



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

***Análisis funcional de proteínas que unen ácidos grasos y retinol
(FAR) pertenecientes al phylum Nematoda***

Tesista: Jose Francisco Lombardo

Directora: Gisela Raquel Franchini

Año: 2024

AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	5
I. INTRODUCCIÓN	7
I.1 Nematodes	7
I.2 Nematodes en ecología y salud	9
I.3 Metabolismo de Nematodes	11
I.4 Proteínas de Unión a Lípidos (LBP)	15
I.5 Proteínas que unen Ácidos grasos y Retinol (FAR)	16
I.6 Necator americanus	20
I.7 Caenorhabditis elegans	25
I.8 Caenorhabditis bovis	30
I.9 Epílogo	33
II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	34
III. MATERIALES Y MÉTODOS	36
A- IN VIVO	36
III.A.1 Cultivo y mantenimiento de C. elegans	36
III.A.2 Cepas de C. elegans utilizadas	39
III.A.3 Silenciamiento con ARNi	39
III.A.4 Ensayos de fertilidad	41
III.A.4 Ensayo de desarrollo	42
III.A.5 Ensayos de longevidad	42
III.A.6 Tinción con Oil red O (ORO)	43
B- IN VITRO	45
III.B.1 Obtención de construcciones plasmídicas	45
III.B.2 Predicción de estructura y análisis de secuencia	46
III.B.3 Miniprep	46
III.B.4 Mutagénesis sitio dirigida en ausencia de ligasa (SLIM)	47
III.B.5 Screening de expresión	50
III.B.6 Expresión de proteínas a gran escala	50
III.B.7 Lisado de células y obtención de fracción soluble	51
III.B.8 Cromatografía de Afinidad en Columna de Níquel	51
III.B.9 Cromatografía de Exclusión Molecular	52
III.B.10 Cromatografía en Fase Reversa (RP-HPLC)	52
III.B.11 SDS-PAGE	53
III.B.12 Dicroísmo Circular (CD)	53
III.B.13 Espectroscopia de Fluorescencia	54
III.B.14 Extracción de lípidos	59
III.B.15 Cromatografía en Capa Fina (TLC)	59
III.B.16 Dot Blot Lipídico	60
IV. RESULTADOS	62
A- IN VIVO	62
IV.A.1 Desarrollo, fertilidad y longevidad	62

IV.A.2 Silenciamiento de la expresión de genes far	71
IV.A.4 Morfología y tinción Oil red O	72
IV.A.5 Discusión parcial de los experimentos in vivo	77
B- IN VITRO (Na-FAR-1 y S-31-D)	80
IV.B.1 Marcha de purificación de proteínas	80
IV.B.2 Caracterización Funcional: Capacidad de unión a ligandos	81
IV.B.3 Dot Blot Lipídico	88
IV.B.4 Discusión parcial de los experimentos in vitro: Na-FAR-1	89
C- IN VITRO (Ce-FAR-8 y Cb-FARs)	91
IV.C.1 Predicción de las estructuras	91
IV.C.2 Marcha de purificación	94
IV.C.3 Dicroísmo Circular	96
IV.C.2 Espectroscopía de Fluorescencia	97
IV.C.4 Curvas de desnaturalización medidas por fluorescencia	99
IV.B.5 Capacidad de unión de ligandos: TLC	103
IV.B.6 Discusión parcial de los experimentos in vitro: Ce-FAR-8 y Cb-FARs	105
V. DISCUSIÓN FINAL	106
VI. CONCLUSIÓN	109
VII. PERSPECTIVAS	110
VIII. BIBLIOGRAFÍA	111
VIII. ANEXO	118

AGRADECIMIENTOS

Estos últimos días de escritura, de mucha locura, pero también disfrute, de compañía, esfuerzo, favores pedidos y comida, resumen lo hermoso que ha sido trabajar este tiempo con la gente hermosa de mi laboratorio. A pesar de la vorágine, no quiero perder la oportunidad de dejar algunas reflexiones y muchos agradecimientos.

Aquí plasmo algunos resultados que me ha dejado este doctorado. No resultados de datos y estadística, sino de experiencias y de alegrías; resultados que voy a llevar atesorados dentro mío por el resto de mi vida.

Fue en el último de mis viajes de pasantía en el exterior, que me di cuenta de que un experimento, resultado, gráfico o imagen no se disfruta tanto como cuando sucede entre amigos, cuando se puede gritar en el laboratorio y festejar comiendo algo rico. Es muy importante tener gente que, aunque sea escuchando sin entender de lo que se habla, acompaña tanto en el éxito y festejo como cuando las cosas no funcionan (a veces de formas inexplicables) o el panorama es oscuro. Se suele catalogar al doctorado como un trabajo “solitario” y si bien no es sin fundamentos, tengo la gran suerte de que haya sido todo lo contrario.

También podría decirse que estos años me vi acompañado también por los miles de C. elegans con los que trabajé. Fue en mi viaje a Escocia, donde aprendí a trabajar con este modelo con la Dra. Collette Britton, que apareció la carta de Tarot que aquí presento, al final de una aventura en bicicleta y sobre un círculo de piedras, en la isla de Arran, muy lejos de mi país y mi gente. Ahora reflexiono sobre esta como si me hubiese dicho “Esto también va a terminar”. Sallie Nichols en su libro Jung y el Tarot dice sobre el arcano XIII:

Partir es una pena, pues nos atamos a todo: a la gente, a los animales, a las cosas. No queremos perder nada de aquello que sentimos que nos “pertenece”.

Estos años de doctorado no me han formado solo como profesional, sino también como persona, que quizás es incluso más importante en estos tiempos. Esto fue gracias a las charlas, anécdotas, chusmeríos, debates y a los delirios, a los mates y almuerzos; escuchando posturas que llevan a cuestionarse a uno en qué vereda de la vida se está parado. También estos años me enseñaron a divertirme, resolver, ser decisivo, preocuparme un poco menos y a seguir. Gané una identidad y un lugar al que pertenezco.

Es por esto que, a pesar de tanta alegría, me da pena el final. En todos estos años me até de cariño al laboratorio, a mi trabajo de investigación, a mi directora, a mis compañerxs y a mi Yo en ese lugar. Pero entiendo que esto termina y voy a hacia lo próximo con la sonrisa de tan lindos recuerdos de estos últimos años. Mi doctorado se termina.

Pero antes de terminar quiero agradecer a quien han hecho posible que hoy esté escribiendo esto.

Primero y antes que nada a Gisela, por tantas cosas. Por haberme enseñado tanto y de tan buena manera, espero algún día poder dirigir a alguien y transmitirle la felicidad que me diste todo este tiempo. Por haberme hecho reír tantas veces, las ridiculeces y todos los festejos. Por la paciencia, la insistencia, la escucha y el empuje a crecer.

A todo el laboratorio, es un abrazo eterno toda la compañía que han sido. Por haber sido un equipo que la banca en todas. El hermoso grupo humano que somos lo

logramos entre todxs. Por todas las charlas profundas y las que no también. Además, gracias por todas las salvadas, favores y préstamos de estos años. Gracias a Delfi, Lucía, Lucas, Rayen, a Juli, Nahi, Kari, Martín, Santi, Luciana, Nati S., Nati B., Caro y a Gise (porque también es parte de esta familia de laboratorio).

A mis amigos/hermanos, que han sido mi sostén en la vida, en cada paso. Por todo lo que compartimos. Por haberme levantado y soportado siempre. Nicky, Gallo, Palo, Tomi y Ro nos doctoramos.

A Flor, amiga en la facultad y en ciencia. Sin ella, terminar la carrera hubiese sido muy difícil y definitivamente más aburrido.

A Mati, por haber sido mi maestro y amigo. Por todas las herramientas sobre el cuerpo, las máscaras, la impro y el tarot que puedo aplicar en el cotidiano. Por todas esas charlas profundas, divertidas y experiencias.

A Delfi. Porque lo feliz que me haces se vuelca en mi entorno y me hace disfrutar todo un poco más. Por acompañarme (más de una vez literalmente el fin de semana al laboratorio) y porque al lado tuyo aprendo mucho sobre mí.

A mis padres por haberme dado todo para estar acá hoy. Por los valores y la actitud que me inculcaron. Haber hecho el doctorado es un privilegio que no podría haber tenido sin su ayuda.

A Laura Migliori y Collette Britton por haber sido mis maestras de C. elegans. Sin ellas, gran parte de esta tesis no habría sido posible.

A Massimo Bellanda por los experimentos de difracción circular.

Al INIBIOLP.

A la Universidad Pública y a la Ciencia Argentina.



RESUMEN

La tesis doctoral titulada "Análisis funcional de proteínas que unen ácidos grasos y retinol (FAR) pertenecientes al phylum Nematoda," se centra en el estudio de proteínas FAR en nematodos, con un enfoque particular en su función y estructura.

Los nematodos son gusanos redondos que durante su evolución han logrado habitar casi todos los ecosistemas conocidos, pudiendo encontrar varias especies de vida libre y muchas otras parásitas de plantas y animales, incluido el humano. Tienen una gran importancia ecológica y médica, donde juegan un papel crucial en la mineralización de nutrientes y la redistribución de microorganismos y, en el ámbito médico, son responsables de diversas enfermedades conocidas como helmintiasis.

Las proteínas FAR (Fatty Acid and Retinol binding proteins) son un subgrupo de proteínas de unión a lípidos (LBP), que tienen la capacidad de unir ácidos grasos y retinol. Son de gran interés dado que son exclusivas de nematodos y resultarían importantes para la supervivencia y reproducción de las especies parásitas. Sin embargo, aún no se han terminado de definir sus posibles funciones y se desconocen los mecanismos moleculares que implican.

El objetivo general del presente trabajo de tesis es describir el rol biológico de las proteínas FARs mediante la caracterización estructura-función de distintos miembros de esta familia de proteínas, provenientes de nematodos de vida libre y parásitos. Particularmente, se trabajó con proteínas FARs de *Necator americanus* (parásito humano), *Caenorhabditis elegans* (nematode modelo de vida libre) y *Caenorhabditis bovis* (especie posiblemente parásita).

Para abordar estos objetivos se realizaron experimentos *in vivo* con el nematode modelo *C. elegans* y experimentos *in vitro*, trabajando con proteínas FAR producidas de forma recombinante en *Escherichia coli*. Con el modelo *C. elegans*, se llevaron a cabo ensayos de fertilidad, desarrollo y longevidad, empleando cepas mutantes knock out. Además, se hicieron estudios de silenciamiento de genes mediante ARNi y tinción para evaluar las reservas lipídicas. Los experimentos *in vitro* incluyeron la obtención de construcciones plasmídicas, mutagénesis sitio-dirigida y posterior purificación las proteínas. Luego, para analizar la estructura y función de las proteínas, se utilizaron técnicas como difracción circular y espectroscopia de fluorescencia.

Los resultados obtenidos, estudiando mutantes knock out de *C. elegans* para las proteínas FARs, sugieren que algunas isoformas estarían relacionadas con el desarrollo y reproducción de los nematodos. Por otro lado, respecto a la caracterización estructural y funcional de las proteínas FAR purificadas, mostraron que son capaces de unir ácidos grasos y fosfolípidos. Además, el modelado de las proteínas y los análisis estructurales mostraron resultados esperables para miembros de la familia de las FARs.

Esta tesis destaca la importancia de las proteínas FAR en nematodos. La evidencia de los resultados refuerza las hipótesis de que estas proteínas estarían implicadas en procesos de desarrollo y reproducción. Además, para el caso de las FARs de *C. bovis*, se ha confirmado su estructura y capacidad de unir ligandos hidrofóbicos para las tres isoformas de FARs recientemente anotadas en su genoma; las cuales podrían haber sido cruciales para la adaptación a un nuevo ambiente dentro del género, distinto al de vida libre.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Nematodes

Los nematodos, junto a los cestodos y trematodos (gusanos planos o plathelminths) se agrupan bajo el término general no taxonómico de helmintos, del griego *helmithos* que significa "gusanos". También conocidos como gusanos redondos, los nematodes reúnen a más de 23,000 especies descritas hasta la fecha dentro del phylum Nematoda, muchas de las cuales son parásitos de plantas, animales y humanos (Blaxter & Koutsovoulos, 2015). No obstante, la evidencia indica que este número es una gran subestimación y el número real de especies supere el millón.

Este grupo de gusanos habita prácticamente en todos los ecosistemas conocidos, donde existen especies de vida libre que se alimentan de bacterias, hongos e incluso de otros nematodos y especies parásitas de plantas y animales, incluyendo al hombre. A simple vista parecen organismos sencillos por sus características anatómicas y comportamientos; son pseudocelomados, presentan un cuerpo redondeado y alargado. Sin embargo, son uno de los grupos de animales más abundantes y diversos en la Tierra, habiendo logrado conquistar una multiplicidad de nichos ecológicos durante su evolución, lo que sugiere que son seres altamente complejos, aunque muchas de sus características siguen siendo un misterio (Lee, 2005).

A lo largo de la historia, el ser humano se ha visto acompañado por estos organismos, datando la evidencia más antigua del período Cámbrico, habiéndose encontrado restos fósiles de un nematode en el digestivo de un artrópodo de más de 500 millones de años (Luo et al., 2023). Incluso puede verse cómo los parásitos han coevolucionado junto a los humanos, a medida que los mismos han cambiado el estilo de vida desde la prehistoria hasta la actualidad. Los parásitos más antiguos se han hallado en muestras de coprolitos humanos y pertenecen a los géneros *Enterobious* y *Ascaris* (Wiscovitch-Russo Santiago-Rodriguez & Toranzos, 2023). Los primeros registros sobre las parasitosis provienen de Egipto entre el 3000 y el 400 A.C en papiros médicos, como por ejemplo el Papiro Ebers o Kahun Gynecological Papyrus, donde se describen las afecciones y tratamientos de las parasitosis por los géneros *Enterobious*, *Ascaris* y *Dracunculus*. Otro ejemplo es el registro de médicos griegos entre el 800 y 300AC, siendo el más destacable la recopilación de trabajos de Hipócrates (*Corpus Hippocratus*) donde describe a "helmins strongyle" (gusanos redondos), "helmins plateia" (gusanos planos), y "ascaris" (que corresponde a *Enterobius vermicularis*).

También se han registrado en otras grandes civilizaciones en la Edad Antigua (3500 AC al 476 DC) como China, India, Roma y el Imperio Árabe, lo que demuestra cómo las helmintiasis han sido siempre un problema de importancia cotidiana en la vida social humana (Cox, 2004; Trompoukis, German, & Falagas, 2007; Smith, 2011).

Sin embargo, el reconocimiento y clasificación formal de los mismos ocurrió mucho más tarde, entre los siglos XVIII y XIX. Primero con "Systema Naturae" de Carl Linnaeus, que primero los reuniría bajo el término "vermes". Su clasificación fue por largos años vertiginosa e imprecisa; pasando por la discusión entre el uso de los términos "Nemata" (Cobb 1914) y "Nematode", terminando con una de las clasificaciones más recientes en "A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda" (Blaxter et al., 1998) que postula una clasificación del phylum basándose en 53 secuencias genéticas de la subunidad menor ribosomal (SSU del rARN), la cual será aceptada como fundamento para esta tesis. Además, este trabajo presenta un interesante enfoque sobre la evolución del grupo hacia el parasitismo, planteando que esta relación interespecífica ha emergido múltiples veces desde grupos de vida libre.

Los nematodos están dentro del superphylum Ecdysozoa, ya que poseen una cutícula externa y maduran por muda o ecdisis, lo cual los ubica junto a su taxón hermano los Nematomorphos y en cercana relación con otros como los Artrópodos. Actualmente, gracias a los estudios moleculares mencionados, están clasificados en 5 clados como se ve en la Figura 1, Dorylaimia (Clado I), Enoplia (Clado II), Spirurina (Clado III), Tylenchina (Clado IV) y Rhabditina (Clado V). A este último clado pertenecen *Necator americanus*, *Caenorhabditis elegans* y *Caenorhabditis bovis*, las especies centrales que son abordadas en este trabajo de tesis (Blaxter, 2003).

