblast and other cell types in noninjured worms., *J. Ultrastruct. Res.* 50 (1975) 1–21.
- [49] C. Auladell, J. Garcia-Valero, J. Baguñà, Ultrastructural localization of RNA in the chromatoid bodies of undifferentiated cells (neoblasts) in planarians by the RNase-gold complex technique, *J. Morphol.* 216 (1993) 319–326. doi:10.1002/jmor.1052160307.
- [50] M. Yoshida-Kashikawa, N. Shibata, K. Takechi, K. Agata, DjCBC-1, a conserved DEAD box RNA helicase of the RCK/p54/Me31B family, is a component of RNA-protein complexes in planarian stem cells and neurons., *Dev. Dyn.* 236 (2007) 3436–50. doi:10.1002/dvdy.21375.
- [51] F. Cebrià, E. Saló, T. Adell, Chapter 4. Regeneration and Growth as Modes of Adult Development: The Platyhelminthes as a Case Study. A. Wanninger (ed.), *Evolutionary Developmental Biology of Invertebrates 2: Lophotrochozoa (Spiralia)*. Springer-Verlag Wien, 2015. doi:DOI 10.1007/978-3-7091-1871-9.
- [52] A.A. Aboobaker, Planarian stem cells: a simple paradigm for regeneration, *Trends Cell Biol.* 21 (2011) 304–311. doi:10.1016/j.tcb.2011.01.005.
- [53] A. Sánchez Alvarado, P. a Newmark, S.M. Robb, R. Juste, The *Schmidtea mediterranea* database as a molecular resource for studying platyhelminthes, stem cells and regeneration., *Development.* 129 (2002) 5659–5665. doi:10.1242/dev.00167.
- [54] L.T. Douglas, The Development of Organ Systems in Nematotaeniid Cestodes . II . The Histogenesis of Paruterine Organs in *Baerietta diana*, *J. Parasitol.* 47 (1961) 681–685.
- [55] R.I. Bolla, L.S. Roberts, Developmental physiology of cestodes. IX. Cytological characteristics of the germinative region of *Hymenolepis diminuta*., *J. Parasitol.* 57 (1971) 267–77.
- [56] B.-J.P. Wikgren, M.K.S. Gustafsson, Cell proliferation and histogenesis in *Diphyllobothrid* tapeworms (Cestoda), *Acta Acad. Aboensis. Ser. B, Math. Phys.* 31 (1971).
- [57] T. Sulgostowska, The development of organ systems in cestodes. I. A study of histology of *H. diminuta* (Rud., 1819)., *Acta Parasit Pol.* 20 (1972) 449–462.
- [58] M.K. Gustafsson, Studies on cytodifferentiation in the neck region of *Diphyllobothrium dendriticum* Nitzsch, 1824 (Cestoda, Pseudophyllidea)., *Zeitschrift Für Parasitenkd. (Berlin, Ger.* 50 (1976) 323–9.
- [59] K.A. Loehr, R.W. Mead, A MACERATION TECHNIQUE FOR THE STUDY OF CYTOLOGICAL IN DEVELOPMENT *HYMENOLEPIS CITELLI*, *J. Parasitol.* 65 (1979) 886–889.

- [60] W.K. Collin, The cellular organization of hatched oncospheres of *Hymenolepis citelli* (Cestoda, Cyclophyllidea), *J. Parasitol.* 55 (1969) 149–166.
- [61] M. Sakamoto, T and Sugimura, STUDIES ON ECHINOCOCCOSIS XXIII ELECTRON MICROSCOPICAL OBSERVATIONS ON HISTOGENESIS OF LARVAL *ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS*, *Jpn. J. Vet. Res.* 18 (1970) 131–144.
- [62] Z. Swiderski, *ECHINOCOCCUS GRANULOSUS*: HOOK-MUSCLE SYSTEMS AND CELLULAR ORGANISATION OF INFECTIVE ONCOSPHERES, *Int. J. Parasitol.* 13 (1983) 289–299.
- [63] A. Jabbar, S. Crawford, Z. Mlocicki, Daniel Siwiderski, D.B. Conn, M.K. Jones, I. Beveridge, et al., Ultrastructural reconstruction of *Taenia ovis* oncospheres from serial sections, *Int. J. Parasitol.* 40 (2010) 1419–1431. doi:10.1016/j.ijpara.2010.04.011.
- [64] D.J. Henderson, R.E.B. Hanna, *HYMENOLEPIS NANA* (CESTODA : CYCLOPHYLLIDEA): DNA , RNA AND PROTEIN SYNTHESIS IN 5-DAY-OLD JUVENILES, *Int. J. Parasitol.* 18 (1988) 963–972.
- [65] U. Koziol, Molecular and developmental characterization of the *Echinococcus multilocularis* stem cell system, PhD thesis. Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Alemania, 2014.
- [66] U. Koziol, T. Rauschendorfer, L. Zanon Rodríguez, G. Krohne, K. Brehm, The unique stem cell system of the immortal larva of the human parasite *Echinococcus multilocularis*, *Evodevo.* 5 (2014). doi:10.1186/2041-9139-5-10.
- [67] I. Espinoza, M. Galindo, C.V. Bizarro, H.B. Ferreira, A. Zaha, N. Galanti, Early post-larval development of the endoparasitic platyhelminth *Mesocostoides corti*: Trypsin provokes reversible tegumental damage leading to serum-induced cell proliferation and growth, *J. Cell. Physiol.* 205 (2005) 211–217. doi:10.1002/jcp.20382.
- [68] A.G. Smith, G. McKer, Tritiated thymidine ([³H]-TdR) and immunocytochemical tracing of cellular fate within the asexually dividing cestode *Mesocostoides vogae* (syn. *M. corti*), *Parasitology.* 121 (2000) 105–110.
- [69] A.E. Bely, J.M. Sikes, Acoel and platyhelminth models for stem-cell research, *J. Biol.* 9 (2010) 14. doi:10.1186/jbiol223.
- [70] N. Shibata, Y. Umesono, H. Orii, T. Sakurai, K. Watanabe, K. Agata, Expression of vasa(vas)-related genes in germline cells and totipotent somatic stem cells of planarians., *Dev. Biol.* 206 (1999) 73–87. doi:10.1006/dbio.1998.9130.
- [71] A. Salvetti, L. Rossi, P. Deri, R. Batistoni, An MCM2-related gene is expressed in proliferating cells of intact and regenerating planarians, *Dev. Dyn.* 218 (2000) 603–614. doi:10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<::AID-DVDY1016>3.0.CO;2-C.
- [72] H. Orii, T. Sakurai, K. Watanabe, Distribution of the stem cells (neoblasts) in the planarian *Dugesia japonica*, *Dev. Genes Evol.* 215 (2005) 143–157. doi:10.1007/s00427-004-0460-y.
- [73] P.W. Reddien, SMEDWI-2 Is a PIWI-Like Protein That Regulates Planarian Stem Cells, *Science* (80-.). 310 (2005) 1327–1330. doi:10.1126/science.1116110.
- [74] L. Rossi, A. Salvetti, R. Batistoni, P. Deri, V. Gremigni, Molecular and Cellular Basis of Regeneration and Tissue Repair, *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (2007) 16–23. doi:10.1007/s00018-007-7426-y.
- [75] A. Salvetti, L. Rossi, A. Lena, R. Batistoni, P. Deri, G. Rainaldi, et al., DjPum, a homologue of *Drosophila* Pumilio, is essential to planarian stem cell maintenance., *Development.* 132 (2005) 1863–1874. doi:10.1242/dev.01785.
- [76] T. Guo, A.H.F.M. Peters, P.A. Newmark, A bruno-like Gene Is Required for Stem Cell Maintenance in Planarians, *Dev. Cell.* 11 (2006) 159–169. doi:10.1016/j.devcel.2006.06.004.
- [77] L. Rouhana, N. Shibata, O. Nishimura, K. Agata, Different requirements for conserved post-transcriptional regulators in planarian regeneration and stem cell maintenance, *Dev. Biol.* 341 (2010) 429–443. doi:10.1016/j.ydbio.2010.02.037.
- [78] R.M. Labbé, M. Irimia, K.W. Currie, A. Lin, S.J. Zhu, D.D.R. Brown, et al., A Comparative Transcriptomic Analysis Reveals Conserved Features of Stem Cell Pluripotency in Planarians and

- Mammals, Stem Cells. 30 (2012) 1734–1745. doi:10.1002/stem.1144.
- [79] P. Önal, D. Grün, C. Adamidi, A. Rybak, J. Solana, G. Mastrobuoni, et al., Gene expression of pluripotency determinants is conserved between mammalian and planarian stem cells, *EMBO J.* 31 (2012) 2755–2769. doi:10.1038/emboj.2012.110.
- [80] J.J. Collins, B. Wang, B.G. Lambrus, M.E. Tharp, H. Iyer, P. a Newmark, Adult somatic stem cells in the human parasite *Schistosoma mansoni*., *Nature.* 494 (2013) 476–9. doi:10.1038/nature11924.
- [81] D.E. Wagner, J.J. Ho, P.W. Reddien, Genetic regulators of a pluripotent adult stem cell system in planarians identified by RNAi and clonal analysis, *Cell Stem Cell.* 10 (2012) 299–311. doi:10.1016/j.stem.2012.01.016.
- [82] G. Rodríguez-Esteban, A. González-Sastre, J.I. Rojo-Laguna, E. Saló, J.F. Abril, Digital gene expression approach over multiple RNA-Seq data sets to detect neoblast transcriptional changes in *Schmidtea mediterranea*., *BMC Genomics.* 16 (2015) 361. doi:10.1186/s12864-015-1533-1.
- [83] T. Hayashi, M. Asami, S. Higuchi, N. Shibata, K. Agata, Isolation of planarian X-ray-sensitive stem cells by fluorescence-activated cell sorting, *Dev. Growth Differ.* 48 (2006) 371–380. doi:10.1111/j.1440-169X.2006.00876.x.
- [84] A. Salvetti, L. Rossi, L. Bonucelli, A. Lena, C. Pugliesi, G. Rainaldi, et al., Adult stem cell plasticity: Neoblast repopulation in non-lethally irradiated planarians, *Dev. Biol.* 328 (2009) 305–314. doi:10.1016/j.ydbio.2009.01.029.
- [85] J. Solana, D. Kao, Y. Mihaylova, F. Jaber-Hijazi, S. Malla, R. Wilson, et al., Defining the molecular profile of planarian pluripotent stem cells using a combinatorial RNAseq, RNA interference and irradiation approach., *Genome Biol.* 13 (2012) R19. doi:10.1186/gb-2012-13-3-r19.
- [86] M.J. Blythe, D. Kao, S. Malla, J. Rowsell, R. Wilson, D. Evans, et al., A dual platform approach to transcript discovery for the planarian *schmidtea mediterranea* to establish RNAseq for stem cell and regeneration biology, *PLoS One.* 5 (2010). doi:10.1371/journal.pone.0015617.
- [87] C.E. Juliano, S.Z. Swartz, G.M. Wessel, A conserved germline multipotency program, *Development.* 137 (2010) 4113–4126. doi:10.1242/dev.047969.
- [88] D. Palakodeti, M. Smielewska, Y.-C. Lu, G.W. Yeo, B.R. Graveley, The PIWI proteins SMEDWI-2 and SMEDWI-3 are required for stem cell function and piRNA expression in planarians., *RNA.* 14 (2008) 1174–86. doi:10.1261/rna.1085008.
- [89] K. Ogawa, C. Kobayashi, T. Hayashi, H. Orii, K. Watanabe, K. Agata, Planarian fibroblast growth factor receptor homologs expressed in stem cells and cephalic ganglions., *Dev. Growth Differ.* 44 (2002) 191–204.
- [90] K. Sato, N. Shibata, H. Orii, R. Amikura, T. Sakurai, K. Agata, et al., Identification and origin of the germline stem cells as revealed by the expression of nanos-related gene in planarians., *Dev. Growth Differ.* 48 (2006) 615–28. doi:10.1111/j.1440-169X.2006.00897.x.
- [91] M. Handberg-Thorsager, E. Saló, The planarian nanos-like gene Smednos is expressed in germline and eye precursor cells during development and regeneration., *Dev. Genes Evol.* 217 (2007) 403–11. doi:10.1007/s00427-007-0146-3.
- [92] Y. Wang, R.M. Zayas, T. Guo, P. a Newmark, Nanos Function Is Essential for Development and Regeneration of Planarian Germ Cells., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 5901–6. doi:10.1073/pnas.0609708104.
- [93] J. Solana, R. Romero, SpolvlgA is a DDX3/PL10-related DEAD-box RNA helicase expressed in blastomeres and embryonic cells in planarian embryonic development, *Int. J. Biol. Sci.* 5 (2009) 64–73. doi:10.7150/ijbs.5.64.
- [94] E. Fernández-Taboada, S. Moritz, D. Zeuschner, M. Stehling, H.R. Schöler, E. Saló, et al., Smed-SmB, a member of the LSm protein superfamily, is essential for chromatoid body organization and planarian stem cell proliferation., *Development.* 137 (2010) 1055–1065. doi:10.1242/dev.051847.
- [95] D.H. Castrillon, B.J. Quade, T.Y. Wang, C. Quigley, C.P. Crum, The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 9585–90. doi:10.1073/pnas.160274797.

