

**Genoma de *Echinococcus spp.*: análisis de enzimas involucradas
en la biogénesis y función de pequeños ARN.**

Bioq. Adolfo Daniel Fox

Tesis de Maestría en Microbiología Molecular Malbran-UNSAM

Directora de Tesis: Dra. Laura Kamenetzky

Lugar de trabajo:

Instituto de Investigaciones en Microbiología y
Parasitología Médica-Conicet-UBA

Buenos Aires, 2013

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

cDNA: ADN complementario obtenido de RNA

CO1: citocromo oxidasa subunidad 1

Ct: ciclo umbral en RT-PCR

dNTP: desoxiribonucleótido trifosfato

dsRBD: *double-strand RNA-binding domain*. Dominio de unión a doble cadena de RNA.

dsRNA: RNA de doble cadena

HIWI: homólogo humano de PIWI

LH: líquido hidatídico

µg: microgramo

µl: microlitro

mg miligramo

miRNA: micro RNA

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PIWI : P-element-induced wimpy testis. Testículos débiles inducidos por elementos P

PTGS: Silenciamiento Génico Post-Transcripcional

RISC : RNA-Induced Silencing Complexes: complejos de silenciamiento inducidos por ARN

RNAi: RNA interferencia

RFLP: polimorfismo en el tamaño de fragmentos de restricción

RT: retro transcripción

qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real.

sRNAs: RNA pequeño

siRNA: RNA pequeño interferente

SSCP: polimorfismo conformacional de cadena simple

Ta: Temperatura de annealing: temperatura establecida teniendo en cuenta el Tm de los primers que permite su hibridación al DNA molde

Tm: temperatura a la que la mitad de las moléculas de ds ADN están disociadas.

INDICE

Resumen.....	6
1 Introducción.....	7
1.1 Ubicación sistemática de <i>Echinococcus</i>	8
1.2 <i>Echinococcus granulosus</i> . Ciclo de vida y morfología de sus estadios.....	8
1.3 Genotipos de <i>E. granulosus</i>	13
1.4 Distribución de Genotipos en Argentina.....	15
1.5 Diferencias en Antígenos y Desarrollo entre genotipos.....	16
1.6 Enzimas de biogénesis y pequeños ARN.....	16
1.7 Proteínas Dicer, Argonauta, Drosha y Pasha.....	16
1.8 Herramientas moleculares para el análisis de expresión génica	19
2 Objetivos.....	24
3 Materiales y métodos.....	25
3.1 Determinación de genotipos.....	26
3.1.1 Preparación de muestras y extracción del material genético.....	26
3.1.2 Amplificación de ADN : PCR del gen mitocondrial CO1.....	27
3.1.3 Reacción de secuenciación Método enzimático de Sanger:.....	28
3.1.4 Purificación del producto de la reacción de secuenciación.....	29
3.1.5 Electroforesis capilar.....	29
3.1.6 Análisis de los resultados de secuenciación.....	29
3.2 Extracción de ARN de protoescolices.....	29
3.2.1 Obtención de cDNA	30

3.2.2	PCR cuantitativa (qPCR).....	30
3.3	Análisis bioinformático.....	31
4	Resultados.....	32
4.1	Genotipos de <i>Echinococcus granulosus</i>	33
4.1.1	Optimización de la tipificación.....	33
4.1.2	Secuenciación del gen mitocondrial CO1.....	34
4.1.3	Árbol filogenético de genotipo y especies de <i>Echinococcus</i>	36
4.2	Enzimas de biogénesis de biorreguladores de <i>E. granulosus</i>	36
4.2.1	Modelos génicos y calidad de cDNA.....	37
4.2.2	Proteínas Argonauta: cuantificación de su ARNm : Real Time PCR.....	37
4.2.3	Análisis de la expresión génica.....	40
5	Discusión.....	47
6	Apéndice.....	55
7	Referencias bibliográficas.....	72

RESUMEN

Echinococcus granulosus, el agente etiológico de la hidatidosis en los seres humanos y otras especies animales, se distribuye en todo el mundo. Este organismo presenta una importante variabilidad genética representada por cepas o genotipos (G1 a G10), con diferentes características biológicas, hospederos intermediarios y definitivos, diferencias en infectividad en humanos, variabilidad antigénica y de desarrollo. Este polimorfismo genético debe, en consecuencia, ser determinado previamente a las investigaciones que se deseen realizar. *E. granulosus* presenta un particular modo de desarrollo, tomando el protoescólex dos caminos diferentes de acuerdo al hospedero: en el intermediario con la formación de nuevo quiste y en el hospedero definitivo el parásito adulto. Debido a la importancia de los ARN pequeños en el desarrollo de metazoos, se consideraba esencial identificar y clasificar la vía de síntesis de ARN pequeños. Si bien se identificaron ARN pequeños (miRNA) en *E. granulosus* (Cucher y col., 2011) poco se sabe de su maquinaria de biogénesis. Uno de los principales miembros de esta vía son las proteínas pertenecientes a la familia Argonauta. Las proteínas de la familia Argonauta se asocian al RNA pequeño (sRNA) y forman complejos ARN-proteína que utilizan al sRNA como guía para silenciar de forma específica los ARN mensajeros con la consecuente degradación o represión de su traducción, formando parte del mecanismo de control de la expresión génica.

En este trabajo se optimizó la secuenciación parcial del gen CO1 como medio para identificar los genotipos, permitiendo realizar la técnica de manera eficiente y precisa.

Asimismo se identificaron y determinaron los genes Argonauta (EchiAgo) en protoescólices de *E. granulosus* y en el metacestode de *E. multilocularis* (especie de referencia) y se realizó la cuantificación relativa de su expresión mediante PCR en tiempo real. Las proteínas de la familia Argonauta tienen un rol imprescindible en el desarrollo de metazoos. En esta tesis se demuestra la expresión diferencial de EchiAgos con secuencias divergentes que podrían indicar función diferencial.

Palabras clave: *Echinococcus granulosus*, variabilidad genética, genotipo, ARN pequeños, proteínas Argonauta.

1. INTRODUCCION

1.1 Ubicación sistemática de *Echinococcus*.

Echinococcus granulosus pertenece a la clase Cestoda (familia Taeniidae) también llamado platelminto o gusano plano, endoparásito.

Su ubicación taxonómica es la siguiente:

Reino: Metazoa

Subreino: Eumetazoa

Rama: Bilateria

Grado: Acoelomata

Phylum: Platyhelminthes

Clase: Cestoda

Subclase: Eucestoda

Orden: Cyclophyllidea

Familia: Taeniidae

Género: *Echinococcus* (Rudolphi, 1801)

Especies: ***E. granulosus*** (Batsch, 1786)(Rudolphi, 1805)

E. multilocularis (Leuckart, 1863)

E. vogeli (Rausch y Berstein, 1972)

E. oligarthrus (Diesing, 1863)

E. shiquicus (Xiao, N 2005)

1.2 *Echinococcus granulosus* – Ciclo de vida y morfología de sus estadíos.

Los organismos parásitos de la clase cestoda necesitan dos hospederos para desarrollar su ciclo de vida. Un hospedero definitivo, mamífero carnívoro, donde residen como tenias maduras en su sistema gastrointestinal; y hospederos intermediarios como ovinos, porcinos, bovinos, equinos, camélidos y humanos (hospedero accidental), donde se desarrolla el metacestode o quiste hidatídico (Figura 1).

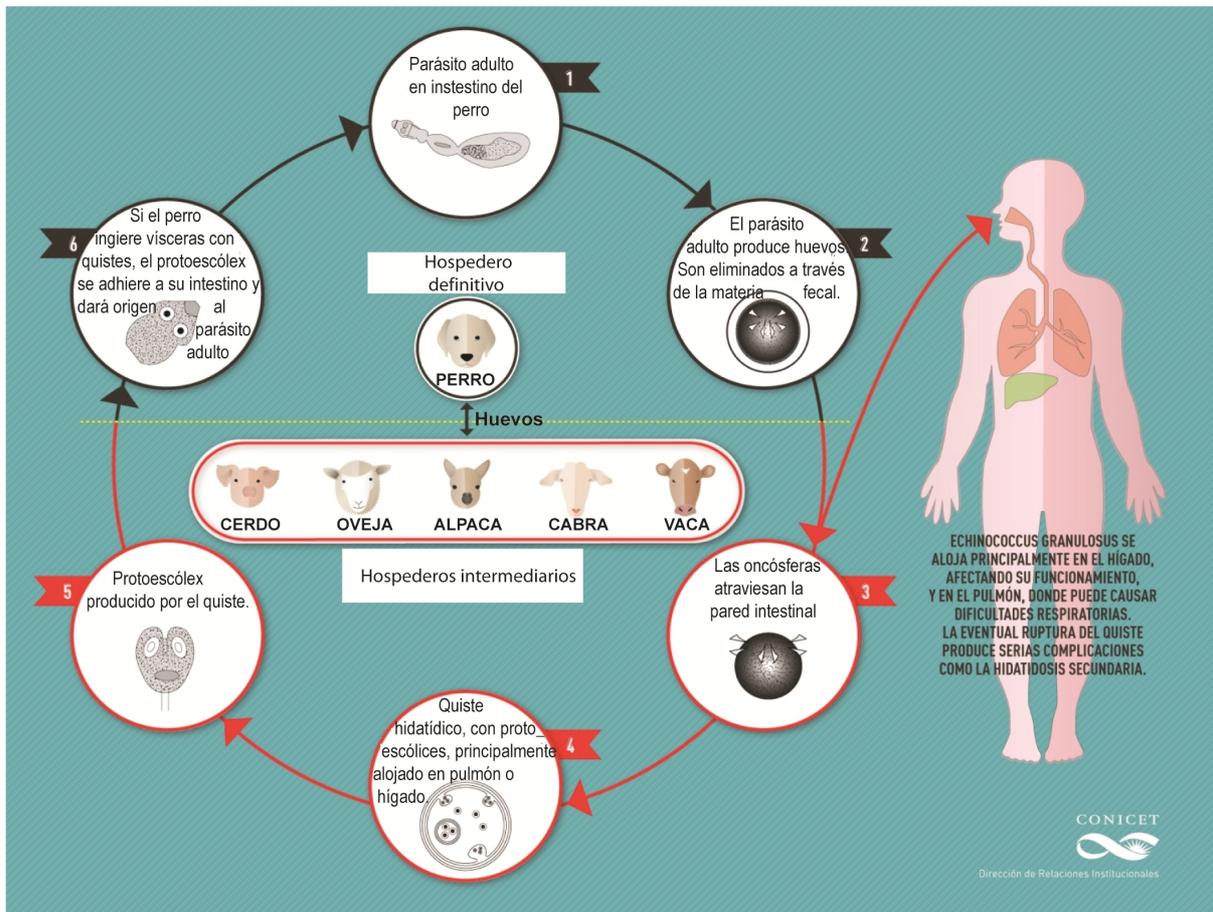


Figura 1. Ciclo de vida de *Echinococcus granulosus*.

La tenia está formada por una cabeza o escólex, cuello y cola. La cabeza posee ventosas que le permiten la absorción de alimentos y un róstelo con ganchos que posibilita su fijación a la pared intestinal del hospedero. La cabeza se conecta, mediante un cuello corto, con la parte inferior de la tenia, denominado cuerpo o estróbilo (Figura 2). El mismo está formado por segmentos independientes pero interconectados llamados proglótides. Los proglótides se desarrollan por debajo de la región del cuello, son hermafroditas y maduran desplazándose a la parte posterior a medida que nuevos segmentos se agregan en su origen.

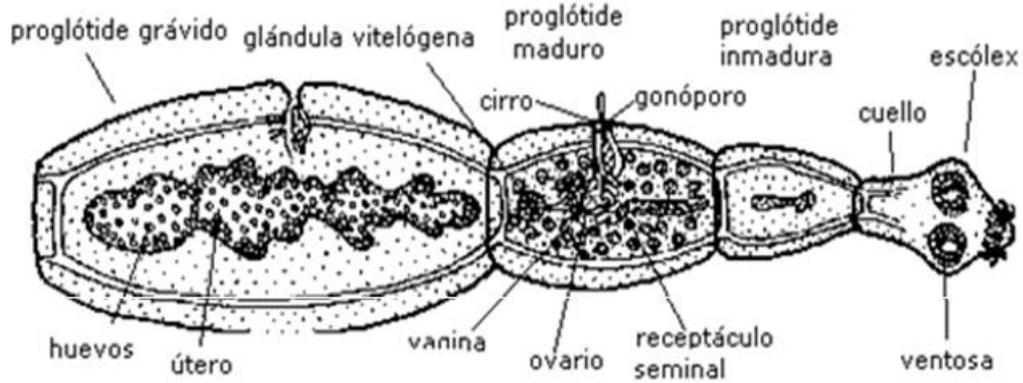


Figura 2. Morfología de adulto de *E. granulosus* (Tomado de Bogitsh y Cheng, 1998)

Las tenias alcanzan la madurez sexual entre tres y cuatro semanas luego de llegar al intestino de su hospedero definitivo. El proglótide grávido finalmente produce huevos (Figura 3) que serán liberados al medio ambiente mediante la materia fecal del hospedero. Estos huevos embrionados pueden infectar al hospedero intermediario inmediatamente, por ingestión de alimentos que los contengan, pudiendo existir otros mecanismos de infección como inhalación y deglución de huevos en ambientes contaminados. Cabe resaltar que en este estadio del ciclo de vida, *Echinococcus*, así como otros platelmintos como *Hymenolepis nana* o *Taenia spp.*, es ampliamente difundido en el ambiente, presentando prolongada infectividad, que puede durar meses o años, en campos con pastizales y en el ámbito doméstico (Mandell y col., 2006).



Figura 3. Huevo de *E. granulosus* en heces de hospedero definitivo (Imagen de CDC).

El huevo embrionado ingerido sufre la acción de enzimas liberando la oncósfera que penetra la mucosa intestinal, ganando la circulación sanguínea y linfática. Es luego transportada a alguno de los órganos del hospedero intermedio, generalmente hígado y pulmón y, con menor frecuencia, puede llegar al corazón, a las vísceras, riñones, bazo,

tiroides, mamas y cerebro, y distintos tejidos como músculos y huesos. La oncósfera da lugar entonces al quiste hidatídico.

Los quistes son el estadio metacestode o larvario del parásito y tienen un contenido acuoso denominado líquido hidatídico (LH). Este líquido es transparente y en su composición tiene una serie de sustancias orgánicas e inorgánicas. Está formado por agua, cloruro de sodio, glucosa, vestigios de albúmina y grasas. No es tóxico pero posee propiedades antigénicas. Además contiene formaciones microscópicas, como vesículas prolíferas, escólices y ganchos, y macroscópicas como vesículas hijas. Estos elementos forman la arenilla hidatídica. Los quistes son en general uniloculares compuestos por una capa nucleada o germinal interna y una capa acelular o laminar externa (Figura 4). La capa laminar está formada principalmente por mucopolisacáridos asociados a proteínas, ricos en galactosa, galactosamina y glucosamina (Morseth, 1967; McManus & Bryant, 1995, Díaz y col., 2011). La capa germinal posee una estructura semejante al tegumento del gusano adulto, que consiste en un sincicio citoplasmático distal del cual se proyectan microtrichas (prolongaciones del tegumento) que penetran la capa laminar. En la capa germinal se encuentran varios tipos celulares: células almacenadoras de glucógeno, musculares, tegumentarias y células indiferenciadas de gran capacidad proliferativa (Morseth, 1967; McManus & Bryant, 1995). A partir de estas células se desarrollan las cápsulas prolíferas. Estas se originan como pequeñas masas nucleares, proliferan y se vacuolarizan pudiendo quedar sujetas a la capa germinal por un pedúnculo corto o soltarse en el interior del quiste. Dentro de las cápsulas prolíferas proliferan células indiferenciadas que resultan en evaginaciones que darán lugar a los protoescólices.

Durante todo su desarrollo los protoescólices quedan adheridos a la capa germinal a través de pedúnculos. Cuando, cada protoescólex, completa su desarrollo el pedúnculo se escinde y el protoescólex infectivo queda libre en el interior del quiste (Galindo y col., 2002). Muchas veces los protoescólices no se producen y en ese caso el quiste es infértil. Los dos factores que determinan la fertilidad del quiste son su edad y la dupla hospedador–genotipo del parásito, por ejemplo la cepa que desarrolla quistes fértiles en ovejas produce quistes mayoritariamente infértiles en cerdos o vacas. En los quistes fértiles los protoescólices permanecen en un estado latente en el interior del quiste hidatídico hasta que la integridad del mismo sea afectada. Cuando los quistes fértiles se rompen liberan los protoescólices dentro del hospedador intermediario y pueden desarrollar nuevos quistes en diferentes órganos, principalmente en el peritoneo, produciendo así la denominada hidatidosis secundaria (Ammann & Eckert, 1995). Este ciclo se puede interrumpir descontaminando sistemáticamente las vísceras del ganado infectado, desparasitando perros una vez por mes y vacunando al ganado (Jensen y col., 1995. Lightowlers y col., 1999).

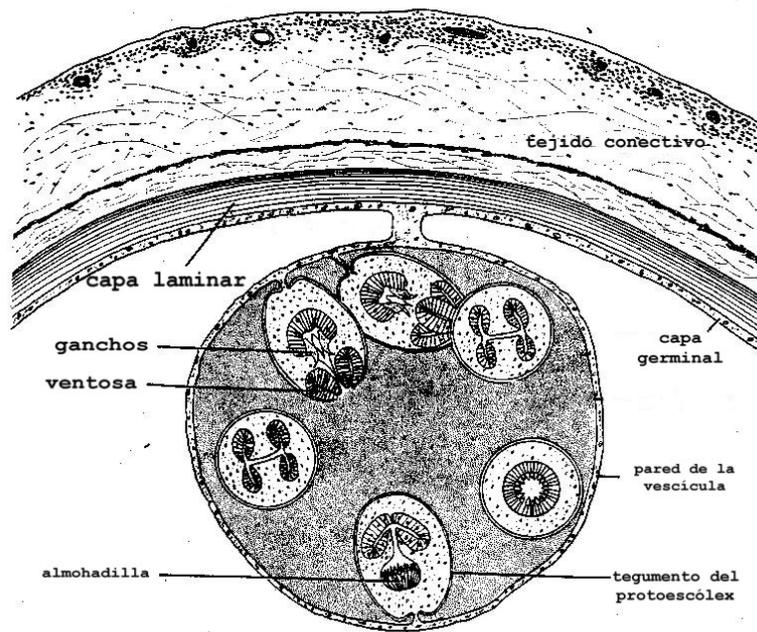


Figura 4. Corte de quiste hidatídico. Modificado de Morseth (1967).

La hidatidosis o enfermedad por quiste hidatídico ocurre cuando los seres humanos ingieren huevos del parásito con alimentos o agua contaminados, o contacto estrecho con perros infectados. Los huevos de *Echinococcus* se rompen en el duodeno e intestino delgado y los embriones hexacanto (oncósfera) se abren paso a través de la pared intestinal en busca de las vénulas de la circulación portal. Una vez allí son transportadas al hígado que actúa como primer filtro. Si lo franquean llegan a través de la las venas suprahepáticas y de la vena cava al corazón derecho y desde este pasan a los pulmones por la arteria pulmonar, siendo los pulmones el segundo filtro. Si lo atraviesan pasan a la circulación general pudiendo llegar a cualquier órgano, incluido el corazón. Otra vía por la cual pueden llegar al corazón y a los pulmones es a través del sistema linfático por el conducto torácico. En la especie *E. granulosus* los quistes hidatídicos se forman en el hígado en un 50 a 70% de los pacientes, en pulmón en un 20 a 30% de los pacientes y en otros órganos como cerebro, corazón, huesos y otros en menos del 10% de los casos (Mandell y col.,2006).

Una vez que la oncósfera llega a los capilares del órgano blanco se comienza a formar una masa multinucleada de 30 a 35 μm rodeada de leucocitos. Después de 7 días está formada la hidátide, que es esférica, vesiculosa y mide entre 60 y 70 μm . El desarrollo posterior de la hidátide es lento y al cabo de cinco meses mide alrededor de 0,5 cm de diámetro y crece aproximadamente 1 mm por mes. A su alrededor el órgano reacciona formando un tejido fibroso llamado capa adventicia. Los quistes pueden crecer hasta unos 10 cm durante el primer año de vida y pueden perdurar muchos años, sin producir síntomas, siendo frecuente su hallazgo accidental mediante diagnóstico por imágenes. Los síntomas

pueden ser debidos al efecto de masa ocupante provocado por el aumento del tamaño del quiste.

Los quistes fértiles en caso de rotura provocan complicaciones en menos del 10% de los pacientes: la hidatidosis secundaria, dada por la liberación de los escólices en la cavidad abdominal o pleural con la subsiguiente formación de nuevos quistes.

E. multilocularis posee un ciclo de vida similar a *E. granulosus* siendo sus hospedadores canidos y roedores. Esta especie produce la hidatidosis por quiste alveolar. Estos se reproducen asexualmente por gemación lateral invadiendo el tejido adyacente pudiendo llegar a partes distales del cuerpo, siendo una enfermedad agresiva (Mandell y col., 2006). Esta especie solo se encuentra en países del hemisferio norte.

1.3 Genotipos de *E. granulosus*.

La variación genética presente en muchas especies de parásitos patógenos para el hombre puede relacionarse muchas veces con diferencias en la epidemiología de la enfermedad y sus manifestaciones clínicas (de Meeûs y col.,1998). Por tal motivo es importante profundizar los estudios en las variaciones encontradas dentro de *E. granulosus*. Este parásito posee un alto grado de divergencia genética, encontrándose hasta 10 genotipos (o cepas) descritos.