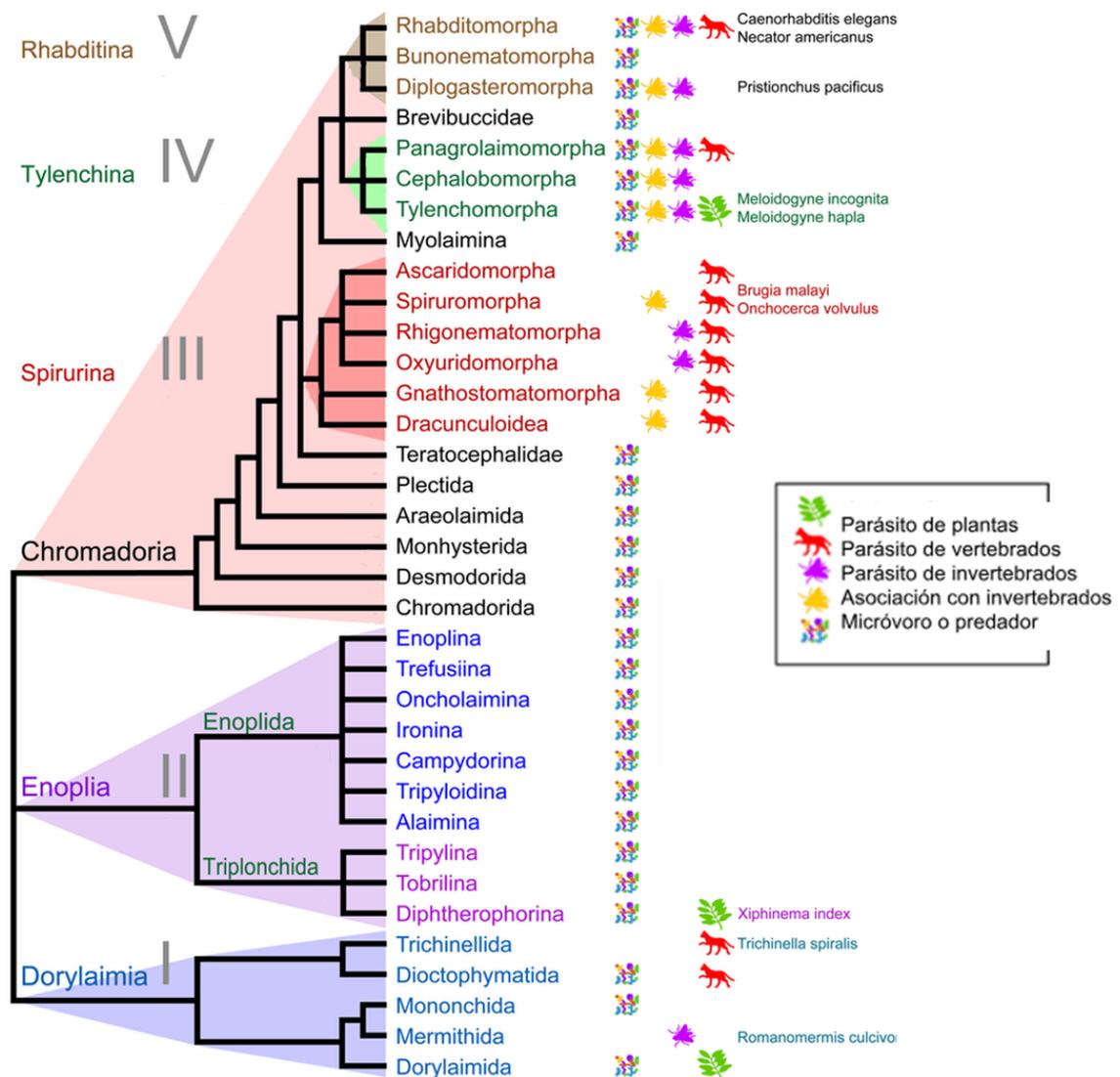


Figura 1: Cladograma del phylum Nematoda modificado de Blaxter & Koutsovoulos, 2015. Los clados, con sus nombres ubicados a la izquierda, están indicados con números romanos.

1.2 Nematodes en ecología y salud

Los helmintos presentan una gran importancia ecológica y médica. Su control ha sido y es un objetivo para mejorar las condiciones de salud y las distintas actividades humanas. Las parasitosis causadas por estos animales se conocen como "helminCIAS" y algunas de ellas forman parte del grupo de las "Enfermedades Tropicales Desatendidas" (ETD) definido por la OMS. Esta denominación engloba un diverso grupo de enfermedades que afectan a poblaciones que se encuentran en situaciones socioeconómicas y ambientales desfavorables ubicadas principalmente en regiones tropicales o subtropicales; con consecuencias devastadoras en el ámbito social, económico y de salud. Varios factores dificultan el control de las ETDs desde un punto

de vista de salud pública, entre los cuales se encuentran la falta de vigilancia y destino de recursos, lo cual conlleva a la continua negligencia de las mismas (WHO, 2024). Dentro de las distintas estrategias para controlar las helmintiasis se encuentran impedir infecciones, regular poblaciones de hospedadores y aplicar programas de desparasitación y vacunación preventiva, lo cual afecta también las poblaciones de otros patógenos, ya que poseen un rol importante en las cadenas tróficas de sus ecosistemas (Wood & Johnson, 2015).

Dentro de las parasitosis causadas por helmintos cabe mencionar las siguientes: geohelmintiasis, esquistosomiasis, hidatidosis, dracunculosis y filariasis. En los últimos años, la OMS ha implementado programas con el objetivo de erradicar estas enfermedades mediante campañas de administración masiva de antihelmínticos; sin embargo, si bien las drogas actuales son efectivas, existe una creciente preocupación frente al desarrollo de resistencias a estas. Un ejemplo de esto puede observarse en las helmintiasis que afectan al ganado (Gasbarre, 2014).

A pesar de los extensos esfuerzos de diferentes entidades, el conocimiento sobre la compleja biología de los nematodos y las parasitosis que causan, avanza lentamente. Al día de hoy es evidente la deficiencia en el desarrollo de nuevas y efectivas técnicas para su diagnóstico, control y tratamiento.

Por otro lado, los nematodos son actores cruciales dentro de los ecosistemas naturales y han sido objeto de estudio en este campo desde mediados del siglo XX. Estos cumplen múltiples roles como la mineralización de nutrientes como carbono, nitrógeno, fósforo y azufre, entre otros, redistribución de otros microorganismos y mejoradores de los servicios de los sistemas, pudiendo ser usados para la mejora de cultivos y monitoreo del suelo. Desde 1970 hasta la actualidad, su aplicación como bio-indicadores de la salud del suelo ha crecido significativamente con la posibilidad de usarlos para el diagnóstico, análisis y predicción de los ecosistemas. Incluso, pueden utilizarse como modelos ecológicos en el laboratorio, siendo el nematode de vida libre *C. elegans* el más ampliamente usado (Neher, 2010; Ferris et al., 2012).

Por último, también puede verse el grave impacto económico que ocasionan las enfermedades causadas por helmintos, no solo por causar enfermedades crónicas y convalecientes para la población, afectando su capacidad de participar en el sistema económico y generando un gasto importante para el sistema de salud, sino también pudiendo afectar la producción agrícola-ganadera, infectando cultivos y animales, requiriendo una persistente inversión en control, prevención y tratamiento en estos sectores (Strydom et al., 2023).

I.3 Metabolismo de Nematodes

Como se mencionó en secciones anteriores, los nematodes presentan muchos tipos de estilos de vida, con una impresionante variedad de nichos en los que habitan, incluyendo ambientes terrestres, acuáticos, condiciones extremas e incluso el interior de otros animales, tanto vertebrados como invertebrados, y plantas. Además, la gran mayoría de ellos atraviesa por distintos estadios larvarios del desarrollo, que pueden explorar distintos entornos. Es por esto que el metabolismo de los nematodes reflejan esta gran diversidad ecológica y, si bien poseen varias vías metabólicas conservadas con otros organismos eucariotas, muchos de ellos poseen adaptaciones específicas a su entorno, que los diferencian entre sí y con otros organismos. Esta complejidad hace muy difícil poder realizar una descripción concisa y genérica sobre el metabolismo de estos organismos.

Los nematodes son organismos multicelulares eucariotas heterótrofos que conservan las principales vías metabólicas; como ejemplo tomaremos a *Caenorhabditis elegans*, que es el organismo modelo de nematodes y se encuentra muy bien estudiado, en el cual se han encontrado genes ortólogos para estas vías (2009, Braeckman).

Al igual que otros nematodes, bajo condiciones aeróbicas, *C. elegans* es capaz de obtener energía en forma de ATP a partir de azúcares, principalmente glucosa, oxidándose por vía glucolítica hasta piruvato. Luego este piruvato puede seguir una vía fermentativa en caso de anaerobiosis o ingresar a la mitocondria y ser descarboxilado a acetil-CoA. Este acetil-CoA a su vez puede entrar al ciclo de Krebs, condensándose con oxalacetato para dar citrato; luego, una serie de reacciones llevan a la oxidación completa, dando como productos finales dos moléculas de CO₂, una molécula de GTP, tres de NADH y FADH₂, estos dos últimos son los transportadores de electrones que permiten llevarlos hasta la cadena transportadora de electrones para que junto con la ATP-sintasa, terminan produciéndose grandes cantidades de energía (2009, Braeckman).

Los ácidos grasos también pueden ser fuente de energía gracias a la β -oxidación que ocurre en las mitocondrias, produciendo además Acetil-CoA que puede también ingresar al ciclo de Krebs. Por último, los aminoácidos también pueden romperse por distintas vías metabólicas para obtener esqueletos carbonados que pueden metabolizarse en el ciclo de Krebs (2009, Braeckman).

Los lípidos son importantes para todos los organismos y en nematodes no solo son reserva energética para el metabolismo aeróbico durante el desarrollo embrionario,

larval y del adulto, sino también son componentes importantes de membranas celulares, cáscara del huevo y la cutícula. También son moléculas esenciales para la señalización y la comunicación dentro de las poblaciones. Dentro de los lípidos neutros, los triglicéridos son la clase predominante, formando gotas lipídicas visibles que son acumulados en tejidos como la epidermis, células intestinales y oocitos. También resultan importantes los fosfolípidos, ácidos grasos libres, esfingolípidos, glicoesfingolípidos, colesterol y otros esteroides. Cabe destacar que los fosfolípidos y esteroides son componentes de membrana que determinan la fluidez de las mismas, lo que significa que cumplen un rol importante en la adaptación de los nematodos a los cambios de temperatura. Por ejemplo, *C. elegans* aumenta los niveles de ácido eicosapentanoico en fosfolípidos y la fracción total de lípidos, ante la disminución de la temperatura de 25°C a 15°C (Tanaka et al., 1996; Tanaka et al., 1999). Esto es de particular interés en el desarrollo de los nematodos parásitos, cuyos entornos cambian radicalmente durante su desarrollo, y los nematodos de vida libre que están expuestos a un rango variable de temperaturas; pero también puede resultar llamativo a nivel evolutivo, para relacionarlo el gran éxito que han tenido los nematodos para conquistar diferentes ambientes (Lee, 2005).

Tanto los nematodos parásitos como los de vida libre son incapaces de realizar la síntesis *de novo* de esteroides, por lo cual el medio para mantener en cultivo a *C. elegans* requiere que se lo agregue en forma exógena, pero son capaces de modificarlos. Es por esto, que la adquisición, transporte y regulación del metabolismo lipídico es crucial en estos organismos. Una gran variedad de ácidos grasos, saturados e insaturados, pueden ser sintetizados *de novo* en organismos de vida libre como *C. elegans* (Figura 2), aunque en especies parásitas como *Ascaris suum* las enzimas están presentes pero presentan muy baja actividad (Barret, 1987).

Los estudios sobre el metabolismo de los nematodos se remontan a principios del siglo XX y hasta el día de hoy resulta de gran interés para un sector de la comunidad científica, enfocado en comprender cómo estos organismos aparentemente sencillos han encontrado múltiples estrategias bioquímicas para adaptarse y desarrollarse a condiciones específicas. El estudio del metabolismo de nematodos parásitos es un desafío particular, debido a su pequeño tamaño, la imposibilidad de mantener el ciclo biológico en condiciones de laboratorio o el hecho de que los estudios *in vitro* no permiten reproducir las condiciones del tejido del hospedador. Es en este caso donde los estudios de nematodos de vida libre permiten ampliar el conocimiento y compensar las dificultades. Además, es en las diferencias bioquímicas donde residen las claves para el desarrollo tecnológico de nuevas estrategias terapéuticas y mejora de las ya

existentes, lo cual es crucial para el futuro de un ecosistema donde las resistencias a antihelmínticos y la carencia de vacunas para el tratamiento de parasitosis amenazan la salud humana, la actividad agrícola-ganadera y las especies en peligro de extinción. Además, los nematodos poseen un rol fundamental en la red trófica de los ecosistemas y sirven como índice del estado de sus procesos. En conclusión, el estudio del metabolismo de nematodos permite arrojar luz a las múltiples incógnitas de estos organismos tan misteriosos y pensar en nuevos horizontes científicos.

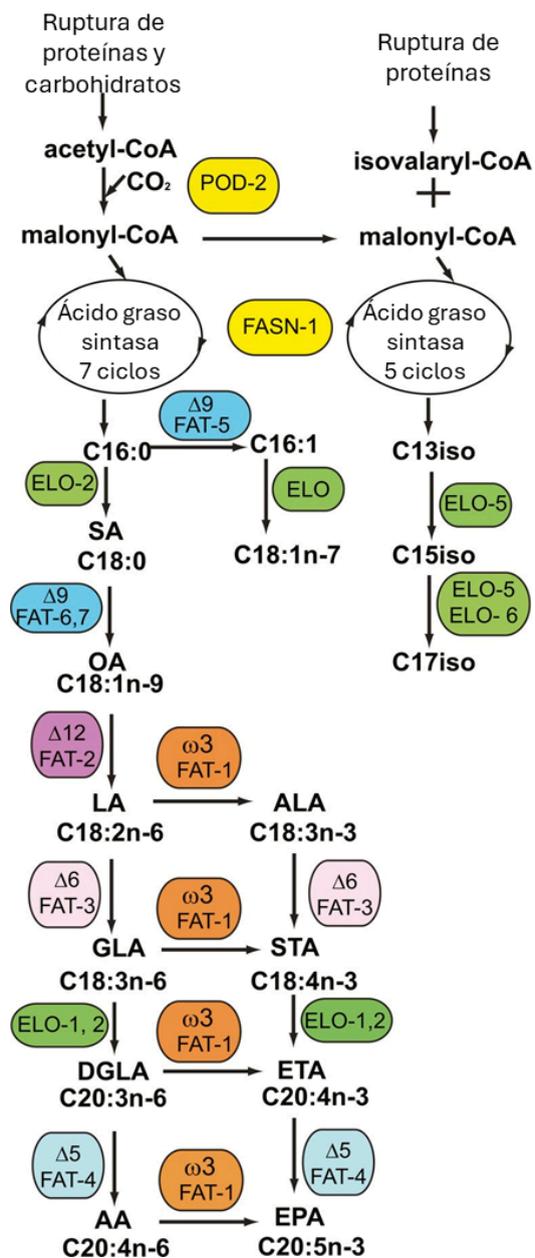


Figura 2 Vía de síntesis de novo de ácidos grasos en *C. elegans*. Imagen adaptada de (Watts & Ristow, 2017). Los nombres de las enzimas están encerrados en óvalos y con flechas se indican

las reacciones químicas de síntesis y elongación de los ácidos grasos ELO, algas; C13iso, ácido 11-metildodecanoico; C15iso, ácido 13-metiltetradecanoico; C17iso, ácido 15-metilhexanoico; SA, ácido esteárico; OA, ácido oleico; LA, ácido linoleico; ALA, ácido alfa linoleico; GLA, ácido gamma linoleico; STA, ácido estearidónico; DGLA, ácido dihomo gamma linoleico; ETA, ácido eicosatetraenoico; AA, ácido araquidónico; EPA, ácido eicosapentaenoico.

I.4 Proteínas de Unión a Lípidos (LBP)

De acuerdo a lo descrito en la sección anterior los nematodos parásitos dependerían del suministro de nutrientes lipídicos como ácidos grasos y colesterol, de sus hospedadores.

Las proteínas que unen lípidos (LBPs, por su sigla en inglés Lipid Binding Proteins) producidas por helmintos, son un grupo altamente heterogéneo de proteínas, que han sido estudiadas durante varias décadas. Estas proteínas, varias presentes en los líquidos de excreción/secreción (E/S) producidos por estos organismos, son estructuralmente diferentes a las proteínas de los hospedadores y actúan como fuertes estimulantes de la respuesta inmune. Por ello, se ha dedicado un gran esfuerzo a su caracterización estructural, con el objetivo de mejorar el diseño de nuevas drogas y métodos diagnósticos. Aunque no se conocen con exactitud sus funciones, se postula que estas proteínas podrían estar involucradas en la captación de lípidos desde el entorno o el hospedador, así como en funciones internas relacionadas con el metabolismo lipídico, comunes a cualquier organismo multicelular o específicas de los tipos celulares y organizaciones estructurales de los helmintos. Además, podrían desempeñar un papel en el mantenimiento y protección de estructuras presentes en estadios larvales, mediante la unión a derivados tóxicos del metabolismo lipídico. En estadios adultos, estas proteínas podrían estar involucradas en la modulación del entorno tisular local del hospedador y en la evasión de su sistema inmune a través del secuestro de moléculas mediadoras (Franchini et al., 2015).

Dentro de la gran variedad de LBPs cabe mencionar que no todas se encuentran en nematodos, como las proteínas de unión a ligando hidrofóbicos HLBP (Hydrophobic ligand binding proteins) que son exclusivas de platelmintos cestodos, aunque el resto están ampliamente distribuidas entre los diferentes clados de nematodos, exceptuando el clado I en el cual sólo han hallado proteínas de unión a ácidos grasos FABPs (Fatty acid binding proteins) y la dorylipoforina, aislada exclusivamente de *Dioctophyme renale* (Giorello et al. 2017). Además de estas, pueden describirse las nemFABPs, que son un caso particular de FABPs que poseen diferencias estructurales que las distancia de sus contrapartes de vertebrados, y las poliproteínas antígeno/alergénicas de nematodos NPAs (Nematode polyprotein antigens/allergens). Particularmente dentro del phylum Nematoda, algunas especies producen proteínas exclusivas que unen ácidos grasos y retinol denominadas FARs (por sus siglas en inglés Fatty Acid and Retinol binding protein), moléculas clave para el metabolismo lipídico y el desarrollo embrionario (Parks, 2022). En esta tesis doctoral, se investigará la estructura y función de estas

proteínas en diferentes especies de nematodos, con el objetivo de comprender mejor su papel en la biología de estos organismos. La Figura 3 resume las diferentes LBPs halladas en helmintos.