- [96] S.W. Lapan, P.W. Reddien, Dlx and sp6-9 control optic cup regeneration in a prototypic eye, *PLoS Genet.* 7 (2011). doi:10.1371/journal.pgen.1002226.
- [97] A. Boser, H.C.A. Drexler, H. Reuter, H. Schmitz, G. Wu, H.R. Scheller, et al., SILAC Proteomics of Planarians Identifies Ncoa5 as a Conserved Component of Pluripotent Stem Cells, *Cell Rep.* 5 (2013) 1142–1155. doi:10.1016/j.celrep.2013.10.035.
- [98] R.A. Blassberg, D.A. Felix, B. Tejada-Romero, A.A. Aboobaker, PBX/extradenticle is required to re-establish axial structures and polarity during planarian regeneration, *Development.* 140 (2013) 730–739. doi:10.1242/dev.082982.
- [99] C.E. Adler, C.W. Seidel, S.A. McKinney, A. Sánchez Alvarado, Selective amputation of the pharynx identifies a FoxA-dependent regeneration program in planaria., *Elife.* 3 (2014) e02238. doi:10.7554/eLife.02238.
- [100] S.J. Zhu, B.J. Pearson, The Retinoblastoma pathway regulates stem cell proliferation in freshwater planarians, *Dev. Biol.* 373 (2013) 442–452. doi:10.1016/j.ydbio.2012.10.025.
- [101] M.L. Scimone, J. Meisel, P.W. Reddien, The Mi-2-like Smed-CHD4 gene is required for stem cell differentiation in the planarian *Schmidtea mediterranea.*, *Development.* 137 (2010) 1231–1241. doi:10.1242/dev.042051.
- [102] L. Bonuccelli, L. Rossi, A. Lena, V. Scarcelli, G. Rainaldi, M. Evangelista, et al., An RbAp48-like gene regulates adult stem cells in planarians., *J. Cell Sci.* 123 (2010) 690–698. doi:10.1242/jcs.053900.
- [103] E. Fernández-Taboada, G. Rodríguez-Esteban, E. Saló, J.F. Abril, A proteomics approach to decipher the molecular nature of planarian stem cells., *BMC Genomics.* 12 (2011) 133. doi:10.1186/1471-2164-12-133.
- [104] S. Fraguas, S. Barberán, F. Cebrià, EGFR signaling regulates cell proliferation, differentiation and morphogenesis during planarian regeneration and homeostasis, *Dev. Biol.* 354 (2011) 87–101. doi:10.1016/j.ydbio.2011.03.023.
- [105] J.P. Hollenbach, A.M. Resch, D. Palakodeti, B.R. Graveley, C.D. Heinen, Loss of dna mismatch repair imparts a selective advantage in planarian adult stem cells, *PLoS One.* 6 (2011). doi:10.1371/journal.pone.0021808.
- [106] C. González-Estévez, D.A. Felix, M.D. Smith, J. Paps, S.J. Morley, V. James, et al., SMG-1 and mTORC1 act antagonistically to regulate response to injury and growth in planarians, *PLoS Genet.* 8 (2012). doi:10.1371/journal.pgen.1002619.
- [107] M. Almuedo-Castillo, X. Crespo, F. Seebeck, K. Bartscherer, E. Saló, T. Adell, JNK Controls the Onset of Mitosis in Planarian Stem Cells and Triggers Apoptotic Cell Death Required for Regeneration and Remodeling, *PLoS Genet.* 10 (2014). doi:10.1371/journal.pgen.1004400.
- [108] T.C.J. Tan, R. Rahman, F. Jaber-Hijazi, D.A. Felix, C. Chen, E.J. Louis, et al., Telomere maintenance and telomerase activity are differentially regulated in asexual and sexual worms., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 4209–14. doi:10.1073/pnas.1118885109.
- [109] I.J. Tsai, M. Zarowiecki, N. Holroyd, A. Garciarrubio, A. Sanchez-Flores, K.L. Brooks, et al., The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism., *Nature.* 496 (2013) 57–63. doi:10.1038/nature12031.
- [110] D.E. Skinner, G. Rinaldi, U. Koziol, K. Brehm, P.J. Brindley, How might flukes and tapeworms maintain genome integrity without a canonical piRNA pathway?, *Trends Parasitol.* 30 (2014) 123–129. doi:10.1016/j.pt.2014.01.001.
- [111] B. Wang, J.J. Collins, P.A. Newmark, Functional genomic characterization of neoblast-like stem cells in larval *Schistosoma mansoni*, *Elife.* 2013 (2013) 1–15. doi:10.7554/eLife.00768.
- [112] A.E. Gorbalenya, E. V. Koonin, Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3 (1993) 419–429. doi:10.1016/S0959-440X(05)80116-2.
- [113] P. Linder, E. Jankowsky, From unwinding to clamping - the DEAD box RNA helicase family., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12 (2011) 505–16. doi:10.1038/nrm3154.
- [114] O. Cordin, J. Banroques, N.K. Tanner, P. Linder, The DEAD-box protein family of RNA helicases.,

- Gene. 367 (2006) 17–37. doi:10.1016/j.gene.2005.10.019.
- [115] P. Linder, F. V. Fuller-Pace, Looking back on the birth of DEAD-box RNA helicases, *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1829 (2013) 750–755. doi:10.1016/j.bbagr.2013.03.007.
- [116] P. Linder, Chapter 2. The Dynamic Life with DEAD-Box RNA Helicases, in: E. Jankowsky (Ed.), *RNA Helicases*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2010: pp. 32–60. doi:10.1039/9781849732215-00032.
- [117] O. Johnstone, R. Deuring, R. Bock, P. Linder, M.T. Fuller, P. Lasko, Belle is a *Drosophila* DEAD-box protein required for viability and in the germ line, *Dev. Biol.* 277 (2005) 92–101. doi:10.1016/j.ydbio.2004.09.009.
- [118] D. Sharma, E. Jankowsky, The Ded1/DDX3 subfamily of DEAD-box RNA helicases., *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 49 (n.d.) 343–60. doi:10.3109/10409238.2014.931339.
- [119] R.Y. Chuang, P.L. Weaver, Z. Liu, T.H. Chang, Requirement of the DEAD-Box protein ded1p for messenger RNA translation., *Science.* 275 (1997) 1468–71.
- [120] P. Leroy, P. Alzari, D. Sassoon, D. Wolgemuth, M. Fellous, The protein encoded by a murine male germ cell-specific transcript is a putative ATP-dependent RNA helicase., *Cell.* 57 (1989) 549–59.
- [121] R. Gururajan, H. Perry-O'Keefe, D.A. Melton, D.L. Weeks, The *Xenopus* localized messenger RNA An3 may encode an ATP-dependent RNA helicase., *Nature.* 349 (1991) 717–9. doi:10.1038/349717a0.
- [122] S.L. Gee, J.G. Conboy, Mouse erythroid cells express multiple putative RNA helicase genes exhibiting high sequence conservation from yeast to mammals., *Gene.* 140 (1994) 171–7.
- [123] J. Sowden, W. Putt, K. Morrison, R. Beddington, Y. Edwards, The embryonic RNA helicase gene (*ERH*): a new member of the DEAD box family of RNA helicases, *Biochem. J.* 308 (1995) 839–846. doi:10.1042/bj3080839.
- [124] L.C. Olsen, R. Aasland, A. Fjose, A vasa-like gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells, *Mech. Dev.* 66 (1997) 95–105. doi:10.1016/S0925-4773(97)00099-3.
- [125] B. Hay, L.Y. Jan, Y.N. Jan, A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by vasa and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases., *Cell.* 55 (1988) 577–87.
- [126] P.F. Lasko, M. Ashburner, The product of the *Drosophila* gene vasa is very similar to eukaryotic initiation factor-4A., *Nature.* 335 (1988) 611–7. doi:10.1038/335611a0.
- [127] D.L. Roussell, K.L. Bennett, glh-1, a germ-line putative RNA helicase from *Caenorhabditis*, has four zinc fingers., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 9300–4.
- [128] Y. Fujiwara, T. Komiya, H. Kawabata, M. Sato, H. Fujimoto, M. Furusawa, et al., Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila* vasa and its specific expression in germ cell lineage., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 12258–62.
- [129] T. Komiya, K. Itoh, K. Ikenishi, M. Furusawa, Isolation and characterization of a novel gene of the DEAD box protein family which is specifically expressed in germ cells of *Xenopus laevis*., *Dev. Biol.* 162 (1994) 354–63. doi:10.1006/dbio.1994.1093.
- [130] T. Komiya, Y. Tanigawa, Cloning of a gene of the DEAD box protein family which is specifically expressed in germ cells in rats., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207 (1995) 405–10. doi:10.1006/bbrc.1995.1202.
- [131] M.E. Gruidl, P.A. Smith, K.A. Kuznicki, J.S. McCrone, J. Kirchner, D.L. Roussell, et al., Multiple potential germ-line helicases are components of the germ-line-specific P granules of *Caenorhabditis elegans*., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 13837–42.
- [132] C. Yoon, K. Kawakami, N. Hopkins, Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells., *Development.* 124 (1997) 3157–65.
- [133] H. Nakao, Isolation and characterization of a *Bombyx* vasa-like gene., *Dev. Genes Evol.* 209 (1999) 312–6.