A nivel mundial, la mayor parte de casos de hidatidosis en humanos es debida a los genotipos G1/G2 (cepa ovina), y en menor medida a los genotipos G6 (cepa camello), G7 (cepa cerdo), G5 (cepa vaca) y G8 (cepa cérvido).

En la Tabla 1 se muestran los genotipos determinados mediante técnicas de biología molecular que incluyen, entre otras, secuenciación parcial de los genes CO1 y ND1 mitocondriales, RFLP del gen ITS1 ribosomal, PCR-SSCP del gen MDH. Como puede observarse, los genotipos de *E. granulosus* difieren en características de importancia biológica y epidemiológica como la infectividad en humanos, período prepatente (tiempo que transcurre desde que el perro ingiere quistes hasta que libera huevos infectivos en las heces) y la distribución geográfica, entre otras. Recientemente los 10 genotipos antes mencionados han sido reclasificados en especies (McManus, 2013).

Existen dos genotipos específicamente adaptados al hospedero oveja, G1 y G2. Sin embargo también pueden infectar otras especies, aunque con menor porcentaje de fertilidad de los quistes. El genotipo G1 se encuentra presente en todos los continentes en áreas de cría de ovinos. La presencia de este genotipo coincide con una alta prevalencia de hidatidosis en humanos (Eckert y Thompson col.,1997; Thompson & MacManus, 2002). La ubicación de los quistes es principalmente hígado y pulmón (Thompson & Lymbery, 1988). El genotipo G2, tiene una distribución geográfica más acotada, hasta el momento se lo encontró sólo en el estado australiano de Tasmania y en la Argentina en la provincia de Tucumán (Rosenzvit y col.,1999). El

período prepatente es significativamente más corto, el adulto desarrolla huevos aproximadamente 7 días antes (39 días post infección) que la cepa oveja (45 días post-infección) (Kumaratilake y col., 1983).

Tabla 1. Características de los diferentes genotipos de *E. granulosus* y su nueva clasificación en especies.

Especie	Genotipo* (cepa)	Hospedador definitivo	Hospedador intermediario	Infectividad en humanos	Período prepatente
<i>E. granulosus</i> sensu stricto	G1(oveja)	perro, zorro, dingo, lobo, chacal, hiena	oveja, cabra, vaca, búfalo, camello, cerdo, macrópodos	sí	45 días
	G2 (oveja de Tasmania)	Perro	oveja, vaca	sí	39 días
	G3 (búfalo)	perro, zorro?	Búfalo, vaca?	?	?
<i>E. equinus</i>	G4 (caballo)	Perro	caballo, otros equinos	no	mayor que G1
<i>E. ortleppi</i>	G5 (vaca)	Perro	vaca	sí	33-35 días
<i>E. canadensis</i>	G6 (camello)	Perro	camello, cabra, vaca	sí	40 días
	G7(cerdo)	perro, zorro?	cerdo, jabalí	si	34 días
	G8(cérvido)	lobo, perro	cérvidos	sí	?
	G9	Perros	?	sí	?
	G10(cérvido de Finlandia)	lobo, perro	cérvidos	?	?

* Determinado mediante técnicas moleculares. ?: no determinado o bajo número de muestras analizadas. Refs.: Bowles y col., 1992; Bowles & McManus, 1993a; Bowles & McManus, 1993b; Bowles & McManus, 1993c; Bowles y col., 1994; Eckert & Thompson, 1997; Scott y col., 1997; Kedra y col., 1999; Rosenzvit y col., 1999; Kedra y col., 2000; Snábel y col., 2000; Kamenetzky y col., 2002; Lavikainen y col., 2003. McManus 2013.

El genotipo G3 está definido por técnicas moleculares y no hay estudios que caractericen su infectividad y desarrollo (Thompson, 1995). El genotipo G4 tiene tanto diferencias morfológicas, de desarrollo y metabólicas como de especificidad de hospedador respecto al genotipo G1, infecta sólo a caballos u otros equinos y lo datos epidemiológicos sugieren que no es patógena para el hombre (Thompson & McManus, 2002). El genotipo G5 también difiere en caracteres morfológicos y período prepatente (33-35 días) respecto al genotipo G1 y en la localización de los quistes, que es preferentemente pulmonar. El genotipo G5 se ha caracterizado en tres casos humanos, uno de ellos proveniente de Holanda, Bowles y col., (1992) y dos en Argentina, Kamenetzky y col., (2002); Gutiérrez y

col., (2001). El genotipo G6 infecta al hombre (Rosenzvit y col., 1999) tiene un período prepatente de 40 días produciendo quistes fértiles predominantemente en pulmón (Eckert & Thompson, 1997). Su ciclo de vida es importante en zonas donde se faenan camellos y cabras (Soriano y col., 2010). El genotipo G7, detectado en humanos (Kedra y col., 1999) y que afecta principalmente al cerdo, posee un período prepatente extremadamente corto (34 días) y posee características diferenciales de infección en ratones (Cucher y col., 2013). El genotipo G8 se encuentra en regiones sub-árticas de Europa, Asia y Norteamérica, no infecta a ungulados domésticos como el resto de los genotipos sino que afecta a cérvidos silvestres (*Alces alces*), el principal hospedador definitivo es el lobo y la mayoría de los casos humanos reportados son asintomáticos (Thompson & Lymbery, 1988), aunque recientemente un único caso grave fue caracterizado con este genotipo (McManus y col., 2002). El genotipo G9 fue encontrado en humanos provenientes de Polonia pero todavía no se encontraron hospedadores intermediarios naturales con este genotipo (Scott y col., 1997). Por último el genotipo G10 encontrado en cérvidos de Finlandia difiere en varios marcadores moleculares respecto al genotipo G8 y se lo caracterizó como nuevo genotipo (Lavikainen y col., 2003).

1.4 Distribución de Genotipos en Argentina

Como se expuso previamente, existen varios genotipos de *E. granulosus* que se han caracterizado utilizando criterios morfológicos, biológicos, bioquímicos y epidemiológicos. Estos genotipos se diferencian por su distribución geográfica, sus características biológicas, capacidad de infectar al ser humano y se denominan de acuerdo al hospedador intermediario.

La hidatidosis está asociada con la producción ganadera, en especial ovina y caprina, con infraestructura sanitaria deficiente, carencia de redes de agua potable, mal uso de pozos sanitarios para eliminación de vísceras, poco conocimiento de la enfermedad y una población de perros sin vigilancia veterinaria. En este contexto se observa que la hidatidosis se extiende por toda América del Sur, siendo las zonas rurales las que presentan las mayores prevalencias, donde la cría de ganado, especialmente ovino, es una de las actividades económicas más importantes. En la actualidad, en algunos países la agricultura ha desplazado a la ganadería a zonas periféricas lo que podría modificar la distribución geográfica de las distintas cepas. En el caso particular de la Argentina, *E. granulosus* está presente en todo el territorio. Los quistes hidatídicos encontrados en las diferentes provincias son producidos por los genotipos G1, G2 en oveja; G1, G2 y G5 en vaca; G6 en cabras y; G1 y G7 en cerdos. En humanos se encontraron genotipos G1, G2, G5 y G6 (Rosenzvit y col., 1999) (Kamenetzky y col., 2002).

1.5 Diferencias en Antígenos y Desarrollo entre genotipos

Uno de los principales antígenos estudiados en los diferentes genotipos es el Antígeno B (AgB). El AgB es altamente polimórfico, cada grupo genético (G1/G2, G5 y G6/G7) posee diferente tipo y número de secuencias correspondientes a esta proteína. Asimismo, se observa que todos los genes del AgB son transcritos en protoesclólices de la cepa G1 (oveja), mientras que el AgB5 no es transcrito por el genotipo G7 (cerdo). Asimismo, se encuentran transcritos del AgB2 procesado por un mecanismo aberrante de *splicing* que conduciría a proteína truncada no funcional (Kamenetzky y col., 2005; Muzulin y col., 2008). Se ha demostrado la existencia de variación genética del gen codificante del antígeno vacunal Eg95 (Chow y col., 2008) y recientemente se han descrito diferencias en su antigenicidad entre los genotipos G1 y G6 (Alvarez Rojas y col., 2013).

Estudios de diferencias de desarrollo durante el ciclo de vida de los distintos genotipos muestran que cuando se inoculan protoesclólices de *E. granulosus* G7 en el modelo murino experimental y se lo compara con la inoculación de protoesclólices de genotipo G1 se observa que los protoesclólices de genotipo G7 son incapaces de desarrollar quistes en ratones, en contraste con protoesclólices de genotipo G1 que sí pueden desarrollar quistes intraperitoneales (Cucher y col., 2013). Estos resultados muestran una diferencia en la capacidad de ambos genotipos para desarrollar quistes hidatídicos secundarios en ratón.

1.6 Enzimas de biogénesis y pequeños RNA

E. granulosus presenta un particular modo de desarrollo, el protoesclólex puede tomar dos caminos diferentes de acuerdo al hospedero: en el intermediario con la formación de nuevo quiste y en el hospedero definitivo el parásito adulto. Esto podría implicar la expresión de diferentes proteínas y la inhibición de la expresión de otras. Debido a la importancia de los RNA pequeños en el desarrollo de metazoos, se considera esencial identificar las enzimas que intervienen en la biogénesis de RNA pequeños en el parásito *Echinococcus*.

1.7 Proteínas Dicer, Argonauta, Drosha y Pasha

La ribointerferencia o RNAi (*RNA interference*) es un mecanismo de silenciamiento post-transcripcional (PTGS) de genes específicos (Figura 5). Consiste en la unión a un ARN mensajero (ARNm) de moléculas de ARN complementarias (por ejemplo: miRNA) que pueden conducir a la degradación del mensajero o la inhibición de su traducción. Los genes de miRNAs se transcriben por la RNA-polimerasa II en un transcripto primario largo: miRNA primario, (pri-miRNA), bicatenario, horquillado en un extremo y con otras estructuras horquilladas o desapareamientos locales de bases. Estos RNA son encapuchados ("*capping*") y poliadenilados.

La proteína **Drosha**, enzima Clase 2 RNasa III nuclear, es responsable de cortar al pri-miRNA produciendo una estructura de bucle de alrededor de 70 pares de bases, conocido como un pre-miRNA. (Figura 5)

Drosha forma parte de un complejo de proteínas llamado complejo microprocesador, que contiene el dsRBD (*double-strand RNA-binding domain*), de unión al RNA doble hebra. Otra enzima de este complejo es **Pasha** (DGCR8), la cual es esencial para la actividad Drosha y es capaz de unirse a fragmentos de cadena sencilla de la pri-miRNA que se requieren para el procesamiento. El pre-miRNA es exportado del núcleo al citoplasma por la **Exportina 5**, de la membrana nuclear, asociada a **Ran-GTP**, proteína G monomérica implicada en el tráfico de péptidos y proteínas a través de la membrana nuclear.

La proteína **Dicer**, ribonucleasa de la familia de las RNA III citosólica, corta pre-miRNA en fragmentos de ARN de interferencia pequeños llamados miRNAs de 20-25 nucleótidos, con dos bases libres en los extremos 3' hidroxilo y un extremo 5' fosfato. Las proteínas de la familia **Argonauta** se asocian al miRNA con una longitud entre 20 y 30 nucleótidos, formando complejos RNA proteína denominados **RISC** (complejos de silenciamiento inducidos por ARN, del inglés *RNA-Induced Silencing Complexes*). Los complejos RISC usan los miRNA como guía para silenciar de forma específica los ARNm que contienen una secuencia complementaria.

Los miRNAs regulan sus genes diana por rotura directa de sus ARNm o por inhibición de la traducción, de acuerdo con las complementariedades al mRNA blanco, generalmente en la región 3'-UTR. Si la complementariedad es muy alta, miRNA y la región del ARNm diana inducen que RISC corte el mRNA, la complementariedad baja induce el silenciamiento traduccional del ARNm, también puede reducir la cantidad de ARNm diana. Todo el proceso depende de las proteínas presentes en el complejo RISC (Ameres y col., 2013).

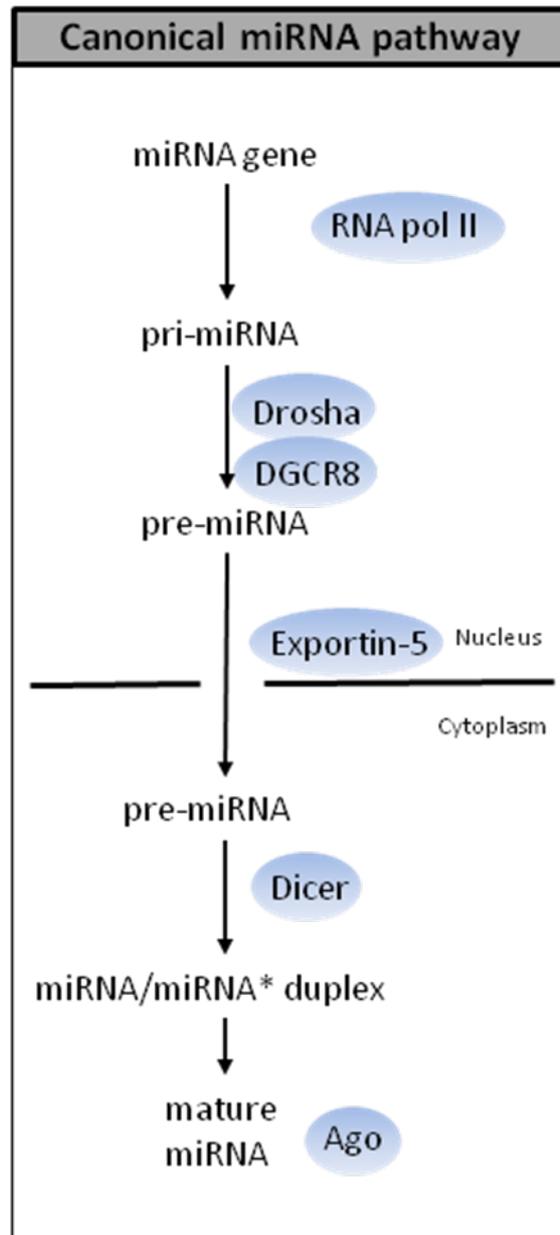


Figura 5. Principales enzimas involucradas en biogénesis y acción de miRNAs en metazoos .(Adaptada de Rosenzvit y col., 2013)

1.8 Herramientas moleculares para el análisis de expresión génica

La PCR en tiempo real cuantitativa, RT-qPCR, junto a los microarreglos de ADN y a RNA-seq (*next-generation sequencing*) son las metodologías usadas actualmente en el estudio de la expresión génica. Mientras RT-qPCR se utiliza para analizar la expresión de genes particulares las otras dos tecnologías permiten analizar el patrón global de expresión génica y sus resultados tienen que ser finalmente validados por RT-qPCR. Por otro lado, la RT-qPCR permite la detección de cambios cuantitativos en la expresión génica durante el curso de alteraciones celulares patológicas, experimentales o durante ciclos celulares normales así como para la cuantificación de niveles de mRNA en muestras de tejidos con RNA parcialmente degradado (Bustin, 2002).

Para la cuantificación mediante PCR en tiempo real, se mide en cada ciclo de PCR la cantidad de productos de amplificación mediante la adición de fluoróforos que se unen al producto de amplificación de forma cuantitativa, de forma que a mayor cantidad de producto de reacción de amplificación se emitirá más fluorescencia. Los sistemas de PCR en tiempo real detectan la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR y mediante un *software* de análisis representan dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos (Figura 6 A). La cantidad de productos de amplificación producidos es proporcional al número de moléculas de cDNA/DNA iniciales, aumentando la fluorescencia con cada ciclo. Entonces se establece un umbral de fluorescencia y se observa en que ciclo cada muestra llegó al umbral, dicho ciclo se denomina Ct (Figura 6 B).

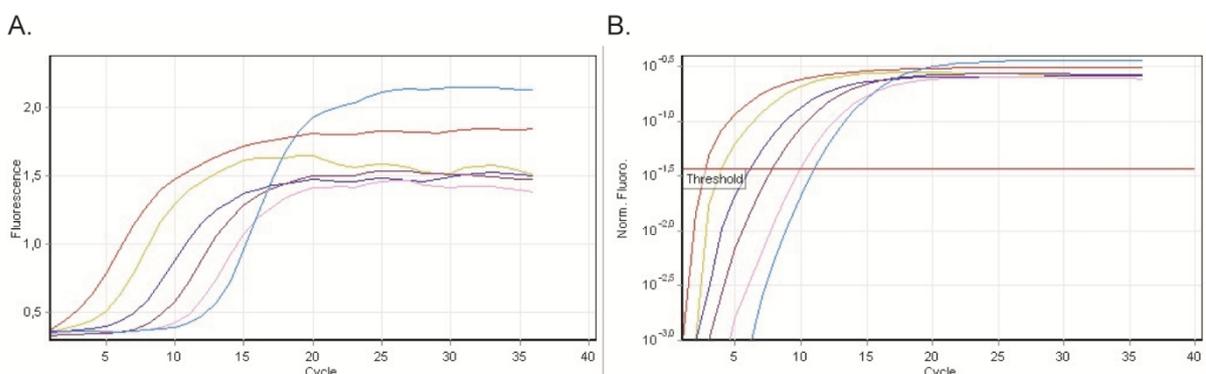


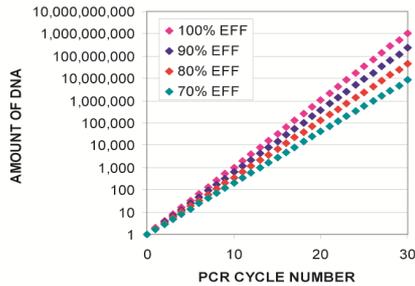
Figura 6: PCR en tiempo real. A. Fluorescencia en función del ciclo de PCR. B. Log (Fluorescencia) en función del ciclo de PCR. El Ct es el ciclo en que una muestra llega a determinado umbral de fluorescencia (Threshold). Dicho umbral se determina de modo arbitrario en la región en que la curva Fluorescencia versus Ciclo es exponencial. El termociclador Corbett 6000 Rotor Gene selecciona automáticamente el mejor umbral.

La cuantificación es dependiente de variables que pueden conducir a errores en la estimación de la expresión génica, por ejemplo: la integridad de cDNA, la contaminación con ADN genómico, la eficiencia enzimática, variables de instrumentación analítica, tecnología de los termocicladores, la secuencia de los *primers* y la manipulación de las muestras, por lo que se han desarrollado sistemas de estandarización.

En estos sistemas de estandarización la variable compleja que siempre se controla es la Eficiencia de Amplificación, que se puede calcular de diferentes maneras. Como se observa en la Figuras 7 A y B con distintas eficiencias se obtienen distintos números de producto de amplificación, siendo esta una fuente de errores en la evaluación de la expresión génica. Es sabido que la eficiencia de la PCR en tiempo real se encuentra influida críticamente por los componentes empleados en la reacción, sobre todo las diferencias en T_m y la composición de los *primers* empleados y el tamaño de producto de amplificación. En el diseño de los *primers* se debe contemplar una serie de factores para que los genes que estemos analizando tengan eficiencias altas y similares. Se debe considerar que: (1) los *primers* se diseñen sobre exones, preferentemente diferentes así se obtiene un producto de diferente tamaño que el genómico; (2) el producto de reacción sea un amplicón de entre 50 y 150 pares de bases; (3) el contenido G/C sea entre 30 y 80%; (4) se eviten secuencias con 4 o más G seguidas y extremos 3' ricos en G y/o C y; (5) la temperatura de *annealing* se encuentre entre 60 y 65 °C.

La cuantificación se puede realizar en términos absolutos o relativos. Generalmente se realizan cuantificaciones relativas a un gen de referencia. Se puede emplear como “gen de referencia” cualquier gen que se exprese en el organismo, tejido o tipo celular y que no varíe entre las condiciones experimentales. Las condiciones experimentales a comparar pueden ser distintos eventos durante una investigación, por ejemplo los efectos antes y después de la administración de un fármaco, o como se desarrolla en este trabajo, la expresión normal y relativa entre el gen de referencia y los genes en estudio en una etapa del ciclo vital del parásito (Vandesopele y col., 2002). Para la cuantificación relativa de mRNA mediante RT-qPCR entre estadios es necesario contar con uno o más genes de referencia cuya expresión sea estable entre las muestras de interés. En este tipo de análisis se utilizan habitualmente genes de expresión constitutiva. (<http://www.qPCR Efficiency Determination –The reference in qPCR>)

A.



B.

CYCLE	100% EFFICIENCY	90% EFFICIENCY	80% EFFICIENCY	70% EFFICIENCY
0	1	1	1	1
1	2	2	2	2
2	4	4	4	3
3	8	7	6	5
4	16	13	10	8
5	32	25	19	14
6	64	47	34	24
7	128	89	61	41
8	256	170	110	70
9	512	323	198	119
10	1,024	613	357	202
11	2,048	1,165	643	343
12	4,096	2,213	1,157	583
13	8,192	4,205	2,082	990
14	16,384	7,990	3,748	1,684
15	32,768	15,181	6,747	2,862
16	65,536	28,844	12,144	4,866
17	131,072	54,804	21,859	8,272
18	262,144	104,127	39,346	14,063
19	524,288	197,842	70,824	23,907
20	1,048,576	375,900	127,482	40,642
21	2,097,152	714,209	229,468	69,092
22	4,194,304	1,356,998	413,043	117,456
23	8,388,608	2,578,296	743,477	199,676
24	16,777,216	4,898,763	1,338,259	339,449
25	33,554,432	9,307,650	2,408,866	577,063
26	67,108,864	17,684,534	4,335,959	981,007
27	134,217,728	33,600,615	7,804,726	1,667,711
28	268,435,456	63,841,168	14,048,506	2,835,109
29	536,870,912	121,298,220	25,287,311	4,819,686
30	1,073,741,824	230,466,618	45,517,160	8,193,466

Figura 7. Influencia de la Eficiencia en el número de productos de amplificación por ciclo. (REAL TIME PCR Dr Margaret Hunt – PCR Tutorial).

a-Cuantificación absoluta

Los métodos de cuantificación absoluta utilizan curvas de calibrado para establecer la cantidad de cDNA o DNA y dependen de que las eficiencias de amplificación de los genes en estudio y el gen de referencia sean idénticas.