	Phylum Platelmintos		Phylum Nematode				
	Cestodes	Trematodes	Clado I	Clado II	Clado III	Clado IV	Clado V
HLBP	✓						
FABP	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
nemFABP				*	✓	✓	✓
FAR				✓	✓	✓	✓
NPAAs				✓	✓	✓	✓
Dorylipoforina			✓				

Figura 3: Distribución de LBPs en los helmintos. Búsqueda de los distintos miembros de las LBPs en distintos taxones de helmintos. Las marcas representan el hallazgo genómico de cada una de las familias de LBPs en los phylums. * si bien no se hallaron nemFABPs, solo se ha descrito el genoma de una especie y no puede descartarse la presencia de estas proteínas de este clado.

1.5 Proteínas que unen Ácidos grasos y Retinol (FAR)

Dentro del grupo de las LBPS exclusivas de nematodos, se describe la familia de las Proteínas que unen Ácidos grasos y Retinol (**FARs**), que es una clase novedosa de proteínas capaces de unir tanto ácidos grasos como retinol.

Se han descrito genes que codifican proteínas FAR en muchas especies de nematodos, tanto de formas de vida libre como parasitarias, presentado varias isoformas dentro de cada especie, lo cual puede sugerir un amplio abanico de funciones, variando incluso a lo largo del desarrollo de cada individuo (Parks et al., 2022). Además, se han identificado en productos de secreción de los nematodos, como es el caso de *Ancylostoma caninum*, *Necator americanus*, *Haemonchus contortus* y *Melodogyne javanica*, entre otros (Kennedy et al., 1997; Basavaraju et al. 2003; Rey-Burusco et al., 2015; Kuang et al., 2009; Iberkleid et al. 2013).

El estudio de las proteínas FAR comenzó en 1995 con Ov-FAR-1 (Tree et al., 1995), una proteína secretada por la filaria *Onchocerca volvulus*, el agente causante de la ceguera de los ríos. En estas infecciones la concentración de retinol en los nódulos linfáticos afectados es aproximadamente 8 veces más alta que en el resto de los tejidos (Sturchler, 1981; Garofalo et al., 2002). Se ha postulado que las proteínas FAR de *O. volvulus* participaría en el secuestro y concentración del retinol utilizándolo para su

desarrollo y generando una deficiencia en su hospedador (Storey 1982, Garofalo et al., 2002).

Desde entonces, la familia de las FARs ha experimentado una gran expansión en cuanto a su estudio, siendo descritas no solo en especies de filarias, sino también en anquilostomas, varios parásitos de plantas y en nematodos de vida libre como *C. elegans*, así como en otras especies de *Caenorhabditis*. Cabe destacar que ninguna de estas proteínas se encuentra en el clado I del Phylum Nematoda. El conocimiento que tenemos sobre ellas en la actualidad parece vasto pero también disperso, con muchos estudios realizados pero en grupos separados de proteínas dentro de la familia, lo cual demanda una ardua tarea de unificar los resultados de diferentes trabajos de investigación para ensamblar este rompecabezas y llegar a una conclusión aplicable a los diferentes contextos en los que se encuentran las FARs (Parks, 2022).

Desde una perspectiva molecular, las FARs tienen entre 130 y 170 aminoácidos, con un tamaño que varía entre 17 y 30 kDa, mostrando sitios de glicosilación relativamente conservados, aunque los patrones de glicosilación difieren entre las distintas proteínas (Nirmalan, 1999). También presentan potenciales sitios conservados de fosforilación para la quinasa de caseína tipo II (Prior et al., 2001). Son notablemente ricas en α -hélices y carecen de análogos estructurales en otros grupos de animales. Hasta el momento, la estructura cristalográfica de las proteínas FAR se ha resuelto solo para dos miembros de la familia, que se muestran en la Figura 4: Ce-FAR-7 de *C. elegans* (Jordanova et al., 2009) y Na-FAR-1 de *Necator americanus* (Rey-Burusco et al., 2015). Ce-FAR-7 exhibe dos cavidades discretas donde podrían alojarse distintos tipos de ligandos; sin embargo, según su identidad de secuencia, esta proteína podría no ser representativa de las proteínas parasitarias. Su estructura general es un elipsoide aplanado que parece adaptarse a diferentes grados de expansión dependiendo de la presencia o ausencia de ligandos en la cavidad central.

En estudios recientes utilizando técnicas *in silico* se compararon dos miembros representativos familias de LBPs distintas: FAR y FABPs. Puntualmente se analizaron de Na-FAR-1 con FABP2 de vertebrados que presentan un plegamiento de tipo barril- β clásico. Mediante simulaciones extendidas de dinámica molecular y análisis de componentes principales, se identificaron diferentes conformaciones adoptadas por cada sistema durante las simulaciones. Na-FAR-1 posee un dominio interno de unión a ligandos altamente flexible y complejo que le permite cambiar reversiblemente entre estados distintos en la proteína. Además, el ligando dentro de la cavidad experimenta grandes cambios conformacionales, siguiendo los cambios en el tamaño de la cavidad

dictados por la estructura transitoria de la proteína. Por el contrario, el complejo proteína-ligando en las FABPs fluctúa alrededor de una conformación única (Barletta et al., 2019). Estos resultados coinciden con la observación de que las proteínas FAR se unen a diferentes ligandos hidrofóbicos, mientras que las FABPs se unen casi exclusivamente a ácidos grasos.

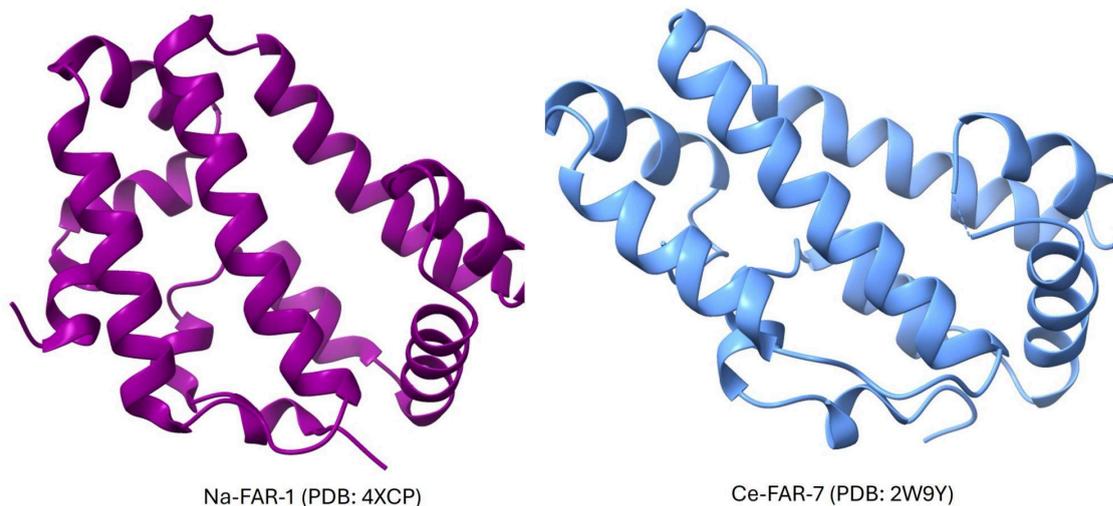


Figura 4. Estructura tridimensional en su forma libre de ligandos de Na-far-1 (Rey-Burusco et al., 2015) y Ce-far-7 (Jordanova et al., 2019). Figura construida utilizando Chimera X.

Na-FAR-1 y posiblemente otras FARs pueden tener un repertorio más amplio de unión a ligandos hidrofóbicos, lo cual se sustenta en el hecho de que una variedad de lípidos neutros y polares co-purifican con la proteína recombinante expresada en bacterias. Muchos estudios muestran que estas proteínas son capaces de unir ácidos grasos (principalmente ácido oleico) y retinol, pero evidencia reciente muestra que también podrían unir fosfolípidos (Rey Burusco 2015). Al igual que con las FABPs, las proteínas FAR tienen una estructura bien descrita y conservada y presentan un amplio rango de similitud de secuencia incluso entre isoformas. Por ejemplo, comparando Na-FAR-1 con FARs de otros nematodos de la clase Rhabditida (*Ancylostoma*, *Ostertagia* y *Caenorhabditis*) tiene una identidad de secuencia que varía del 44 al 60% , pero esta identidad desciende al 25-38% con otras clases como Spirurida (*Onchocerca*, *Brugia*, *Acanthocheilonema*) y Diplogasterida (*Globodera* y *Meloidogyne*) (Tesis Rey-Burusco 2014). En el caso de *C. elegans*, Ce-FAR-8 y Ce-FAR-7 son tan divergentes (19-23%) que incluso se ha llegado a catalogarlas como atípicas, sin tener en cuenta su posible importancia.

En cuanto a los niveles de expresión, se encuentran diferentes isoformas en todas las etapas del desarrollo de nematodos, algunas se expresan en gran medida durante las etapas infectivas (larvales) y otras durante las etapas reproductivas o pre-reproductivas. Además, en la mayoría de los casos se encuentra más de una isoforma de FAR en la misma etapa y muestran un patrón de expresión diferente, como es el caso de *C. elegans* (Garofalo et al., 2003). Esta evidencia sugiere que las proteínas FAR podrían desempeñar diferentes roles a lo largo del desarrollo en lugar de tener una función biológica única.

Las FARs son los principales componentes de las secreciones de parásitos humanos, animales y vegetales (Kennedy et al., 1997; Basavaraju et al., 2003). Como ejemplo, tenemos el caso de Na-FAR-1, donde se ha demostrado que se encuentra en los productos de secreción de los adultos pero no de larvas, gracias a ensayos inmunológicos con anticuerpos específicos (Rey-Burusco et al., 2015). Un análisis proteogenómico de los productos de secreción reveló que las proteínas FAR están entre las 10 familias de proteínas más abundantes en los productos de secreción de *N. americanus* adulto (Logan et al., 2020). Esto plantea la hipótesis de que podrían desempeñar roles en la interacción con el hospedador y en la patogénesis al interferir con las señales de defensa del hospedador (Bradley 2001, Iberkleid et al., 2013, Hewitson, Grainger & Maizels 2009). De hecho, resultados recientes demostraron que la inyección de proteínas FAR recombinantes de nematodos entomopatógenos como *Steinernema carpocapsae* puede reducir la supervivencia del hospedador *Drosophila melanogaster* cuando está expuesto a infecciones bacterianas, lo que muestra que estas proteínas pueden interferir con la respuesta inmunitaria. Aunque se necesitan más estudios, el mecanismo parece implicar el secuestro de señales lipídicas, alterando así el funcionamiento normal de las defensas del hospedador (Parks et al., 2021).

Finalmente las hipótesis anteriormente mencionadas se centran en el parasitismo y por lo tanto son insuficientes cuando observamos las ocho proteínas FAR descritas para *C. elegans*, donde siete de ellas presentan un péptido señal para su secreción y Ce-FAR-7 carece de esta secuencia (Garofalo et al., 2003). Por lo tanto, es importante formular nuevas hipótesis que incluyan la posible función de estas proteínas secretadas en los nematodos de vida libre.

El panorama de la aplicación directa en la salud parece favorable ya que gracias a estas investigaciones se ha logrado desarrollar herramientas diagnósticas que utilizan las proteínas FAR, para estudiar algunas enfermedades parásitas (Burbelo et al., 2009). Además de esto, cabe destacar que Ace-FAR-1 de *Ancylostoma ceylanicum* se ha

mostrado potencialmente útil como vacuna, ya que es capaz de conferir inmunidad en pruebas de desafío en animales de laboratorio (Fairfax et al., 2009).

1.6 *Necator americanus*

Esta especie está representada por nematodos parásitos humanos, intestinales y hematófagos que causan pérdida de sangre, anemia, deficiencias en el crecimiento y desarrollo intelectual. Son parásitos de importancia global y junto con *Ancylostoma duodenale* causan las enfermedades conocidas como uncinariasis que afectan a alrededor de 440 millones de personas en todo el mundo, como se puede apreciar en el mapa de la Figura 5 (Loukas et al., 2016). En la Argentina afectan a poblaciones del norte, hallándose una positividad superior al 30%, que puede llegar al 50% en comunidades de pueblos originarios (Sociás et al., 2014; Menghi et al., 2007).

Los métodos de diagnóstico por microscopía no distinguen entre las dos especies de uncinarias. Este hecho junto con la desatención de las parasitosis, la escasez de recursos en las zonas de mayor prevalencia y la carencia de programas de diagnóstico y vigilancia para estas enfermedades han llevado a que la infección por *N. americanus* esté subdiagnosticada. En un estudio reciente para estudiar la prevalencia de estas parasitosis en Misiones (la provincia con mayor incidencia reportada en nuestro país) y en una población de inmigrantes en provincia de Buenos Aires se encontró un 24.3% de positividad para uncinarias, de las cuales el 91.2% provenían de misiones y el 8.8% de Buenos Aires. Estos resultados fueron luego complementados con métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y se detectó una prevalencia de *N. americanus* del 32.85% en las muestras (Servián et al., 2022).

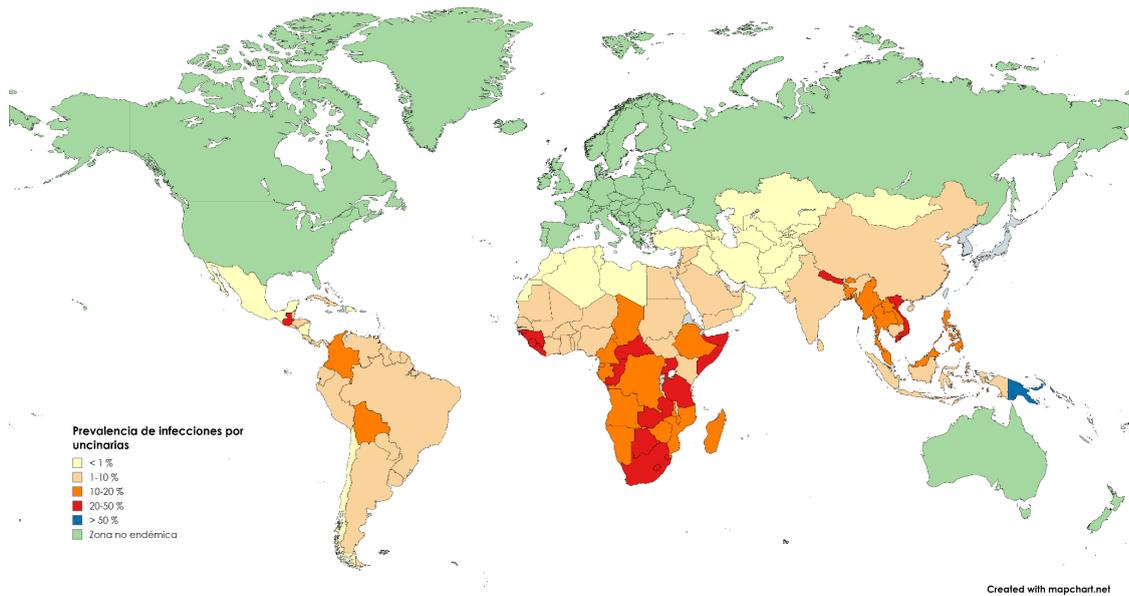


Figura 5 Distribución mundial de las infecciones causadas por uncinarias. Adaptada de Loukas et al., 2016.

Ciclo de vida de *Necator americanus*

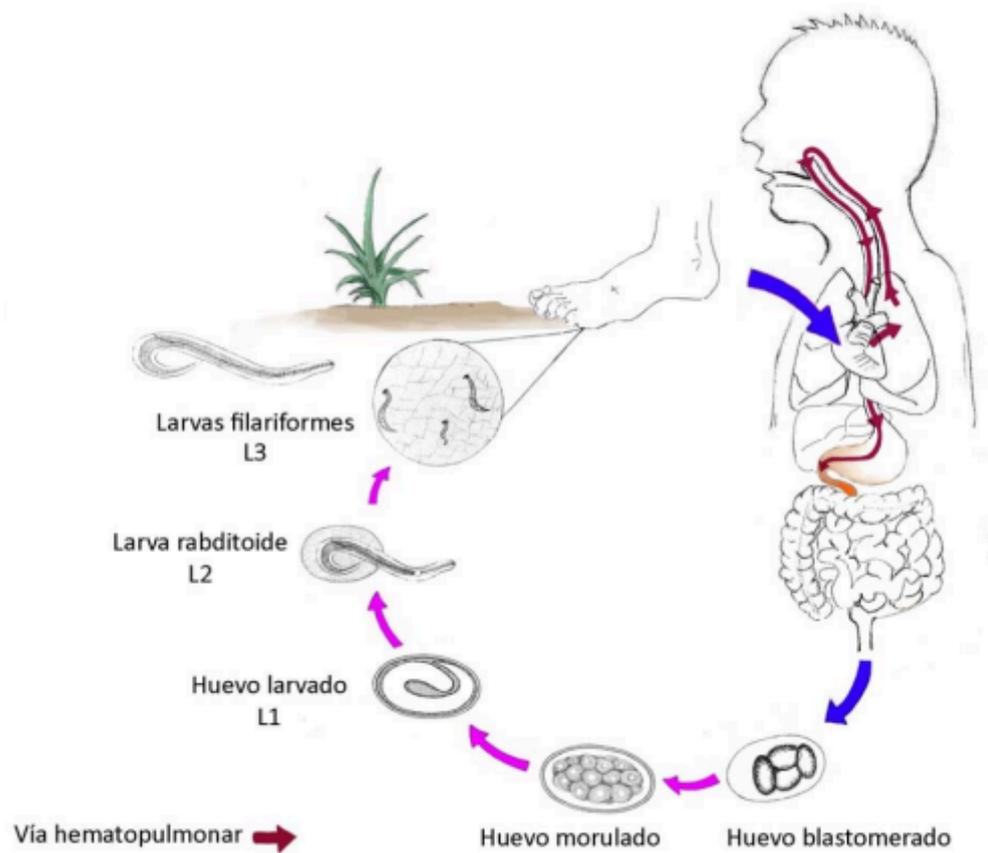


Figura 6 Ciclo de vida *N. americanus* imagen tomada de Kozubsky & Costas, 2017.