- [134] M. Fujimura, K. Takamura, Characterization of an ascidian DEAD-box gene, Ci-DEAD1: specific expression in the germ cells and its mRNA localization in the posterior-most blastomeres in early embryos., *Dev. Genes Evol.* 210 (2000) 64–72.
- [135] K.A. Kuznicki, P.A. Smith, W.M. Leung-Chiu, A.O. Estevez, H.C. Scott, K.L. Bennett, Combinatorial RNA interference indicates GLH-4 can compensate for GLH-1; these two P granule components are critical for fertility in *C. elegans*., *Development.* 127 (2000) 2907–16.
- [136] A. Shinomiya, M. Tanaka, T. Kobayashi, Y. Nagahama, S. Hamaguchi, The vasa-like gene, olvas, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes*., *Dev. Growth Differ.* 42 (2000) 317–26.
- [137] N. Tsunekawa, M. Naito, Y. Sakai, T. Nishida, T. Noce, Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells., *Development.* 127 (2000) 2741–50.
- [138] G. Yoshizaki, S. Sakatani, H. Tominaga, T. Takeuchi, Cloning and characterization of a vasa-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage., *Mol. Reprod. Dev.* 55 (2000) 364–71. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(200004)55:4<364::AID-MRD2>3.0.CO;2-8.
- [139] K. Ikenishi, T.S. Tanaka, Involvement of the protein of *Xenopus* vasa homolog (*Xenopus* vasa-like gene 1, XVLG1) in the differentiation of primordial germ cells., *Dev. Growth Differ.* 39 (1997) 625–33.
- [140] K. Mochizuki, C. Nishimiya-Fujisawa, T. Fujisawa, Universal occurrence of the vasa-related genes among metazoans and their germline expression in *Hydra*, *Dev. Genes Evol.* 211 (2001) 299–308. doi:10.1007/s004270100156.
- [141] Y. Zheng, Phylogenetic analysis of the Argonaute protein family in platyhelminths., *Mol. Phylogenet. Evol.* 66 (2013) 1050–4. doi:10.1016/j.ympev.2012.11.014.
- [142] H. Ohashi, N. Umeda, N. Hirazawa, Y. Ozaki, C. Miura, T. Miura, Expression of vasa (vas)-related genes in germ cells and specific interference with gene functions by double-stranded RNA in the monogenean, *Neobenedenia girellae*, *Int. J. Parasitol.* 37 (2007) 515–523. doi:10.1016/j.ijpara.2006.11.003.
- [143] D.E. Skinner, G. Rinaldi, S. Suttiprapa, V.H. Mann, P. Smircich, A.A. Cogswell, et al., Vasa-like dead-box rna helicases of *schistosoma mansoni*, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6 (2012) 26–31. doi:10.1371/journal.pntd.0001686.
- [144] M. Wickens, D.S. Bernstein, J. Kimble, R. Parker, A PUF family portrait: 3'UTR regulation as a way of life, *Trends Genet.* 18 (2002) 150–157. doi:10.1016/S0168-9525(01)02616-6.
- [145] D. Curtis, D.K. Treiber, F. Tao, P.D. Zamore, J.R. Williamson, R. Lehmann, A CCHC metal-binding domain in Nanos is essential for translational regulation, *EMBO J.* 16 (1997) 834–843. doi:10.1093/emboj/16.4.834.
- [146] P.M. Macdonald, The *Drosophila pumilio* gene: an unusually long transcription unit and an unusual protein., *Development.* 114 (1992) 221–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1576962>.
- [147] E.K. White, T. Moore-Jarrett, H.E. Ruley, PUM2, a novel murine puf protein, and its consensus RNA-binding site, *Rna.* 7 (2001) 1855–1866. doi:10.1017/S1355838201010470.
- [148] X. Wang, J. McLachlan, P.D. Zamore, T.M.T. Hall, Modular recognition of RNA by a human *Pumilio*-homology domain, *Cell.* 110 (2002) 501–512. doi:10.1016/S0092-8674(02)00873-5.
- [149] T.A. Edwards, S.E. Pyle, R.P. Wharton, A.K. Aggarwal, Structure of *Pumilio* reveals similarity between RNA and peptide binding motifs., *Cell.* 105 (2001) 281–9.
- [150] D.S. Spassov, R. Jurecic, The PUF family of RNA-binding proteins: does evolutionarily conserved structure equal conserved function?, *IUBMB Life.* 55 (2003) 359–366. doi:10.1080/15216540310001603093.
- [151] L. Cui, Q. Fan, J. Li, The malaria parasite *Plasmodium falciparum* encodes members of the Puf RNA-binding protein family with conserved RNA binding activity., *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 4607–17.
- [152] B. Dallagiovanna, L. Pérez, J. Sotelo-Silveira, P. Smircich, M.A. Duhagon, B. Garat, *Trypanosoma cruzi*: molecular characterization of TcPUF6, a *Pumilio* protein., *Exp. Parasitol.* 109 (2005) 260–4. doi:10.1016/j.exppara.2005.01.003.

- [153] M. Fox, J. Urano, R.A. Reijo Pera, Identification and characterization of RNA sequences to which human PUMILIO-2 (PUM2) and deleted in Azoospermia-like (DAZL) bind., *Genomics*. 85 (2005) 92–105. doi:10.1016/j.ygeno.2004.10.003.
- [154] H.T. Jenkins, R. Baker-Wilding, T.A. Edwards, Structure and RNA binding of the mouse Pumilio-2 Puf domain., *J. Struct. Biol.* 167 (2009) 271–6. doi:10.1016/j.jsb.2009.06.007.
- [155] S. Nakahata, Y. Katsu, K. Mita, K. Inoue, Y. Nagahama, M. Yamashita, Biochemical identification of *Xenopus* Pumilio as a sequence-specific cyclin B1 mRNA-binding protein that physically interacts with a Nanos homolog, Xcat-2, and a cytoplasmic polyadenylation element-binding protein., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 20945–53. doi:10.1074/jbc.M010528200.
- [156] L. Opperman, B. Hook, M. DeFino, D.S. Bernstein, M. Wickens, A single spacer nucleotide determines the specificities of two mRNA regulatory proteins., *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12 (2005) 945–51. doi:10.1038/nsmb1010.
- [157] X. Wang, P.D. Zamore, T.M. Tanaka Hall, Crystal structure of a Pumilio homology domain, *Mol. Cell.* 7 (2001) 855–865. doi:10.1016/S1097-2765(01)00229-5.
- [158] P.D. Zamore, J.R. Williamson, R. Lehmann, The Pumilio protein binds RNA through a conserved domain that defines a new class of RNA-binding proteins., *RNA*. 3 (1997) 1421–1433. doi:10.1101/gad.241422.114.
- [159] J. Sonoda, R.P. Wharton, Recruitment of Nanos to hunchback mRNA by Pumilio., *Genes Dev.* 13 (1999) 2704–12.
- [160] T.A. Edwards, B.D. Wilkinson, R.P. Wharton, A.K. Aggarwal, Model of the brain tumor-Pumilio translation repressor complex., *Genes Dev.* 17 (2003) 2508–13. doi:10.1101/gad.1119403.
- [161] L.Y. Kadyrova, Y. Habara, T.H. Lee, R.P. Wharton, Translational control of maternal Cyclin B mRNA by Nanos in the *Drosophila* germline., *Development*. 134 (2007) 1519–27. doi:10.1242/dev.002212.
- [162] J. Sonoda, R.P. Wharton, *Drosophila* Brain Tumor is a translational repressor., *Genes Dev.* 15 (2001) 762–73. doi:10.1101/gad.870801.
- [163] F.L. Moore, J. Jaruzelska, M.S. Fox, J. Urano, M.T. Firpo, P.J. Turek, et al., Human Pumilio-2 is expressed in embryonic stem cells and germ cells and interacts with DAZ (Deleted in AZoospermia) and DAZ-like proteins., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 538–43. doi:10.1073/pnas.0234478100.
- [164] C. Luitjens, M. Gallegos, B. Kraemer, J. Kimble, M. Wickens, CPEB proteins control two key steps in spermatogenesis in *C. elegans*., *Genes Dev.* 14 (2000) 2596–609.
- [165] A. Forbes, R. Lehmann, Nanos and Pumilio have critical roles in the development and function of *Drosophila* germline stem cells., *Development*. 125 (1998) 679–690.
- [166] H. Lin, A. Spradling, A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary., *Development*. 124 (1997) 2463–2476.
- [167] M. Parisi, H. Lin, The *Drosophila* pumilio gene encodes two functional protein isoforms that play multiple roles in germline development, gonadogenesis, oogenesis and embryogenesis., *Genetics*. 153 (1999) 235–50.
- [168] M. Parisi, H. Lin, Translational repression: a duet of Nanos and Pumilio., *Curr. Biol.* 10 (2000) R81–3. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00283-9.
- [169] M. Ariz, R. Mainpal, K. Subramaniam, *C. elegans* RNA-binding proteins PUF-8 and MEX-3 function redundantly to promote germline stem cell mitosis, *Dev. Biol.* 326 (2009) 295–304. doi:10.1016/j.ydbio.2008.11.024.
- [170] S.L. Crittenden, C.R. Eckmann, L. Wang, D.S. Bernstein, M. Wickens, J. Kimble, Regulation of the mitosis/meiosis decision in the *Caenorhabditis elegans* germline., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 358 (2003) 1359–62. doi:10.1098/rstb.2003.1333.
- [171] L.B. Lamont, S.L. Crittenden, D. Bernstein, M. Wickens, J. Kimble, FBF-1 and FBF-2 regulate the size of the mitotic region in the *C. elegans* germline., *Dev. Cell.* 7 (2004) 697–707.