Correlaciona, por ejemplo, la cantidad de mRNA con respecto a RNA total, o masa de un tejido o un determinado número de células. En este método es importante determinar la calidad de la muestra que se utilizará de molde.

Las curvas de calibrado se construyen mediante diluciones seriadas de la misma muestra y RT-qPCR idéntica para cada gen, con sus *primers* específicos, para disminuir la influencia de las variables experimentales sobre la pendiente.

b- Cuantificación relativa

1 -Método de Ct comparativo

Este modelo, sin corrección de eficiencia, asume una eficiencia cercana al 100% en la reacción, tanto del gen en estudio como del gen de referencia (Livak & Schmittgen, 2001). Este es el método, $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, que se aplica para una estimación rápida, con eficiencias cercanas al 100%, de la relación relativa de expresión génica. El método $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores Ct de la muestra y los valores Ct del control tal y como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\text{Ratio} = 2^{-[\Delta\text{CP Muestra} - \Delta\text{CP control}]}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta \Delta\text{CP}}$$

CP equivale a Ct de la muestra menos el Ct del control.

Este método fue uno de los primeros que se utilizarán para calcular los resultados de PCR en tiempo real. Sin embargo se trata de un método de aproximación.

2- Método de Pfaffl

Otro modelo para cuantificación relativa ha sido publicado por Pfaffl (2001). En este modelo las diferentes eficiencias de la PCR tanto para los genes en estudio como para los genes de referencia se toman en cuenta como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CP}_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP}_{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

En esta ecuación se relacionan la expresión del gen de referencia y el gen en estudio. **E target** es la eficiencia de la PCR en tiempo real del gen en estudio; **E ref** es la eficiencia de la PCR en tiempo real del gen de referencia o control; **ΔCP target** es la desviación en Ct del control menos el Ct de la muestra del gen en estudio; y **ΔCP ref** es la desviación en Ct del control menos el Ct de la muestra del gen de referencia. Dado que en esta tesis no contamos con muestras con diferentes tratamientos, este método no fue empleado. Actualmente se han desarrollado métodos con varios genes de referencia.

3- Reporte comparativo cuantitativo (Corbett)

Este método se encuentra disponible en el software Rotor Gene (Qiagen) y es empleado para comparar la expresión relativa de genes con respecto a un control de expresión sin necesidad de realizar curvas estándar (Warton y col., 2004). La eficiencia se calcula en cada curva de fluorescencia de cada muestra analizando la pendiente de la región de aumento exponencial de la fluorescencia desde el punto de *Take off* (Figura 8). En este método comparativo se utiliza un promedio de replicados del gen de referencia para medir la cantidad amplificada de las muestras con respecto a él. Este método relaciona la medición de fluorescencia en cada ciclo y calcula la Eficiencia de Amplificación, a diferencia de otros métodos de aproximación descritos en este trabajo, que al desconocerla, la estiman.

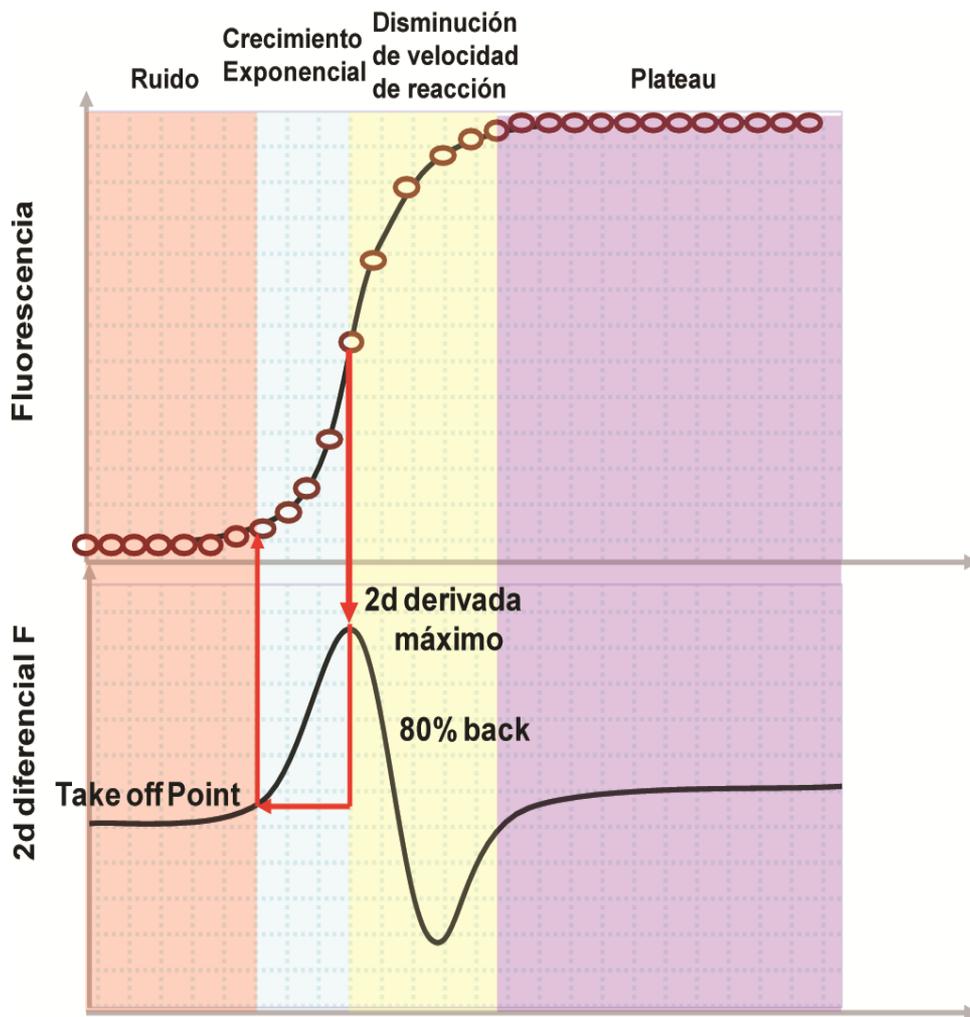


Figura 8: Interpretación de la Segunda derivada de la curva de Fluorescencia en función del Ct. Imagen modificada a partir de una presentación de Corbett.

2. OBJETIVOS

El **objetivo general** de esta tesis es aplicar técnicas de biología molecular al estudio de genotipos *Echinococcus granulosus* y a la expresión de genes Argonauta en el estadio larval de esta especie.

Los **objetivos específicos** son:

1. Optimizar la metodología de genotipificación de *E.granulosus* mediante PCR y secuenciación parcial del gen mitocondrial CO1.
2. Búsqueda de enzimas Argonauta en el estadio larval de *Echinococcus* spp. mediante estrategias bioinformáticas.
3. Extracción de ARN de protoescolices y metacestodes y posterior generación de cDNA. Cuantificación de la expresión de los genes Argonauta mediante RT- qPCR.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

En el Apéndice (Instrumental) figuran detalles de los instrumentos y kit's empleados en el estudio.

3.1. Determinación de genotipos.

Las distintas etapas del protocolo se presentan en el siguiente esquema (Figura 9) y se detallan dentro de este apartado.

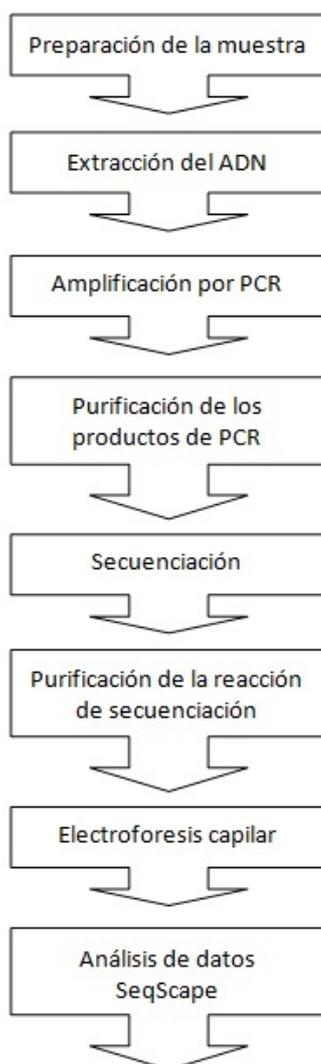


Figura 9: Esquema del procedimiento para secuenciación capilar

3.1.1 Preparación de la muestra y extracción del material genético.

Se utilizaron protoescólices frescos o conservados en etanol 70%. Las muestras fueron centrifugadas a 12.000 rpm y se resuspendió el pellet en 300 µl de buffer Tris –EDTA (TE) (Promega) - Tween 20 0,1%. Se congeló a -85 °C y se procesó en un mortero de vidrio, de 6 cm de diámetro, llevándolo a temperatura ambiente dos veces hasta obtener un material

(desnaturalización inicial); 8 ciclos: 45 segundos a 94 °C (desnaturalización), 1 minuto a 58 °C (alineación), 2 minutos a 72 °C (extensión). Luego 32 ciclos: con iguales condiciones y tiempos, pero con 50 °C de temperatura de alineación y un ciclo final de 60 minutos a 60 °C y 4 °C indefinidamente.

Los productos de PCR para secuenciar deben observarse como una banda única en un gel de agarosa. Esto se logró optimizando la reacción para evitar productos secundarios. Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, con Bromuro de Etidio, durante 45 minutos con 100 bp Marker (Promega).

Purificación del producto de PCR.

Se removieron los *primers* y nucleótidos sobrantes de la reacción de PCR, ya que podían interferir con la reacción de secuenciación. El producto de PCR se purificó en el equipo para extracción de ADN QIAcube con QIAquick Gel Extraction Kit (70 pb/10kbp) (Qiagen). Posteriormente se cuantificó el ADN con Qubit dsDNA BR Assay.

3.1.3 Reacción de secuenciación: Método enzimático de Sanger.

Este método fue descrito por Sanger, Nicklen y Coulson en 1977, es conocido como método de terminadores de cadena o dideoxynucleotidos. La enzima ADN polimerasa I (fragmento de Klenow) copia en forma complementaria la cadena templado de ADN simple con un *primer* (17 a 20 pb) complementario a una región anterior, alejada 20 o 30 bases, donde se inicia la secuencia de interés. Se extiende la cadena desde el OH- libre del extremo 3' incorporando dNTPs. Durante la reacción se incorporan al azar pequeñas cantidades de ddNTP que impiden la elongación de la cadena por no tener en 3' un OH-libre. Los preparados de dNTP/ddNTP deben tener un valor adecuado a la longitud de la cadena que se quiere obtener, disminuyendo al aumentar la proporción de ddNTP.

Para obtener buenos resultados en una secuenciación, es necesario cuantificar el templado o molde de ADN. En este trabajo utilizamos distintas tecnologías: un espectrofotómetro SmartSpec 3000 (Bio Rad), un fluorómetro Qubit (Applied Bioscience) que nos permite cuantificar ADN en distintos rangos y estimamos la concentración por comparación con un marcador de peso molecular de peso conocido (Mass Ruler DNA Ladder, Fermentas), con el beneficio de observar en el mismo gel bandas secundarias o dímeros de primers.

Reacción de ciclado de secuenciación:

Big Dye Terminator v3.1 2,5x.....	2 µl
Solución amortiguadora BDT 5x.....	3 µl
Primer (3,2 picomoles).....	2 µl
Templado ADN 3 a 10 ng.....	1 µl

Agua csp.....20 µl

Programa de Termociclador:

Desnaturalización inicial: 94 °C – 1 min

30 ciclos:

Desnaturalización: 94 °C – 15 seg

Alineación 50 °C – 10 seg

Extensión 60 °C – 4 min

Final 4 °C

3.1.4 Purificación de la reacción de secuenciación.

Los productos de la reacción de secuenciación fueron purificados mediante BigDyeX *Terminator Purification* (Applied Biosystem), para eliminar los nucleótidos no incorporados durante la reacción, y así evitar interferencias en el secuenciador. Este es un método que estabiliza la muestra hasta 10 días a 4 °C.

3.1.5 Electroforesis capilar.

Luego de la purificación se resuspendió el producto de la reacción con 15 µl de Hi-Di formamida. Esta se utiliza para desnaturalizar el ADN, al impedir la formación de enlaces por puente de hidrógeno, y obtener cadenas simples. Las muestras son estables 48 hs. La electroforesis capilar se realizó en un secuenciador automático ABI prism 310 Genetic Analyzer con polímero POP 4 y un capilar de 47 cm por 50 µm

3.1.6 Análisis de los resultados de la secuenciación.

Terminada la electroforesis se realizó el análisis de los datos con *Sequencing Analysis Software v5.2*. Mediante un control de calidad las muestras se evaluaron en características como *Basecaller* (asignación de bases) y *Post Processing Status* (Región de la secuencia de alta calidad, que resulta de quitar las bases de los extremos 5'y 3' (equivalente a *Clear Range*). El resultado de esta evaluación puede hacerse desde el *Report Manager* en donde mediante una serie de colores (Verde, Azul, Amarillo y Rojo) se puede deducir el score final de cada muestra. Los resultados se guardan en archivos con extensiones ab1, pdf, phd.1, txt y AB1.

3.2

3.2 Extracción de RNA de protoescólices.

Los metacestodes se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta su uso. Las muestras fueron centrifugadas y el pellet se llevó inmediatamente a -85°C con reactivo TRIzol en proporción adecuada y homogeneizadas en un mortero de vidrio. Posteriormente se les

agregó cloroformo y se continuó con el protocolo para muestras de tejidos. Luego se determinó el rendimiento del procedimiento cuantificando el ARN.

3.2.1 Obtención de cDNA.

Con el objetivo de evitar la posible interferencia del DNA contaminante en el ARN obtenido de las muestras, se trataron éstas con RQ1 DNase – Free RNase (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante. Partiendo del ARN libre de ADN genómico, y utilizando *SuperScript III First-Strand Synthesis System* para RT-PCR (Invitrogen, Life Technologies), según se detalla en la Figura 11, se obtuvo cDNA con buen rendimiento ya que SuperScript III es una versión de la enzima M-MLV RT con actividad RNase H reducida. Para la amplificación de cDNA de alto peso molecular se utilizó el kit Long PCR Enzyme Mix (Thermo Scientific- Fermentas) con actividad *proofreading*. Se secuenciaron los productos obtenidos como se describió previamente.

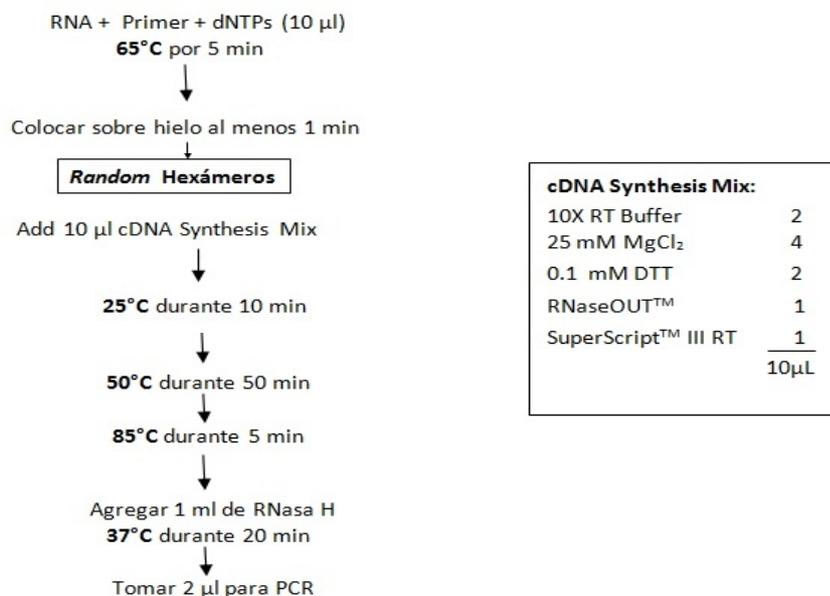


Figura 11. Esquema del procedimiento *SuperScript III First-Strand Synthesis System* for RT-PCR

Con el objetivo de determinar el grado de contaminación con RNA del hospedador, se realizaron RT-PCRs con primers Actina de cerdo. En todos los casos las PCRs dieron negativas (se utilizó como control positivo DNA de cerdo).

3.2.2 PCR cuantitativa (qPCR).

La selección de reactivos, temperaturas y tiempo de ciclado, *primers* y la realización de curvas de calibrado para cada uno de los genes Argonauta se puede ver en el apéndice. Finalmente la selección de estas variables fue la siguiente: a) Reactivos para Real Time PCR marca Firepol Eva Green (Solis BioDyne), b) alineación 30" a 60 °C y c) *primers*

purificados por HPLC. De este modo se pudieron compatibilizar en un solo procedimiento de Real Time PCR eficiencias comparables, aunque no óptimas, con curvas de *melting* libres de dímeros de *primers* (Figura 9 del Apéndice). Se utilizó un termociclador Rotor Gene 6000 5 Plex (Corbett, Qiagen).

Primers:

Se diseñaron *primers* para amplificación de mensajeros completos y para RT-qPCR (Tabla 1 del Apéndice). Los números al lado de los nombres de los *primers* indican el modelo génico según el genoma de *Echinococcus* spp.

(<http://www.genedb.org/Homepage/Emultilocularis>): Ago-L; Pasha (para amplificación de genes completos); Eif; EchiActina_190400 (genes de referencia de qPCR).

Primers específicos para los genes Argonauta: EchiAgo_346200; EchiAgo_911600; EchiAgo_739100; EchiAgo_911700.

Asimismo, se determinó mediante análisis por BLASTn que los *primers* diseñados no poseen identidad con genes de cerdo.

3.3 Análisis Bioinformáticos.

Para el diseño de *primers* se utilizó el programa de acceso libre Primer3 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Para el análisis de los datos generados por el secuenciador automático ABI prism 310 se utilizó el *Sequencing Analysis Software* v5.3.1. Finalmente para analizar filogenéticamente los datos generados se utilizaron los programas Clustal X, Bioedit y MEGA 5.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Genotipos de *Echinococcus granulosus*

Como se expuso en la Introducción la variación genética presente en muchas especies de parásitos patógenos para el hombre puede vincularse a diferencias en la epidemiología de la enfermedad y en sus manifestaciones clínicas (de Meeûs y col., 1998). Por otro lado, el genoma mitocondrial tiene una organización típica en la mayoría de los animales, presentando regiones polimórficas características. Esta propiedad es ampliamente explotada para caracterizar organismos en distintas ramas de la ciencia, y actualmente 10 genotipos distintos de *E. granulosus* (G1-G10) se encuentran descriptos basándose en la diversidad genética del gen mitocondrial CO1 (citocromo C oxidasa subunidad 1, *cox1*) (Sharma y col., 2013). Entonces, como primer paso en esta tesis se optimizó la técnica de tipificación empleando muestras de diferente origen.

4.1.1 Optimización de la tipificación

Se optimizó la extracción de ADN genómico mediante el agregado de un paso de precipitación con alcohol. De esta manera muestras escasas o heterogéneas (con mucha capa laminar contaminante) pudieron ser amplificadas por PCR (ver materiales y métodos).

La reacción de PCR del gen mitocondrial CO1 se realizó adaptando el protocolo de Kamenetzky y col., 2000. Se adicionaron 8 ciclos iniciales con una temperatura de alineación de 58 °C lo cual mejoró la especificidad de la reacción. Como se puede apreciar en el gel, el producto de la amplificación tuvo un peso molecular de 400 pb aproximadamente y no aparecen bandas de menores pesos moleculares ni dímeros de *primers* (Figura 12).