En la Figura 6 se muestra cómo se desarrolla el ciclo de vida de *N. americanus*. Los huevos embrionan y eclosionan en el suelo bajo las condiciones favorables de humedad y temperatura que se dan en regiones tropicales y subtropicales. Las larvas salen de los huevos se mueven y alimentan en la tierra, lo cual ubica a esta parasitosis dentro del grupo de las geohelmintiasis. En esta primera etapa juvenil L1, las larvas denominadas rhabditiformes (en forma de bastón) crecen y mudan en el suelo, transformándose en la segunda etapa juvenil, L2. Luego, mudan una vez más alcanzando la tercera etapa juvenil L3, también llamada filariforme (en forma de filaria); siendo esta la forma infectiva. La misma presenta geotropismo negativo ubicándose en los extremos de las hojas de las áreas infectadas donde pueden permanecer varios meses hasta que entran en contacto con el hospedador definitivo. Las larvas L3 son capaces de penetrar la piel humana, migrar por el torrente sanguíneo y alcanzar los pulmones. Una vez ahí, estas larvas filariformes perforan y penetran la cavidad alveolar y ascienden por la tráquea donde son deglutidas, para descender hasta el intestino delgado.

En la mucosa del intestino sufren otra muda al estadio larval L4, maduran y se convierten en adultos que se fijan a la pared intestinal gracias a sus dientes aserrados. En el intestino, donde pueden permanecer por más de cinco años, los adultos se alimentan de sangre y se aparean. Finalmente, los huevos producidos por las hembras se liberan al ambiente a través de las heces completando el ciclo. (Kozubsky & Costas, 2017)

Desarrollo de la enfermedad

Las infecciones por *N. americanus* y *A. duodenale* aumentan con la edad y se estabilizan alrededor de los 25 años y esto las diferencia de otras geohelmintiasis causadas por *Ascaris lumbricoides* y *Trichuris trichura* cuya incidencia es mayor en la niñez. Estas observaciones indican que las uncinarias no inducen defensas en los hospedadores, lo cual se debe a que producen diversas moléculas antiinflamatorias e inmunomoduladoras entre las que podrían encontrarse las FAR (Hotez, 2005).

La sintomatología varía según las etapas de invasión y actividad del parásito. Las larvas infectivas (L3) penetran por la piel, siendo la zona más afectada los pies, dando lesiones cutáneas como eritema, edema, pápulas, vesículas y pústulas por infección secundaria con bacterias piógenas. Luego, la migración de las larvas por los alvéolos pulmonares produce una sintomatología pulmonar inespecífica con tos, expectoración, febrículas transitorias y focos de condensación bronconeumónica similar a un cuadro gripal. Junto con la intensa eosinofilia, estos síntomas respiratorios conforman el síndrome de Löeffler, común a las helmintiasis que realizan ciclo pulmonar. Finalmente,

los adultos fijados a la pared intestinal producen lesiones inflamatorias sangrantes (úlceras) por acción directa de los parásitos y la secreción de sustancias anticoagulantes; los síntomas gástricos como el dolor gástrico, dispepsia, náuseas, diarreas alternadas con estreñimiento y geofagia dependen del número de parásitos y el estado nutricional del hospedador, viéndose agravado en los casos de desnutrición. Además, la anemia producida por estos parásitos se debe a la pérdida de hierro, presentando eritrocitos microcíticos e hipocrómicos. En las formas leves dan debilidad física y palidez, mientras que en casos más graves se presenta pérdida de fuerza, cansancio, palpitaciones, vértigo, disnea, cefalea, lipotimias, parestesias y anorexia (Brooker, Bethony & Hotez, 2004; Brooker, Hotez & Bundy, 2008).

Diagnóstico

La sintomatología digestiva, pulmonar y la presencia de anemia son características indistinguibles de otras patologías, por lo que la asociación a zonas endémicas, la referencia de haber estado en contacto con tierra y antecedentes de lesiones cutáneas pruriginosas en los pies son los indicios que orientan a este diagnóstico. El diagnóstico de laboratorio para las uncinarias consiste en la búsqueda de huevos blastomerados, de cáscara fina y con cámara de aire en materia fecal, por métodos de flotación.

En esta parasitosis es importante conocer el número aproximado de especímenes adultos que existen en el intestino ya que la sintomatología está en relación directa con el número de parásitos. La cuantificación de huevos por los métodos de Stoll-Hausheer o Kato-Katz (Periago, 2015; Bosch et al., 2021) entre otros, se expresa como huevos por gramo de heces y nos da la idea del número de parásitos adultos presentes, que se utiliza para estimar la intensidad de infección y evaluación terapéutica. El coprocultivo por el método de Harada-Mori (Kitvatanachai et al., 2019) permite el desarrollo de los huevos hasta los estadios larvarios L1 y L3 cuya observación morfológica es útil para el diagnóstico de identificación de especies. El hallazgo de parásitos adultos en materia fecal permite la identificación de especie mediante la observación de la cápsula bucal en la extremidad anterior. Existen pruebas inmunológicas como la intradermorreacción y pruebas serológicas que carecen de utilidad práctica. La PCR e Inmunoblot son utilizadas en infecciones mixtas y estudios epidemiológicos (Kozubsky & Costas, 2017).

Prevención y Tratamiento

Los factores que inciden en la prevalencia de uncinariosis son principalmente los factores personales, como la escasa higiene, la falta de uso de calzado y el desconocimiento de la transmisión de las enfermedades, y los factores ambientales

como un sistema de eliminación de desechos sanitarios deficiente y la presencia de suelos cubiertos de hojas, sombreados, húmedos y con temperaturas entre 15 y 30 °C contribuyen a la infección parasitaria de las geohelmintiasis. Es por esto que las medidas de prevención están dirigidas al mejoramiento del nivel de vida, uso de letrinas y zapatos, saneamiento ambiental, educación sanitaria y tratamiento con medicamentos.

Para la eliminación de los vermes se utiliza el Tiabendazol en dosis de 50 mg/kg/día durante 3 días, el Albendazol en dosis única de 400 mg por vía oral y el Pirantel en dosis de 20 mg/kg/día durante 3 días (Ghodeif & Jain, 2023). También debe mejorarse el estado general de salud del paciente infectado, para lo cual se trata la anemia con la administración de sulfato ferrosos y hematopoyéticos y en casos graves se realizan transfusiones. La evaluación de la efectividad del tratamiento se realiza con una serie de tres coproparasitoscópicos cuantitativos en días sucesivos dos semanas después de terminado el esquema terapéutico. (Kozubsky & Costas, 2017).

I.7 *Caenorhabditis elegans*

I.7.a Historia del Modelo

Probablemente, la primer persona que observó a los gusanos del género *Caenorhabditis* fue el comerciante holandés Anton van Leeuwenhoek (1632 - 1723), quien inventó el microscopio en el siglo XVII y es considerado como el “padre de la microbiología”; y en 1676 describió en una muestra de vino añejo a “*pequeños seres vivientes, con forma de pequeñas anguilas*”, que posiblemente habrían sido nematodos de vida libre. Varios años más tarde, el interés por la biología del archivista y bibliotecario Emile Maupas (1842 - 1916) lo llevaría a aislar, nombrar y describir por primera vez a *Rhabditis elegans* (hoy *Caenorhabditis elegans*), en la Figura 7 se muestran sus dibujos originales.

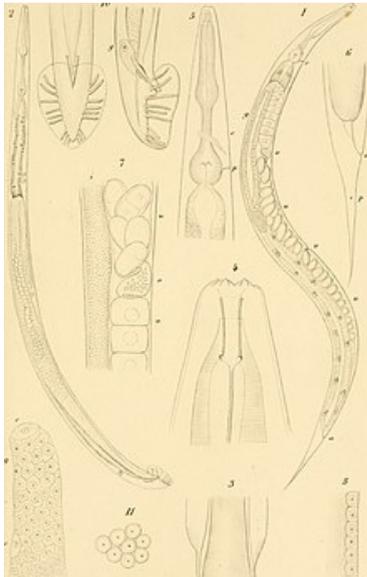


Figura 7 Dibujos originales de Emile Maupas ([Centre national de la recherche scientifique \(France\)](https://www.cnr.fr/); [Lacaze-Duthiers, Henri de, 1821-1901 urn:oclc:record:907999311](https://nbn-resolving.org/urn:oclc:record:907999311))

Los nematodos han resultado de gran interés a lo largo de la historia de la biología, teniendo un rol importante en el avance de estudios de reproducción, desarrollo, genética, neurología, entre otros. Hacia finales del siglo XIX el género *Ascaris*, que habría sido uno de los primeros modelos empleados, resultaba atractivo por su gran tamaño y simpleza. En las palabras de Édouard van Beneden (1846 - 1910), biólogo Belga, “*He encontrado con los Ascaris del caballo, un material maravilloso. Estoy convencido de que el huevo de este nematodo pronto se convertirá en un objeto de estudio clásico para investigar e ilustrar los fenómenos relacionados con la fecundación*”. En estos tiempos, destacaron también biólogos que trabajaron en diferentes especies de *Rhabditis* enfocándose en la reproducción y citología de estos,

como Eva Krüger, Paula Hertwig, Karl Belar y Hikokura Honda, siendo este último quien determinó que *C. elegans* posee seis cromosomas (Krüger, 1913; Hertwig, 1920; Bělař, 1923; Bělař, 1924; Honda, 1925).

En 1940 surgen dos grupos de investigación importantes, el de Victor M. Nigon en Lyon (Francia) y el de Ellsworth C. Dougherty en California (EEUU), que trabajaron a la par con el modelo de *Caenorhabditis briggsae*, asentando las bases de su cultivo y métodos de experimentación, logrando una reproducibilidad en los resultados que se obtenían. Sin embargo, sus proyectos no lograron convencer a las autoridades financiadoras y se vieron interrumpidos.

Finalmente, la figura más importante sobre *C. elegans* es Sydney Brenner (1927 - 2019), el biólogo sudafricano que ubicó a este modelo en un lugar privilegiado en el mundo de la biología molecular. Lo llamó "El regalo de la naturaleza a la ciencia" en su conferencia al recibir el premio Nobel de Fisiología o Medicina en 2002, junto a H. Robert Horvitz y John E. Sulston. Enfocándose primero en *C. briggsae* y cambiando luego a *C. elegans*, por crecer más rápidamente en cultivo, eligió este modelo por ser un organismo eucariota simple, transparente, de fácil crecimiento y alta reproducción, además de ser hermafroditas con autofecundación y un número constante de células; lo cual significaron características ideales para sus estudios de neurociencia. Tiempo después se descubriría la maquinaria de auto-silenciamiento de la expresión de genes que posee *C. elegans*, herramientas de biología molecular y otros avances que permitieron que este modelo conquistara múltiples campos de estudio (Nigon & Félix, 2017).

Fue Sydney Brenner, en 1965, quien vio la potencialidad del uso de nematodos como modelos para el futuro de la biología molecular, especialmente para el estudio del desarrollo y el sistema nervioso (Brenner, 1974; Brenner, 1988; Brenner, 2009). Los nematodos ya eran un objetivo interesante, dado que se los consideraba organismos eucariotas simples, con un tamaño y un número de células manejables, y Brenner vio a *Caenorhabditis briggsae* como un sistema ideal (Corsi et al., 2015). Más tarde, cambió a *C. elegans* porque la cepa creció mejor que el aislado de *C. briggsae*; lo cual fue para mejor ya que *C. elegans* demostró ser un modelo incluso mejor de lo que Brenner podría haber predicho. *C. elegans* es una especie en la que la aplicación externa de ácido ribonucleico de doble cadena (dsARN) inactiva la expresión genética, lo que resultó ser una gran herramienta que impulsó los estudios genéticos. En segundo lugar, su línea germinal sincicial facilita la transgénesis, ya que el ADN inyectado se recombina y forma un cromosoma adicional que con frecuencia se transmite a

generaciones posteriores. En tercer lugar, se pueden llevar adelante mutagénesis química dado que demostró ser eficiente mostrando un equilibrio entre toxicidad y efecto mutagénico (Félix, 2008). Finalmente, en 1969, John Sulston congeló con éxito ejemplares de *C. elegans*, lo que significó que las cepas podían almacenarse en laboratorios durante varios años. A partir de entonces, la comunidad de *C. elegans* comenzó a crecer rápidamente y hoy en día hay más de mil laboratorios registrados en todo el mundo en el sitio www.wormbase.org, con más de 1700 artículos de investigación publicados cada año durante los últimos 5 años (Corsi et al., 2015).

Entre las virtudes que presenta este modelo, que lo hacen atractivo para diferentes campos de investigación, son su rápido crecimiento hasta el estadio adulto, a temperatura ambiente. Además su tamaño, que oscila entre 0,25 mm en la primera etapa larvaria y 1 mm en la etapa adulta, significa que los gusanos generalmente pueden ser observados en placas de Petri con agar sólido bajo una lupa estereoscópica mientras se mueven, comen, se desarrollan y ponen huevos, mientras que los microscopios compuestos o confocales permiten resoluciones mucho más finas y abordan la observación a nivel celular. Como *C. elegans* es transparente, muchas de sus estructuras pueden verse directamente con una lupa binocular. Además, su número constante de células (959) significa que es posible trabajar con células individuales e incluso visualizarlas incluyendo detalles subcelulares. Dichos detalles se pueden mejorar utilizando proteínas fluorescentes como etiquetas, lo que permite el estudio de procesos de desarrollo, una fácil detección de mutantes, el aislamiento de células y la caracterización de interacciones de proteínas *in vivo* (Chalfie et al., 1994; Boulin et al., 2006; Kerr & Schafer, 2006; Feinberg et al., 2008; Husson, Gottschalk, A. & Leifer, 2013).

Uno de los principales objetivos de Brenner era identificar neuronas individuales y sus conexiones sinápticas. Gracias a la microscopía electrónica y a herramientas de nuevas tecnologías se logró algo que no se encuentra descrito para ningún otro organismo: mapear las conexiones neuronales de las 302 neuronas que se encuentran en el hermafrodita, completando el primer conectoma (White, 1986). Esto también se logró recientemente para los gusanos macho (Cook et al., 2019; Jarrell et al., 2012).

El descubrimiento y descripción del mecanismo de regulación de la expresión génica mediante ARN de interferencia (ARNi) se logró en 1998 inyectando ARN bicatenario en la gónada de gusanos adultos hermafroditas, evaluando luego los efectos del silenciamiento en la progenie (Fire et al., 1998). Posteriormente, se desarrollaron otras técnicas como sumergir a los individuos en una solución con dsARN o, la más usada

actualmente por su practicidad y efectividad, alimentarlos con bacterias diseñadas para expresar dsARN, que se observó que produce una respuesta robusta de silenciamiento de genes (Tabara et al., 1998; Timmons, Court & Fire, 2001). La alimentación demostró ser un método fácil y eficaz que se utiliza comúnmente en estudios genéticos y se desarrollaron dos bibliotecas de cepas de bacterias ARNi en experimentos de silenciamiento masivo, la biblioteca del laboratorio Ahringer y el laboratorio Vidal (Kamath & Ahringer, 2003; Rual et al., 2004).