- doi:10.1016/j.devcel.2004.09.013.
- [172] M.-H. Lee, B. Hook, G. Pan, A.M. Kershner, C. Merritt, G. Seydoux, et al., Conserved regulation of MAP kinase expression by PUF RNA-binding proteins., *PLoS Genet.* 3 (2007) e233. doi:10.1371/journal.pgen.0030233.
- [173] I. Kurisaki, T. Iwai, M. Yamashita, M. Kobayashi, E. Ito, I. Matsuoka, Identification and expression analysis of rainbow trout pumilio-1 and pumilio-2., *Cell Tissue Res.* 327 (2007) 33–42. doi:10.1007/s00441-006-0260-y.
- [174] G. Chen, W. Li, Q.-S. Zhang, M. Regulski, N. Sinha, J. Barditch, et al., Identification of synaptic targets of *Drosophila* pumilio., *PLoS Comput. Biol.* 4 (2008) e1000026. doi:10.1371/journal.pcbi.1000026.
- [175] J. Dubnau, A.-S. Chiang, L. Grady, J. Barditch, S. Gossweiler, J. McNeil, et al., The staufen/pumilio pathway is involved in *Drosophila* long-term memory., *Curr. Biol.* 13 (2003) 286–96.
- [176] R. Fiore, S. Khudayberdiev, M. Christensen, G. Siegel, S.W. Flavell, T.-K. Kim, et al., Mef2-mediated transcription of the miR379-410 cluster regulates activity-dependent dendritogenesis by fine-tuning Pumilio2 protein levels., *EMBO J.* 28 (2009) 697–710. doi:10.1038/emboj.2009.10.
- [177] C.J. Mee, E.C.G. Pym, K.G. Moffat, R.A. Baines, Regulation of neuronal excitability through pumilio-dependent control of a sodium channel gene., *J. Neurosci.* 24 (2004) 8695–703. doi:10.1523/JNEUROSCI.2282-04.2004.
- [178] B.A. Schweers, K.J. Walters, M. Stern, The *Drosophila melanogaster* translational repressor pumilio regulates neuronal excitability., *Genetics.* 161 (2002) 1177–85.
- [179] J.P. Vessey, A. Vaccani, Y. Xie, R. Dahm, D. Karra, M.A. Kiebler, et al., Dendritic localization of the translational repressor Pumilio 2 and its contribution to dendritic stress granules., *J. Neurosci.* 26 (2006) 6496–508. doi:10.1523/JNEUROSCI.0649-06.2006.
- [180] B. Ye, C. Petritsch, I.E. Clark, E.R. Gavis, L.Y. Jan, Y.N. Jan, Nanos and Pumilio are essential for dendrite morphogenesis in *Drosophila* peripheral neurons., *Curr. Biol.* 14 (2004) 314–21. doi:10.1016/j.cub.2004.01.052.
- [181] J.L. Bachorik, J. Kimble, Redundant control of the *Caenorhabditis elegans* sperm/oocyte switch by PUF-8 and FBF-1, two distinct PUF RNA-binding proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (2005) 10893–10897. doi:10.1073/pnas.0504593102.
- [182] C.B. Walser, G. Battu, E.F. Hoier, A. Hajnal, Distinct roles of the Pumilio and FBF translational repressors during *C. elegans* vulval development., *Development.* 133 (2006) 3461–71. doi:10.1242/dev.02496.
- [183] M.J. Nolde, N. Saka, K.L. Reinert, F.J. Slack, The *Caenorhabditis elegans* pumilio homolog, puf-9, is required for the 3'UTR-mediated repression of the let-7 microRNA target gene, hbl-1., *Dev. Biol.* 305 (2007) 551–63. doi:10.1016/j.ydbio.2007.02.040.
- [184] D.D. Barker, C. Wang, J. Moore, L.K. Dickinson, R. Lehmann, Pumilio is essential for function but not for distribution of the *Drosophila* abdominal determinant Nanos., *Genes Dev.* 6 (1992) 2312–2326. doi:10.1101/gad.6.12a.2312.
- [185] Y. Murata, R.P. Wharton, Binding of pumilio to maternal hunchback mRNA is required for posterior patterning in *drosophila* embryos, *Cell.* 80 (1995) 747–756. doi:10.1016/0092-8674(95)90353-4.
- [186] R.P. Wharton, J. Sonoda, T. Lee, M. Patterson, Y. Murata, The Pumilio RNA-binding domain is also a translational regulator., *Mol. Cell.* 1 (1998) 863–72.
- [187] C. Gamberi, D.S. Peterson, L. He, E. Gottlieb, An anterior function for the *Drosophila* posterior determinant Pumilio., *Development.* 129 (2002) 2699–2710.
- [188] A.P. Gerber, D. Herschlag, P.O. Brown, Extensive association of functionally and cytotopically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast., *PLoS Biol.* 2 (2004) E79. doi:10.1371/journal.pbio.0020079.
- [189] A.P. Gerber, S. Luschnig, M.A. Krasnow, P.O. Brown, D. Herschlag, Genome-wide identification of mRNAs associated with the translational regulator PUMILIO in *Drosophila melanogaster*., *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. U. S. A. 103 (2006) 4487–92. doi:10.1073/pnas.0509260103.
- [190] L.J. García-Rodríguez, A.C. Gay, L.A. Pon, Puf3p, a Pumilio family RNA binding protein, localizes to mitochondria and regulates mitochondrial biogenesis and motility in budding yeast, *J. Cell Biol.* 176 (2007) 197–207. doi:10.1083/jcb.200606054.
- [191] Y. Saint-Georges, M. Garcia, T. Delaveau, L. Jourden, S. Le Crom, S. Lemoine, et al., Yeast mitochondrial biogenesis: a role for the PUF RNA-binding protein Puf3p in mRNA localization., *PLoS One.* 3 (2008) e2293. doi:10.1371/journal.pone.0002293.
- [192] C.N. David, A quantitative method for maceration of *hydra* tissue, *Wilhelm Roux Arch. Für Entwicklungsmechanik Der Org.* 171 (1973) 259–268. doi:10.1007/BF00577724.
- [193] A. Kun, L. Otero, J.R. Sotelo-Silveira, J.R. Sotelo, Ribosomal distributions in axons of mammalian myelinated fibers, *J. Neurosci. Res.* 85 (2007) 2087–2098. doi:10.1002/jnr.21340.
- [194] M. Johnson, I. Zaretskaya, Y. Raytselis, Y. Merezuk, S. McGinnis, T.L. Madden, NCBI BLAST: a better web interface, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) W5–W9.
- [195] J.D. Thompson, T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D.G. Higgins, The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 4876–4882.
- [196] T.A. Hall, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41 (1999) 95–98.
- [197] K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar, MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods, *Mol. Biol. Evol.* 28 (2011) 2731–2739.
- [198] R.C. Edgar, MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 1792–1797. doi:10.1093/nar/gkh340.
- [199] M.N. Price, P.S. Dehal, A.P. Arkin, FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments, *PLoS One.* 5 (2010). doi:10.1371/journal.pone.0009490.
- [200] A. Costáble, Superfamilia SCP/TAPS del cestodo *Mesocestoides corti*. Contribución a la dilucidación del rol de estas proteínas durante el desarrollo estrobilar, Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. PEDECIBA. Fac. Ciencias - UdelaR. Montevideo - Uruguay., 2013.
- [201] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method., 25 (2001). doi:10.1006/meth.2001.1262.
- [202] E.F. Lascano, E.A. Coltorti, V.M. Varela-Díaz, Fine structure of the germinal membrane of *Echinococcus granulosus* cysts., *J. Parasitol.* 61 (1975) 853–60.
- [203] A.I. Lalanne, Estudios moleculares del desarrollo de cestodos: genes Hox y LIM-homeobox de *Echinococcus granulosus* y *Mesocestoides corti*, Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. PEDECIBA. Fac. Ciencias - UdelaR. Montevideo - Uruguay., 2003.
- [204] H. Yaegashi, C. Howard, G. McKerr, A. Burns, Stereological estimation of the total number of neurons in the asexually dividing tetrathyridium of *Mesocestoides corti*, *Parasitology.* 106 (1993) 177–183. doi:http://dx.doi.org/10.1017/S0031182000074977.
- [205] N.B. Terenina, M. Reuter, M.K.S. Gustafsson, An experimental, NADPH-diaphorase histochemical and immunocytochemical study of *Mesocestoides vogae* tetrathyridia, *Int. J. Parasitol.* 29 (1999) 787–793. doi:10.1016/S0020-7519(99)00027-2.
- [206] Z. V. Korneva, Characterization of Cestoda tissue organization, *Biol. Bull.* 40 (2013) 146–157. doi:10.1134/S1062359013020052.
- [207] F.J. Etges, V. Marinakis, Formation and excretion of calcareous bodies by the metacystode (Tetrathyridium) of *Mesocestoides vogae*., *J. Parasitol.* 77 (1991) 595–602.
- [208] R.. T.. Young, Some Unsolved Problems of Cestode Structure and Development, *Trans. Am. Microsc. Soc.* 54 (1935) 229–239.

- [209] R.D. Lumsden, R. Specian, THE MORPHOLOGY, HISTOLOGY, AND FINE STRUCTURE OF THE ADULT STAGE OF THE CYCLOPHYLLIDEAN TAPEWORM *Hymenolepis diminuta*, ACADEMIC PRESS, INC., 1980. doi:10.1016/B978-0-12-058980-7.50008-7.
- [210] M.F. Domínguez, U. Koziol, V. Porro, A. Costábile, S. Estrade, J. Tort, et al., A new approach for the characterization of proliferative cells in cestodes, *Exp. Parasitol.* 138 (2014) 25–29. doi:10.1016/j.exppara.2014.01.005.
- [211] R. Nunez, DNA Measurement and Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry, *Curr. Issues Mol. Biol.* 3 (2001) 67–70.
- [212] H. Kang, A.S. Alvarado, Flow cytometry methods for the study of cell-cycle parameters of planarian stem cells, *Dev. Dyn.* 238 (2009) 1111–1117. doi:10.1002/dvdy.21928.
- [213] E. Saló, J. Bagnà, Regeneration and pattern formation in planarians. I. The pattern of mitosis in anterior and posterior regeneration in *Dugesia (G) tigrina*, and a new proposal for blastema formation., *J. Embryol. Exp. Morphol.* 83 (1984) 63–80.
- [214] D. Pfister, K. De Mulder, I. Philipp, G. Kuales, M. Hrouda, P. Eichberger, et al., The exceptional stem cell system of *Macrostomum lignano*: screening for gene expression and studying cell proliferation by hydroxyurea treatment and irradiation., *Front. Zool.* 4 (2007) 9. doi:10.1186/1742-9994-4-9.
- [215] M. Spiliotis, D. Tappe, L. Sesterhenn, K. Brehm, Long-term in vitro cultivation of *Echinococcus multilocularis* metacestodes under axenic conditions., *Parasitol. Res.* 92 (2004) 430–2. doi:10.1007/s00436-003-1046-8.
- [216] M. Spiliotis, S. Lechner, D. Tappe, C. Scheller, G. Krohne, K. Brehm, Transient transfection of *Echinococcus multilocularis* primary cells and complete in vitro regeneration of metacestode vesicles, *Int. J. Parasitol.* 38 (2008) 1025–1039. doi:10.1016/j.ijpara.2007.11.002.
- [217] K. Brehm, M. Spiliotis, Recent advances in the in vitro cultivation and genetic manipulation of *Echinococcus multilocularis* metacestodes and germinal cells., *Exp. Parasitol.* 119 (2008) 506–15. doi:10.1016/j.exppara.2008.03.007.
- [218] A. Costábile, Caracterización transcriptómica de neoblastos de platelmintos parásitos., Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas (en curso). PEDECIBA. Fac. Ciencias - UdelaR. Montevideo - Uruguay., 2014.
- [219] J. Hagen, J.-P.Y. Scheerlinck, R.B. Gasser, Knocking down schistosomes - promise for lentiviral transduction in parasites., *Trends Parasitol.* 31 (2015) 324–32. doi:10.1016/j.pt.2015.03.009.
- [220] S. Tyler, M. Hooge, Comparative morphology of the body wall in flatworms (Platyhelminthes), *Can. J. Zool.* 82 (2004) 194–210. doi:10.1139/z03-222.
- [221] R. Leducq, C. Gabrion, Developmental changes of *Echinococcus multilocularis* metacestodes revealed by tegumental ultrastructure and lectin-binding sites., *Parasitology.* 104 (1992) 129–141. doi:10.1017/S003118200006087X.
- [222] M.M. Markoski, E.S. Trindade, G. Cabrera, A. Laschuk, N. Galanti, A. Zaha, et al., Praziquantel and albendazole damaging action on in vitro developing *Mesocestoides corti* (Platyhelminthes: Cestoda), *Parasitol. Int.* 55 (2006) 51–61. doi:10.1016/j.parint.2005.09.005.
- [223] N. Dell’Oca, Estandarización de la interferencia de ARN en *Fasciola hepatica*., Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. PEDECIBA. Fac. Ciencias - UdelaR. Montevideo - Uruguay., 2016.
- [224] G. Rinaldi, M.E. Morales, M. Cancela, E. Castillo, P.J. Brindley, J.F. Tort, Development of Functional Genomic Tools in Trematodes: RNA Interference and Luciferase Reporter Gene Activity in *Fasciola hepatica*, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2 (2008) e260. doi:10.1371/journal.pntd.0000260.