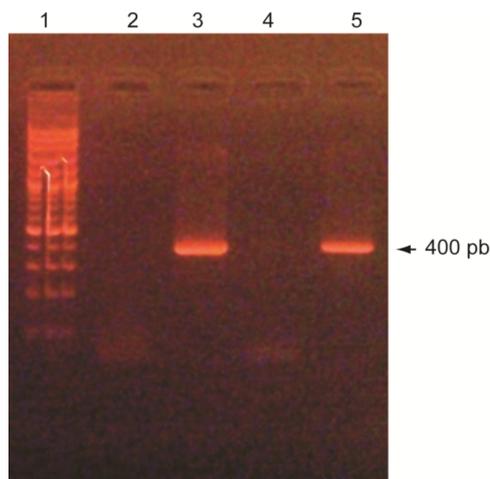
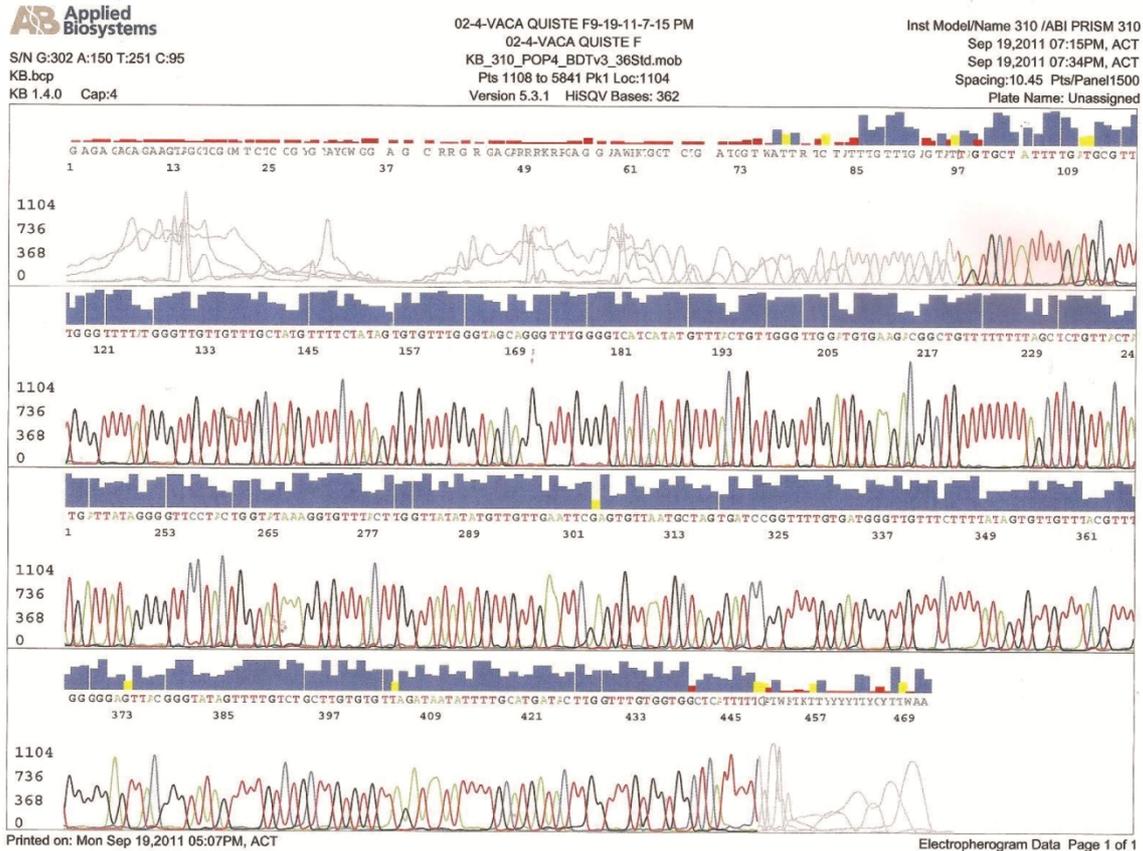


Figura 12. PCR del gen CO1. Calle 1: Cien Marker; Calle 2 y 4 sin control; Calle 3 y 5: muestras C2P2 y C2 M2. En las calles con muestras no se observan dímeros de *primers*.

4.1.2 Secuenciación del gen mitocondrial CO1.

Se secuenciaron 26 muestras de PCR del gen CO1, obteniéndose electroferogramas claros, que se alinearon con todas las secuencias CO1 patrones y se determinó las secuencias de CO1 exitosamente (Figura 13 A y B). De manera similar a lo ya reportado por Kamenetzky y col., (2002), los genotipos presentes fueron G1, G5, G6 y G7 (Tabla 2).

A.



B.

```

CAACGGTKRCTCGTGCATCTGRTGTATTGCTCTCTTTGTTTGWCGCTTACTCTACTTCGKATGTTTT
TGGGTTTTATGGGTTGTTGTTTGCTCTGTTTTCTCTAGTGTGTCGGTAGTAGTGTTCCTCCAT
CATATGTTTACTGTTGCATTAGATGTGAGCACTGCTGTTTTTTTAGTTCTGTTACTATGATTATA
GGTGTTCCTACTGGTATAAAGGTGTTTACTTGGTTGTATATGTTATTGAATTCTAATGTTAATGCT
AGTGATCCTGTTTTGTGGTGGGTTATTTCTTTTATAGTTTTATTTACGTTTGGGGCGTCACTGGT
ATAGTTWTGTCTGCTWSWGTGTTGGATAATGTTTTACATGATACTTGRTTTTGTAGTAGCTCATT
TTCATTGKTYYYYYYTYCYTTATAA
    
```

Figura 13. Secuenciación del gen mitocondrial CO1. A. Electroferograma modelo de la secuenciación del gen CO1 con primer Forward. **B.** Secuencia obtenida a partir de una muestra modelo.

Tabla 2. Muestras genotipificadas, hospedero de origen y genotipos obtenidos.

Muestra ID	Hospedero	Genotipo
Pe067L5	Cabra	G6
B3-24-1-22-12-3-55	Cabra	G6
Pe_P11	Cerdo	G7
Pe_C2P2	Cerdo	G7
C1-34-1-22-12-12-28	Cabra	G6
Pe_010808	Oveja	G1
14-9-L-12-1-R2-29-12-5-39	Cabra	G1
C3-36-1-22-12-2-10	Cabra	G1
C2-35-1-22-12-1-19	Cabra	G1
B8-29-1-22-12-8-12	Cabra	G1
A4-4-1-21-12-6-31	Cabra	G1
A11-20-1-22-12-12-30	Cabra	G1
A6-7-1-21-12-8-14	Cabra	G1
B4-25-1-22-12-4-46	Cabra	G1
B11-32-1-22-12-10-45	Cabra	G1
A3-3-1-21-12-5-40	Cabra	G1
B1-22-1-22-12-2-12	Cabra	G6
B6-27-1-22-12-6-29	Cabra	G6
B7-28-1-22-12-7-20	Cabra	G6
B10-31-1-22-12-9-54	Cabra	G6
A9-21-1-21-12-10-48	Cabra	G6
B12-33-1-22-12-11-37	Cabra	G6
A5-6-1-21-12-7-22	Cabra	G6
A12-21-1-22-12-1-21	Cabra	G6
B2-23-1-22-12-3-04	Cabra	G6
Pe_2013	Vaca	G5

4.1.3 Árbol filogenético de genotipo y especies de *Echinococcus*.

Para investigar la relación entre los *E. granulosus* secuenciados y genotipos ya identificados realizamos un árbol filogenético (Figura 10) utilizando las secuencias CO1 obtenidas y secuencias patrones según Kamenetzky y col., (2000).

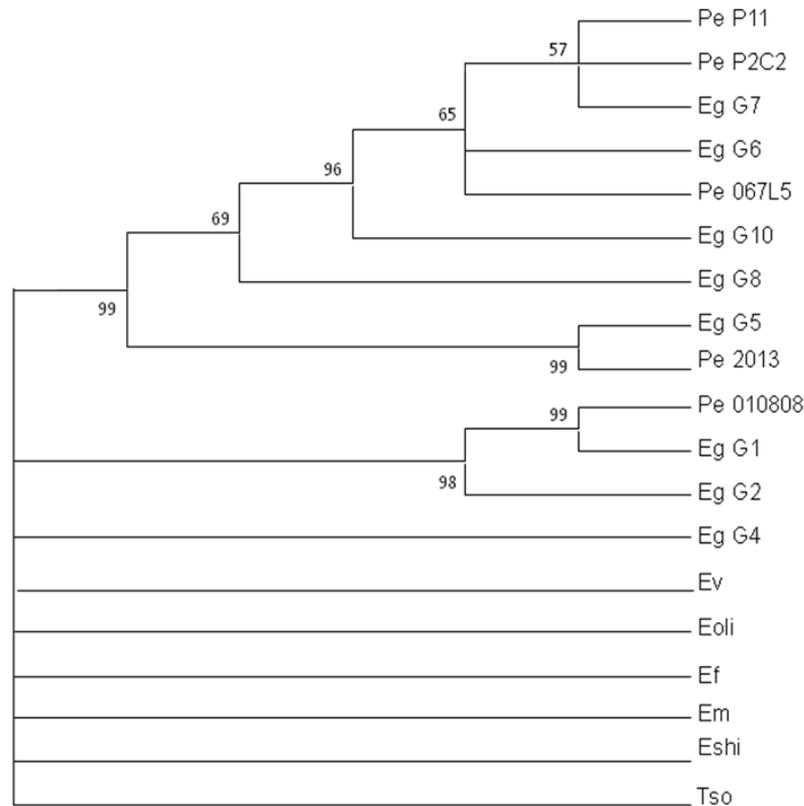


Figura 14. Árbol filogenético. Las secuencias CO1 obtenidas de todas las muestras fueron alineadas con secuencias patrones según Kamenetzky y col., 2000. Los genotipos fueron determinados analizando cada sitio polimórfico. Se muestra el árbol filogenético obtenido con el método de Neighbour-Joining y 1000 replicas de *bootstrap* mediante el programa MEGA5. Se utilizaron secuencias representativas de cada genotipo obtenido y las secuencias patrones: *E. granulosus* genotipo G1-10 (Eg G1-10); *E. multilocularis* (Em); *E. oligarthrus* (Eoli); *E. vogeli* (E.v); *E. shiquicus* (E. shi); *E. felidis* (Ef); *Taenia solium* (Tso) como *outgroup*. Se muestran los nodos con *bootstrap* mayor a 50. El total de las muestras analizadas y sus genotipos se muestran en la Tabla 2.

4.2 Enzimas de biogénesis de biorreguladores en *E. granulosus*

Para identificar y cuantificar RNA mensajeros de las enzimas Argonauta, involucradas en el procesamiento de miRNA, se realizaron extracciones de RNA de protoescólices de *E. granulosus* (G7) y del metacestode de *E. multilocularis*, se obtuvo cDNA y finalmente se cuantificaron los genes por PCR en tiempo real.

4.2.1 Modelos génicos y calidad del cDNA

El cDNA obtenido se analizó en geles de agarosa para evaluar la contaminación con ADN genómico. Se muestra como ejemplo el producto obtenido con Long-PCR sobre la muestra C2P2 (Figura 15). En la figura se observa que no hay contaminación con ADN genómico dado que en la reacción de PCR sembrada en la calle 2 no se observa producto de amplificación.



Figura 15. Long-PCR C2P2: Calle 1: 100 bp DNA Ladder Solis Biodyne; 2: Control negativo no RT; 3: RT-PCR (aproximadamente 800 pb).

Se intentó verificar si los modelos génicos, como el presentado en la Figura 5 de la Introducción, de las proteínas de la vía de sRNAs efectivamente se expresan en protoescólex de *E. granulosus* (G7). Para esto, se amplificó cDNA completo (kit longPCR Thermo Scientifics - Fermentas) y pudieron verificarse los modelos génicos de Argonauta EchiAgo_000739100 con una cobertura del 60% y una identidad del 100% y el gen Pasha con una cobertura del 50% y una identidad 100%. Por falta de material no se pudo amplificar la totalidad de los genes de la vía y se decidió realizar a experimentos de RT-qPCR de los genes Argonauta.

4.2.2 Proteínas Argonauta: cuantificación de su ARNm mediante Real Time PCR

En el presente estudio se utilizó un método de cuantificación relativa del mRNA de interés respecto del mRNA de un gen denominado “gen de referencia”. Como primer paso se seleccionaron dos genes Actina, cuya expresión y secuencia fue disponible gracias al proyecto genoma del cual somos parte (Tsai y col., 2013) y *eukaryotic translation initiation factor* (eif), previamente utilizado por Zhang y col., (2010), como gen de referencia en *E. granulosus*. Se diseñaron *primers* y se confirmó la expresión de ambos genes por medio de análisis de RT-PCR y RT-qPCR (Figura 17). Para la amplificación de las 4 proteínas argonautas de *Echinococcus* se diseñaron *primers* con el siguiente procedimiento: se tomaron los *contigs* disponibles del genoma de *E. multilocularis* y *E. granulosus* (versión 1 septiembre 2011) y se analizaron por tBLASTn utilizando las argonautas Ago-1 y Ago-2 de humanos como referencia. Se detectaron 4 *contigs* con identidad parcial a dichas argonautas. Se tomaron +/- 5 kb de cada región de hit y se predijeron los genes con el *software* Augustus utilizando como modelo a *H. sapiens*. De esta forma se obtuvieron 4 regiones codificantes para proteínas similares a Argonauta.

En paralelo a este trabajo se generó el genoma de *Echinococcus* y los modelos génicos predichos coincidieron con los resultados del genoma y transcriptoma. Los códigos de los 4 genes son: *E. multilocularis*: EmuJ_000346200, EmuJ_000911600, EmuJ_000739100, EmuJ_000911700; *E. granulosus*: EgrG_000346200, EgrG_000911600, EgrG_000739100, EgrG_000911700 (Figura 17).

Dado que la identidad entre los genes de ambas especies es de 90-100% se pudieron diseñar los *primers* de manera de amplificar cada gen, de ambas especies, con el mismo par de *primers*.

Tabla 3. Información general de los genes Argonauta obtenida del sitio geneDB (<http://www.genedb.org>).

Gen	Tamaño (pb)	Secuencia codificante (CDS) (pb)	Proteína (aa)	Sitio de amplificación de los primers (# de exon)
EchiAgo_000346200	10501	2964	987	7
EchiAgo_000911600	5691	2586	861	7
EchiAgo_000739100	3342	1671	556	2
EchiAgo_000911700	4639	2427	808	1

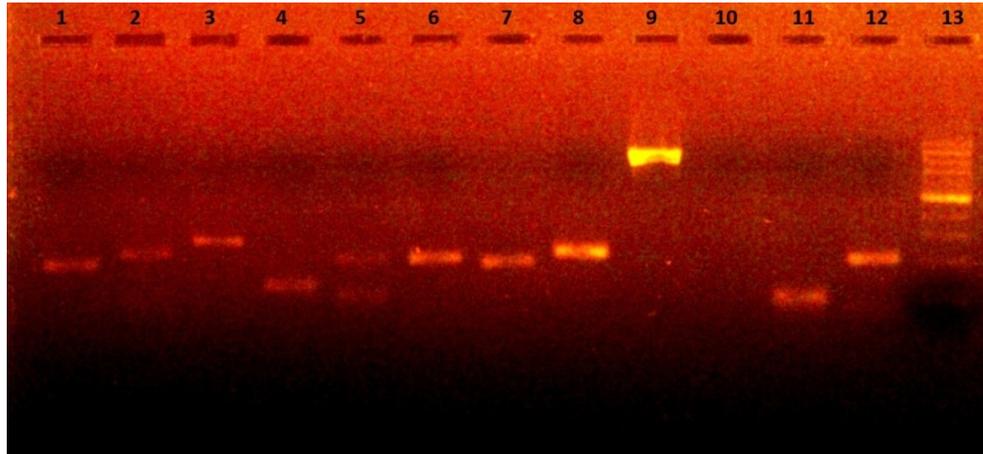


Figura 17. RT-PCR de los genes Argonauta. Calles 1 a 6 cDNA: EchiAgo_346200, EchiAgo_911600, EchiAgo_739100, EchiAgo_911700, Echi_Eif, EchiActina_190400. Calles 7 a 12 DNA genómico en el mismo orden. Calle 13: *Marker* 50 pb, la banda intensa corresponde a un fragmento de 250 pb.

4.2.3 Análisis de la expresión génica

Se optimizó la RT-qPCR con el gen de Actina RT-qPCR, utilizando 5x HOT FirePol Eva Green qPCR Mix Plus (no Rox) de Solis BioDyne (Estonia) según el protocolo del fabricante. Luego se realizaron curvas de calibrado con diluciones seriadas de la misma muestra para los cuatro genes Ago y para el gen de referencia Actina a distintas temperaturas de *annealing*. Los informes del Termociclador Corbett Rotor Gene 6000 corresponden a las figuras 2 a 6 del Apéndice y se presentan en las Tablas con códigos de colores y en la Curva Estándar.

a- Construcción de curvas estándar y cálculo de eficiencia

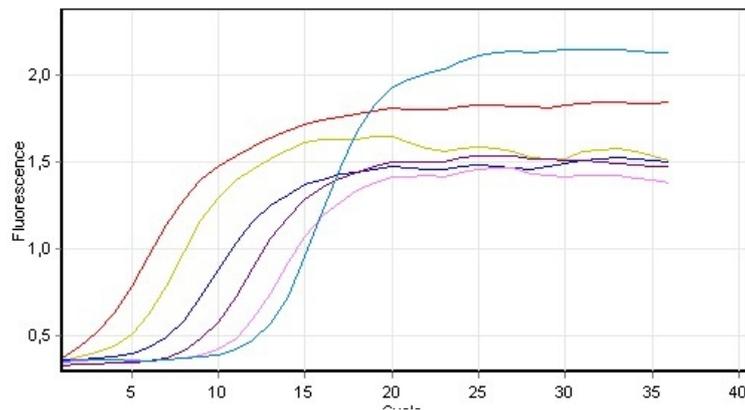
La eficiencia se calcula a partir de las pendientes de la curva estándar obtenidas después de realizar diluciones seriadas con las reacciones de la PCR en tiempo real (Pfaffl, 2004) de acuerdo a la siguiente fórmula: $E=10^{-1/pendiente}-1$. Una pendiente de -3,32 corresponde a una eficiencia de 1,0000 y una Amplificación de 2,0000 copias de amplicones por ciclo, correspondiente al 100 %. Valores negativos mayores de la pendiente significan menor eficiencia. Valores menos negativos (Ej.: -2,6) pueden indicar mala calidad de la muestra por inhibición de la reacción (Kontanis, 2006). RT-PCR se utiliza para detectar inhibidores estudiando estas propiedades y en casos positivos intentar su eliminación. Se muestran los resultados obtenidos con Actina, los demás genes se muestran en el Apéndice.

ACTINA

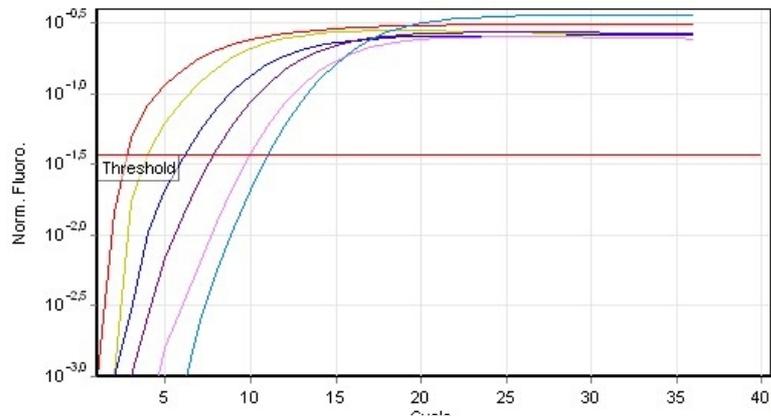
Umbral	0,0368
Curva estándar (1)	$\text{conc} = 10^{(-0,343 \cdot \text{CT} + 2,276)}$
Curva estándar (2)	$\text{CT} = -2,912 \cdot \log(\text{conc}) + 6,627$
Eficiencia de reacción	1,20526 (* = $10^{(-1/m)} - 1$)
M	-2,91155
B	6,62718
R ²	0,99344

Ciclado	
Hold @ 95°C, 15 min 0 secs	
Cycling (40 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 10 secs
	Step 2 @ 55°C, hold 30 secs
	Step 3 @ 72°C, hold 30 secs, acquiring to Cycling A([Green][1][1])

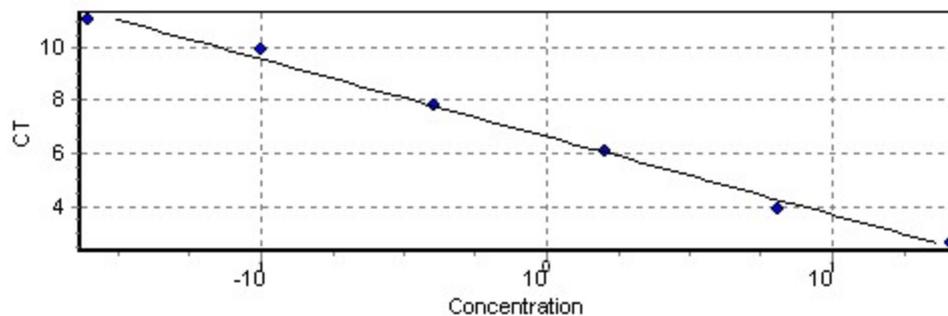
Actina: Fluorescencia en función de los ciclos de PCR



Actina: Log (Fluorescencia) en función de los ciclos de PCR. Se señala con una recta el umbral.



Actina: Curva estándar



Se realizaron diluciones seriadas de las muestras de cDNA para determinar la eficiencia de qPCR de cada reacción y evaluar si se podía utilizar la estrategia de curvas estándar o método de cuantificación absoluta antes mencionado, para la cuantificación de los ARNm. Esta estrategia requiere que las eficiencias sean altas y similares.

Tabla 4. Datos generales y Eficiencias obtenidas durante los ensayos de cuantificación mediante Curvas Estándar.

Denominación	Secuencia del <i>primer</i>	Tm ^a °C	Producto de PCR (pb)	Ta ^b °C	Eficiencia	m ^c
EchiAgoF_346200	CAAGTGGGTCAAGAGCAGAA	51,78	100	48	0,989	-3,34
EchiAgoR_346200	AGGTCTGCATGTCAGTGAGC	53,83				
EchiAgoF_911600	AAATTCGGATTGGGAATGAG	47,68	97	55	0,980	-3,37
EchiAgoR_911600	GTACCAGCTCCCCCTATCAA	53,83				
EchiAgoF_739100	GCAGATCGTTTTGGGAATTT	47,68	143	48	0,825	-3,38
EchiAgoR_739100	AAAGTGAGCACTCGGTTGTG	51,78				
EchiAgoF_911700	GGAGGAACAATTGGGAGAAA	47,68	67	55	0,808	-3,89
EchiAgoR_911700	ACACATCCGATACGTCGAAA	49,73				
Echi_EifF	TCGGGACAAGAGGGTAGAGA	53,83	108			
Echi_EifR	ACTAACAGCGGAAGGCGTAA	51,78				
EchiActinaF_190400	ACGGGTATCGTCTTGACTC	53,83	105	55	1,205	-2,91
EchiActinaR_190400	CACGACCAGCTAAATCGAGA	51,78				

^a Melting, ^b Annealing; ^c Pendiente

Como se observa en la Tabla 4, las eficiencias obtenidas fueron muy diferentes y algunas muy bajas (teniendo todas las curvas R² aceptables, ver Apéndice).