Ciclo de vida de *C. elegans*

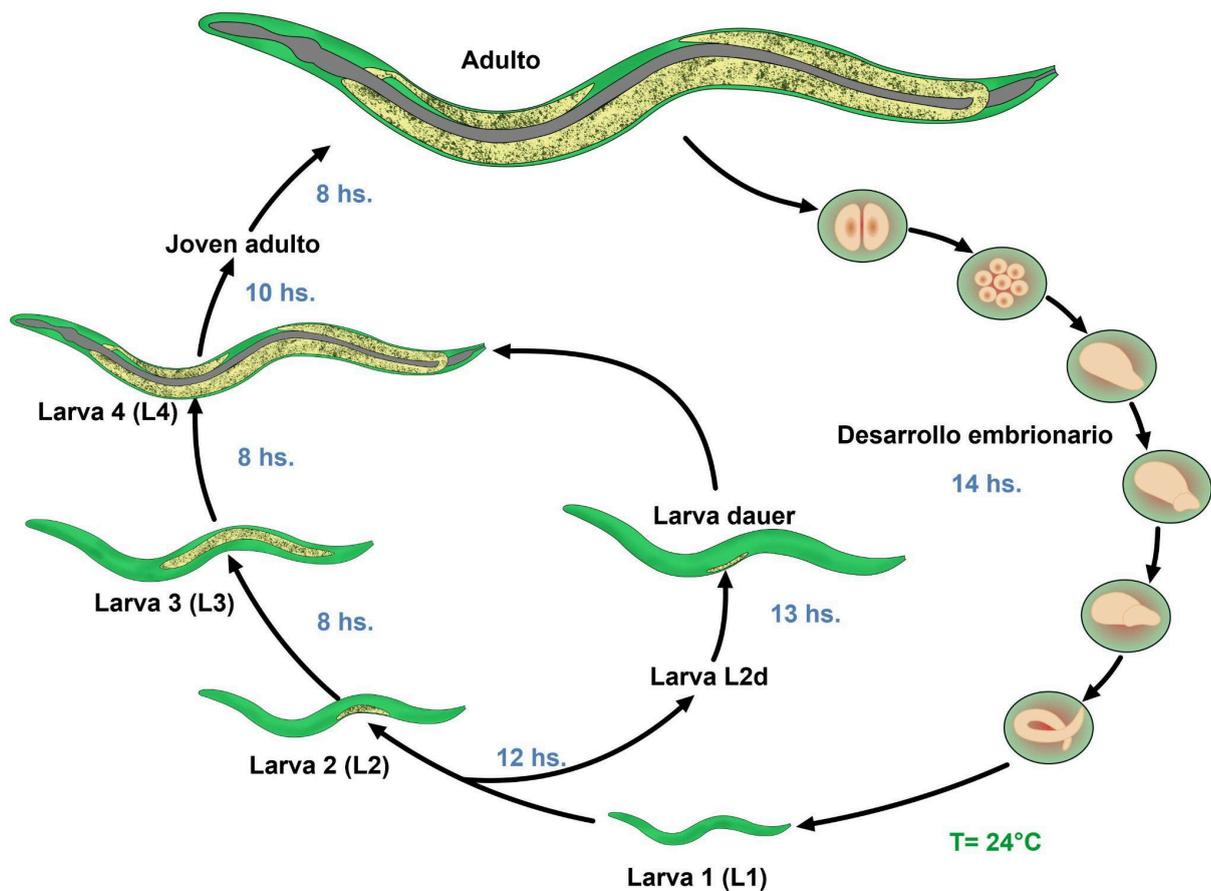


Figura 8 Ciclo de vida de *C. elegans* a temperatura de 24°C. Imagen creada en base a Altun & Hall, 2024

En la Figura 8 se puede ver cómo el ciclo comienza cuando dentro de un individuo hermafrodita, los oocitos pasan a través de la espermateca y son fertilizados, formando un huevo, cuya cáscara es prácticamente impermeable, lo que permite que se desarrolle de forma completamente independiente de la madre. Sin embargo, los embriones generalmente se retienen en el útero del hermafrodita hasta aproximadamente la etapa de aproximadamente 30 células en la que son expulsados al

exterior. Luego de que el embrión sufre varias divisiones, eclosiona y se convierte en una larva de primer estadio (L1). Los animales comienzan a comer y desarrollarse a través de cuatro estadios larvarios (L1-L4). A 20°C, la etapa L1 dura aproximadamente 16 horas; las otras etapas duran aproximadamente 12 horas. Cada etapa termina con un período de inactividad denominado letargo (Raizen et al., 2008) en el que se forma una nueva cutícula (capa externa de proteínas, principalmente colágeno) y termina con la muda de la cutícula vieja. Aproximadamente 12 horas después de la muda L4, los hermafroditas adultos comienzan a producir progenie hasta que han utilizado todo el esperma que ellos mismos produjeron; este ciclo de postura tiene su punto máximo entre el segundo y tercer día y concluye al cuarto o quinto día. El hermafrodita podría generar más progenie si es fecundado por un individuo macho que le provea de más espermatozoides. Después del período reproductivo, los hermafroditas pueden vivir por dos a tres semanas más antes de morir de senescencia, aproximadamente hasta los 15 días (Corsi et al., 2015).

Cuando las bacterias que se utilizan como alimento se agotan y los animales están hacinados, las larvas L2 activan un ciclo de vida alternativo (Hu, 2007) y mudan a un estadio larvario L3 facultativo llamado larva “dauer” (“dauer” en alemán significa “duradero”)(Lu et al., 2005). La cutícula de la larva dauer rodea completamente al animal y tapa la boca impidiendo que el animal coma y por lo tanto deteniendo el desarrollo. Esta tiene una mayor resistencia a los productos químicos, por lo que proporciona a las larvas una mayor protección contra el estrés ambiental y los agentes cáusticos. Las larvas Dauer pueden sobrevivir durante muchos meses y son la forma de dispersión que se encuentra más comúnmente en la naturaleza. Cuando las larvas dauer se transfieren a placas con las bacterias, pierden los tapones bucales, mudan y continúan su desarrollo como larvas L4 ligeramente diferentes (Hu, 2007).

Habiendo descrito la vida de *C. elegans* en el laboratorio, como nematode modelo, es importante abrir el contexto y mencionar las diferencias que presentan en su hábitat natural. Esta particular especie puede ser encontrada ampliamente distribuída en el mundo, particularmente en zonas de clima templado y húmedo, donde se alimenta de bacterias provenientes de frutas y plantas en descomposición; tanto en ámbitos urbanizados asociados al hombre como en bosques salvajes. Las características de su desarrollo y comportamiento son claves para la regulación de sus poblaciones, con ciclos de “BOOM-and-BUST” o “Explosión y Declive” y migraciones que son llevadas a cabo principalmente por larvas dauer más móviles y la asociación forética con organismos que los transportan hasta llegar a condiciones más favorables. Aunque no se ha caracterizado en profundidad, es interesante pensar que la alimentación de los *C.*

elegans salvajes resulta mucho más diversa que la cepa de *Escherichia coli* OP50 que se utiliza normalmente en los laboratorios y que la obtención de este alimento conlleva la competencia con otros organismos. Además, en la naturaleza *C. elegans* está sometido a ser presa de otras especies o también interactúa con hongos, microsporidios y bacterias que pueden colonizar su cutícula o intestino pudiendo infectarlo y potencialmente matarlo. Estos detalles son de vital importancia cuando se estudia al modelo y son claves para la postulación de hipótesis y la discusión de resultados acordes con la biología de estos gusanos (Frezal y Felix, 2015).

Ce-FARs

C. elegans posee ocho isoformas de proteínas FARs (Ce-FAR-1, Ce-FAR-2, Ce-FAR-3, Ce-FAR-4, Ce-FAR-5, Ce-FAR-6, Ce-FAR-7 y Ce-FAR-8), las cuales han sido descritas en Garofalo et al., 2002, aunque no se incluyó Ce-FAR-8 por ser catalogada como una proteína atípica para la familia. Excepto Ce-FAR-7, poseen péptido señal en su secuencia, lo que indicaría que estas son secretadas. Sin embargo, Ce-FAR-7 es la única FAR de *C. elegans* para la cual se posee su estructura obtenida por cristalografía (Jordanova et al., 2009). En cuanto a su función unen ácidos grasos y retinol con diferentes afinidades. Además, estas se transcriben de manera diferencial a lo largo del ciclo de vida de *C. elegans*, con bajos niveles de expresión en los estadios embrionarios. De particular interés resulta que Ce-far-4 se transcribe en niveles más altos en el estadio de larva cuatro (L4), y Ce-far-3 y -7 predominaban en los machos.

1.8 *Caenorhabditis bovis*

Dentro del género *Caenorhabditis* la mayoría de las especies son de vida libre, con frecuentes hallazgos en frutas o flores en descomposición. *Caenorhabditis bovis*, ubicado filogenéticamente en el árbol de la Figura 9, se presenta como un caso atípico dentro de su género, habiendo sido recurrentemente aislada del canal auditivo de ganado bovino, específicamente de las razas Cebú en el este de África y Gyr en Sudamérica (Kiontke & Sudhaus, 2006; Cardona, 2010). Es por esto que se plantea que *C. bovis* podría ser uno de los agentes causantes de la otitis parasitaria, una condición que se manifiesta con síntomas como inflamación, supuración marrón oscura y adormecimiento, llegando incluso a ser fatal en casos severos. Similar a otras especies de *Caenorhabditis*, se postula que *C. bovis* mantiene una asociación forética con la mosca *Chromya bezziana*, también localizada en las orejas del ganado Cebú (Msolla et al., 1993). No obstante, persiste la incertidumbre respecto a si *C. bovis* es el agente directo de la otitis parasitaria o si, en cambio, coloniza infecciones bacterianas o

fúngicas preexistentes. A pesar de estas incógnitas, es evidente que *C. bovis* emerge como una especie que ha logrado adaptarse a un nicho ecológico notablemente diferente al ocupado por otros miembros de su género. Este nematodo exhibe la capacidad de sobrevivir a temperaturas elevadas (32-35°C), que para el resto de las especies del género serían condiciones adversas o estresantes según el tiempo de exposición, lo cual representa un fascinante punto de interés para las investigaciones sobre la evolución de los nematodos y la diversidad inherente al género *Caenorhabditis*.

Los resultados de la reciente publicación del genoma de *C. bovis* (Stevens et al., 2020) han despertado nuevamente el interés en comprender los procesos evolutivos de los nematodos y la aparición del parasitismo en el phylum. Al comparar el genoma de *C. bovis* con el de *C. elegans*, este es más pequeño y, al mismo tiempo, se han identificado varias familias de genes que han sufrido una expansión y han sido relacionadas independientemente con el parasitismo en otras especies de nematodos. Particularmente, dentro de la familia de las FARs, *C. bovis* ha perdido los genes para estas proteínas, excepto por un gen homólogo de Ce-far-8, la cual tuvo dos eventos de duplicación, resultando en tres copias totales en el genoma; siendo estas llamadas Cb-far-08 y sus copias, más cortas en secuencia, Cb-far-41 y Cb-far-40. Este evento puede estar relacionado con la adaptación de *C. bovis* hacia una vida posiblemente parásita, colocando a las FARs como potenciales claves en la evolución genética del phylum (Stevens et al., 2020).

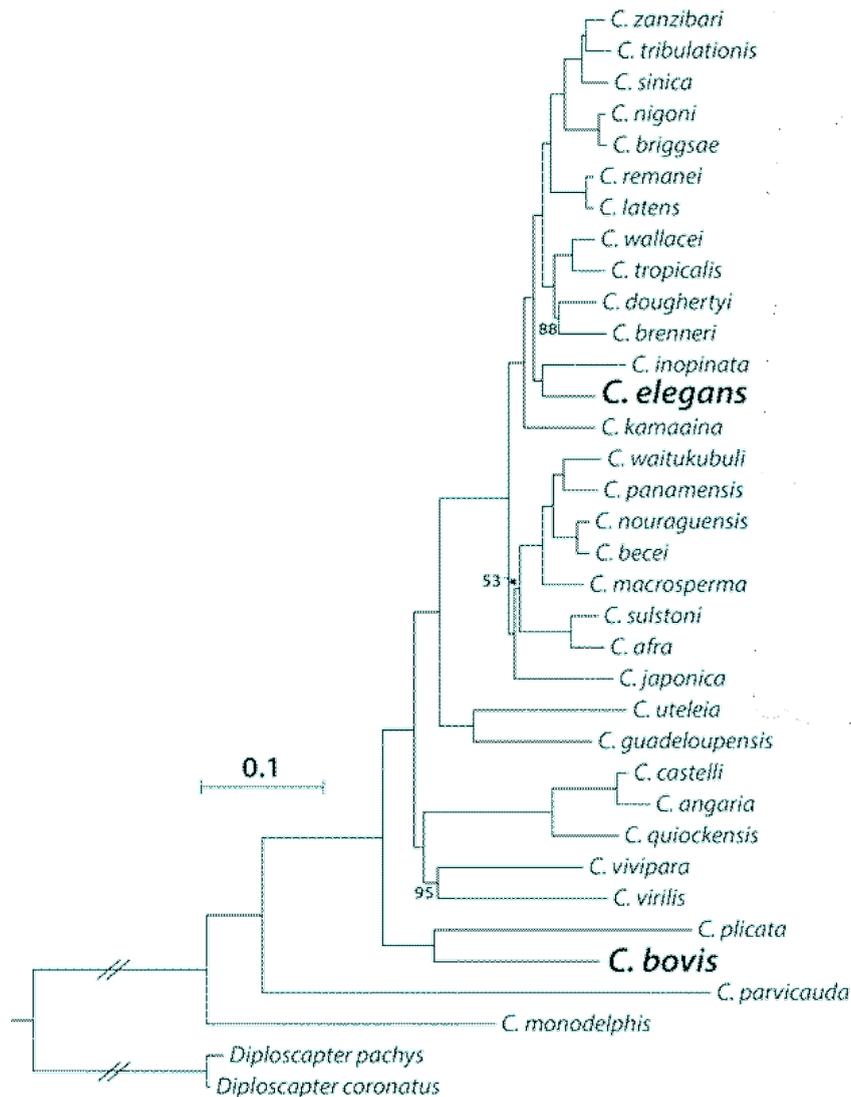


Figura 9: Árbol filogenético del género *Caenorhabditis*. *C. bovis* y *C. elegans* están resaltados. Filogenia inferida usando una supermatriz de 1167 ortólogos de copia única bajo el modelo general de sustitución reversible en el tiempo con variación de tasa distribuida gamma entre sitios (GTR + G). El árbol tiene su raíz en las dos especies de *Diploscapter*. Las longitudes de las ramas están en sustituciones por sitio; se muestra la escala. Los bootstraps fueron 100 a menos que se indique como anotaciones de rama. Imagen modificada de Stevens et al. 2020.

Es importante destacar que la hipótesis más aceptada describe que el phylum Nematoda surge desde un organismo de vida libre y que el parasitismo ha aparecido evolutivamente en seis oportunidades separadas, lo cual refleja el éxito de esta estrategia adaptativa que conlleva procesos de reducción del genoma, expansión de genes específicos además de adaptaciones morfológicas que han llevado a diferentes especies a conquistar múltiples nichos (Blaxter & Koutsovoulos, 2015).

I.9 Epílogo

Como cierre de este capítulo introductorio y por todo lo antedicho, este trabajo de tesis aborda el estudio funcional y bioquímico de las proteínas FARs de nematodos. Para ello se presenta el estudio de las proteínas FAR de nematodos de vida libre utilizando el modelo *C. elegans*, el trabajo realizado sobre la proteína FAR de parásito Na-FAR-1 de *Necator americanus*, y por último, evaluamos por primera vez las propiedades de FARs de la especie *C. bovis*, comparadas con la proteína ortóloga de *C. elegans* Ce-FAR-8.

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Como se ha mencionado en la introducción, las proteínas FAR son exclusivas de nematodos y poseen características estructurales novedosas que no se han encontrado en otros organismos hasta la actualidad. Adicionalmente, estas proteínas son capaces de unir ácidos grasos y retinol con alta afinidad, lo cual las relaciona con el metabolismo lipídico de estos organismos, un área poco explorada. Más aún, se ha descrito que las FAR son abundantes en las secreciones de los parásitos presentes en los tejidos del hospedador.

El objetivo general del presente trabajo de tesis es describir el rol biológico de las proteínas FARs mediante la caracterización estructura-función de distintos miembros de esta familia de proteínas, provenientes de nematodos de vida libre y parásitos. Para ello, se trabajó sobre los siguiente objetivos específicos:

A. Estudio del rol de proteínas FAR en el metabolismo de nematodos utilizando el sistema modelo *Caenorhabditis elegans*.

Se postula que las proteínas FARs tienen funciones asociadas al metabolismo lipídico, reproducción y desarrollo. Por lo tanto, se hipotetiza que la supresión de la expresión de los genes que codifican para las diferentes isoformas de proteínas FARs en el modelo *C. elegans*, ya sea por silenciamiento con ARN de interferencia o la delección de la secuencia codificante en el caso de cepas mutantes comerciales, afectará estos procesos biológicos, disminuyendo su capacidad reproductiva, enlenteciendo su desarrollo, lo cual aumentaría su longevidad y tendrían alteradas sus reservas lipídicas.

B. Caracterización de la interacción de Na-FAR-1 recombinante con lípidos.

El sitio de fosforilación conservado en la familia de las proteínas FARs modula la actividad de estas, modificando su capacidad de unir lípidos, variando la constante de disociación con los mismos. Una mutación puntual en la secuencia de aminoácidos en este sitio, que simula el estado fosforilado, producirá cambios en la afinidad de esta por lípidos. También se postula que la Na-FAR-1 y su mutante “fosforilada” son capaces de unir fosfolípidos.

C. Caracterización estructural y funcional de FARs de *C. bovis* y *Ce-far-8* obtenidas en forma recombinante.

El análisis de secuencia de los genes codificantes para las recientemente reportadas proteínas FAR de *C. bovis*, han demostrado ser ortólogas de *Ce-far-8* de *C. elegans*.

Es importante destacar que Ce-FAR-8 fue considerada atípica dentro de la familia y por ello nunca fue caracterizada. Sin embargo, hipotetizamos que tanto Ce-FAR-8 como las proteínas ortólogas de *C. bovis* pertenecen a la familia de las FARs y poseen sus características particulares antes mencionadas.