APÉNDICES

1. Obtención del Material parasitario

1.1 Cultivo de *M. corti*

Hanks: 9.8g/1 sales de Hanks (*Sigma - Aldrich*, catálogo número H6136, Lote 087K83012), 350mg/1 NaHCO₃ (Fluka). Se ajustó el pH a 7.5 y se esterilizó por filtración.

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

1.2 Extracción de ARN y proteínas

PBS (Buffer Fosfato salino): 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄. Se ajustó el pH a 7.4 y se esterilizó por autoclavado. En el caso de utilizarlo para extracción de ARN se utilizó PBS en tabletas (*Sigma - Aldrich*, catálogo número P4417) disueltas en agua DEPC (*Sigma - Aldrich*).

2. Preparación de material para estudios histológicos

2.1 Hibridación in toto de ARN

PBSTx: PBS – 0.5% Triton-X100

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

3. Electroforesis

3.1 Ácidos nucleicos

Buffer TAE 1X: 40mM Tris base, 20mM ácido acético, 1mM EDTA; pH 8.4.

Buffer de carga 6X: 0.25% Azul de bromofenol, 0.25% Azul de xilencianol, 30% Glicerol

4. Caracterización morfológica de células de *M. corti*

4.1 Inmunohistoquímica sobre cortes y suspensiones celulares

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

4.2 Microscopia Electrónica de Transmisión

PHEM: EGTA 10mM, Pipes 60mM, Hepes 25mM, 2mM MgCl₂. Esterilizado por filtración.

5. Estudio de Marcadores moleculares de *M. corti*

5.1. Análisis de expresión espacial del gen pL10

5.1.1 Cuantificación de sondas marcadas con Digoxigenina

Buffer 1: 100mM Tris – HCl pH 7.5, 150mM NaCl.

Buffer 2: 0.5% w/v agente de bloqueo (*Boehringer*) en *buffer* 1

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

Buffer de revelado: 330µg/ml NBT (*Amresco*), 167µg/ml BCIP (*Amresco*) en *Buffer* 3

5.1.2 Hibridación *in toto* sobre organismos enteros

Proteínasa K: 20µg/ml (*New England Biolabs*) en PBSTx con 0.1% SDS

Solución de prehibridación 50%: Formamida, 5X SCC, 1mg/ml tRNA, 1% Tween-20

Solución de hibridación: 0.1ng/µl de sonda desnaturaliza en *buffer* de prehibridación complementado con 5% de sulfato de dextrano.

Solución de lavado 1: Una parte de Solución de prehibridación con una parte de 2X SCC, 0.1% TritonX-100.

Solución de lavado 2: 2X SCC, 0.1% TritonX-100

Solución de lavado 3: 0.2X SCC, 0.1% TritonX-100

MABT: 1X MAB, 0.1% Tween-20

Solución de bloqueo: 5% Suero de caballo en MABT

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

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

5.1.3 Hibridación *in situ* sobre suspensiones celulares

Solución de prehibridación: 100 ng/ ml de heparina, 3X SSC, DTT

Solución de hibridación: 2 ng/ μ l de sonda desnaturaliza en *buffer* de prehibridación

Solución de lavado 1: Una parte de Solución de prehibridación con una parte de 2X SCC, 0.1% TritonX-100.

Solución de bloqueo: 2% reactivo de bloqueo, 5% Suero de caballo en MABT



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexpr



Research Brief

A new approach for the characterization of proliferative cells in cestodes



M.F. Domínguez^{a,1}, U. Koziol^{a,b,1}, V. Porro^c, A. Costáble^{a,d}, S. Estrade^a, J. Tort^d, M. Bollati-Fogolin^c, E. Castillo^{a,*}

^aSección Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

^bInstitute for Hygiene and Microbiology, University of Würzburg, Würzburg, Germany

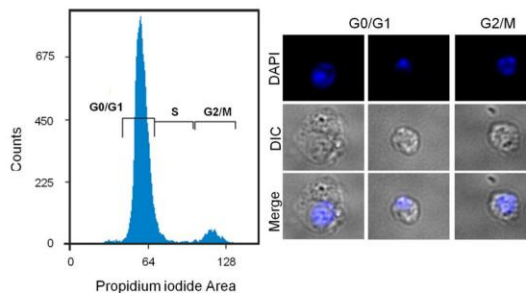
^cUnidad de Biología Celular, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

^dDepartamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

HIGHLIGHTS

- Optimization of a method to obtain cell suspensions of the cestode *Mesocostoides corti*.
- Cell cycle analysis of cell suspensions by flow cytometry.
- Isolation of cellular fractions in G0/G1 and G2/M phase of *M. corti* by cell sorting.
- The cells isolated on the G2/M fraction have the characteristics of germinative cells.
- It is possible to obtain RNA from the cells isolated by FACS.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 November 2013

Received in revised form 8 January 2014

Accepted 16 January 2014

Available online 24 January 2014

Keywords:

Cestodes

Proliferative cells

Flow cytometry

FACS

Mesocostoides corti

ABSTRACT

Cestodes show a remarkable proliferative capability that sustains the constant growth and differentiation of proglottids essential for their lifestyle. It is believed that a separate population of undifferentiated stem cells (the so-called germinative cells) are the only cells capable of proliferation during growth and development. The study of this particular cell subpopulation is hampered by the current lack of methods to isolate it. In this work, we developed a reproducible flow cytometry and cell sorting method to quantify and isolate the proliferating cells in the tetrathyridia larvae of the model cestode *Mesocostoides corti*, based on the DNA content of the cells. The isolated cells display the typical germinative cell morphology, and can be used for RNA isolation with a yield in the ng to µg range. We expect that this approach may facilitate the characterization of the germinative cells in *M. corti* and other model tapeworms.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Adult cestodes show constant growth, producing new segments from the generative region of the neck. Within each segment, male and female reproductive systems are formed and produce a massive output of eggs by sexual reproduction. These processes require abundant cell proliferation and differentiation. Evidence

from different cestode models indicates that similarly to what happens in free living flatworms, only undifferentiated stem cells proliferate (the so-called “neoblasts” in free living flatworms and “germinative cells” in cestodes), whereas differentiated somatic cells do not divide (Gustafsson, 1990; Koziol and Castillo, 2011; Reuter and Kreshchenko, 2004). These germinative cells are thought to be responsible for all cell proliferation and renewal, although it is not clear so far whether only one or several morphologically similar germinative cell populations exist.

We and others have used *Mesocostoides corti* as a model to study the proliferation and differentiation of germinative cells (Espinosa

* Corresponding author. Address: Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, CP 11400 Montevideo, Uruguay. Fax: +598 25258617.

E-mail address: estelacasti@gmail.com (E. Castillo).

¹ These authors contributed equally to this work.

et al., 2007; Hess, 1981, 1980; Koziol et al., 2010). *M. corti* is particularly well suited for this since it is possible to easily culture and experimentally manipulate the tetrathyridia larvae *in vitro*, and to induce their development into adult worms (Barret et al., 1982; Markoski et al., 2003; Saldaña et al., 2001; Thompson et al., 1982). However, simple methods for rapidly quantifying cell proliferation and cell cycle parameters in cestodes are currently lacking, except for hydatid vesicles of *Echinococcus multilocularis* (Spiliotis et al., 2008). Methods for isolating cestode germinative cells would allow *in vitro* culture and gene expression analyses, an essential step in characterizing these particular cells. In other flatworms, X-ray irradiation has been used to eliminate the neoblasts from the tissues, and the resulting animals were used for obtaining the neoblast-specific transcriptome by comparison with unirradiated controls (e.g. (Eisenhoffer et al., 2008; Rossi et al., 2007)). In cestodes, however, it appears that even high irradiation doses are ineffective (Pohle et al., 2011), and our own unpublished results), making the isolation of germinative cells a more attractive alternative for gene expression studies. Relatedly, the neoblasts of planarians have been isolated by cell sorting, based on their size and DNA content (since neoblasts are small and are the only cells that proliferate) (Hayashi et al., 2006). These enriched neoblast fractions were also used to study gene expression in the stem cell compartment, without any interference from the irradiated differentiated cells (Onal et al., 2012).

In this work, we have developed flow cytometry methods for the quantification and isolation of proliferating cells in *M. corti*. These methods can now be applied for studying the germinative cells in this model, and are likely to be easily adapted to other cestode models such as *Echinococcus multilocularis* larvae (Brehm, 2010a) and *Hymenolepis microstoma* adults (Cunningham and Olson, 2010).

2. Materials and methods

2.1. Parasite culture and preparation of dissociated cells of *M. corti*

Mice infected with *M. corti* tetrathyridia were kindly donated by Jenny Saldaña (Laboratorio de Experimentación Animal, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay). Parasite removal, culture and induction of strobilization were performed as previously described (Britos et al., 2000; Koziol et al., 2010).

After 6 days of culture, tetrathyridia were washed with modified RPMI (Koziol et al., 2010) supplemented with 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The worms were cut into small pieces with a scalpel in a Petri dish with a minimal solution volume. The resultant fragments were incubated in a solution of 0.1% (w/v) trypsin (Sigma–Aldrich) in modified RPMI (lacking fetal bovine serum) with 2 mM EDTA, during 10 min at 37 °C in a hybridization oven with mild agitation (45 strokes/min). Tissues were then very gently broken with a mortar mallet on the petri dish and placed on a magnetic stirrer at low speed for 5 min at room temperature. The samples were then dissociated into single cells by gentle pipetting. To inactivate trypsin, 1% fetal bovine serum was added and the cellular debris was allowed to settle. The supernatant was centrifuged for 5 min at 1300g and the pellet was re-suspended in 2 ml of modified RPMI supplemented with 2 mM EDTA. The cell mixture was then filtered through 45 µm pore-size gauze.