Las eficiencias en amplificación podrían ser mejoradas re diseñando los *primers* o cambiando condiciones de ciclado, entre otras condiciones. Para ellos es necesario contar suficiente material de cDNA de partida. Dado la baja disponibilidad de muestras de quistes almacenados en condiciones de extraer RNA es que se decidió la simplificación de los métodos de expresión relativa que requieren menos material para su puesta a punto dado que en una sola reacción de PCR se comparan simultáneamente varios genes en las mismas condiciones experimentales.

b- Cálculo de la expresión relativa con el método Ct comparativo

En este procedimiento se supuso una eficiencia del 100% al considerar que cada ciclo duplica el número de productos de amplificación. Se toma a Actina como gen de referencia y se toma el Ct mayor para el cálculo de $R=2^{-\Delta\Delta Ct}$, en ambos casos EchiAgo_739100. Debido a que este método no utiliza el valor real de eficiencia de cada reacción sino que lo supone al 100%, sus resultados deben tomarse como aproximaciones al valor relativo de la expresión génica.

En las tablas 5 y 6 se muestran los resultados obtenidos a distintas temperaturas de ciclado.

Tabla 5. *E. multilocularis* (Temperatura de *annealing* 55 °C) cálculos Nivel Relativo de expresión.

Gen	Ct- AGO	Ct-ACTINA	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	Nivel Rel ($R=2^{-\Delta\Delta Ct}$)
EchiAgo_346200	27,35	21,3	6,05	-6,20	73,51
EchiAgo_911600	31,95	21,3	10,65	-1,60	3,03
EchiAgo_739100	33,55	21,3	12,25	0	1,00
EchiAgo_911700	25,50	21,3	4,20	-8,05	265,03

Gen de referencia: *EchiActina_190400*

Tabla 6. *E. granulosus* P11 (Temperatura de *annealing* 60 °C) cálculos Nivel Relativo de expresión.

Gen	Ct- AGO	Ct- ACTINA	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	Nivel Rel ($R=2^{-\Delta\Delta Ct}$)
EchiAgo_346200	21,07	15,94	5,13	-6,00	64,00
EchiAgo_911600	25,50	15,94	9,56	-1,57	2,97
EchiAgo_739100	27,07	15,94	11,13	0	1,00
EchiAgo_911700	18,37	15,94	2,43	-8,70	415,00

Gen de referencia: *EchiActina_190400*

Se observa que los genes EchiAgo_911700 y EchiAgo_346200 poseen mayor expresión que los EchiAgo_911600 y EchiAgo_739100 tanto en *E. granulosus* como en *E. multilocularis*.

Con la idea de determinar certeramente el nivel de expresión relativo se eligió un método que utiliza la eficiencia de amplificación real de cada ciclo.

c- Real Time PCR – Reporte comparativo cuantitativo (Corbett)

Este método fue seleccionado para el presente trabajo, dado que calcula la eficiencia real de la reacción y permite determinar si las eficiencias a pesar de ser diferentes al 100 % son comparables entre sí. En este método comparativo se utiliza un promedio de replicados del gen de referencia para medir la cantidad amplificada de las muestras con respecto a él, tal como se describió en la Introducción. En la Figura 4 del Apéndice, se puede ver el *Comparative Quantitation Report* obtenido mediante el *software* del *Real Time PCR Rotor Gene 6000 5Plex*, Corbett (Qiagen) (Rotor Gene Operator Manual 1.7.87 Corbett Research. Pág. 84-86). En el presente estudio la Eficiencia de Amplificación del gen de referencia y genes en estudio permitió comparar la expresión diferencial. Se emplearon tres muestras de metacestodes, dos de *E. granulosus* (C2P2 y P11) y una de *E. multilocularis*. En las Tablas 7, 8 y 9, con código de colores en la segunda columna y el nombre de los analitos en la tercera se identifican las muestras en el gráfico (Figura 7, 8 y 9 en el Apéndice). En la cuarta columna, *Take off*, definido como el ciclo en el que la segunda derivada (dF 2/d2c) alcanza el 20% del punto máximo de la curva, donde cesa el ruido y comienza la fase exponencial (Figura 18). La cuarta columna muestra la eficiencia de cada muestra. La quinta columna muestra la concentración comparativa.

Con la muestra C2P2 se utilizó Tm 55 °C y se observaron eficiencias comparables en todos los genes menos en EchiAgo_911700 (Tabla 7). Es por ello que en la segunda muestra de *E. granulosus* P11 se empleó la Tm de 60 °C pudiéndose determinar el nivel de expresión de todos los genes (Tabla 8).

Para *E. multilocularis* también pudieron determinarse los niveles de expresión siendo coincidentes a los de P11 (Tabla 9).

Tabla 7. Reporte cuantitativo comparativo de la Muestra C2P2- *E. granulosus*

No.	Color	Nombre	Take Off	Amplificación	Concentración comparativa
1		EchiActina_190400	13,8	1,58	1,00E+00
5		EchiAgo_346200	19,1	1,80	1,77E-01
6		EchiAgo_911600	28,5	1,29	8,20E-03
7		EchiAgo_739100	29,5	1,57	5,91E-03
8		EchiAgo_911700	19,1	0,69*	1,77E-01

*Eficiencia de amplificación no comparable.

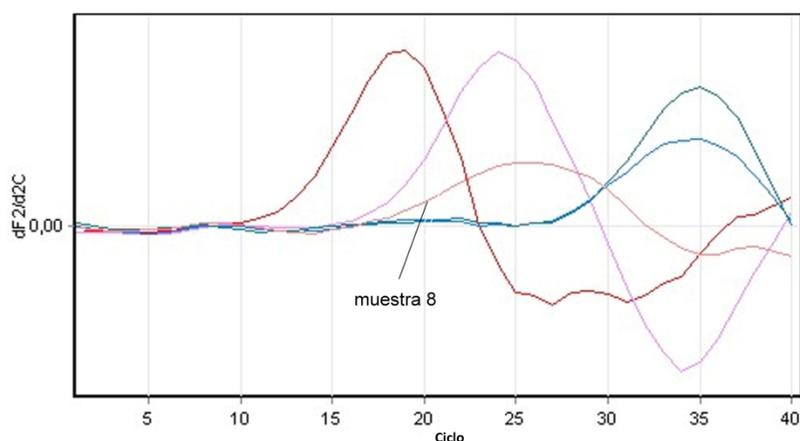


Figura 18. Segunda derivada de la curva de Fluorescencia en función de los ciclos de PCR de la Muestra C2P2- *E.granulosus*. Puede observarse que curvas con baja pendiente se corresponden con bajas eficiencias (muestra 8).

Tabla 8. Reporte cuantitativo comparativo de la Muestra P11- *E. granulosus*

No.	Color	Nombre	Take Off	Amplificación	Concentración comparativa.
1	Red	EchiActina_190400	15,9	1,69	1,00E+00
2	Yellow	EchiActina_190400	16,0	1,68	9,49E-01
3	Blue	EchiActina_190400	16,0	1,70	9,49E-01
4	Purple	EchiActina_190400	15,9	1,68	1,00E+00
5	Pink	EchiActina_190400	15,9	1,64	1,00E+00
6	Light Blue	EchiAgo_346200	21,1	1,64	6,67E-02
7	Teal	EchiAgo_346200	21,0	1,66	7,03E-02
8	Light Red	EchiAgo_346200	21,1	1,70	6,67E-02
9	Green	EchiAgo_911600	25,4	1,64	7,11E-03
10	Magenta	EchiAgo_911600	25,7	1,72	6,08E-03
11	Black	EchiAgo_911600	25,4	1,67	7,11E-03
12	Cyan	EchiAgo_739100	26,9	1,73	3,26E-03
13	Gold	EchiAgo_739100	27,3	1,74	2,64E-03
14	Light Green	EchiAgo_739100	27,0	1,71	3,09E-03
15	Light Teal	EchiAgo_911700	18,4	1,73	2,72E-01
16	Light Blue	EchiAgo_911700	18,3	1,60	2,87E-01
17	Purple	EchiAgo_911700	18,4	1,83	2,72E-01

Tabla 9. Reporte cuantitativo comparativo de la Muestra *E. multilocularis*.

No.	Color	Nombre	Take Off	Amplificación	Concentración comparativa
1	Red	EchiActina_190400	21,3	1,79	1,01E+00
2	Yellow	EchiActina_190400	21,3	1,78	1,01E+00
3	Blue	EchiActina_190400	21,4	1,67	9,72E-01
5	Pink	EchiAgo_346200	27,7	1,61	6,54E-02
6	Light Blue	EchiAgo_346200	27,4	1,64	7,43E-02
7	Teal	EchiAgo_911600	31,0	1,01	1,59E-02
9	Green	EchiAgo_911600	32,9	1,45	7,04E-03
10	Magenta	EchiAgo_739100	32,5	1,43	8,36E-03
11	Black	EchiAgo_739100	34,6	1,43	3,40E-03
13	Gold	EchiAgo_911700	25,3	1,31	1,83E-01
14	Light Green	EchiAgo_911700	25,2	1,25	1,91E-01

Con los datos obtenidos en las tablas 7, 8 y 9 se establecieron los niveles de expresión respecto a Actina obteniéndose los siguientes resultados: los genes EchiAgo_911700 y EchiAgo_346200 se expresan en mayor grado que los genes EchiAgo_739100 y EchiAgo_911600 en *E. multilocularis* y en *E. granulosus* coincidentemente con lo obtenido mediante el método b). Las curvas obtenidas y los datos sin procesar pueden verse en el apéndice.

Tabla 10. Expresión porcentual con respecto a expresión de *EchiActina_190400*

<i>E. granulosus</i> C2P2		
Gen	Expresión relativa	
	Actina = 1,00000	Actina=100%
EchiG_346200	0,1770	17,70
EchiG_911600	0,0082	0,82
EchiG_739100	0,00591	0,59
EchiG_911700	0,1770	17,70*
<i>E. granulosus</i> P11		
Gen	Expresión relativa	
	Actina = 1,00000	Actina=100%
EchiG_346200	0,06790	6,790
EchiG_911600	0,00677	0,677
EchiG_739100	0,00299	0,299
EchiG_911700	0,27700	27,700
<i>E. multilocularis</i>		
Gen	Expresión relativa	
	Actina = 1,00000	Actina=100%
EchiG_346200	0,06980	6,98
EchiG_911600	0,04315	4,31
EchiG_739100	0,00588	0,588
EchiG_911700	0,18700	18,70

*Eficiencias de Amplificación no comparables.

En la tabla 10 se observa el nivel de la expresión de los genes estudiados expresados como porcentaje de la expresión del gen Actina, salvando las dificultades experimentales, en todas las muestras predominan dos genes: EchiAgo_911700 y EchiAgo_346200.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Genotipificación:

El primer paso en toda línea de investigación de *Echinococcus* debería ser procurar la información de los genotipos involucrados. Dado que los genotipos presentan características particulares, de importancia biológica y epidemiológica, que se observan en las etapas del ciclo de vida del parásito como se ha descrito en la Introducción.

En esta tesis se optimizó la técnica de determinación de los genotipos mediante amplificación y secuenciación del gen CO1 mitocondrial. Dicha técnica es la que provee mayor información en cuanto al genotipo comparada con técnicas de RFLP ó SSCP previamente descritas (Kamenetzky y col., 2002). Si bien el procedimiento requiere secuenciar el producto obtenido, la optimización realizada en esta tesis en el paso previo de amplificación y en el de purificación del producto obtenido dieron como resultado que cada muestra se secuencie solo una vez con cada primer debido a la alta calidad de los electroferogramas. Asimismo, muestras limitadas en cuanto a la cantidad de material dan buenos resultados gracias a la optimización de la obtención de ADN genómico. Todos los genotipos descritos hasta el momento en el país fueron establecidos por Rosenzvit, 1999 y Kamenetzky y col., 2002.

Extracción de información a partir del genoma de *Echinococcus spp.*

Si bien la Ribointerferencia es un mecanismo extremadamente conservado entre los organismos eucariotas los cuatro genes Argonauta descritos en la Figura 16 y Tabla 3, tienen diferentes niveles de correspondencia con Argonautas de otros organismos. Como se puede apreciar en la Tabla 11 EchiAgo_000346200 es ortóloga a alg-1 de *Caernohabditis elegans* y a la Ago-2 de humanos.

Tabla 11: Nivel de identidad de proteínas de la familia Argonauta de *Echinococcus* spp. comparada con *Caenorhabditis elegans* (alg-1) y *Homo sapiens* (Argonaute 1-4 y HIWI)

<i>Echinococcus</i> spp.	<i>C. elegans</i>	% Identidad	<i>Homo sapiens</i>	% Identidad
EchiAgo_000346200	alg-1	67,51	Argonaute2	73,00
			Argonaute-1	70,00
			Argonaute-3	70,00
			Argonaute-4	69,00
			HIWI	24,00
EchiAgo_000911700	alg-1	30,49	Argonaute-3	33,00
			Argonaute-2	33,00
			Argonaute-1	32,00
			Argonaute-4	32,00
			HIWI	29,00
EchiAgo_000911600	alg-1	30,11	Argonaute-2	32,00
			Argonaute-3	32,00
			Argonaute-1	31,00
			Argonaute-4	32,00
			HIWI	28,00
EchiAgo_000739100	alg-1	36,21	Argonaute-3	38,00
			Argonaute-2	36,00
			Argonaute-1	36,00
			Argonaute-4	37,00
			HIWI	32,00

Nuestro grupo en colaboración con el *Wellcome Trust Sanger Institute* determinó que 3 de las 4 proteínas forman un grupo filogenéticamente nuevo (Tsai y col., 2013) presente en todas las especies de parásitos platelmintos analizadas (*Echinococcus granulosus*, *E. multilocularis*, *Taenia solium*, *Hymenolepis microstoma* y *Schistosoma mansoni*) (Figura 19). La filogenia de la figura 19 muestra que las proteínas Argonauta se han dividido en el clado Ago-like, el clado Piwi-like, el grupo específico de *C. elegans* grupo, Wago y un nuevo clado

Argonauta. Alguno de los miembros de la familia Argonauta son altamente conservados entre diferentes organismos, desde moscas a humanos. Dentro de esta familia se han estudiado principalmente dos subfamilias actualmente se distinguen: las proteínas Piwi e interactúan con un sub grupo de sRNAs: Piwi associated RNAs (piRNAs). Estas proteínas regulan células madre, el desarrollo de células germinales y las proteínas Ago. Los miembros de la subfamilia Piwi se expresan sólo en las células de la línea germinal e interactúan con piRNA, pero sus funciones celulares aún no son claras (Sasaki y col., 2003; Meister y col., 2004; Aravin and Bourc'his, 2008; Klattenhoff and Theurkauf, 2008). En cambio, la subfamilia Ago es ubicua y sus miembros desempeñan un papel clave en la regulación de la expresión génica. Se unen a siRNA y miRNA, que conducen a silenciamiento de los genes a través de la inducción de la escisión del mRNA diana o la inhibición de su traducción (Meister y col., 2007; 9; Eulalio y col 2009; Filipowicz y col., 2008). Asimismo son de importancia en el desarrollo (ver siguiente sección).

A partir de estudios filogenéticos computacionales de toda la vía siRNA en todas las especies disponibles (Murphy y col., 2008) se infirió que el ancestro común más reciente de todos los eucariotas probablemente ya poseía una ruta primitiva de RNAi; se piensa que la ausencia de la ruta en ciertos eucariotas es una característica derivada, como en *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania major* (Certutti y col., 2006). Por lo tanto el nuevo clado Argonauta podría ser una adquisición del grupo de parásitos platelmintos o una divergencia particular del clado Piwi.

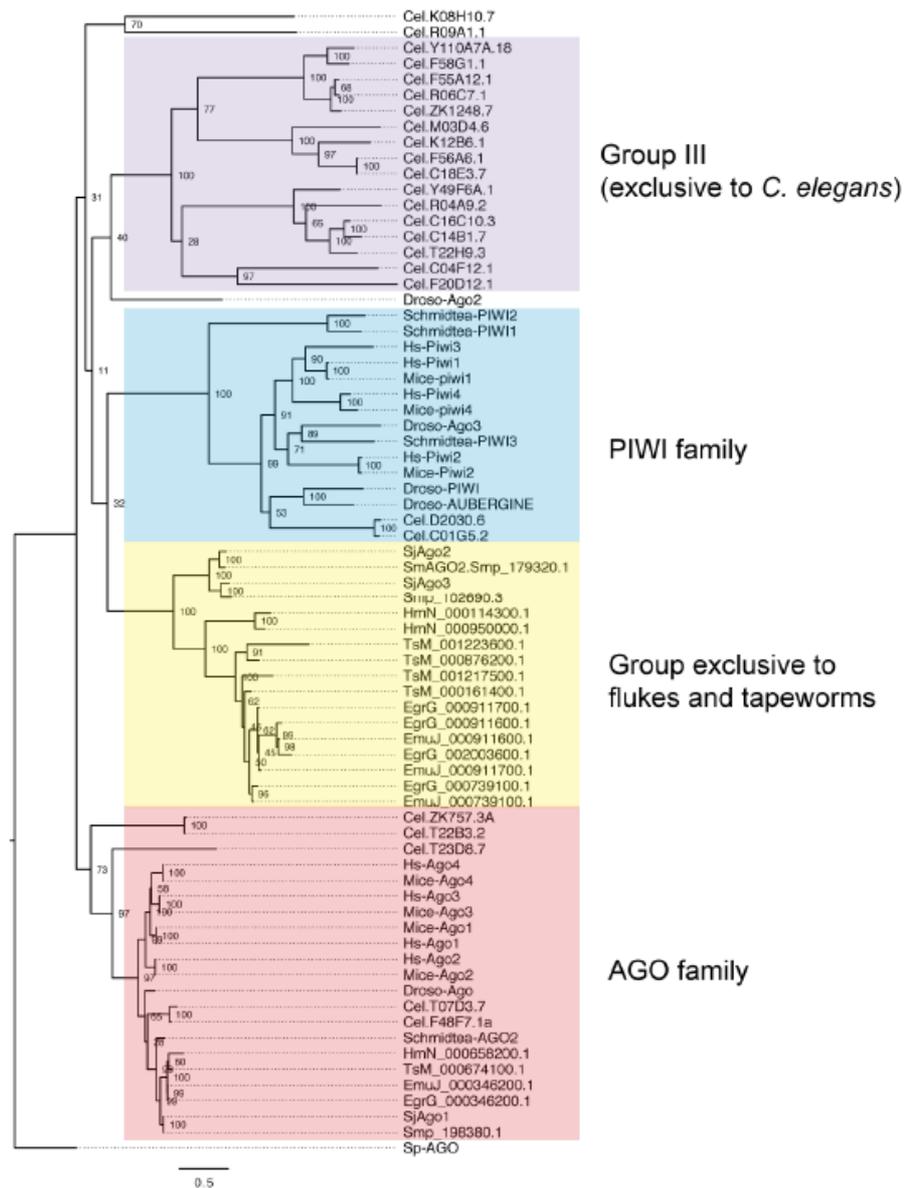


Figura 19. Árbol filogenético. Obtenido a partir de alineamientos múltiples de las proteínas Ago de parásitos platelmintos y Agos de referencia de otras especies. (Tomado de Tsai y col., 2013)

Quantificación de la expresión

En base a los modelos génicos predichos se pudo diseñar *primers* para la amplificación específica de los 4 genes. En esta tesis, se describe por primera vez la expresión de los cuatro genes argonauta en *E. granulosus* y *E. multilocularis* con la metodología RT-qPCR.