La hipótesis general de este trabajo de Tesis es que las proteínas FAR de nematodos poseen un rol importante en la biología de los mismos, participando en procesos de desarrollo y reproducción; lo cual, en el caso de nematodos parásitos, son aspectos claves para el establecimiento de la infección.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta sección estará subdividida en dos partes, teniendo la misma organización que el capítulo 5 “RESULTADOS”. La primera, titulada “*In Vivo*”, describe los materiales y métodos utilizados en los experimentos realizados con el modelo de *C. elegans*, con un enfoque biológico en el estudio y relacionado con el objetivo específico A. La segunda sección se titula “*In Vitro*” e involucra aquellos experimentos realizados para la obtención de las proteínas recombinantes Na-far-1 y su mutante fosforilada, relacionado con el objetivo específico B, así como también proteínas Ce-far-8 y FARs de *C. bovis* Cb-far-08, Cb-far-40 y Cb-far-41; todas enmarcadas dentro del objetivo específico C.

A- IN VIVO

III.A.1 Cultivo y mantenimiento de *C. elegans*

Las cepas de *C. elegans* se cultivaron en placas de petri con medio NGM (Nematode Growth Media), que es un medio sólido, bajo las condiciones de cultivo necesarias, según la literatura (Stiernagle, 2014). Como alimento de *C. elegans* se utilizó un stock de bacteria *Escherichia coli* OP50 en medio Luria Bertani (LB), crecido a 37°C hasta saturación y conservado a 4°C hasta dos semanas. Al momento de preparar las placas para el mantenimiento de las cepas se colocó una gota de 100ul del stock de bacterias por placa y se creció a 20°C al menos por 24hs. Estas son las condiciones estándares y se especificará su variación en los diferentes experimentos.

Para mantener las diferentes cepas usadas o si el experimento lo requería, se transferían gusanos a una placa nueva y se la dejaba crecer hasta el número de individuos y estadio deseado. Esto se realizó por el método de “chunking”, el cual consiste en cortar un trozo de del agar de una placa con gusanos con el alimento agotado y transferirlo a una placa nueva con alimento; la población crece rápidamente con individuos en diferentes estadios de desarrollo. También, si se requería un número discreto de individuos, estos se transferían individualmente levantándolos con un ansa hecha con un alambre de platino calentado y enfriado rápidamente para esterilizarlo y colocándolos en una placa nueva.

Para asegurar cultivos sincronizados, en el cual la gran mayoría de los gusanos estén en un único estadio del desarrollo, se utilizó el método de “bleaching” o “blanqueamiento”. En este, a partir de una placa de gusanos con un número abundante de adultos grávidos, se lavan los mismos con 1 ml de solución buffer M9, se los

centrifuga a 1000 xg por 1 minuto, se retira el sobrenadante y se los somete a una solución de lavandina e hidróxido de potasio (312 µl KOH 1M + 250µl 25 g/l lavandina, cada dos placas) con agitación suave hasta 4 minutos. Luego se lava los gusanos tres veces con buffer M9, bajando el volumen centrifugando a 1000 xg por 1 minuto y retirando hasta dejar 100 ul finales de la solución. Luego del tercer lavado, se siembra el volumen remanente en una placa nueva sin bacterias; esto permite que eclosionen los huevos, pero en ausencia de alimento las larvas L1 ven arrestado su desarrollo. Al día siguiente se transfieren las larvas, levantandolas con 1ml de M9, centrifugando a 1000 xg por 1 minuto y retirando 900ul de sobrenadante. Se las coloca en una placa nueva con bacterias *E. coli* OP50 como alimento; esto es lo que permite que las larvas retomen su ciclo de vida, con una población sincronizada.

Las cepas de gusanos utilizadas en este trabajo de tesis se mantuvieron congeladas en freezer a -70°C en una solución de congelamiento que consiste en 500 µl de buffer B + 500 µl de buffer M9 (utilizado para levantar las larvas L1 de las placas que desean congelarse). Las recetas de las soluciones utilizadas se detallan a continuación:

Medio NGM (Para 500ml)

CINa (g)	1.5
Agar (g)	8.5
Peptona (g)	3
H ₂ Od (ml)	Llevar a 500

Autoclavar medio y dejar enfriar hasta 60-70°C

Luego agregar las siguientes soluciones de sales previamente autoclavadas

MgSO ₄ 1 M (ml)	0.5
CaCl ₂ 1 M (ml)	0.5
Buffer PO ₄ 1 M (ml)	12.5
Colesterol 5 mg/ml (ml)	0.5 *

*Esta solución es esterilizada por filtración y no es autoclavada porque tiene etanol.

Sulfato de Magnesio 1M (Para 10ml)

MgSO ₄ .7H ₂ O (g)	2.46
H ₂ Od (ml)	10

Cloruro de Calcio 1M (Para 10ml)

CaCl ₂ .2H ₂ O (g)	1,47
H ₂ Od (ml)	10

Buffer fosfato 1M (Para 100ml)

KH ₂ PO ₄ (g)	10,83
K ₂ HPO ₄ (g)	3,56
H ₂ O (ml)	100

Colesterol 5mg/ml (Para 10ml)

Volumen (ml)	10
Colesterol sigma (g)	0,05
EtOH 100 % (ml)	10

Buffer M9 (Para 1 lt solución 1X)

KH ₂ PO ₄ (g)	3
Na ₂ HPO ₄ (g)	6
NaCl (g)	5
H ₂ O _d (ml)	1000

Después de autoclavar agregar solución salina previamente autoclavada

MgSO ₄ 1M (ml)	1
---------------------------	---

Buffer B (Para 100 ml)

NaCl (g)	0.57
KH ₂ PO ₄ 1 M (ml)	5
Glicerol(ml)	30
H ₂ O _d (ml)	64,43

Ajustar a pH = 6 y autoclavar.

Luego de autoclavar agregar 30 µl de MgSO₄ 1 M estéril

Medio LB (Para 1lt)

NaCl (g)	10
Triptona (g)	10
Extracto de levadura (g)	5
H ₂ O _d (ml)	1000

III.A.2 Cepas de *C. elegans* utilizadas

En este trabajo de tesis se trabajó principalmente con la cepa salvaje Bristol N2 y cepas mutantes knock out (K.O) para los genes Ce-FAR-2 (RB667), Ce-FAR-4 (RB1402) y Ce-FAR-6 (RB1515) (los codigos son identificatorios para el Caenorhabditis Genetics Center <https://cgc.umn.edu/>, donde pueden encontrarse más detalles sobre estas cepas). Además, en los experimentos de silenciamiento con ARN de interferencia (ARNi) se emplearon la cepa N2 y una cepa sensible a ARNi.

III.A.3 Silenciamiento con ARNi

El modelo *C. elegans* tiene la capacidad de incorporar doble ARN doble hebra (ARNdh) del medio y procesarlo a través de su propia maquinaria de silenciamiento, de manera tal de distribuirlo a todos sus órganos, siendo este un fenómeno sistémico y con la posibilidad de ser transmisible a la progenie. Dentro de las estrategias existentes para entregar el ARNdh la más empleada, por ser una técnica efectiva y de fácil aplicación, es alimentar al gusano con bacterias cuya expresión del ARNdh es inducible con Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Las bacterias silenciadoras son una cepa de *E. coli* HT-115 transformadas con el plásmido L4440 (Kamath & Ahringer, 2003) que codifica el gen de resistencia a ampicilina, y que contienen una parte específica de la secuencia de interés a ser silenciada (Fay, 2013).

El medio de cultivo empleado es agar NGM con el agregado de ampicilina (concentración final 1 mM) e IPTG (concentración final 1 mM), al momento de preparar las placas de petri de 35 mm. Las bacterias silenciadoras se crecen durante toda la noche en medio líquido LB con ampicilina. Al día siguiente se siembra una gota de 50 μ l por placa, se deja secar en flujo laminar y luego se guardan a 20°C.

Los gusanos provenientes de una sincronización se siembran en estadio L4, colocando entre 3 y 5 por placa. Al día siguiente, estas larvas llegan al estadio adulto, ponen entre 60 y 100 huevos y luego se las retira, de tal manera que la mayoría de los huevos están en una etapa de desarrollo similar. En los días posteriores, se observan las placas bajo lupa, en búsqueda de diferencias fenotípicas. Este protocolo se muestra en forma esquemática en la Figura 10.

Las bacterias silenciadoras utilizadas en este trabajo, expresan ARNdh para los siguientes genes: *elt-2*, *dpy-11*, *Ce-far-1*, *Ce-far-2*, *Ce-far-3*, *Ce-far-4*, *Ce-far-5*, *Ce-far-6*, *Ce-far-7* y *Ce-far-8*. Todas ellas fueron obtenidas de la biblioteca de Kamath & Ahringer, 2003. Como control negativo se utilizó la cepa de bacterias con el plásmido

vacío y como control positivo se utilizó el silenciamiento de *elt-2*, que arroja un fenotipo fuerte de arresto en estadio larval al inhibir el correcto desarrollo del aparato digestivo de los gusanos, y *dpy-11* que da un fenotipo de morfología regordete (dumpy) .

Fenotipo esperado	Gen de <i>C. elegans</i>	Coordenadas biblioteca (Cromosoma-placa: well)
Arresto en estadio larval	<i>elt-2</i>	X-5:I11
Morfología regordete	<i>dpy-11</i>	V-4:F04
Morfología regordete	<i>far-1</i>	III-4:J18
Indefinido	<i>far-2</i>	III-4:J20
Indefinido	<i>far-3</i>	V-8:L21
Indefinido	<i>far-4</i>	V-8:L23
Indefinido	<i>far-5</i>	V-8:L21
Indefinido	<i>far-6</i>	IV-7:G05
Indefinido	<i>far-7</i>	II-1:K15
Indefinido	<i>far-8</i>	III-1:C14

Tabla 1: Cepas silenciadas utilizadas en los experimentos de RNAi con su correspondiente ubicación en la biblioteca de Kamath & Ahringer, 2003.

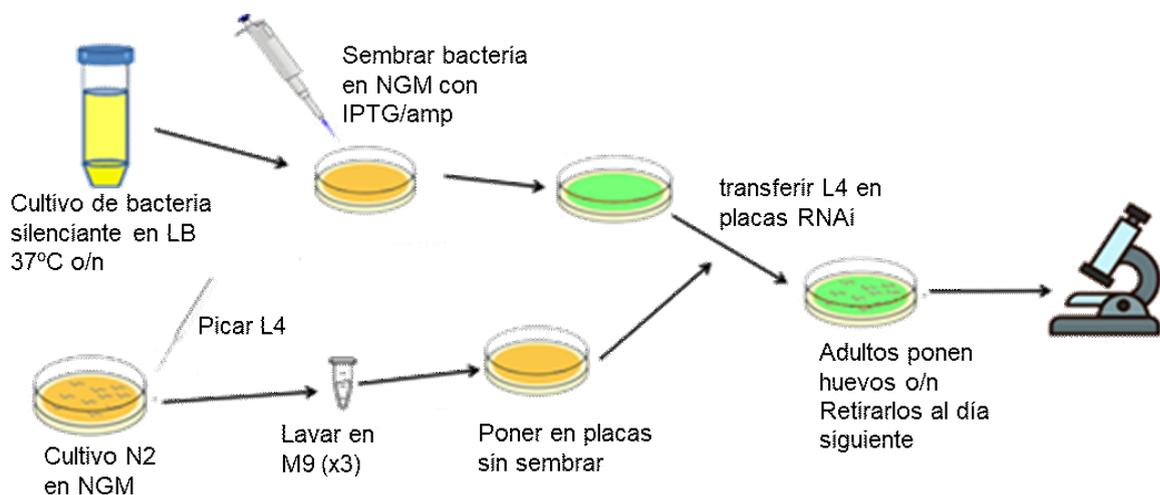


Figura 10 Esquema de protocolo de trabajo para el experimento de silenciamiento con ARNi

III.A.4 Ensayos de fertilidad

Para realizar este ensayo se utilizaron las cepas N2, FAR-2 KO, FAR-4 KO Y FAR-6 KO. Para cada una de ellas se realizó un protocolo de sincronización y se tomaron 30 larvas en estadio L4 de cada cepa y se las dividió en 3 placas de 65 mm con 10 individuos cada una.

Transcurridas las 24hs se transfirieron los adultos de esta placa (día 1) a una placa nueva (día 2), registrándose el total de gusanos transferidos. Dada la dificultad visual para contar los huevos se decidió realizar el recuento de larvas L3/L4 a las 48hs, la diferencia de tamaño entre los estadios L1/L2 presentes a las 24hs de eclosión con respecto a L3/L4 a las 48hs hace que estas últimas sean más fáciles de visualizar y por ende de contabilizar en una observación bajo lupa estereoscópica. Se terminó el experimento al quinto día de postura, dado que el período fértil promedio corresponde a 4.6 días a 20°C en NGM con OP50 como fuente de alimento (Hart, 2006).

En algunos casos pueden encontrarse menos adultos para transferir, esto puede ser por la muerte de alguno de estos o porque los mismos están en lugares inalcanzables como los bordes de la placa o bajo el agar; en estos casos se consideró el “total de adultos” de cada día solo como el número de adultos transferidos. Ninguna placa fue excluida del ensayo, ya que no se observaron adultos remanentes al día siguiente de haberlos retirado. Los adultos se transfirieron cada 24hs hasta el final del experimento.

El conteo se realizó en lupa estereoscópica (Leica M60) bajo un aumento de 25X, en forma de guarda griega. Los datos se analizaron utilizando el programa GraphPad Prism, aplicando el ensayo de Dunnett de comparaciones múltiples junto con el análisis de varianza de dos vías (2way ANOVA); tomando como grupo control a la cepa N2 y contrastando los datos obtenidos de las mutantes K.O con esta. El número total de larvas de cada grupo fue comparado por el análisis de varianza de una vía (1way-ANOVA) y el ensayo de Dunnett.

III.A.4 Ensayo de desarrollo

Los gusanos de las cepas N2, FAR-2 KO, FAR-4 KO y FAR-6 KO mantenidos en condiciones estándar fueron pasados por una solución de blanqueamiento y los huevos obtenidos fueron colocados en una placa con OP50 y crecidos a 20°C, realizándose un duplicado para cada cepa. Se realizaron cuatro experimentos, dando un total de ocho repeticiones por cepa.

Durante los siguientes 4 días se observaron las placas describiendo una guarda griega contabilizando el número de individuos, discriminando los diferentes estadíos en los cuales se encontraban.

Para analizar los datos se utilizó el programa GraphPad, se graficó la división entre el número de individuos en cada estadío y el total de gusanos contabilizados, esto fue realizado para cada día y cada cepa de forma independiente. Posteriormente se realizó un test de ANOVA, análisis de varianza, comparando entre sí las medias de cada cepa y cada estadío diferente, en forma separada para cada día; utilizando la cepa N2 como control (Hart, 2006).

III.A.5 Ensayos de longevidad

Los gusanos de las cepas N2, FAR-2 KO, FAR-4 KO Y FAR-6 KO mantenidos en condiciones estándar fueron sincronizados y las larvas L1 obtenidas fueron colocados en una placa con OP50 y crecidos a 20°C, hasta llegar al estadío L4. Luego, las larvas se repicaron a una placa nueva con OP50 y se las dejó crecer 24hs hasta el estadío de adultos. Adicionalmente, para evitar que los huevos puestos por los adultos entorpezcan el seguimiento, pudiendo estos individuos llegar adultos imposibilitando el conteo, los individuos fueron transferidos a una placa nueva cada 24hs durante los primeros cinco días, luego cada 48hs y, por último, al dejar de poner huevos se suspendió su traspaso a nuevas placas. Para determinar si un individuo estaba vivo se evaluaban tres posibles indicadores, movimiento, pulsación de la faringe o el reflejo de toque al ser tocados ligeramente con el alambre de platino; si fallaba estas examinaciones, era considerado muerto. El criterio de exclusión del ensayo fue para aquellos individuos que no podían ser contabilizados como vivos o muertos, individuos que habían excavado en el agar o individuos que murieron al ser transferidos (Collins et al., 2008). Este experimento se realizó por duplicado, logrando una población total de aproximadamente cien individuos iniciales en total. Cada día las placas eran revisadas

bajo la lupa estereoscópica Leica M60 con un aumento de 25X, contabilizando los gusanos vivos, muertos y excluidos cada día.

Los datos obtenidos fueron representados en un gráfico Kaplan-Meyer de supervivencia y analizados mediante el test Log-rank (Mantel-Cox) utilizando Graph Pad Prism (Park, Jung, & Lee, 2017).

III.A.6 Tinción con Oil red O (ORO)

Para esta técnica se siguió el protocolo establecido por Escorcia et al., 2018. En primera instancia se preparó una solución madre de ORO: 500 mg de polvo ORO en 100 mL de isopropanol 100%. La solución es guardada herméticamente cerrada y sin exposición a la luz.

Por otra parte se preparó la solución de trabajo ORO: Se diluye la solución madre de ORO en agua hasta un 60 % de isopropanol, lo que equivale a 3 partes de solución madre: 2 partes de agua. Antes de usar, es filtrada a través de un filtro de jeringa estéril de acetato de celulosa de 0,2 μm . Esta solución es preparada el día anterior a ser usada.

Para la tinción de lípidos con ORO se hicieron crecer los gusanos a 20 °C en medio NGM sembrado con *E. coli* OP50 hasta la etapa de vida deseada, en este caso adultos. Se agregaron 2 ml de solución de M9 a la placa y se pipetea para levantar a los individuos. Se transfirió la suspensión de gusanos a tubos eppendorf de 1,5 ml. Se centrifugó a 1000 x g durante 1 min. Se retiró el sobrenadante sin alterar el sedimento y se repitió el paso de lavado con 1 ml de M9 dos veces. Se retiró todo el sobrenadante excepto 100 μl .