2.2. Preparation of single-cell suspensions for fluorescence-activated cell sorting analysis

Viable single-cell suspensions were identified by selective staining with Calcein AM (Sigma–Aldrich; excitation 485 nm;

emission 530 nm), an intracellular esterase substrate, useful to determine the cellular volume of viable cells. Dead cells were identified by their inability to exclude propidium iodide (Sigma–Aldrich, excitation 535, emission 560–720 nm). Cell cycle analysis was performed by staining nuclear DNA with Hoechst 33342 (Invitrogen; excitation 360 nm, emission 400–550 nm). For staining, single-cells suspensions were incubated at 20 °C for 90 min in modified RPMI with 2 mM EDTA containing 0.02 µg/ml Calcein AM. Cells were pelleted by centrifugation at 1300g for 5 min and resuspended in phosphate buffer saline (PBS) with 2 mM EDTA at an appropriate cell density. Hoechst 33342 was added at a final concentration of 5 µg/ml and incubated for 20 min at 37 °C. Propidium iodide was added at a final concentration of 2 µg/ml immediately before cytometry.

2.3. Flow cytometric analysis and cell sorting

2.3.1. Cell-cycle analyses by flow cytometry of fixed cells

The cell suspension was fixed in cold 70% ethanol for at least 2 h at 4 °C. The cells were centrifuged at 1300g for 5 min and resuspended in PBS with 2 mM EDTA and 0.1% Triton X-100. Then the cells were centrifuged again as described above and resuspended at an appropriate cell density.

Approximately 300,000 cells were treated with 50 µg/ml Ribonuclease A for 15 min at 37 °C and stained with 50 µg/ml of propidium iodide for 15 min at room temperature protected from light. Flow cytometric analysis was performed using a flow cytometer CyAn (Beckman Coulter).

2.3.2. Cell-cycle analyses and flow cytometry sorting of live cells

Flow cytometric analysis and cell sorting was performed using a High-Speed cell sorter MoFlo (Beckman Coulter) equipped with a solid state diode 488 nm laser and a water-cooled argon ion laser (Coherent, Innova 90C) tuned to emit at 363 nm of excitation wavelength. Both lasers power were set to 100 mW. Analysis of the following parameters was carried out with Summit 4.3 software (Beckton Dickinson): forward-angle light scatter, sideward scatter, FL 1 channel (530/40 band pass) for Calcein AM detection, FL 2 channel (580/30 band pass) for propidium iodide and FL 7/FL 8 channels for Hoechst 33342 determination and pulse analysis for doublets discrimination (pulse-area/pulse height respectively at 450/65 nm range). Cells were sorted using a 70-nm nozzle at a rate of 500–1500/eps. Sorting mode was set in Sort purify 1–2 drops. Sorting decision was performed using the following gate strategies: FL 1/FL 2 plots to determine viable cells (Calcein AM positive/propidium iodide negative cells) FL 7/FL 8 Hoechst 33342 pulse analysis for doublet discrimination and G2/M selection and G1/G0 selection.

Cells suspensions and the sorted cells were analyzed with an Olympus IX81 fluorescence microscope with Filter cube U-MNUA2 and the images were collected with a Hamamatsu Orca ER camera using program Image Pro version 6.1.

RNA was purified with TRIreagent® (Sigma–Aldrich) and the quantification was performed using Qubit® RNA BR Assay Kit (Invitrogen) as instructed by the manufacturer.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of dissociation protocols for maximum cell yield, viability and quantification of proliferating cells

Since it is widely accepted that germinative cells are the only proliferative cells in cestodes, it is essential for their isolation to start from cell suspensions with high viability. This would allow the identification of different phases of the cell cycle, providing a

tool for their selection. We tested and optimized several methods to dissociate the tetrathyridia, combining mechanical disaggregation with different titration series of concentration and incubation times with trypsin or trypsin-collagenase. To quantify the efficiency of the dissociation protocols in terms of cell yield and viability, the dissociated cells were counted, stained with propidium iodide and analyzed by flow cytometry (viable cells with intact membranes are not stained). Furthermore, we analyzed the DNA content of cells by flow cytometry of propidium iodide stained cells after ethanol fixation, in order to estimate the amount of cells obtained in the different stages of the cell cycle.

Cell suspensions obtained using 0.1% trypsin for 10 min in combination with mild mechanical separation contains less debris, more viable cells and less doublets of incompletely dissociated cells as compared to the other methods tested, being the optimal method described in Section 2.2 (Fig. 1A). With this method, we could routinely obtain in the order of 10^7 cells starting from only 200 μ l of tetrathyridia, and these cells were on average 90% viable.

We then analyzed the distribution of cells along the cell cycle (G0/G1, S y G2/M) by propidium iodide staining of fixed cells, obtaining peaks with an appropriate variation coefficient (CV) of 7.92. In these preparations, we estimated 92% of cells to be in G0/G1, 3.7% in S and 3.3% in G2/M (Fig. 1B). The cell distribution is comparable to that observed in other organisms (Kang and Sánchez Alvarado, 2009), indicating that the method is sensitive enough to detect proliferating cells in a pool of heterogeneous cells derived from the whole parasite. We also wished to determine if

we could detect and reproducibly measure changes in the number of proliferative cells during development or after experimental treatments. As a proof of principle, we determined the number of cells in G2/M after treatment with colchicine, a cytostatic agent that blocks the exit from M phase. Preliminary results have shown that after treatment for 12 h with 0.018% colchicine, we could detect an increase in the number of cells in G2/M.

In summary, we developed a dissociation method that combines good yield and cell viability, and that can be used in for quantification of the proliferating cells in *Mesocestoides* tetrathyridia.

3.2. Isolation of proliferative cells by fluorescence-activated cell sorting

Fluorescence-activated cell sorting (FACS) strategies have been applied to isolate highly enriched populations of planarian neoblasts (Hayashi et al., 2006; Higuchi et al., 2007). We have adapted and optimized this FACS-based approach to *M. corti* in order to isolate proliferating germinative cells, by selecting cells in the G2/M phase of the cell cycle. Single cell suspensions (obtained as described in Section 2.2) were triple-stained with Hoechst 33342, Calcein AM and propidium iodide. Hoechst 33342 is a dye for DNA that can be applied to live cells, whereas Calcein AM only labels viable cells, with a staining intensity that is approximately proportional to cell size in other organisms (Hayashi et al., 2006; Higuchi et al., 2007). We tested and optimized dye concentration by a titration series of Hoechst 33342 (2, 3, 4, or 5 μ g/ml) and Calcein AM (0.35, 0.25, or 0.02 μ g/ml). We determined that optimal

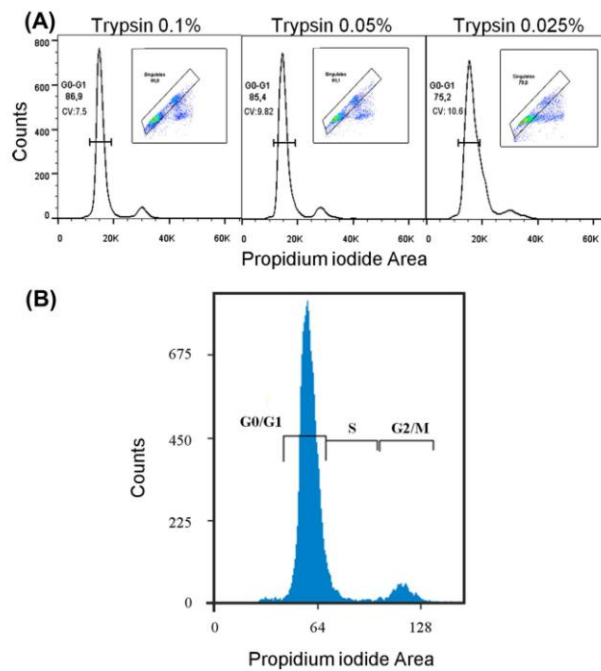


Fig. 1. Flow cytometric cell-cycle analyses of fixed cells with Propidium iodide staining. (A) Representative plots of the cell cycle profile obtained with several trypsin concentrations during the optimization of dissociation protocols. (B) Representative frequency plots of the cell-cycle profile obtained from analyzing the heterogeneous mixture of cells obtained after dissociating complete parasite into individual cells. Cell cycle was determined by counting all the cells in the sample and plotting their respective DNA content. The two prominent peaks represent G0/G1 and G2/M phase cells, respectively. The intermediate region between peaks represents S phase cells.

staining was reproducibly obtained by using 5 µg/ml of Hoechst 33342 for 20 min at 37° C and 0.02 µg/ml of Calcein AM for 90 min at room temperature. The cell suspension is next stained with propidium iodide to label non-viable cells for later elimination during sorting. We applied this protocol to samples of *M. corti* at different time points after the induction of segmentation by sodium taurocholate (TC) treatment, in order to determine the best

time point for the isolation of G2/M cells. We found that within the first 13 days of culture, the best results were obtained after 6 days of TC treatment, as determined by the absolute number of cells in G2/M, and the clear separation of the G0/G1 and G2/M peaks (data not shown).

Labeled cells were subjected to FACS analysis (Fig. 2). First, the degree of forward-angle light scatter and sideward scatter were