La expresión diferencial de proteínas Ago y Piwi ya ha sido descrita en otras especies, como por ejemplo en humanos. En la Figura 20 se muestra nivel de expresión relativa de cuatro proteínas Ago y de la proteína Hiwi en distintos tejidos y órganos en

humanos. Dos proteínas, Ago 1 y Ago 2 tienen una mayor expresión particularmente en cerebro, musculo esquelético y placenta; Ago 3 y Ago 4 tienen baja expresión en todos los tejidos (Valdamis y col., 2012). La proteína HIWI se expresa en varios tejidos siendo su nivel de expresión mayor en testículo e hígado (Sharma y col., 2001)

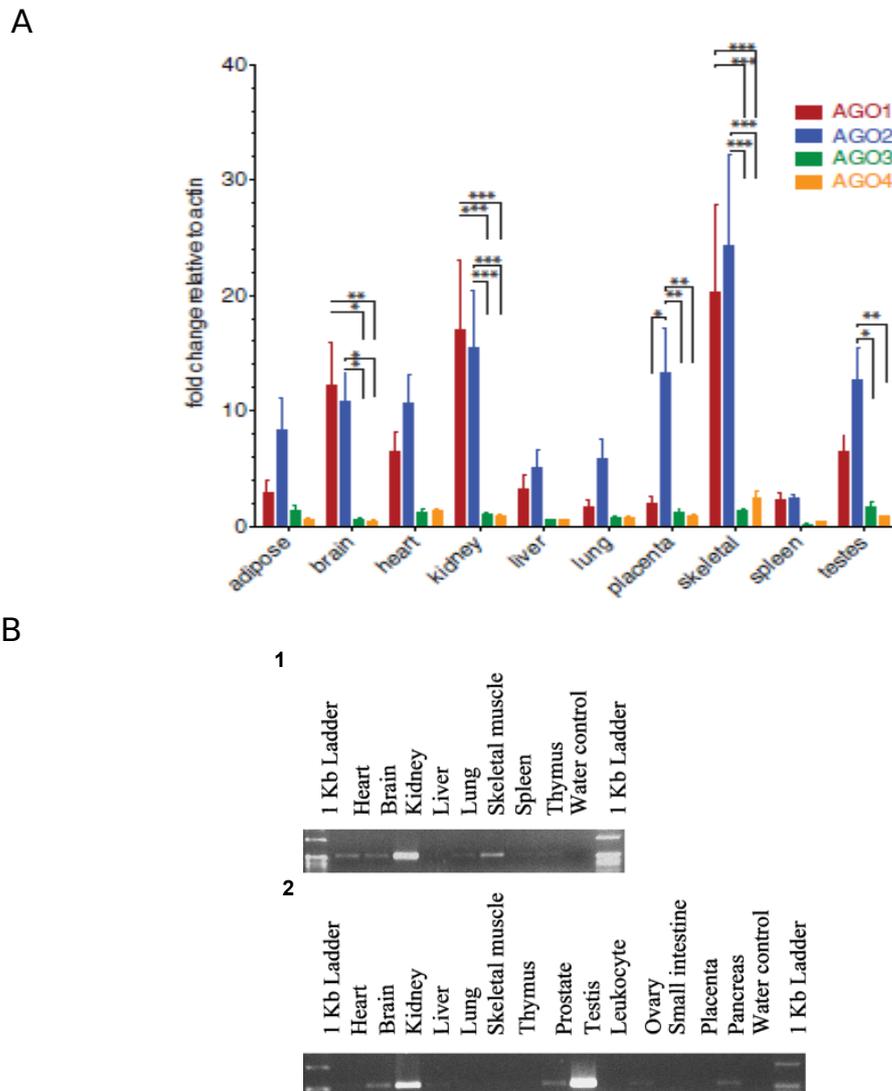


Figura 20. Nivel de expresión de proteínas Ago y Piwi en humanos. A Nivel de expresión relativo a Actina de proteínas Argonauta. El método empleado es RT-qPCR con sondas Taqman (Valdamis y col., 2012). **B** Expresión de las proteínas HIWI en (1) Tejido fetal (2) Tejido adulto. El método empleado es RT-PCR semicuantitativa (Sharma y col., 2001)

En protoescólices y metacestode de *Echinococcus* spp. también se observan dos proteínas Argonautas con alta expresión relativa, EchiAgo_346200 perteneciente al clado Ago y EchiAgo_911700 perteneciente al nuevo clado Argonauta (Tabla 10 y Figura 15). Es decir que, en dichos estadios, habría al menos 2 Argonautas divergentes altamente

expresadas. Interesantemente, también las enzimas Argonauta de *Schistosoma mansoni* parásito platelminto filogenéticamente relacionado con *Echinococcus* spp. se expresan en forma diferencial en distintas etapas del desarrollo del trematodo (Figura 21).

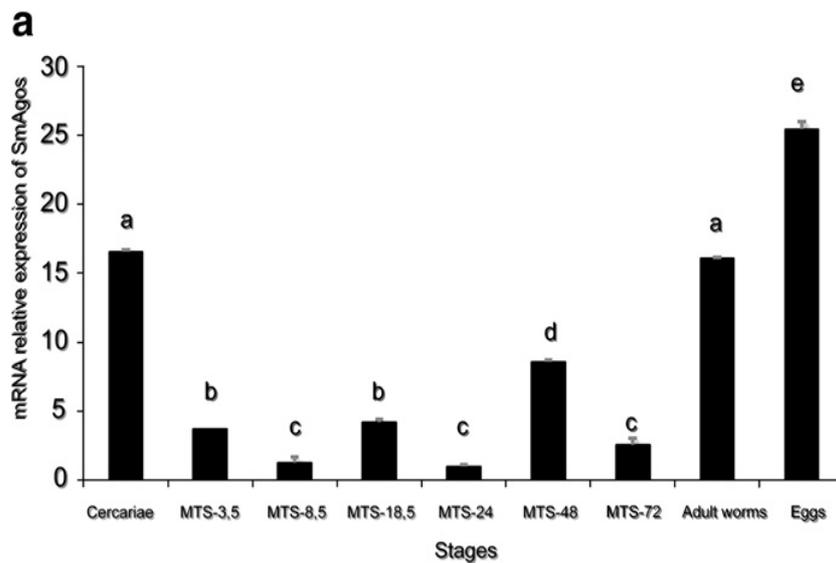


Figura 21. Análisis de la expresión de Argonautas durante el desarrollo de *Schistosoma mansoni* (Gomes, M S y col., 2009). Se midieron los niveles de expresión de ARNm, en las etapas de: cercarias, MTS-3.5; MTS-8.5; MTS-18.5; MTS-24; MTS-48, MTS-72 h, los gusanos adultos y huevos usando RT-qPCR Método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ con α -tubulina como control endógeno, se normalizaron con respecto a la etapa MTS-24. En a, b, c, d y e indican estadísticamente diferentes niveles de expresión para SmAgo 1/2/3/4.

Por el contrario, en la planaria *Schmidtea mediterránea* se observa expresión ubicua de Ago1 y Ago2 en niveles comparables (Yong L y col.i, 2011) pero no se han realizado estudios de expresión diferencial en diferentes estadios o tejidos. Las proteínas Piwi se expresan principalmente en células totipotenciales (neoblastos) (ver siguiente sección).

En un futuro sería interesante evaluar si en *E. granulosus* varían los niveles de expresión de las Argonautas en sus diferentes estadios del desarrollo.

Implicancias de las proteínas argonauta en el desarrollo

Las proteínas Ago1, Ago2 y Ago3 se sabe que se unen a miRNAs, Ago 2 también una siRNAs y Ago4 pareciera tener un rol en meiosis en células germinales masculinas en ratón, (Modzelewski y col., 2012). Las células humanas expresan cuatro proteínas Ago (hAgo1-hAgo4), y cuatro proteínas Piwi, llamadas HIWI1, HIWI2, HIWI3, y HILI. De las cuatro proteínas hAgo, sólo hAgo2 muestra la actividad de corte, y es el componente principal del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), que cataliza la escisión del mRNA diana inducida por siRNA (Liu y col., 2004; Meister y col., 2004). Curiosamente, hAgo3

también lleva una tríada catalítica (DDH), tal como hAgo2, pero no se observó actividad catalítica *in vitro*.

Las perturbaciones en la función de las proteínas Ago afectan las propiedades de células madre en una variedad de tejidos u organismos, lo que indica que esta familia de proteínas podría ser uno de los reguladores más básicos de los estados de células madre. Estudios previos en *Drosophila* y *Caenorhabditis elegans* revelan que los miembros de la subfamilia Piwi, de la familia Argonauta, tienen un papel importante en el mantenimiento de la línea germinal de células madre (GSC) (Cox, DN. 2000). La proteína Ago1 de *Drosophila* se ha demostrado que determina el destino GSC. En ratón se observa que la expresión de Ago2 materna es esencial en estadios tempranos de embriogénesis (Lykke-Andersen, 2008). En planarias el rol de la sub familia PIWI ha sido demostrado como crucial para la diferenciación de *stem cells* adultas y la regeneración. Luego del silenciamiento parcial (knockdown) de Ago2 en planarias, se observan severos defectos en su regeneración. Estas observaciones demostraron que Ago2 es necesaria para la regeneración y la homeostasis normal del tejido. Por otro lado, en *Schistosoma mansoni* la proteína denominada por los autores Ago2 forma parte del grupo de argonautas nuevo de parásitos platelmintos (figura 19). Esta proteína posee alta expresión en ovario, glándula vitelina y testículos de gusanos adultos. Curiosamente en *Schistosoma japonicum* la Ago2 demostró tener una fuerte asociación a transposones (Gomes y col., 2009).

La expresión diferencial de proteínas con secuencias divergentes, como es el caso de las EchiAgo podría indicar función diferencial. Los alcances de la función del mecanismo de RNAi, desde sus orígenes son amplios, desde protección inmune contra genomas extraños como virus y transposones, apareciendo luego otras funciones como la regulación del desarrollo por los miRNA y detención de la transcripción por los mecanismos descriptos. Por lo expuesto anteriormente se evidencia que las proteínas de la familia Argonauta tienen un rol imprescindible en el desarrollo de metazoos. Sería interesante determinar el rol de estas proteínas durante el desarrollo del parásito durante su ciclo de vida. Para ello, están en marcha ensayos de RT-qPCR a partir de mRNA extraído de la capa germinal del quiste. Este tejido es difícil de estudiar dado que no puede separarse completamente de la capa acelular laminar cuyo alta contenido de mucopolisacáridos contaminan la extracción de ARN. Asimismo se planea silenciar genes argonauta en protoescólex de *E. granulosus*.

Los objetivos generales y específicos propuestos en esta tesis fueron cumplidos, aunque no en forma ideal por algunas limitantes, siendo la más importante la baja disponibilidad de muestras de quistes almacenados en condiciones de extraer RNA, es decir quistes provenientes de materia de matadero con menos de dos días de faenado, no congelado ni adicionado ningún conservante.

6. APÉNDICE

Tabla 1. Primers para amplificar cDNA de Argonautas

Genes	Secuencia (5'-3')	Temperatura de alineación (°C)	Tamaño del fragmento (pb)
EchiAgoF1_346200	CAAGTGGGTCAAGAGCAGAA	51,78	
EchiAgoR1_346200	AGGTCTGCATGTCAGTGAGC	53,83	100
EchiAgoF2_911600	AAATTCGGATTGGGAATGAG	47,68	
EchiAgoR2_911600	GTACCAGCTCCCCCTATCAA	53,83	97
EchiAgoF4_739100	GCAGATCGTTTTGGGAATTT	47,68	
EgrAgoR4_739100	AAAGTGAGCACTCGGTTGTG	51,78	143
EgrAgoF5_911700	GGAGGAACAATTGGGAGAAA	47,68	
EchiAgoR5_911700	ACACATCCGATACGTGCGAAA	49,73	67
eif_F	TCGGGACAAGAGGGTAGAGA	53,83	
eif_R	ACTAACAGCGGAAGGCGTAA	51,78	108
actin_190400_F1	ACGGGTATCGTCTTGGACTC	53,83	
actin_190400_R1	CACGACCAGCTAAATCGAGA	51,78	105

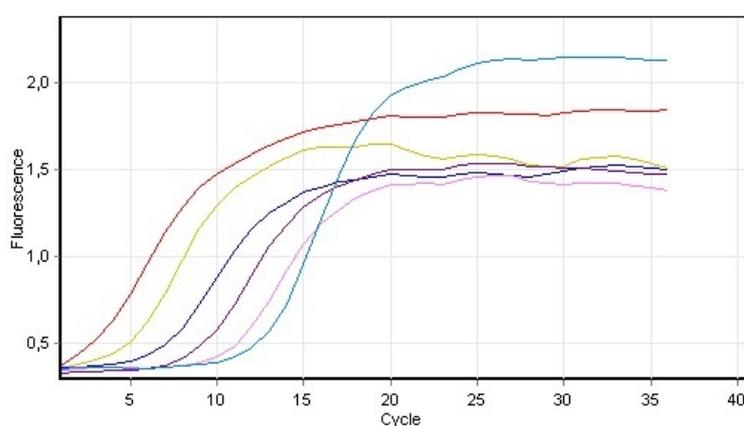
Reacciones de Real Time PCR para la selección del método de cuantificación

1- Curvas de calibración con diluciones crecientes:

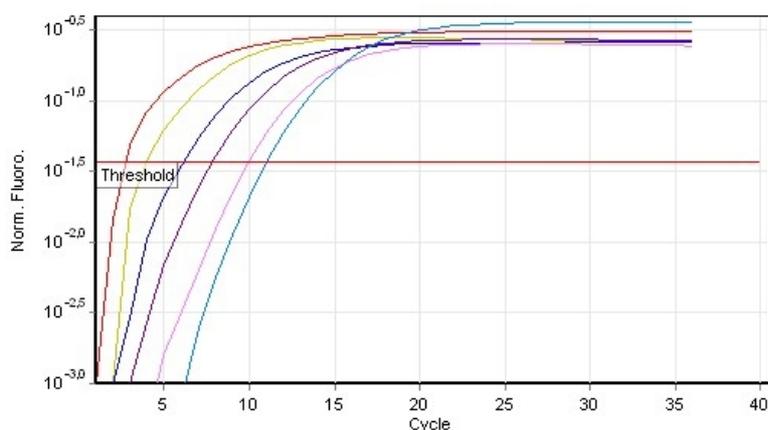
ACTINA

Umbral	0,0368
Curva estándar (1)	$\text{conc} = 10^{(-0,343 \cdot \text{CT} + 2,276)}$
Curva estándar (2)	$\text{CT} = -2,912 \cdot \log(\text{conc}) + 6,627$
Eficiencia de reacción	1,20526 (* = $10^{(-1/m)} - 1$)
M	-2,91155
B	6,62718
R ²	0,99344

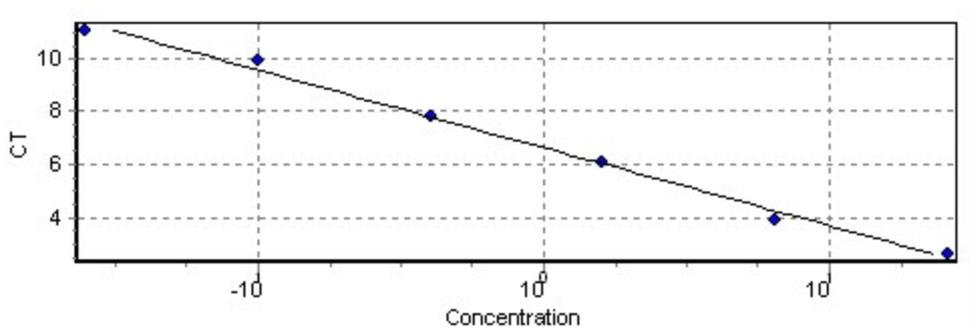
Ciclado	
Hold @ 95°C, 15 min 0 secs	
Cycling (40 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 10 secs
	Step 2 @ 55°C, hold 30 secs
	Step 3 @ 72°C, hold 30 secs, acquiring to Cycling A([Green][1][1])



Actina: Log (Fluorescencia) en función de los ciclos de PCR. Se señala con una recta el umbral.



Actina: Curva estándar



Actina: Resultados de la PCR en tiempo real

No.	Color	Muestra	Ct	Concentración dada (# copias)	Concentración calculada (# copias)	% Var
1	Red	1152	2,65	25,9500	23,2083	10,6%
2	Yellow	4608	3,94	6,4870	8,3424	28,6%
3	Blue	18432	6,06	1,6122	1,5612	3,2%
4	Purple	73728	7,79	0,4055	0,3977	1,9%
5	Pink	294912	9,91	0,1014	0,0744	26,7%
6	Cyan	1179648	11,01	0,0250	0,0312	24,9%

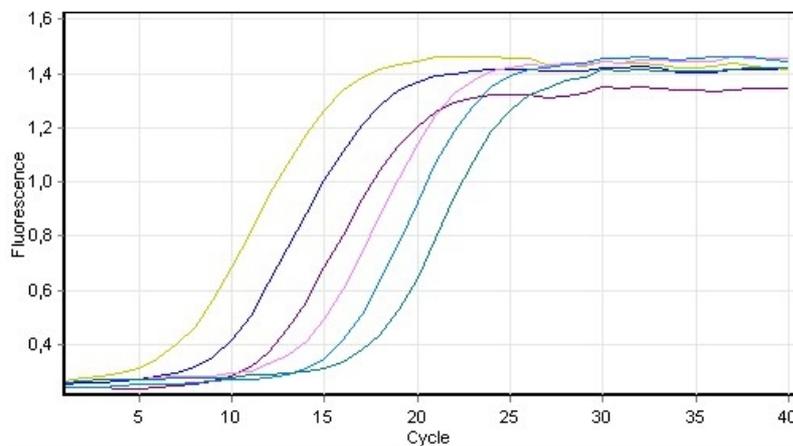
AGO 1 EchiAgo_346200

Umbral

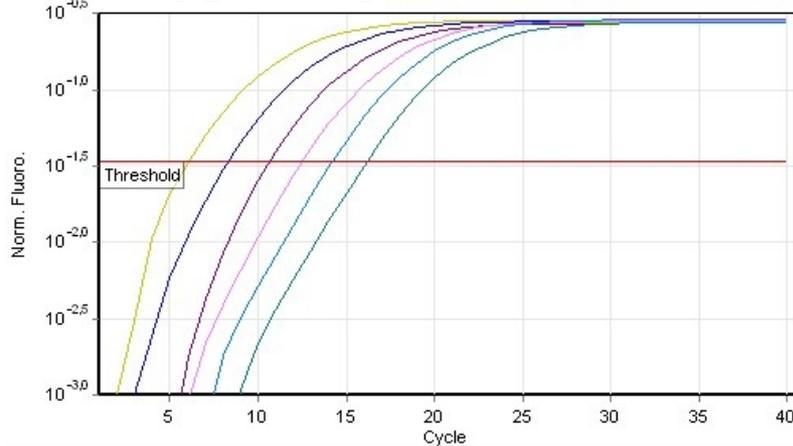
Curva estándar (1)	$\text{conc} = 10^{(-0,299 \cdot \text{CT} + 3,049)}$
Curva estándar (2)	$\text{CT} = -3,348 \cdot \log(\text{conc}) + 10,207$
Eficiencia de reacción	$0,98938 \left(* = 10^{(-1/m) - 1} \right)$
M	-3,34764
B	10,2066
R ²	0,99633

Ciclado	
Hold @ 95°C, 15 min 0 secs	
Cycling (40 repeats)	Step 1 @ 94°C, hold 10 secs
	Step 2 @ 48°C, hold 30 secs
	Step 3 @ 72°C, hold 30 secs, acquiring to Cycling A([Green][1][1])
Melt (67-95°C), hold secs on the 1st step, hold 5 secs on next steps, Melt A([Green][1][1])	

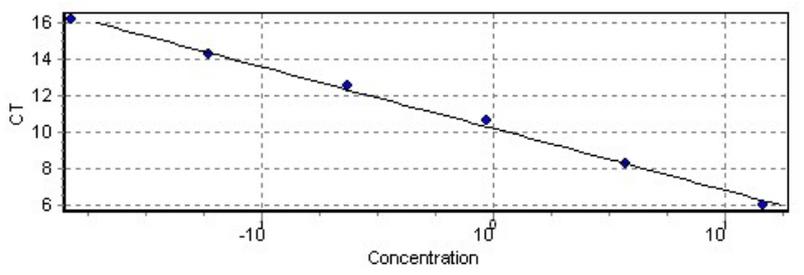
AGO 1 EchiAgo_346200: Fluorescencia en función de los ciclos de PCR



AGO 1 EchiAgo_346200: Log (Fluorescencia) en función de los ciclos de PCR.



AGO 1 EchiAgo_346200: Curva estándar



AGO 1 EchiAgo_346200: Resultados de la PCR en tiempo real

No.	Color	Dilución	Ct	Concentración dada (# copias)	Concentración calculada (# copias)	% Var
2	Yellow	1152	6,03	14,7600	17,6313	19,5%
3	Blue	4608	8,28	3,7540	3,7572	0,1%
4	Purple	18432	10,63	0,9385	0,7456	20,6%
5	Pink	73728	12,52	0,2340	0,2035	13,0%
6	Light Blue	294912	14,21	0,0590	0,0637	8,0%
7	Teal	1179648	16,15	0,0150	0,0168	12,1%

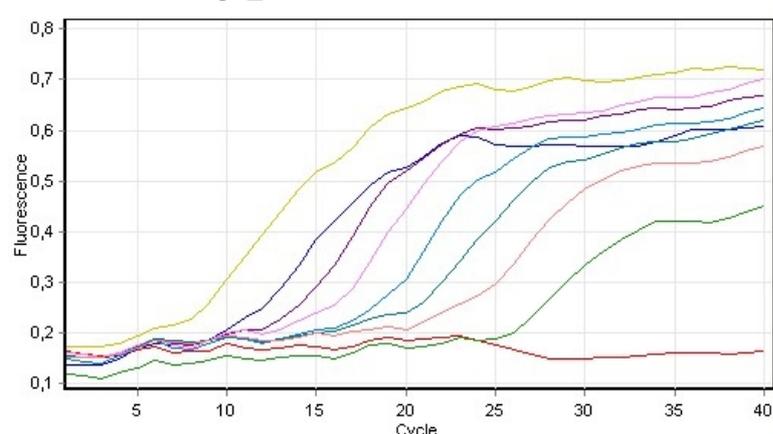
AGO2 >EchiAgo_911600

Umbral	0,0088
Curva estándar (1)	conc= 10 [^] (-0,297*CT + 2,700)
Curva estándar (2)	CT = -3,370*log(conc) + 9,102
Eficiencia de reacción	0,98014 (* = 10 [^] (-1/m) - 1)
M	-3,37046
B	9,10158
R [^] 2	0,99782

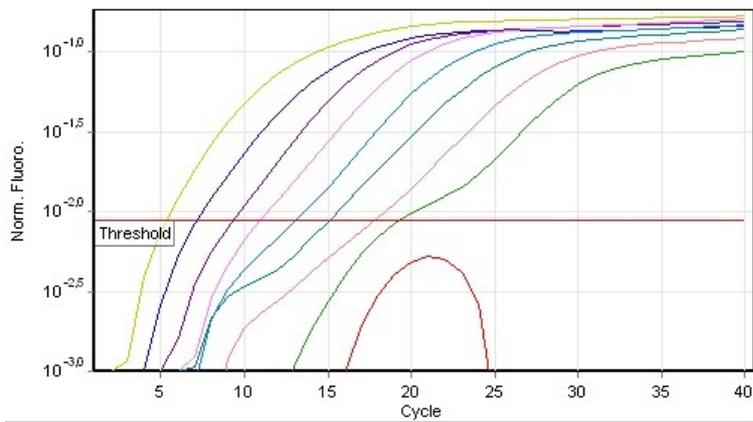
Ciclado

Hold @ 95°C, 15 min 0 secs	
Cycling (40 repeats)	Step 1 @ 94°C, hold 10 secs
	Step 2 @ 47°C, hold 30 secs
	Step 3 @ 72°C, hold 30 secs, acquiring to Cycling A([Green][1][1])
Melt (67-95°C), hold secs on the 1st step, hold 5 secs on next steps, Melt A([Green][1][1])	

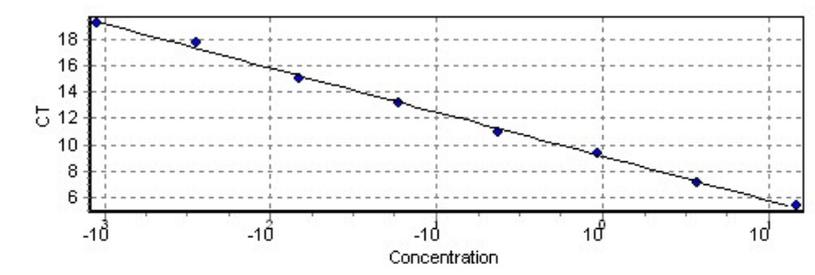
AGO2 >EchiAgo_911600: Fluorescencia en función de los ciclos de PCR.