Se agregaron 600 μL de isopropanol al 40 % al pellet de gusanos y se agitó a temperatura ambiente durante 3 min. Se centrifugaron los gusanos a 1000 x g durante 1min y se descartó todo el sobrenadante excepto 100 μL sin alterar el sedimento de gusanos.

Se agregaron 600 μL de solución de trabajo ORO a cada muestra. Se homogeneizó por inversión tres veces y se mezclaron bien con la solución de ORO. Las muestras se mantuvieron en un agitador a 30 rpm durante 2 h a temperatura ambiente.

Se centrifugaron las muestras a 1000 x g durante 1 min y se descartó todo el sobrenadante excepto 100 μL . Para eliminar el exceso de tinte ORO se resuspendieron las muestras en 600 μL de M9 y se agitaron los tubos a 30 rpm durante 30 minutos

más. Se centrifugaron las muestras a 1000 x g durante 1 min y se descartó el sobrenadante hasta 50 μ L.

Para la observación microscópica se resuspendieron los gusanos en el sobrenadante restante y se mezcló bien la solución. Se colocaron 5 μ L de suspensión de gusanos en un portaobjetos de microscopio y un cubreobjetos con cuidado, asegurándose de que no se formen burbujas de aire. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio modelo ICC50 E con un aumento total de 100X y 400X, con el software LAS EZ para realizar la captura de imágenes.

B- IN VITRO

Para la caracterización biofísica y bioquímica de proteínas se requieren muestras homogéneas y con un elevado grado de pureza. La proteína debe ser estable en el tiempo requerido para los experimentos y no formar agregados al ser concentrada. Es por esto que la producción de proteína constituyó un paso fundamental en el desarrollo del presente trabajo de tesis.

En líneas generales las proteínas FAR se sobreexpresaron en forma recombinante conteniendo cola de histidinas en el sistema *E. coli* BL21 (DE3) . Para su purificación, luego de la lisis celular por sonicatedo, se realizaron sucesivos pasos cromatográficos y se evaluó por distintos métodos la calidad de la muestra.

III.B.1 Obtención de construcciones plasmídicas

Dependiendo de la proteína de interés, se emplearon diferentes procedimientos para la obtención de stocks de glicerol de bacterias BL21 (DE3) transformadas con un plásmido que contiene la secuencia del gen que codifica para cada proteína (Sambrook, & Russell, 2001). Las secuencias utilizadas se incluyen en la sección Anexo (S1):

- La construcción y producción de proteína Na-FAR-1, sin péptido señal y con una cola de poli-histidinas adicionada para facilitar su purificación, ya había sido realizada en el trabajo de Tesis previo de la Dra. Rey-Burusco, por lo que se procedió a su expresión y purificación a partir de stocks de glicerol de bacterias con la construcción de Na-FAR-1 en el plásmido pET-11a y capaces de expresar esta proteína, siguiendo el protocolo establecido (Rey Burusco et al., 2015).
- Tomando como base la secuencia de uno de los clones de Na-FAR-1 pet11a mencionado anteriormente, se realizó una mutación sitio dirigida libre de ligasa empleando la técnica SLIM (Site-directed, Ligase-Independent Mutagenesis) para obtener una proteína Na-far-1 con una sustitución de la serina en posición 31 por un ácido aspártico. Esta técnica se detalla en la sección posterior (Chiu et al., 2004).
- La isoforma Ce-far-8 de *C. elegans* se obtuvo gracias al esfuerzo de Camila Reyes, estudiante de Bioquímica y becaria CIN de nuestro laboratorio, quien clonó exitosamente la secuencia codificante sin péptido señal obteniendo la construcción o Ce-far-8 pET-28a+ en *E. coli* BL21 (DE3).
- A partir de las secuencias publicadas en el genoma de *C. bovis* en (Stevens et al., 2020) se encargó a la empresa GenScript (Piscataway, NJ,USA) la

construcción sintética de las secuencias de ADN codificante para las proteínas FAR Cb-far-08 (Código GenBank: CAB3401232.1), Cb-far-40 (Código GenBank: CAB3410998.1) y Cb-far-41 (Código GenBank: CAB3410999.1), insertas en el vector de expresión pET28a+. Las tres isoformas fueron encargadas sin el péptido señal. Estas construcciones luego se usaron para transformar bacterias competentes BL21(DE3) y obtener así los stocks para expresar las proteínas Cb-far-08, Cb-far-40 y Cb-far-41.

Se hicieron stocks de glicerol de cada una de las bacterias transformadas obtenidas siguiendo el mismo protocolo en todos los casos. Para ello, se inoculó cada cepa en 5ml de medio LB, con antibiótico kanamicina y ampicilina según correspondiera (concentración final 50µg/ml y 100µg/ml, respectivamente), y se dejó creciendo durante la noche a 37°C con agitación. Al día siguiente se mezclaron, en un tubo eppendorf de 1,5ml, 500 µl del cultivo de la noche anterior con 50 ml de LB-glicerol al 40%; se mezcló por inversión y se guardó en el freezer a -70°C para su conservación.

III.B.2 Predicción de estructura y análisis de secuencia

A partir de las secuencias obtenidas para Ce-far-8, Cb-far-08, Cb-far-40 y Cb-far-41; se procedió a analizar las secuencias obtenidas. Para esto se empleó el programa de acceso libre SnapGene Viewer (www.snapgene.com) junto con Blast de NCBI para corroborar la identidad de las secuencias obtenidas y la ausencia del péptido señal. A su vez, a partir de estas se obtuvo la secuencia aminoacídica traducida para las proteínas Ce-FAR-8, Cb-FAR-08, Cb-FAR-40 y Cb-FAR-41 y se procedió a modelar las mismas con el programa AlphaFold 3.0 (Abramson, 2024). Este programa además permite la predicción de las estructuras plegadas de las proteínas, en presencia de diferentes ligandos; es por esto que, al tratarse de proteínas de unión a lípidos, se las modeló en presencia del ligando ácido oleico. La visualización de las predicciones y la captura de imágenes se realizó con el programa ChimeraX (Meng et al., 2023).

III.B.3 Miniprep

La obtención de ADN plasmídico se realizó a partir de cultivos de *E. coli* según el protocolo de Sambrook & Russell, 2001. Se emplearon kits comerciales Puro-Plásmido Miniprep Kit (PBL) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Se emplearon 5 ml de cultivo bacteriano fresco, crecido toda la noche a 37°C en un tubo tipo Falcon de 50 ml. Se centrifugó a 12000 x g durante 1 min y se descartó el

sobrenadante. El pellet fue homogeneizado en 250 μ l de solución 1, la cual contiene RNasa. Las soluciones 2 y 3 usadas en los pasos siguientes permiten la lisis bacteriana, la neutralización y precipitado del ADN genómico, para su separación. El ADN plasmídico se sembró a una columna de purificación, provista por el Kit de PBL. Se hicieron lavados con la solución 4 y se eluyó con 50 μ l de H₂O ultrapura, estéril. Por último se midió la absorbancia a 280 y 260 nm para evaluar su grado de pureza y se guardó a -20 °C. Alternativamente, la presencia de plásmidos con los distintos insertos se evidenció mediante una digestión con las enzimas de restricción correspondientes y electroforesis en geles de agarosa 1%.

III.B.4 Mutagénesis sitio dirigida en ausencia de ligasa (SLIM)

Con el fin de mutar la serina en posición 31 de Na-FAR-1 por un aspartato se utilizó la técnica de SLIM (Site-directed, Ligase-Independent Mutagenesis). Este es un método que utiliza una amplificación por PCR, utilizando dos pares de primers, dos largos y otros dos cortos, en una misma reacción (Chiu et al., 2004).

Se utilizó como molde una miniprep realizada a partir de un glicerol-stock de bacterias que tenían la construcción Na-far-1 - pET11a, agregando 1 μ l del mismo a la mezcla de reacción. Para dicha mezcla de reacción se utilizaron 0,5 U de Taq DNA polimerasa, 0,25 U polimerasa Q5 DNA (NEB), 0.4 μ M de cada primer, 200 μ M de cada dNTP, 1 mM de MgSO₄, 2,5 μ l de buffer Q5 y agua ultrapura para un volumen final de 25 μ l por reacción. A continuación, se detallan los parámetros usados:

Las condiciones de PCR fueron:

Hot start: 98°C por 2 minutos

Inicio: 85°C y se agrega la DNA polimerasa

30 ciclos de:

- 15 segundos a 95°C
- 20 segundos a 61°C
- 3.5 minutos a 68°C

Elongación final 7 minutos a 68°C

Se construyó un set de cuatro primers (dos cortos Sfw,Srv y dos largos Tfw,Trv). Los primers largos se diseñan conteniendo la mutación deseada en las porciones sobresalientes, es decir sobre el extremo 5' del primer (overhang). Los primers cortos son iguales a los largos a excepción del overhang. Al momento de amplificarse, las

combinaciones de primers largos y cortos (Tfw + Srv y Sfw + Trv) dan lugar a la formación de extremos cohesivos que corresponden a las regiones identificadas como overhangs y que permiten la circularización espontánea del plásmido amplificado y mutado. El producto de PCR es entonces directamente usado para la transformación de bacterias competentes, en este caso se usó la cepa *E. coli* Top 10. Luego se sembraron estas bacterias en una placa con el antibiótico ampicilina, a una concentración final en placa 100 ug/ml, para seleccionar las bacterias transformadas.

Los primers utilizados en esta técnica fueron (Los overhangs se resaltan en cursiva y el codón mutado en negrita y subrayado):

Na-far1 Tfw 5' CCTGGATGATGGCGATAAAACCGTGCTGAAAGAAGTG 3'

Na-far1 Sfw 5'CGATAAAACCGTGCTGAAAGAAGTG 3'

Na-far1 Trv 5'CCATCATGCGAGGTTCTGCAGAAAATCACGCGCTTC 3'

Na-far1 Srv 5'TTCTGCAGAAAATCACGCGCTTC 3'

La Figura 11 esquematiza el plásmido pET-11a con la secuencia para Na-far-1 inserta, los primers mencionados con su orientación y los productos obtenidos en cada paso de la técnica SLIM.

La proteína Na-far-1 que posee esta sustitución de su serina en posición 31 por un aspartato se nombra en las secciones siguientes como **S-31-D**. La calidad de las construcciones obtenidas fue evaluada enviando una muestra de plásmidos obtenidos por miniprep al servicio de secuenciación de MacroGen (Seúl, Korea del Sur). Aquellas colonias que resultaron positivas para el procedimiento fueron almacenadas y se extrajo ADN plasmídico de ellas para poder transformar bacterias de la cepa BL21 (DE3).

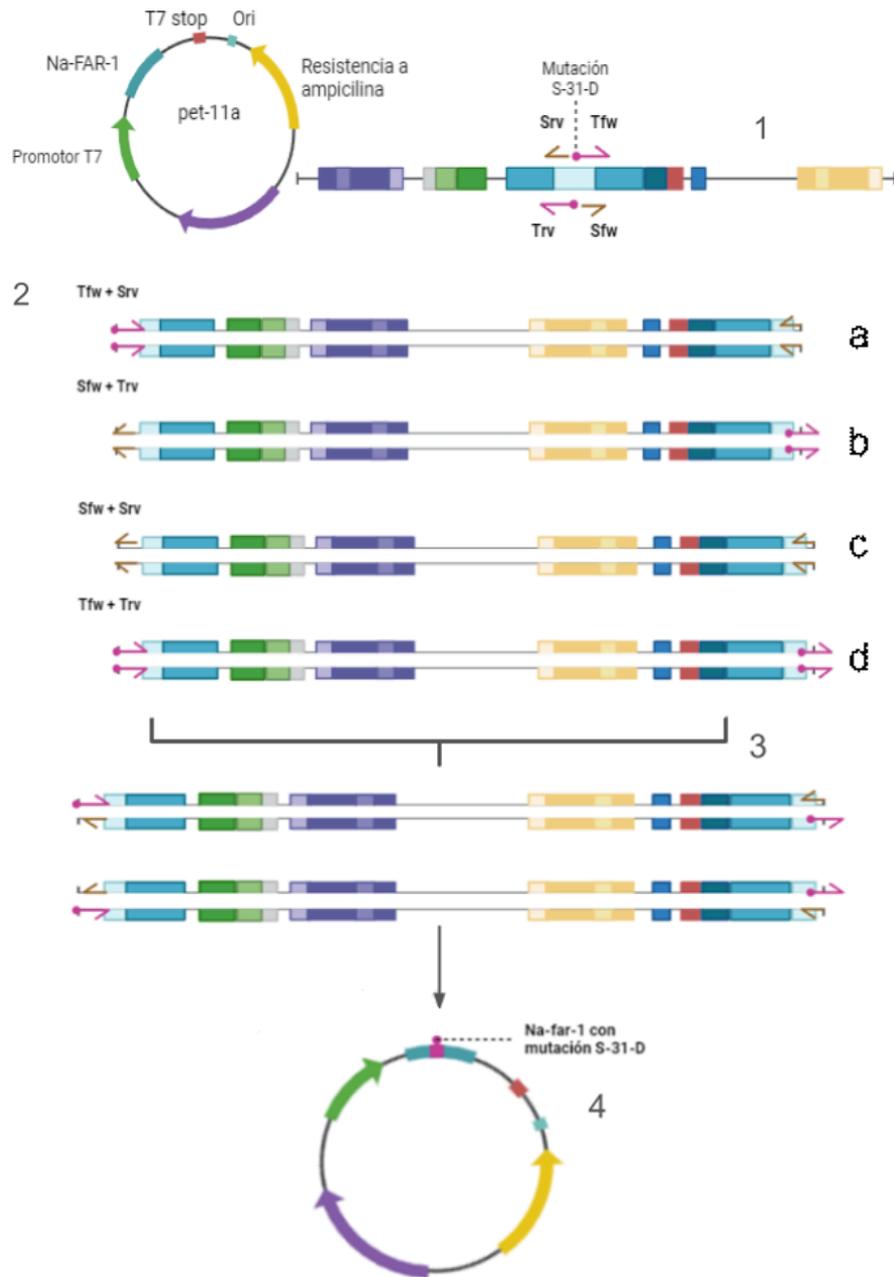


Figura 11 Técnica SLIM.

1. Los primers están representados por flechas, los primers cortos están en marrón (Sfw corto-foward y Srv corto-reverse) y los primers largos en magenta (Tfw largo-foward y Trv largo-reverse), el punto en su extremo representa la mutación puntual en la secuencia. Estos son complementarios al sitio de fosforilación en la secuencia molde de Na-far-1 inserta en el plásmido pet-11a. Estos primers van desde esta secuencia hacia el resto del primer.
2. Inserción de la secuencia. Se forman cuatro productos de PCR (a, b, c, d) a partir de las combinaciones de los primers. Estos después se combinan en un paso de desnaturalización y re-annealing para dar diferentes híbridos, de los cuales solo unos pocos son productivos.
3. Solo los híbridos doble hebra de la combinación de a y b son productivos, con extremos cohesivos capaces de recircularización espontánea.

El producto final son plásmidos recircularizados espontáneamente por la complementariedad de los extremos cohesivos formados entre los primers largos (Tfw y Trv)

III.B.5 Screening de expresión

Con el objetivo de constatar si las diferentes construcciones eran capaces de expresar las distintas proteínas se procedió a realizar ensayos en pequeña escala. A partir de colonias obtenidas en las diferentes transformaciones de *E. coli* BL-21 (DE3), se inocularon 5 ml de medio líquido LB, con kanamicina o ampicilina (concentración final 50 µg/ml kanamicina o 100 µg/ml ampicilina), dejando crecer este cultivo overnight (o/n) a 37°C con una agitación de 180 rpm. Al día siguiente, 0,5 ml de cultivo resultante se utilizó como inóculo de un medio fresco de 3 ml de LB, con el antibiótico correspondiente. Este cultivo fue crecido a 37°C con una agitación de 180 rpm. Pasada la primera hora de incubación se separó 1 ml de cultivo, como control no inducido, y se agregó IPTG (concentración final 1 mM); dejándolos crecer en las condiciones anteriores por tres horas, luego del cual se separó 1 ml de cultivo inducido. Posteriormente se obtuvo el pellet de bacterias por centrifugado a máxima velocidad por 5 minutos y se resuspendió en 30 µl de buffer de siembra. Los resultados fueron constatados por SDS-PAGE.

III.B.6 Expresión de proteínas a gran escala

Para todas las construcciones de proteínas que fueron utilizadas en esta tesis se procedió en forma similar al protocolo antes descrito. A partir de un cultivo inicial de 10 ml se inoculó un medio fresco de 1 Lt de LB (distribuidos en 5 erlenmeyers de 2 Lt) suplementados con kanamicina 50 µg/ml o ampicilina 100 µg/ml según correspondiera. Este cultivo creció a 37°C con una agitación de 180 rpm hasta que alcanzó un valor de densidad óptica a 600 nm entre 0,8 y 1,0 UA (Unidades Arbitrarias). Se indujo la expresión de la proteína mediante el agregado de IPTG (concentración final 1 mM) y se incubó en las mismas condiciones por 3 horas más. Posteriormente, el cultivo fue centrifugado durante 15 min a 4000 x g y 4°C. Las células se resuspendieron en buffer de unión (ver más adelante), 20 ml de volumen final y fueron almacenadas a -70°C hasta su posterior procesamiento.