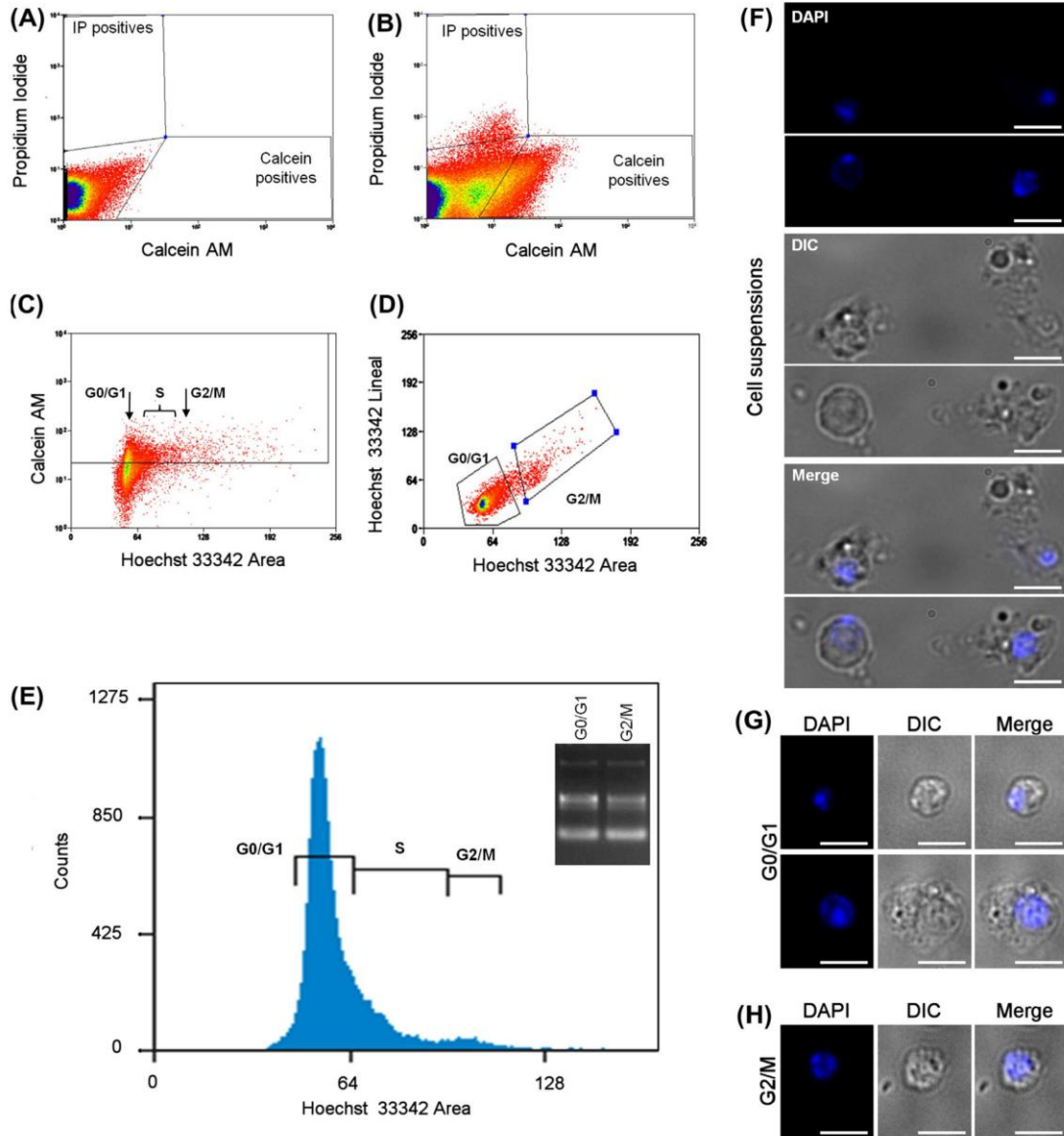


Fig. 2. Isolation of proliferating cells by FACS (Hoechst 33342/Calcein AM/propidium iodide staining). (A and B) Dot plot of propidium iodide intensity against Calcein AM intensity (A, control without staining; B, sample), which allows the identification of viable cells (Calcein AM positives/propidium iodide negatives) (C) Dot plot for single cells (Calcein AM vs Hoechst 33342 area). (D) Dot plot for single cells (Hoechst 33342 lineal vs Hoechst 33342 area). This dot plot allows the identification of the cell population for sorting based on the DNA content of individual cells, also eliminating cell doublets that have double Hoechst 33342 signal width. The analysis gates from which the cells are sorted are shown in the frame. (E) Histogram of Hoechst 33342 staining for live cells (from the data of Fig. 2D) reveals different DNA content of the parasite cells, which correspond to different phases of the cell cycle. The inset shows the RNA isolated from G0/G1 and the G2/M cell fractions. (F) Morphology of cells in the total cell suspensions, (G) in the G0/G1 fraction and (H) in the G2/M fraction.

used to exclude non-cellular debris and/or any large cell clumps present in the samples and selected the singlets by pulse analysis (data not shown). The samples were then analyzed based on the intensities of DNA and vital dyes. For the identification of viable cells, the relative fluorescence intensity of propidium iodide was plotted against the relative fluorescence intensity of Calcein AM. The cutoff was selected with an unstained control and single staining for each dye (Fig. 2A). Fig. 2B shows the identification of viable cells in the sample in which most of the cells were Calcein AM positive/propidium iodide negative. The dot plot Calcein AM against Hoechst 33342 intensity allows the identification of the *M. corti* cells population for FACS analyses (Fig. 2C). These cells were selected for cell cycle analysis by Hoechst 33342 staining (Fig. 2D, E). Based on the DNA content of individual cells, we could clearly identify the cells in G2/M for sorting. The number of cells in G2/M obtained by this method is estimated to be 3–5%, which is congruent with the results obtained by propidium iodide staining of fixed cells (as previously described in Section 3.1). The morphological traits of sorted G2/M were examined microscopically. This fraction consisted of homogeneous cells in terms of size (approximately 5 µm in diameter) and shape (Fig. 2H). These cells were spherical with large nuclei and scant cytoplasm, which is characteristic of germinative cells (compared with the heterogeneous morphology of non-sorted cells (Fig. 2F), and cells in G0/G1 phase (Fig. 2G). With this approach, we could obtain in the order of 10⁵ cells in G2/M phase from only 600 µl of starting tetrathyridia. These cells were used for RNA isolation (200–500 ng obtained from one FACS procedure, Fig. 2E, inset) which has been successfully used for RT-PCR (data not shown).

In conclusion, we have developed and optimized flow cytometry methods to study and isolate proliferating cells in *M. corti*. Changes in the cell cycle of the parasite cells could be reproducibly determined using these flow cytometry assays in live and fixed cells. Our data indicate that the methodologies described here can be used to characterize cell cycle phenotypes caused by RNAi studies (Pierson et al., 2010; Pouchkina-Stantcheva et al., 2013) or drug treatments (Brehm, 2010b) in *Mesocostoides* and other larval and adult cestodes. Finally we have succeeded with the combinatorial use of the fluorescent dyes Hoechst 33342, Calcein AM and propidium iodide, which allowed us to isolate G0/G1 and G2/M cell populations that may be used for gene expression studies and highly enriched cultures of germinative cells. We expect that this approach will facilitate the characterization of the germinative cells in cestodes.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by Grants from: ANII Uruguay (Agencia Nacional para Investigación y Desarrollo) and CSIC (Comisión Sectorial de Investigación Científica), UDELAR, Uruguay, PEDECIBA, Uruguay. MFD was the recipient of a M.Sc fellowship from ANII.

References

- Barret, N.J., Smyth, J.D., Ong, S.J., 1982. Spontaneous sexual differentiation of *Mesocostoides corti* tetrathyridia in vitro. *Int. J. Parasitol.* 12, 315–322.
- Brehm, K., 2010a. *Echinococcus multilocularis* as an experimental model in stem cell research and molecular host–parasite interaction. *Parasitology* 137, 537–555.
- Brehm, K., 2010b. The role of evolutionarily conserved signalling systems in *Echinococcus multilocularis* development and host–parasite interaction. *Med. Microbiol. Immunol.* 199, 247–259.
- Britos, L., Domínguez, L., Ehrlich, R., Marín, M., 2000. Effect of praziquantel on the strobilar development of *Mesocostoides corti* in vitro. *J. Helminthol.* 74, 295–299.
- Cunningham, L.J., Olson, P.D., 2010. Description of *Hymenolepis microstoma* (Nottingham strain): a classical tapeworm model for research in the genomic era. *Parasit. Vectors* 3, 123.
- Eisenhoffer, G.T., Kang, H., Sánchez Alvarado, A., 2008. Molecular analysis of stem cells and their descendants during cell turnover and regeneration in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Cell Stem Cell* 3, 327–339.
- Espinoza, I., Gomez, C.R., Galindo, M., Galanti, N., 2007. Developmental expression pattern of histone H4 gene associated to DNA synthesis in the endoparasitic plathyhelminth *Mesocostoides corti*. *Gene* 386, 35–41.
- Gustafsson, M.K.S., 1990. The cells of a cestode. *Diphyllobothrium dendriticum* as a model in cell biology. *Acta Acad. Abo. Ser. B* 50, 13–44.
- Hayashi, T., Asami, M., Higuchi, S., Shibata, N., Agata, K., 2006. Isolation of planarian X-ray-sensitive stem cells by fluorescence-activated cell sorting. *Dev. Growth Differ.* 48, 371–380.
- Hess, E., 1980. Ultrastructural study of the tetrathyridium of *Mesocostoides corti* Hoeppli, 1925: tegumen and parenchyma. *Z. Parasitenk.* 61, 135–159.
- Hess, E., 1981. Ultrastructural study of the tetrathyridium of *Mesocostoides corti* Hoeppli, 1925 (Cestoda): pool of germinative cells and suckers. *Rev. Suisse Zool.* 88, 661–674.
- Higuchi, S., Hayashi, T., Hori, I., Shibata, N., Sakamoto, H., Agata, K., 2007. Characterization and categorization of fluorescence activated cell sorted planarian stem cells by ultrastructural. *Dev. Growth Differ.* 49, 571–581.
- Kang, H., Sánchez Alvarado, A., 2009. Flow cytometry methods for the study of cell-cycle parameters of planarian stem cells. *Dev. Dyn.* 238, 1111–1117.
- Kozioł, U., Castillo, E., 2011. Cell proliferation and differentiation in cestodes. In: Esteves, A. (Ed.), *Research in Helminths*. Transworld Research Network, Kerala, India, pp. 121–138.
- Kozioł, U., Domínguez, M.F., Marín, M., Kun, A., Castillo, E., 2010. Stem cell proliferation during in vitro development of the model cestode *Mesocostoides corti* from larva to adult worm. *Front. Zool.* 7, 22.
- Markoski, M.M., Bizarro, C.V., Farias, S., Espinoza, I., Galanti, N., Zaha, A., Ferreira, H.B., 2003. In vitro segmentation induction of *Mesocostoides corti* (Cestoda) tetrathyridia. *J. Parasitol.* 89, 27–34.
- Onal, P., Grün, D., Adamidi, C., Rybak, A., Solana, J., Mastrobuoni, G., Wang, Y., Rahn, H.-P., Chen, W., Kempa, S., Ziebold, U., Rajewsky, N., 2012. Gene expression of pluripotency determinants is conserved between mammalian and planarian stem cells. *EMBO J.* 31, 2755–2769.
- Pierson, L., Mousley, A., Devine, L., Marks, N.J., Day, T.A., Maule, A.G., 2010. RNA interference in a cestode reveals specific silencing of selected highly expressed gene transcripts. *Int. J. Parasitol.* 40, 605–615.
- Pohle, S., Ernst, R., MacKenzie, C., Spicher, M., Romig, T., Hemphill, A., Gripp, S., 2011. *Echinococcus multilocularis*: the impact of ionizing radiation on metacestodes. *Exp. Parasitol.* 127, 127–134.
- Pouchkina-Stantcheva, N.N., Cunningham, L.J., Hrčková, G., Olson, P.D., 2013. RNA-mediated gene suppression and in vitro culture in *Hymenolepis microstoma*. *Int. J. Parasitol.* 43, 641–646.
- Reuter, M., Kreshchenko, N., 2004. Flatworm asexual multiplication implicates stem cells and regeneration. *Can. J. Zool.* 82, 334–356.
- Rossi, L., Salvetti, A., Marincola, F.M., Lena, A., Deri, P., Mannini, L., Batistoni, R., Wang, E., Gremigni, V., 2007. Deciphering the molecular machinery of stem cells: a look at the neoblast gene expression profile. *Genome Biol.* 8, R62.
- Saldaña, J., Marín, M., Fernández, C., Domínguez, L., 2001. In vitro taurocholate-induced segmentation and clustering of *Mesocostoides vogae* (syn. *corti*) tetrathyridia (Cestoda)—inhibition by cestocidal drugs. *Parasitol. Res.* 87, 281–286.
- Spiliotis, M., Lechner, S., Tappe, D., Scheller, C., Krohne, G., Brehm, K., 2008. Transient transfection of *Echinococcus multilocularis* primary cells and complete in vitro regeneration of metacestode vesicles. *Int. J. Parasitol.* 38, 1025–1039.
- Thompson, R.C., Jue Sue, L.P., Buckley, S.J., 1982. In vitro development of the strobilar stage of *Mesocostoides corti*. *Int. J. Parasitol.* 12, 303–314.