AGO2 >EchiAgo_911600: Log (Fluorescencia) en función de los ciclos de PCR.



AGO2 >EchiAgo_911600: Curva estándar



AGO2 >EchiAgo_911600: Resultados de la PCR en tiempo real

No.	Color	Muestra	Ct	Concentración dada (# copias)	Concentración calculada (# copias)	% Var
2	■	1152	5,33	14,7600	13,1321	11,0 %
3	■	4608	7,09	3,7540	3,9484	5,2%
4	■	18432	9,32	0,9385	0,8631	8,0%
5	■	73728	10,96	0,2340	0,2810	20,1 %
6	■	294912	13,14	0,0590	0,0636	7,7%
7	■	1179648	15,05	0,0150	0,0172	14,6 %
8	■	4718592	17,78	0,0036	0,0027	26,1 %
9	■	18874368	19,28	0,0009	0,0010	6,0%

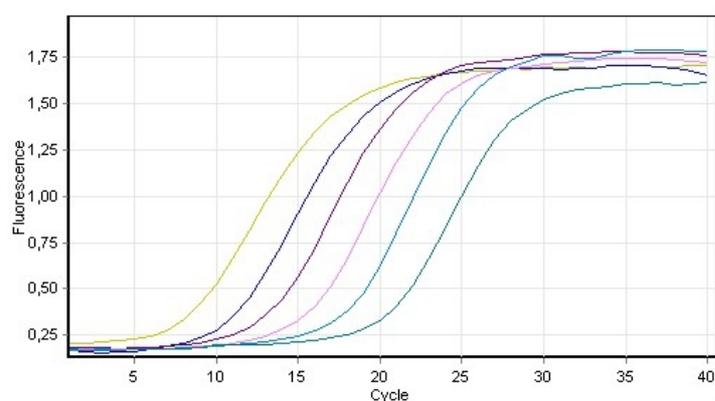
Ago4 >EgrAgo_739100

Umbral	0,0812
Curva estándar (1)	$\text{conc} = 10^{(-0,261 \cdot \text{CT} + 3,422)}$
Curva estándar (2)	$\text{CT} = -3,825 \cdot \log(\text{conc}) + 13,092$

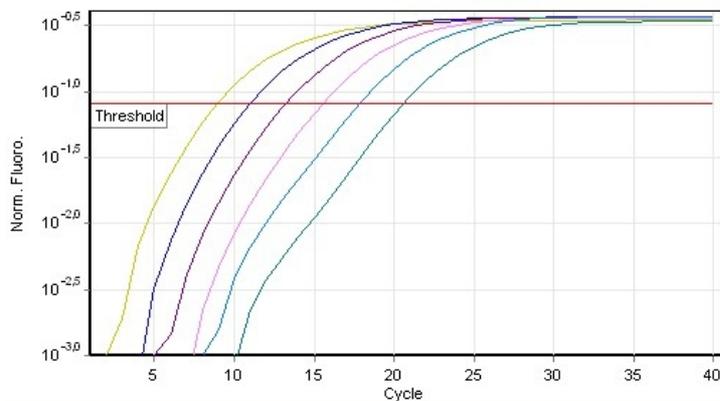
Eficiencia de reacción	0,82565 (* = 10 ^{^(-1/m) - 1})
M	-3,82528
B	13,09199
R ²	0,99761

Ciclado	
Hold @ 95°C, 15 min 0 secs	
Cycling (40 repeats)	Step 1 @ 94°C, hold 10 secs
	Step 2 @ 48°C, hold 30 secs
	Step 3 @ 72°C, hold 30 secs, acquiring to Cycling A([Green][1][1])
Melt (67-95°C), hold secs on the 1st step, hold 5 secs on next steps, Melt A([Green][1][1])	

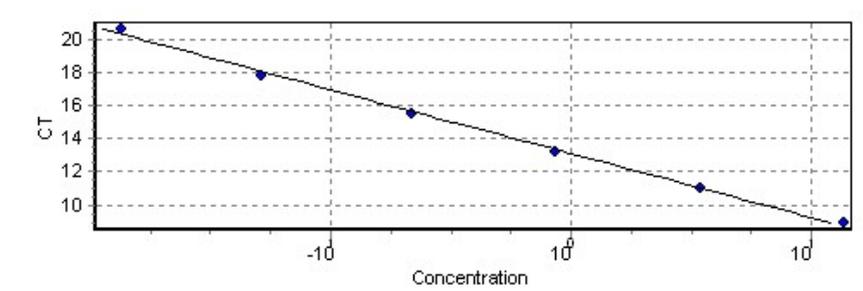
Ago4 >EgrAgo_739100: Fluorescencia en función de los ciclos de PCR.



Ago4 >EgrAgo_739100: Log (Fluorescencia) en función de los ciclos de PCR.



Ago4 >EgrAgo_739100: Curva estándar



Ago4 >EgrAgo_739100: Resultados de la PCR en tiempo real

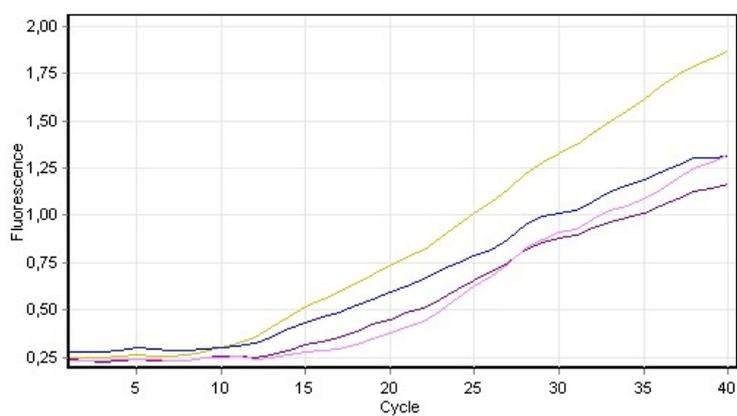
No.	Color	Muestra	Ct	Concentración dada (# copias)	Concentración calculada (# copias)	% Var
2		1152	8,93	13,8000	12,2694	11,1 %
3		4608	10,99	3,4500	3,5368	2,5%
4		18432	13,22	0,8626	0,9250	7,2%
5		73728	15,52	0,2156	0,2313	7,3%
6		294912	17,80	0,0508	0,0586	15,4 %
7		1179648	20,57	0,0134	0,0111	17,4 %

AGO5 >EchiAgoR5_911700

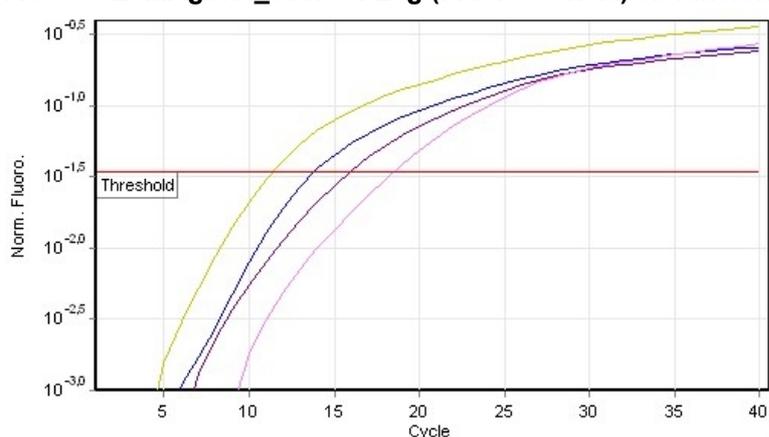
Umbral	0,0344
Curva estándar (1)	conc= 10 [^] (-0,257*CT + 3,520)
Curva estándar (2)	CT = -3,887*log(conc) + 13,681
Eficiencia de reacción	0,80838 (* = 10 [^] (-1/m) - 1)
M	-3,88666
B	13,68076
R ²	0,99795

Ciclado	
Hold @ 95°C, 15 min 0 secs	
Cycling (40 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 10 secs
	Step 2 @ 55°C, hold 30 secs
	Step 3 @ 73°C, hold 30 secs, acquiring to Cycling A([Green][1][1])
Melt (67-95°C), hold secs on the 1st step, hold 5 secs on next steps, Melt A([Green][1][1])	

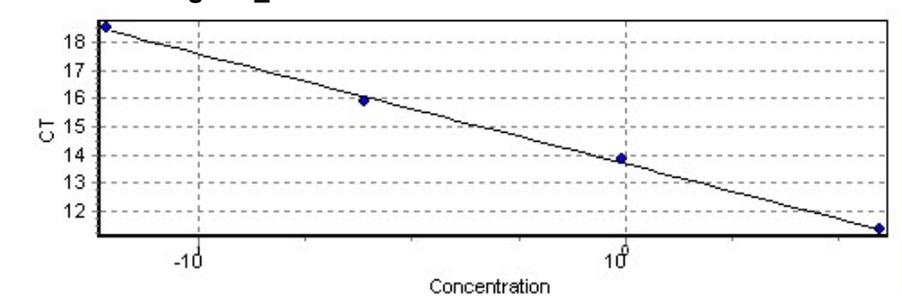
AGO5 >EchiAgoR5_911700: Fluorescencia en función de los ciclos de PCR.



AGO5 >EchiAgoR5_911700: Log (Fluorescencia) en función de los ciclos de PCR.



AGO5 >EchiAgoR5_911700: Curva estándar



AGO5 >EchiAgoR5_911700: Resultados de la PCR en tiempo real

No.	Color	Muestra	Ct	Concentración dada (# copias)	Concentración calculada (# copias)	% Var
1	Yellow	4608	11,37	3,906	3,920	0,4%
2	Blue	18432	13,83	0,976	0,917	6,0%
3	Purple	73728	15,87	0,244	0,273	12,0%

No.	Color	Muestra	Ct	Concentración dada (# copias)	Concentración calculada (# copias)	% Var
4		294912	18,49	0,061	0,058	5,3%

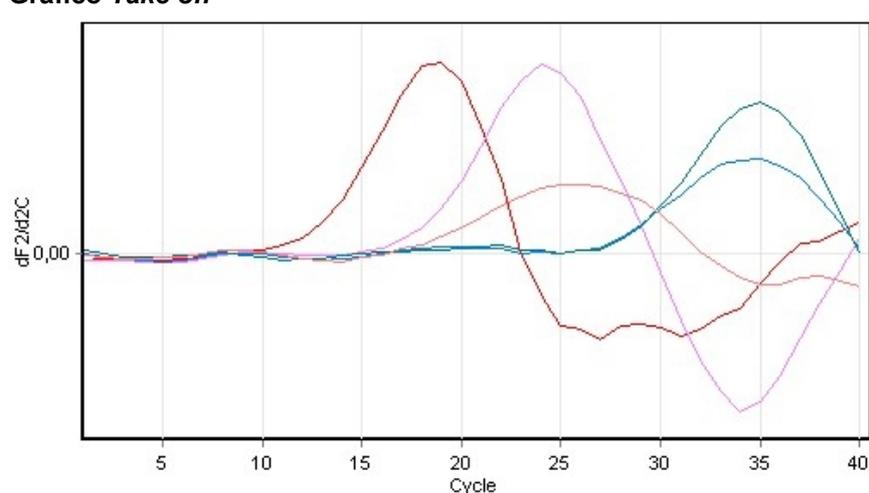
2- Real Time PCR Reporte comparativo. Optimización de temperatura de Annealing.

Muestra: *E. granulosus* C2P2

Información de la Comparación cuantitativa

Amplificación de la reacción	1,39
Desvío estándar	0,43
Réplica control	(1) actina 6

Gráfico Take off



Take off: Resultados

No.	Color	Muestra	Take Off	Amplificación	Conc. Comparativa	Rep. Takeoff
1		EchiActina_190400	13,8	1,58	1,00E+00	13,8
5		EchiAgo_346200	19,1	1,80	1,77E-01	19,1
6		EchiAgo_911600	28,5	1,29	8,20E-03	28,5
7		EchiAgo_739100	29,5	1,57	5,91E-03	29,5
8		EchiAgo_911700	19,1	0,69	1,77E-01	19,1

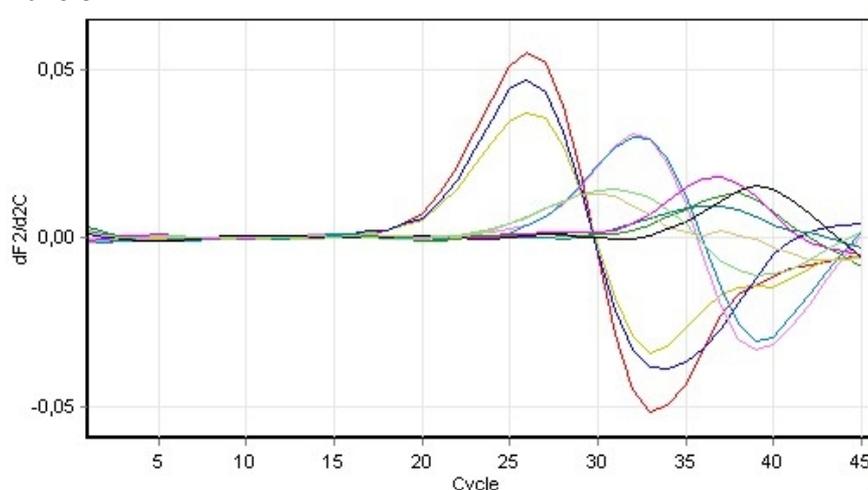
Figura 8. Cuantificación comparativa (Annealing 55 °C)

Muestra: *E. multilocularis*

Información de la Comparación cuantitativa

Amplificación de la reacción	1,53
Desvío estándar	0,19
Réplica control	(1) actina

Gráfico Take off



Take off: Resultados

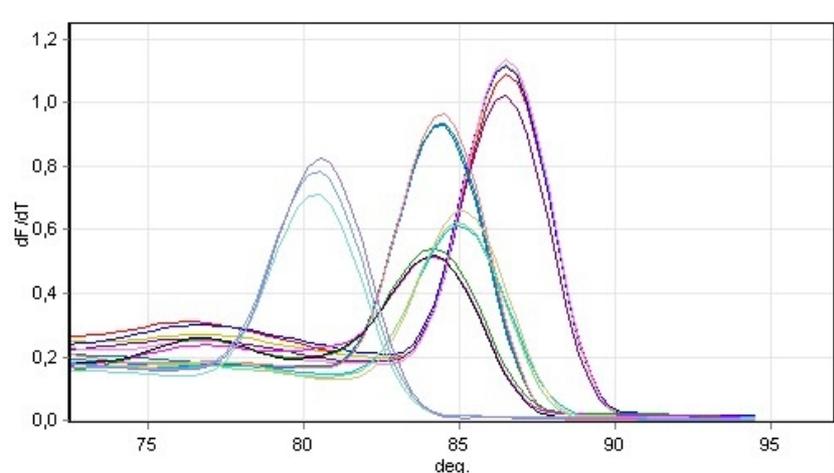
No.	Color	Nombre	Take Off	Amplificación	Conc. Comparativa	Rep. Take off
1	Red	EchiActina_190400	21,3	1,79	1,01E+00	21,3
2	Yellow	EchiActina_190400	21,3	1,78	1,01E+00	
3	Blue	EchiActina_190400	21,4	1,67	9,72E-01	
5	Pink	EchiAgo_346200	27,7	1,61	6,54E-02	27,6
6	Light Blue	EchiAgo_346200	27,4	1,64	7,43E-02	

No.	Color	Nombre	Take Off	Amplificación	Conc. Comparativa	Rep. Take off
7		EchiAgo_911600	31,0	1,01	1,59E-02	32,0
9		EchiAgo_911600	32,9	1,45	7,04E-03	
10		EchiAgo_739100	32,5	1,43	8,36E-03	33,6
11		EchiAgo_739100	34,6	1,43	3,40E-03	
13		EchiAgo_911700	25,3	1,31	1,83E-01	25,3
14		EchiAgo_911700	25,2	1,25	1,91E-01	

***E. granulosus* P11**

Curva de Melting

Ciclo	
Hold @ 95°C, 15 min 0 secs	
Cycling (40 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 10 secs
	Step 2 @ 60°C, hold 30 secs
	Step 3 @ 72°C, hold 30 secs, acquiring to Cycling A([Green][1][1])
Melt (72-95°C) , hold secs on the 1st step, hold 5 secs on next steps, Melt A([Green][1][1])	



No.	Color	Name	Pico
1		EchiActina_190400	86,5
2		EchiActina_190400	86,5
3		EchiActina_190400	86,5
4		EchiActina_190400	86,5

No.	Color	Name	Pico
5		EchiActina_190400	86,5
6		EchiAgo_346200	84,5
7		EchiAgo_346200	84,3
8		EchiAgo_346200	84,5
9		EchiAgo_911600	84,2
10		EchiAgo_911600	84,2
11		EchiAgo_911600	84,0
12		EchiAgo_739100	85,0
13		EchiAgo_739100	85,0
14		EchiAgo_739100	85,0
15		EchiAgo_911700	80,3
16		EchiAgo_911700	80,5
17		EchiAgo_911700	80,5

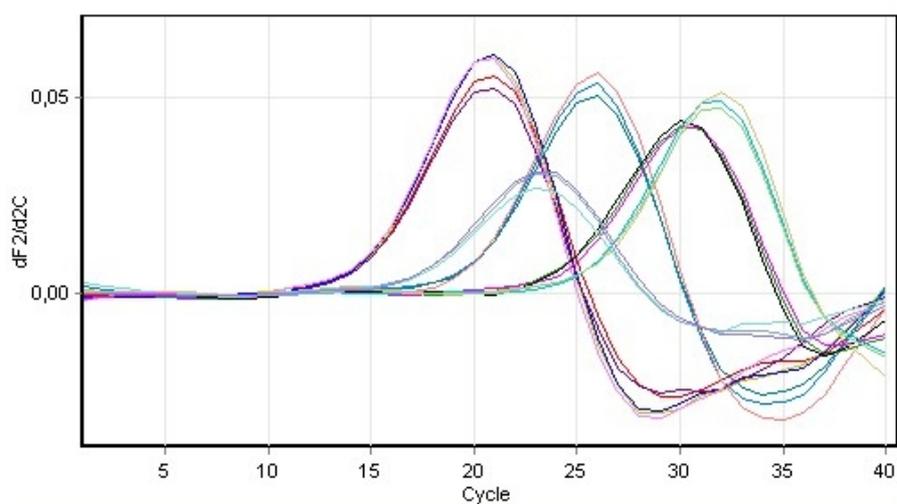
***E.granulosus* P11**

Cuantificación comparativa (Annealing 60 °C)

Información de la Comparación cuantitativa

Amplificación de la reacción	1,68
Desvío estándar	0,04
Réplica control	(1) 1 actina

Gráfico *Take off*



Take off: Resultados

No.	Color	Nombre	Take Off	Amplificaci ^o n	Conc. Comparativa	Rep. Take off
1	■	EchiActina_190400	15,9	1,69	1,00E+00	15,9
2	■	EchiActina_190400	16,0	1,68	9,49E-01	16,0
3	■	EchiActina_190400	16,0	1,70	9,49E-01	16,0
4	■	EchiActina_190400	15,9	1,68	1,00E+00	15,9
5	■	EchiActina_190400	15,9	1,64	1,00E+00	15,9
6	■	EchiAgo_346200	21,1	1,64	6,67E-02	21,1
7	■	EchiAgo_346200	21,0	1,66	7,03E-02	21,0
8	■	EchiAgo_346200	21,1	1,70	6,67E-02	21,1
9	■	EchiAgo_911600	25,4	1,64	7,11E-03	25,4
10	■	EchiAgo_911600	25,7	1,72	6,08E-03	25,7
11	■	EchiAgo_911600	25,4	1,67	7,11E-03	25,4
12	■	EchiAgo_739100	26,9	1,73	3,26E-03	26,9

No.	Color	Nombre	Take Off	Amplificaci ^o n	Conc. Comparativa	Rep. Take off
13		EchiAgo_739100	27,3	1,74	2,64E-03	27,3
14		EchiAgo_739100	27,0	1,71	3,09E-03	27,0
15		EchiAgo_911700	18,4	1,73	2,72E-01	18,4
16		EchiAgo_911700	18,3	1,60	2,87E-01	18,3
17		EchiAgo_911700	18,4	1,83	2,72E-01	18,4

Take off point : 20% máx dF 2/d2c (máx de la segunda derivada del incremento de Fluorescencia)

Instrumental

Para la manipulación de muestras se dispone de un gabinete de bioseguridad clase II marca ESCO.

Termocicladores: Apolo, PE 9600, MiniCycler M J , Labnet Multigene , Real Time PCR

Rotor Gene 6000 5Plex, ABI Gene Amp PCR System 9700.

Fuente de electroforesis Labnet 300 y Bio Rad 3000. Cubas de electroforesis para geles de agarosa y poliacrilamida.

Instrumento para documentación digital de geles Gel Logic 212 Pro

Secuenciador: ABI 310 Genetic Analyzer con el software Sequencing Analysis v5.3.1

Extracción de ácidos nucleicos : Equipo para extracción automática de Ácidos Nucleicos QIAcube (Qiagen). QIAamp DNA Blood Mini Kit RNeasy Mini Kit (Qiagen).

Freezer Presvac de -85C.

Freezer Presvac de -35C

Cuantificación de ácidos nucleicos:

Qubit Fluorometer: Qubit Cuantitation System (Life Technologies)

Reagent/Assay	Assay range	Sample starting concentration range
Qubit dsDNA HS Assay	0.2–100 ng	10 pg/μl–100 ng/μl
Qubit dsDNA BR Assay	2–1,000 ng	100 pg/μl–1 μg/μl
Qubit ssDNA Assay	1-200 ng	50 pg/μL-200 ng/μL
Qubit RNA Assay	5–100 ng	250 pg/μl–100 ng/μl
Qubit RNA BR Assay	20-1,000 ng	1 ng/μ-1 μg/μL
Qubit Protein Assay*	0.25–5 μg	12.5 μg/ml–5 mg/ml

Espectrofotómetro UV-vis:

SmartSpec 3000 Bio Rad con celda de cuarzo.

Retrotranscripción:

AMV, MMLV, Impron II (Promega), SuperScrip III Platinum (Invitrogen)

RNaseOUT Recombinant Ribonucleasa Inhibitor (Invitrogen)

Amplificación:

GenomiPhi (GE) Amplificación isotérmica de ADN

FirePol Master Mix 5x (Solis Biodine), GoTaq DNA polimerasa (Promega)

Long PCR Enzyme Mix (Fermentas)

Electroforesis:

Geles de agarosa D1 AGAROSE LOW EEO (CONDA PRONADISE)

Solis BioDyne 100 bp DNA Ladder : marcador de peso molecular.

Purificación de productos de PCR:

QIAquick PCR Purification Kit (100pb/10kbp)

QIAquick Gel Extraction Kit (70 pb/10kbp) (Qiagen)

Secuenciación :

Purificación de la reacción de secuenciación: BigDye XTerminator Purification kit

Reacción de secuenciación:

BigDye v3.1 Kit

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarez Rojas, C.A., Gauci C.G., Lightowers M.W. (2013). Antigenic differences between the EG95-related proteins from *Echinococcus granulosus* G1 and G6 genotypes: implications

for vaccination. *Parasite Immunol*;35(2):99-102. doi:10.1111/pim.12009. PubMed PMID: 23009356.

Ameres, S.L. and Zamore, P.D. (2013). Diversifying microRNA sequence and function. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 14, 475–488.

Ammann, R. and Eckert, J. (1995). Clinical diagnosis and treatment of Echinococcosis in humans in *Echinococcus* and Hydatid Disease, Thompson, R.C.A and Lymbery, A.J., eds. CAB International, Wallingford, Oxon, UK. Pág: 411-463.

Aravin, A.A., Bourc'his D. (2008). Small RNA guides for de novo DNA methylation in mammalian germ cells. *Genes Dev.* 22:970-5

Bernstein E, Caudy A, Hammond, S., Hannon, G. (2001). «Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference». *Nature* 409 (6818): pp. 363-6

Bogitish, Burton j. and Cheng, Thomas C. Human Parasitology, San Diego, Academic Press, 1998. NLM ID: 100886470.

Bowles J., Blair D. and McManus D.P. (1992). Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular and Biochemical Parasitology* 54,165-173.

Bustin, S.A.(2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* 29: 23-39.

Cabrera, M., Canova, S., Rosenzvit, M., Guarnera, E. (2002) Identification of *Echinococcus granulosus* eggs. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 44 29–34.

Certutti, H., Casas-Mollano, J. (2006). On the origin and functions of RNA-mediated silencing:from protists to Man. *Current Genetics*. August vol 50 Issue 2, pp 81-99.

Chow, C., Gauci, C.G., Vural, G., Jenkins, D.J., Heath, D.D., Rosenzvit, M.C., Harandi, M.F., Lightowers, M.W. (2008). *Echinococcus granulosus*: variability of the host-protective EG95 vaccine antigen in G6 and G7 genotypic variants. *Exp Parasitol.* 119(4):499-505. doi: 10.1016/j.exppara.2008.01.004. Epub 2008 Feb 2. PubMed PMID: 18342311.

Cox, D.N., Chao, A., Lin, H. (2000). Piwi encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells. *Development* 127(3):503-14. PMID 10631171

Cucher, M., Prada, L., Mourglia-Ettlin, G. Dematteis, S, Camicia, F, Rosenzvit, M. (2011). Identification of *Echinococcus granulosus* microRNA and their expression in different life cycle stages and parasite genotypes. *Int J for Parasitology.* 41, 439-448.

Cucher, M., Mourglia-Ettlin, G., Prada, L., Costa, H., Kamenetzky, L., Poncini, C. Dematteis, S., Rosenzvit, M.C. (2013). *Echinococcus granulosus* pig strain (G7 genotype) protoscoleces did not develop secondary hydatid cysts in mice. *Vet Parasitol.* 193(1-3):185-92. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.11.027. Epub 2012 Nov 30. PubMed PMID: 23265812.

Díaz, A., Casaravilla, C., Irigoín, F., Lin, G., Previato, J.O., Ferreira, F. (2011). Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* I: structure. *Trends Parasitol.* 27:204-13.

de Meeûs, T., Michalakis, Y. and Renaud, F. (1998). Santa Rosalia Revisited: or Why are there so many kinds of parasites in “The garden of earthly delights”? *Parasitology Today.* 14, 10-13.

Eckert, J., Thompson, R.C. (1997). *Intraspecific variation of Echinococcus granulosus and related species with emphasis on their infectivity to humans.* *Acta Trop.* 1997 Apr 1;64(1-2):19-34. Review. *PubMed PMID: 9095286.*

Eminaga, Seda. Christodoulou, Danos .Vigneault, Francois . Chirch, George. Seidman,j. (2013). *Quantification of microRNA Expression with Next-Generation Sequencing.* Current Protocols in Molecular Biology. Published Online: doi: 10.1002/0471142727.mb0417s103.

Esquela-Kerscher, A.,Slack F. (2006).Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6(4):259-69

Eulalio, A., Huntzinger, E., Nishihara, T., Rehwinkel, J., Fauser, M., Izaurralde, E. (2009). Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA.* 15:21-32. doi: 10.1261/rna.1399509.

Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 9:102-14.

Filipowicz, W., Jaskiewicz, L., Un Kolb, F., Pillai, R.S. (2005) Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Current Opinion in Structural Biology* 13:331-341.

Galindo, M., Gonzalez, M.J. and Galanti N. (2002) *Echinococcus granulosus* protoscolex formation in natural infections. *Biological Research,* 35:365-371.

Gomes, M.S., Cabral, F.J., Jannotti-Passos, L.K., Carvalho, O.C., Rodrigues V., Baba, E.H., Sá, R.G. (2009) Preliminary analysis of miRNA pathway in *Schistosoma mansoni*. *Parasitology International* 58:61–68.

Gutiérrez, A.M., Kamenetzky, L., Parra, A., García, A., Guarnera, E. y Rosenzvit, M.C. (2001) Cepas de *Echinococcus granulosus* y su importancia para el control de la hidatidosis en Argentina. *Academia Nacional de Medicina Premio José M. Jorge*

Jenkins, D.J., Romig,T., Thompson, R.C. (2005) Emergence/re-emergence of *Echinococcus* spp.a global update. *International Journal for Parasitology* 35:1205-19.

Jensen, O., Fernández, R., Gonzalo, R., Fernández, E., Iriarte, J., Lago, J. (1995).Perspectivas de los Programas de Hidatidosis a través del Control de la enfermedad en el Ovino. *Boletín de Hidatidosis de la Provincia del Chubut.* 1995 3: 17-18.

Jones, L., Ratcliff, F. Baulcombe, D. (2001). RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Current Biology* 11:747-757.

Jopling, C.L., Yi, M., Lancaster, A.M., Lemon, S.M., Sarnow, P. (2005). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 2;309 (5740):1577-81.

Kamenetzky, L., Canova, S., Guarnera, E. and Rosenzvit, M. (2000). *Echinococcus granulosus*: DNA Extraction from Germinal Layers Allows Strain Determination in Fertile and Nonfertile Hydatid Cysts. *Experimental Parasitology* 95, 122–127

Kamenetzky, L., Gutierrez, A.M., Canova, S.G., Haag, K.H., Guarnera, E. A., Parra, A., Garcia, G., Rosenzvit, M., C. (2002). Several strains of *Echinococcus granulosus* Infect Livestock and humans in Argentina. *Infection and Evolution* 63:1-8.

Kamenetzky, L., Muzulin, P.M., Gutierrez, A.M., Angel, S.O., Zaha, A., Guarnera, E.A., Rosenzvit, M.C. (2005). High polymorphism in genes encoding antigen B from human infecting strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*; 131(Pt 6):805-15. PubMed PMID: 16336734.

Kedra A.H., Swiderski Z., Tkach V. V., Dubinský P., Pawlowski Z., Stefaniak J. and Pawlowski J. (1999). Genetic analysis of *Echinococcus granulosus* from humans and pigs in Poland, Slovakia and Ukraine. A multicenter study. *Acta Parasitológica* 44 (4) 248-254

Klattenhoff, C., Theurkauf, W. (2008). Biogenesis and germline functions of piRNAs. *Development* 135:3-9.

Kontanis, E.J. and Reed Floyd A. (2006). Evaluation of Real-Time PCR Amplification Efficiencies to Detect PCR Inhibitors *J Forensic Sci*, July 2006, Vol. 51, No. 4

Kumaratilake, L.M., Thompson, R.C., Dunsmore, J.D. (1983). Comparative strobilar development of *Echinococcus granulosus* of sheep origin from different geographical areas of Australia in vivo and in vitro. *Int J Parasitol*;13(2):151-6. PubMed PMID: 6853016.

Lavikainen, A., Lehtinen, M.J., Meri, T., Hirvelä-Koski, V., Meri, S. (2003). Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*;127(Pt 3):207-15. PubMed PMID:12964823.

Lecellier, C.H., Dunoyer, P., Arar, K., Lehmann-Che, J., Eyquem, S., Himber, C., Saïb, A., Voinnet, O. (2005). A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science*; 308 (5721):557-60.

Lightowlers, M.W., Jensen, O., Fernández, E., Iriarte, J.A., Woollard, D.J., Gauci, C.G., Jenkins, D.J., Heath, D.D. (1999). Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep. *International Journal for Parasitology*. 1999; 29: 531-534.

Liu, Y.X., Li, X.J. (2004) The advance of RNA interference. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*. Jan;35(1):53-6. Review. Chinese. PubMed PMID: 15127600.

Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. *Methods* 25:402–8.

Lykke-Andersen K. (2008) Maternal Argonaute 2 is essential for early mouse development at the maternal-zygotic transition. *Mol Biol Cell*.19(10):4383-92.

Ma L., Weinberg, R.A. (2008). Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis. **Trends Genet.** 24(9):448-56. doi: 10.1016/j.tig.2008.06.004.

Mandell, G. Bennet, J. Dolin, R. (1995). Enfermedades Infecciosas. Principios y práctica. Sexta Edición 2006. Elsevier. **McManus & Bryant** (1995) Biochemistry, physiology and molecular biology of *Echinococcus* in *Echinococcus* and Hydatid Disease, Thompson, R.C.A and Lymbery, A.J., eds. CAB International, Wallingford, Oxon, UK. 134-181.

McManus, D.P. (2002). The molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus* and cystic hydatid disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*;96 Suppl 1:S151-7. PubMed PMID: 12061336.

McManus, D.P. (2004). Molecular taxonomy and epidemiology of cystic Echinococcosis Southeast Asian *J Trop Med Public Health*. Vol 35 (Suppl 1)

McManus & Bryant (1995) Biochemistry, physiology and molecular biology of *Echinococcus* in *Echinococcus* and Hydatid Disease, Thompson, R.C.A and Lymbery, A.J., eds CAB International, Wallingford, Oxon, UK.

McManus, D.P., Zhang, L., Castrodale, L.J., Le, T.H., Pearson, M., Blair, D. (2002) Short report: molecular genetic characterization of an unusually severe case of hydatid disease in Alaska caused by the cervid strain of *Echinococcus granulosus*. *Am J Trop Med Hyg*; 67(3):296-8. PubMed PMID: 12408670.

Matzke, M., Aufsatz, W., Kanno, T., Daxinger, L., Papp, I., Mette, M., Matzke, A. (2004). Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing. *Biochimica et Biophysica Acta* 1677:129–141.

Meijerink, J. Mandigers, C. van de Locht, L. Tönnissen, E. Goodsaid, F and Raemaekers, J.A Novel (2001) A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. *J Mol Diagn.* 3(2):55-61.

Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell.* 15(2):185-97.

Meister G. (2007). miRNAs get an early start on translational silencing. *Cell.* 131:25-8.

Morseth, D. J. (1967). Fine structure of the hydatid cyst and protoscolex of *Echinococcus granulosus*. *The Journal of Parasitology*, 53, 312-325.

Modzelewski, A.J., Rebecca J. Holmes, R.J., Hiltz, S., Grimson, A. and Cohen, P.E. (2012). AGO4 Regulates Entry into Meiosis and Influences Silencing of Sex Chromosomes in the Male Mouse Germline. *Developmental Cell* 23(2):251 – 264. doi:10.1016/j.devcel.2012.07.003

Murphy, D.; Dancis, Barry and Brown, James. (2008). The evolution of core proteins involved in microRNA biogenesis *BMC Evolutionary Biology* 2008, 8:92 doi:10.1186/1471-2148-8-92

Muzulin, P. M., Kamenetzky, L., Gutiérrez, A.M., Zaha, A., Guarnera, E. A., Rosenzvit, M.C. (2008). *Echinococcus granulosus* antigen B gene family: Further studies of strain polymorphism at the genomic and transcriptional levels. *Experimental Parasitology* Volume 118, issue 2, February 2008, Pages 156–164

Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: e45.

Pfaffl, M.W., Graham, W., Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in Real-Time PCR. *Nucleic Acids Research* 30, No. 9 00

Pfaffl, M.W. (2004). Quantification Strategies in Real-Time PCR. In: A-Z of Quantitative PCR S.A.Bustin, Editor. International University Line. La Jolla, p. 87-120. **Rotor Gene Operator Manual** 1.7.87 Corbett Research. Pag. 84-86

Rosenzvit, M.C., Zhang, L.H., Kamenetzky, L., Canova, S.G., Guarnera, E.A., McManus, D.P. (1999). Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *Parasitology* 118 (Pt 5):523-30. PubMed PMID: 10363285.

Rosenzvit, M., Cucher, M., Kamenetzky, L., Macchiaroli, N., Prada, L., Camicia, F. (2013). MicroRNAs in Endoparasites. From the book *MicroRNA and Non-Coding RNA: Technology, Developments and Applications* Editors: James C. Johnson. Series: Genetics – Research and Issues Pages: 7x10 - (NBC-R) ISBN: 978-1-62618-443-5

Santibáñez, S., Gutierrez, A., Rosenzvit, M. (2008) Human Hydatid Disease in Peru Is Basically Restricted to *Echinococcus granulosus* Genotype G. *Am J Trop Med Hyg* 79(1): 89-92.

Sasaki, T., Shiohama, A., Minoshima, S., Shimizu, N. (2003). Identification of eight members of the argonaute family in the human genome small star, filled. *Genomics* 82:323–330.

Sharma, Monika, Rakesh, Sehgal (2013). Molecular Characterization of *Echinococcus granulosus* Cysts in North Indian Patients: Identification of G1, G3, G5 and G6 Genotypes. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013 Jun; 7(6): e2262.

Sharma, A.K., Nelson, M.C., Brandt, J.E., Wessman, M., Mahmud, N., Weller, K.P., Hoffman, R. (2001). Human CD34(+) stem cells express the hiwi gene, a human homologue of the *Drosophila* gene piwi. *Blood* 97(2):426-34.

Soriano S.V., Pierangeli, N.B., Pianciola, L., M. Mazzeo b, L.E. Lazzarini a, Saiz, M.S., Kossman, A.V., Bergagna, H.F.J., Chartier, K., Basualdo, J.A. (2010). Molecular characterization of *Echinococcus* isolates indicates goats as reservoir for *Echinococcus canadensis* G6 genotype in Neuquén, Patagonia Argentina *Parasitology International* 59:626–628.

Thompson, R. C. A. and Lymbery A. J. (1988). The Nature, Extent and Significance of Variation Within the Genus *Echinococcus*. *Advances in Parasitology* 27, 209-259.

Thompson, R. C. A. (1995) Biology and Systematics of *Echinococcus*. In *Echinococcus* and Hydatid Disease, Thompson, R. C. A. and Lymbery A. J. eds CAB International , Wallingford, Oxon , UK .

Thompson, R. C. and MacManus, D.P. (2002) Towards taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends in Parasitology* 18, 452-457

TSAI, J.; Zarowiecki, M., Holroyd, N., Garciarrubio, A., Sanchez-Flores, A., Brooks, K.L., Tracey, A., Bobes, R.J., Fragoso, G., Scitutto, E., Aslett, M., Beasley, H., Bennett, H.M., Cai Camicia, F., Clark, R., Cucher, M., De Silva, N., Day, T.A., Deplazes, P., Estrada, K., Fernández, C., Holland, P.W., Hou, J., Hu, S., Huckvale, T., Hung, S.S., Kamenetzky, L., Keane, J.A., Kiss, F., Koziol, U., Lambert, O., Liu, K., Luo, X., Luo, Y., Macchiaroli, N., Nichol, S., Paps, J., Parkinson, J., Pouchkina-Stantcheva, N., Riddiford, N., Rosenzvit, M., Salinas, G., Wasmuth, J.D., Zamanian, M., Zheng, Y.; Taenia solium Genome Consortium, Cai, X., Soberón, X., Olson, P.D., Lacleste, J.P., Brehm, K., Berriman, M. (2013). The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature*; 496 (7443):57-63.

Valdmanis, P., Shuo Gu, Nina Schurmann, Praveen Sethupathy, Dirk Grimm and Mark, A. Kay. (2012). Expression determinants of mammalian argonaute proteins in mediating gene silencing. *Nucleic Acids Research* 40, No. 8

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. (2002). Accurate normalisation of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Gen. Biol.* 3: 1–12.

Ward, P. Equinet, L., Packer, J. and Doerig, C. (2004). Protein Kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: the kinome of a divergent eukaryote. *BMC genomics* 5:79.

Warton, K., Foster, N.C., Gold, W.A., Stanley, K.K. (2004) A novel gene family induced by acute inflammation in endothelial cells. *Gene*. 342 (1): 85-95.

Williams, R.W., Rubin, G.M. (2002). ARGONAUTE1 is required for efficient RNA interference in *Drosophila* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99 (10). 6889-94.

Yong-Qin Li, An Zeng, Xiao-Shuai Han, Chen Wang, Ge Li, Zhen-Chao Zhang, and Qing Jing. (2011). Argonaute-2 regulates the proliferation of adult stem cells in planarian. *Cell Research* doi: 10.1038/cr.2011.151.

Zhang, W., Li, J., Jones, M.K., Zhang, Z., Zhao, L., Blair, D., McManus, D.P. (2010). The *Echinococcus granulosus* antigen B gene family comprises at least 10 unique genes in five subclasses which are differentially expressed. *PLoS Negl Trop Dis*. 4(8):e784.

Zheng, Y. (2013). Phylogenetic analysis of the Argonaute protein family in platelminths. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66(3):1050-4.

Zheng H, Zhang W, Zhang L, Zhang Z, Li J, Lu G, Zhu Y, Wang Y, Huang Y, Liu J, Kang H, Chen J, Wang L, Chen A, Yu S, Gao Z, Jin L, Gu W, Wang Z, Zhao L, Shi B, Wen H, Lin R, Jones MK, Brejova B, Vinar T, Zhao G, McManus DP, Chen Z, Zhou Y, Wang S (2013). The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. *Nat Genet*; 45(10):1168-75. doi: 10.1038/ng.2757. Epub 2013 Sep 8. PubMed PMID: 24013640.