1. Códigos de acceso de secuencias de referencia utilizadas para determinar las relaciones de ortología con los genes aislados en este trabajo.

Identificador	Especie	Proteínas DEAD	Código de Acceso NCBI
Ce_GLH2	<i>Caenorhabditis elegans</i>	RNA helicase GLH-2	AAB03337.1
Ce_GLH1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	ATP-dependent RNA helicase glh-1	NP_491963.1
Ce_gRhel3	<i>Caenorhabditis elegans</i>	germline RNA helicase-4	AAC28387.1
Ce_gRhel4	<i>Caenorhabditis elegans</i>	ATP-dependent RNA helicase glh-3	NP_491681.1
Ci_DEADbox	<i>Ciona intestinalis</i>	DEAD-Box Protein	NP_001027593.1
Dr_DEADp	<i>Danio rerio</i>	putative RNA helicase (DEAD box)	CAA73349.1
Dr_DEADbox	<i>Danio rerio</i>	RNA helicase (DEAD box)	CAA72735.1
Dm_Vasa	<i>Drosophila melanogaster</i>	Vasa_DROME	NP_723899.1
DjVLGA	<i>Dugesia japonica</i>	DjVLGA	BAA34993.1
DjVLGB	<i>Dugesia japonica</i>	DjVLGB	BAA34994.1
Em_PL10p	<i>Echinococcus multilocularis</i>	atp dependent rna helicase an	CDI97219.1
Ef_PoPL10r	<i>Ephydatia fluviatilis</i>	PL10-related protein PoPL10	BAB13309.1
Ef_PoVAS1r	<i>Ephydatia fluviatilis</i>	Vasa-related protein PoVAS1, partial	BAB13310.1
Gg_Cvh	<i>Gallus gallus</i>	Cvh	BAB12337.1
Dd_PIVAS1r	<i>Girardia dorotocephala</i>	Vasa-related protein PIVAS1	BAB13313.1
Hm_CnPL10r	<i>Hydra vulgaris</i>	PL10-related protein CnPL10	BAB13306.1
Hm_CnVAS1r	<i>Hydra vulgaris</i>	vasa-related protein CnVAS1	BAB13307.1
MI_DEADb1	<i>Macrostomum lignano</i>	DEAD box helicase	CAL91031.1
MI_DEADb2	<i>Macrostomum lignano</i>	DEAD box helicase	CAL91030.1
Mm_DDX3X	<i>Mus musculus</i>	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	NP_034158.1
Mm_P110	<i>Mus musculus</i>	putative ATP-dependent RNA helicase P110	NP_149068.1
Mm_DDX4	<i>Mus musculus</i>	DDX4_Mouse	EDL18409
Ng_Rhel1	<i>Neobenedeniagirellae</i>	RNA helicase	BAF44659.1
Ng_Rhel2	<i>Neobenedeniagirellae</i>	RNA helicase	BAF44660.1
Ng_Rhel3	<i>Neobenedeniagirellae</i>	RNA helicase	BAF44661.1
Om_Vasa	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Vasa	NP_001117665.1
Pw_VASA2n	<i>Paragonimus westermani</i>	VASA2n	ABM30180.1
Rn_DDX4	<i>Rattus norvegicus</i>	RAT_DDX4	NP_001071115.1
Sj_belle	<i>Schistosoma japonicum</i>	belle	AX82519.1
Sj_DDX3X	<i>Schistosoma japonicum</i>	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	CAX73517.1
Sj_DDX5p	<i>Schistosoma japonicum</i>	putative ATP-dependent RNA helicase DDX5	CAX75400.1
Sm_DEADb1	<i>Schistosoma mansoni</i>	putative dead box ATP-dependent RNA helicase	CCD75090.1
Sm_DEADb2	<i>Schistosoma mansoni</i>	DEAD box ATP-dependent RNA helicase, putative	CCD58911.1
Sm_DEADb3	<i>Schistosoma mansoni</i>	putative dead box ATP-dependent RNA helicase	CCD77209.1
Sm_DEADb4	<i>Schistosoma mansoni</i>	DEAD box ATP-dependent RNA helicase, putative	CCD58866.1
Xl_DDX3	<i>Xenopus laevis</i>	putative ATP-dependent RNA helicase an3	NP_001095245.1

2. Códigos de acceso de secuencias de referencia utilizadas para identificar genes pertenecientes DEAD helicasas.

Proteínas DEAD (especie)	Número de Acceso
<i>DDX3X_Homo_sapiens</i>	O00571.3
<i>DDX3X_MOUSE</i>	Q62167.3
<i>DDX3Y_Homo_sapiens</i>	O15523.2
<i>DDX3Y_MOUSE</i>	Q62095.2
<i>DDX3L_MOUSE_pL10</i>	P16381.1
<i>DDX4_Homo_sapiens_vasa</i>	Q9NQI0.2
<i>DDX4_MOUSE_vasa</i>	Q61496.2
<i>DDX43_Homo_sapiens</i>	NP_061135.2
<i>DDX53_Homo_sapiens</i>	Q86TM3.3
<i>DDX5_Homo_sapiens_p68</i>	P17844.1
<i>DDX5_MOUSE_p68</i>	Q61656.2
<i>DDX17_Homo_sapiens_p72</i>	Q92841.2
<i>DDX17_MOUSE</i>	Q501J6.1
<i>DDX42_Homo_sapiens</i>	Q86XP3.1
<i>DDX42_MOUSE</i>	Q810A7.3
<i>DDX23_Homo_sapiens</i>	AAH02366.1
<i>DDX46_Homo_sapiens</i>	NP_055644.2
<i>DDX46_Mus_musculus</i>	AAH92240.1
<i>DDX41_Homo_sapiens</i>	Q9UJV9.2
<i>DDX41_Mus_musculus</i>	AAH11308.1
<i>DDX1_Homo_sapiens</i>	Q92499.2
<i>DDX1_Mus_musculus</i>	NP_598801.1
<i>DDX24_Homo_sapiens</i>	Q9GZR7.1
<i>DDX24_MOUSE</i>	Q9ESV0.2
<i>DDX59_Homo_sapiens</i>	Q5T1V6.1
<i>DDX59_MOUSE</i>	Q9DBN9.1
<i>DDX52_Homo_sapiens</i>	Q9Y2R4.3
<i>DDX28_Homo_sapiens</i>	NP_060850.2
<i>DDX28_Mus_musculus</i>	NP_082314.2

Proteínas DEAD (especie)	Número de Acceso
<i>eIF4I_Homo_sapiens</i>	P60842
<i>eIF4I_Mouse</i>	P60843
<i>RCK_Homo_sapiens</i>	BAA04482
<i>DDX6_mouse</i>	P54823
<i>Ddx19A_Homo_sapiens</i>	AAH05162
<i>Ddx19a_Mus_musculus</i>	AAH11270
<i>DDX25_Homo_sapiens</i>	Q9UHL0
<i>DDX25_Mus_musculus</i>	AAH61130
<i>DX39B_Homo_sapiens</i>	Q13838
<i>DX39B_MOUSE</i>	Q9Z1N5
<i>DDX20_Homo_sapiens</i>	Q9JJY4
<i>DDX20_MOUSE</i>	Q9UHI6
<i>DDX18_Homo_sapiens</i>	BAA91709.1
<i>DDX18_Mus_musculus</i>	NP_080136.2
<i>DDX10_Homo_sapiens</i>	AAH93654.1
<i>DDX10_Mus_musculus</i>	AAH23303.1
<i>DDX55_Homo_sapiens</i>	AAH30020.1
<i>DDX55_Mus_musculus</i>	BAC28459.1
<i>DDX31_Homo_sapiens</i>	AAH12726.2
<i>DDX31_Mus_musculus</i>	NP_001028466.2
<i>DDX47_Homo_sapiens</i>	Q9H0S4.1
<i>DDX47_MOUSE</i>	Q9CWX9
<i>DDX49_Homo_sapiens</i>	AAH02674
<i>Ddx27_Homo_sapiens</i>	Q96GQ7
<i>Ddx27_Mus_musculus</i>	AAH11321
<i>DDX54_Homo_sapiens</i>	AAL85336
<i>DDX54_MOUSE</i>	Q8K4L0

3. Códigos de ID de secuencias de *E. multilocularis*, *M. corti* y *S. mansoni* utilizadas para identificar genes pertenecientes DEAD helicasas.

	<i>E. multilocularis</i>	<i>M. corti</i>	<i>S. mansoni</i>
Número de ID	EmuJ_000511750	MCOS_0000588301	Smp_157660.1
	EmuJ_001009800	MCOS_0000850101	Smp_094020.1
	EmuJ_000900600	MCOS_0000885001	Smp_031010.1
	EmuJ_001058400	MCOS_0000076501	Smp_172030.1
	EmuJ_000194600	MCOS_0000755201	Smp_133120.1
	EmuJ_000545600	MCOS_0000785701	Smp_133120.2
	EmuJ_000567900	MCOS_0000441101	Smp_158970.1
	EmuJ_000098400	MCOS_0000044301	Smp_096530.1
	EmuJ_000793400	MCOS_0000370501	Smp_033710.1
	EmuJ_000640000	MCOS_0000374401	Smp_013790.1
	EmuJ_000122300	MCOS_0000465901	Smp_154320.1
	EmuJ_000086400	MCOS_0000222201	Smp_069600.1
	EmuJ_001183300	MCOS_0000251701	Smp_068440.1
	EmuJ_001193600	MCOS_0000014801	Smp_182110.1
	EmuJ_000035000	MCOS_0000689001	Smp_211330.1
	EmuJ_000853100	MCOS_0000174401	Smp_163110.1
	EmuJ_000097900	MCOS_0000147201	Smp_131770.1
	EmuJ_000505900	MCOS_0000464601	Smp_146340.1
	EmuJ_000805100	MCOS_0000542101	Smp_213800.1
	EmuJ_000777250	MCOS_0000000301	Smp_171180.1
	EmuJ_000110700	MCOS_0000419701	Smp_057020.1
	EmuJ_000150000	MCOS_0000489201	Smp_047110.1
	EmuJ_000127400	MCOS_0000656401	Smp_131360.1
	EmuJ_000789550		Smp_090440.1
	EmuJ_001094300		Smp_020200.1
	EmuJ_000546900		Smp_174210.1
	EmuJ_000666300		Smp_166400.1
	EmuJ_000123700		Smp_123410.1
	EmuJ_001058000		Smp_123410.2
	EmuJ_000941800		Smp_097660.1
	EmuJ_000346000		Smp_003660.1
	EmuJ_001180000		Smp_093690.1
	EmuJ_001197500		Smp_093690.2
		Smp_034190.1	
		Smp_034190.2	
		Smp_127120.1	