III.B.7 Lisado de células y obtención de fracción soluble

El pellet de bacterias obtenido en el paso anterior se sometió a un lisado de células por sonicación. Se utilizó un sonicador de punta Branson con extremo chato, aplicando 7 ciclos de 1 min a potencia 4 con 1 min de descanso entre cada ciclo y un último ciclo de 2 min. La observación de pérdida de viscosidad y cambio de coloración, confirmaba un correcto sonicado. Las fracciones soluble e insoluble se separaron por centrifugación a 10000 x g por 50 min a 4 °C y el precipitado obtenido fue resuspendido en 30 ml de buffer de unión (ver más adelante) para su posterior análisis.

III.B.8 Cromatografía de Afinidad en Columna de Níquel

La fracción soluble obtenida de la centrifugación posterior al sonicado se pasó por gravedad a una columna de afinidad con resina Ni-NTA (GE Healthcare), siguiendo las indicaciones del fabricante. Los buffers, soluciones y H₂O utilizadas son previamente filtrados con filtros de acetato de celulosa de 0,22 micras.

Buffers utilizados:

- Tris - HCl (pH=7.4)
- Buffer de unión: 0,5 M NaCl - 20 mM Tris - 5 mM Imidazol
- Buffer de lavado: 0,5 M NaCl - 20 mM Tris - 25 mM Imidazol
- Buffer de elución: 0,5 M NaCl - 20 mM Tris - 250 mM Imidazol

Al pasar la muestra por la columna, queda retenida la proteína gracias a que la cola de histidinas interactúa con la resina. Luego se limpia con 10 volúmenes de columna (VC) de buffer de unión y 10 VC de buffer de lavado, para eliminar aquello que se haya unido de forma inespecífica. Todos los lavados fueron colectados en tubos limpios. Finalmente, al agregar el buffer de elución, el imidazol desplaza la interacción His-Ni y libera a la proteína. Se agregó 6 ml de buffer de elución y se colectaron fracciones en tubos eppendorf limpios cada 1 ml. En conjunto, las distintas fracciones se denominan: FT (Flow-through: no retenido luego de agregar la fracción soluble luego del sonicado de bacterias); W1 (Wash1: eluido con 10VC de Buffer de unión); W2 (Wash2: eluido con 10VC de Buffer de lavado) y E1-E6 (Fracciones eluidas con buffer de elución). Antes de continuar con la marcha de purificación, se realizó un gel SDS-PAGE 15 % para evaluar las fracciones eluidas e identificar dónde se encuentra la proteína de interés. Finalmente, las columnas se regeneran limpiándose con 10 VC de buffer de elución, 10 VC de H₂O milliQ y se guardan en EtOH 30% filtrado.

III.B.9 Cromatografía de Exclusión Molecular

Con la finalidad de eliminar contaminantes tales como moléculas pequeñas presentes en los buffers (v.g. imidazol), o proteínas de diferentes pesos moleculares que co-eluyeran con las proteínas en la columna de afinidad, se realizó una cromatografía de filtración en geles. En los casos en los que fue necesario, se concentró el volumen eluido de la cromatografía de afinidad empleando filtros concentradores Amicon 10 kDa (Millipore, Merck) mediante centrifugación a $3500 \times g$ y 4°C , hasta llegar a un volumen final de ~ 1.5 ml. Se empleó una columna Superdex 75 GL 10/300 (GE Healthcare) en un equipo de FPLC Äkta design (GE Healthcare). Se equilibró la columna con 30 ml de buffer PBS (Buffer PBS: 137 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 , 1 mM NaN_3 , pH=7,4), luego se inyectó la muestra de proteína (entre 400 y 500 μl por inyección) y se corrió a un flujo de 0,7 ml/min, hasta alcanzar 1,5 volúmenes de columna. La cromatografía se monitoreó por absorbancia UV a 280 nm y a 220 nm. Se colectaron fracciones de 0,7 ml.

III.B.10 Cromatografía en Fase Reversa (RP-HPLC)

Dado que estamos trabajando con proteínas que unen lípidos, es importante poder obtener la misma en su forma libre de ligandos hidrofóbicos. Para lograr esto se utilizó la técnica HPLC en fase reversa empleando un equipo Merck-Hitachi, con detector UV a 280 nm al cual se conectó una columna Phenomenex, Luna C8 (OOG-4249-EO, 5 μ , 250 x 4,6mm). La corrida se realizó a un flujo de 1 ml/min utilizando una fase móvil inicial de 90 % buffer A (0,1 % (v/v) ácido trifluoroacético (TFA) en agua) y 10 % buffer B (acetonitrilo, TFA 0,1 % (v/v)). Luego de sembrar la proteína se utilizaron los siguientes gradientes lineales:

- 10-30 % solvente B en 5min
- 30-70 % de B en 18 min
- 70-100 % de B en 2min
- 100 % de B por 5 min

Las distintas fracciones eluidas fueron diluidas con agua hasta llegar a una concentración de acetonitrilo compatible con los filtros Amicon mencionados anteriormente y se realizó un cambio de buffer a PBS mediante varios ciclos de dilución y concentración.

III.B.11 SDS-PAGE

Para evaluar las purificaciones realizadas se empleó la técnica de electroforesis de muestras proteicas, que se llevó a cabo empleando geles de poliacrilamida 15 % conteniendo dodecilsulfato de sodio (SDS) en condiciones reductoras, según lo descrito por Laemmli, 1970. La tinción de los geles se realiza con Coomassie Blue coloidal (Dyballa & Metzger, 2009).

III.B.12 Dicroísmo Circular (CD)

Con el objetivo de tener una primera caracterización estructural de las proteínas Ce-FAR-8 y las FARs de *C. bovis*, se midieron espectros de CD en el UV lejano con el objetivo de evaluar los componentes de estructura secundaria de la proteína y espectros en el UV cercano que son característicos de la estructura terciaria de cada una de ellas. Los espectros de CD fueron tomados en un espectropolarímetro Jasco J-810 (Jasco Corporation, Japan) (Kelly, Jess & Price, 2005).

- **Medidas en el UV lejano**

Para las determinaciones en el UV-lejano se utilizaron muestras de proteínas en PBS con una concentración de 0,1 mg/ml para cada una de ellas, en una cubeta de 0,1 cm de paso óptico. Los parámetros de medición fueron los siguientes:

$\lambda = 195-260$ nm

Intervalo de datos= 0,2 nm

Ancho de banda= 1 nm

Tiempo de integración= 1 segundo

Velocidad de lectura= 20 nm/min

Se promediaron cuatro espectros.

Temperatura= 25°C

Los espectros fueron graficados como elipticidad molar en función de la longitud de onda, expresado como grados de elipticidad por centímetro cuadrado sobre decimol ($\text{grad.cm}^2/\text{dmol}$).

- **Medidas en el UV cercano**

Para las determinaciones en el UV cercano se utilizaron muestras de proteínas en PBS que tuvieran una Abs aproximada a 0,3 UA (unidades arbitrarias), utilizando una cubeta de 1 cm. Los parámetros de medición fueron los siguientes:

$\lambda = 320-250 \text{ nm}$

Intervalo de datos= 0.2 nm

Ancho de banda= 1 nm

Tiempo de integración= 1 sec

Velocidad de lectura= 20 nm/min

Se promediaron cuatro espectros.

Temperatura= 25°C

Las proteínas fueron analizadas en su formas holo-, es decir en presencia del ligando. Se agregó un volumen suficiente de un stock diluido de ácido oleico en etanol, para lograr una relación final de 1:2 o 1:4 entre proteína y ligando.

III.B.13 Espectroscopia de Fluorescencia

- **Ensayos de Unión**

Todos los experimentos se llevaron a cabo en un espectrofluorómetro Fluorolog 3 (Horiba-Jobin Yvon). Las medidas se hicieron al menos por duplicado a una temperatura de 25 °C y empleando muestras de ~2 mL en una cubeta de cuarzo. Las concentraciones de los ácidos grasos se mantuvieron por debajo de su concentración micelar crítica (CMC) y con un contenido final de etanol menor al 2 % en cubeta. Se usaron blancos en buffer PBS para corregir por dispersión Raman y basal.

Utilizando como referencia el trabajo realizado en la tesis de Rey-Burusco, 2014, se utilizaron dos estrategias diferentes para analizar la capacidad de las proteínas FAR de unir ligandos lipídicos. Estas fueron: la unión a la sonda fluorescente DAUDA (ácido 11- (dansilamino)undecanoico) y la emisión de fluorescencia intrínseca. (Kennedy 1997; Lakowicz, 1999; Jordanova et al., 2009).

En líneas generales los datos obtenidos de las medidas de fluorescencia fueron procesados utilizando los programas Microsoft Excel y GraphPad Prism 6. Se emplearon diferentes modelos de análisis de datos, los cuales están incorporados en el programa de Graphpad Prism 6.

- Titulación directa

Unión a sonda fluorescente DAUDA

La sonda DAUDA (Sigma- Aldrich) es un análogo fluorescente de ácidos grasos y ve alterado su espectro de emisión al unirse a entornos hidrofóbicos (en este caso proteínas). De esta manera se detectan los cambios en los espectros de emisión utilizando una $\lambda_{exc} = 350$ nm, y un rango de emisión de $\lambda_{em} = 380-600$ nm; de acuerdo al protocolo descrito por Prior et al., 2001. Se utilizó una concentración inicial de 1 μ M de proteína en cubeta y se realizaron agregados de 1 μ l de un stock de DAUDA 1 mM en etanol, registrándose sucesivamente los incrementos en la señal emitida. Luego de cada agregado de sonda, se dejó estabilizar la solución por al menos un minuto antes de realizar la medida del espectro.

El ensayo fue realizado por triplicado para cada proteína. Para los cálculos se consideraron los cambios de intensidad en el pico de emisión máxima a 475 nm. Además, los valores se dividieron por la señal obtenida a la máxima concentración de DAUDA (4 μ M) y se les restó el valor mínimo a concentración 0 μ M de DAUDA, para ajustar la curva entre los valores 0 y 1. Según los datos obtenidos, se empleó un modelo de regresión no lineal que provee el programa, utilizando el modelo “Unión específica con pendiente de Hill - Un sitio de unión” (E.1), correspondiente a una curva sigmoidea:

Ecuación de Hill (Ecuación E.1)

$$Y = \frac{B_{max} \times X^h}{K_d^h + X^h}$$

Y: señal de la unión específica

X: concentración de ligando

Bmax: señal máxima de unión

Kd: constante de disociación

h: pendiente de Hill (h=1)

Fluorescencia intrínseca

Se pudo seguir la fluorescencia intrínseca de estas proteínas gracias a que las mismas emiten una señal apreciable entre 290 nm y 390 nm, luego de ser excitadas a 280 nm,

correspondiente a la fluorescencia de los aminoácidos aromáticos, con un máximo a los 305 nm. En una cubeta de cuarzo 2 ml, se colocó una solución de proteína para una concentración final de 1 µM, la señal de fluorescencia en este caso es máxima. Dicha señal se ve disminuida con los agregados sucesivos de un ligando hidrofóbico. En este caso, se hicieron agregados de a 1µl de una solución de ácido oleico (stock: 1 mM en EtOH), lo que permite realizar un cálculo directo de la constante de disociación para la unión de este ligando.

Estas medidas se realizaron por triplicado para Na-FAR-1 y para S-31-D. Para analizar los datos se tomó la señal obtenida a 305 nm, se le restó el blanco realizado con PBS, se los dividió por el máximo de señal (concentración 0 µM de ácido oleico), se hizo la inversa de estos y se restó el mínimo. Luego, para el cálculo de la constante de disociación se ajustó el modelo de “unión específica con un sitio de unión” con la siguiente ecuación:

Ecuación de Unión Específica - Un sitio de unión (Ecuación E.2)

$$Y = \frac{B_{max} \times X}{K + X}$$

Y: señal de la unión específica

X: concentración de ligando

Bmax: señal máxima de unión

Kd: constante de disociación

- Ensayo de desplazamiento

Para los ensayos de desplazamiento, se partió de un máximo correspondiente a una concentración saturante de DAUDA (10 µM) sobre 1 µM de proteína. Se detectan los cambios en los espectros de emisión utilizando una $\lambda_{exc} = 350$ nm, y un rango de emisión de $\lambda_{em} = 380-600$ nm. El equilibrio establecido fue desplazado con agregados sucesivos a razón de 1 µl de una solución 1 mM del ácido graso insaturado oleico (18:1 $\Delta 9$) (AO) diluido en etanol y se monitorearon los cambios en el espectro inicial. Cada agregado era incubado por 2 minutos a temperatura ambiente.

Este experimento se realizó por duplicado. Se registraron los cambios en el pico de emisión máxima a 475 nm. A estos valores se les restó el valor mínimo a concentración

0 μM de DAUDA y fueron divididos por la señal obtenida a la máxima concentración de DAUDA (4 μM), para ajustar los datos entre los valores 0 y 1. Se empleó un ajuste del modelo “Unión competitiva con ajuste de cuadrados mínimos” para el cálculo de las constantes de disociación, utilizando la siguiente ecuación:

Ecuación de Unión competitiva (Ecuación E.3)

$$Y = \frac{F_{res} \times F_0}{1 + \frac{X}{K_{dapp}}}$$

Y: señal de la unión específica

X: concentración de ligando

F_{res}: es la intensidad de fluorescencia residual, es decir, la intensidad de fluorescencia cuando la concentración del ligando no fluorescente es infinitamente alta, lo que da cuenta de cuánta sonda remanente sigue estando unida a la proteína.

F₀: es la intensidad de fluorescencia basal, medida en ausencia completa del ligando no fluorescente.

K_{dapp}: Es la constante de disociación aparente. Indica la concentración de ligando en la que la mitad de los sitios de unión del receptor están ocupados por el ligando no fluorescente. En otras palabras, es una medida de la afinidad aparente del ligando no fluorescente para su receptor en condiciones competitivas.

● Monitoreo de desnaturalización por fluorescencia

Con el objetivo de conocer la estabilidad de las proteínas en solución se realizaron ensayos de desnaturalización por agentes químicos de acuerdo a Franchini et al. 2009. Para ello, se preparó una batería de tubos con 200 μl volumen final en los cuales se mantuvo una concentración fija de proteína (3 μM) y concentraciones crecientes de agente desnaturalizante (0 a 9 M final urea o 0 a 6 M Guanidinio (Gdn.HCl)) en buffer PBS. Luego de al menos una hora de incubación a temperatura ambiente, se monitoreó la variación en la emisión fluorescencia intrínseca de la proteína en estudio, similar a lo presentado en la sección 4.B.13.

Es necesario aclarar que para evaluar las proteínas Ce-FAR-8 y Cb-FAR-08 se excitó la muestra a 295 nm y se colectaron datos en el rango 310-410 nm, siguiendo la emisión del grupo aromático del triptofano. Ante la exposición de este aminoácido frente a

concentraciones crecientes de desnaturalizante, se espera que la intensidad de fluorescencia disminuya y ocurra un corrimiento del máximo de emisión hacia la región rojo del espectro. Como las proteínas Cb-FAR-40 y Cb-FAR-41 carecen de este aminoácido, en su lugar se excitó a 280 nm y se colectaron datos de 300 nm a 400 nm, siguiendo la disminución de señal de emisión de las tirosinas presentes en la proteína. Se utilizó una curva control de urea o guanidinio sin proteína como línea de base.

Se utilizó el programa Excel de Microsoft, se graficó la intensidad total obtenida para cada condición, corregida por la curva control antes mencionada. Para el análisis de datos se siguió el cambio en la intensidad de fluorescencia en el máximo de cada proteína (336 nm para Ce-FAR-8 y Cb-FAR-08 y 305 nm para Cb-FAR-40 y Cb-FAR-41). Luego, se realizó un ajuste no lineal de acuerdo a un modelo de dos estados de acuerdo a Santoro & Bolen, 1988, utilizando la herramienta solver de Excel y obteniéndose así una concentración media (C_m), que es la concentración a la cual la mitad de la fracción total de proteína se encuentra desplegada.

Adicionalmente se calculó el centro de masa de los espectros correspondientes a la mayor concentración de desnaturalizante (6 M Guanidinio) y la proteína en ausencia del agente (0 M Guanidinio). Este parámetro es un promedio pesado de las intensidades a las distintas longitudes de onda por lo cual puede dar cuenta de corrimientos en los espectros de fluorescencia y la existencia de un estado mayoritariamente plegado de la proteína o un estado mayoritariamente desplegado. Adicionalmente, este dato puede luego utilizarse como una medida de control de calidad de la muestra ya que es un parámetro que contempla de manera integral los espectros. Para calcular el centro de masa de cada estado para cada proteína se utilizó la siguiente ecuación:

Ecuación de centro de masa (Ecuación E.4)

$$\nu_{cm} = \frac{\int \nu \cdot I(\nu) \cdot \delta\nu}{\int I(\nu) \cdot \delta\nu}$$

ν es la inversa de la longitud de onda

ν_{cm} es el centro de masa

$I(\nu)$ es la intensidad de fluorescencia a la ν dada

$\delta\nu$ es el diferencial de ν .

III.B.14 Extracción de lípidos

Con el objetivo de aislar y describir los posibles lípidos unidos a las proteínas se realizó una extracción de lípidos basada en su solubilidad en solventes orgánicos. En primer lugar, los lípidos se solubilizaron en una mezcla de solventes. Luego, mediante la utilización de un sistema de partición y posterior centrifugación, se separaron de otros compuestos. Como se describió anteriormente, se procedió a purificar las proteínas Cb-FAR-08, Cb-FAR-40, Cb-FAR-41, aplicando los pasos de cromatografía de afinidad y cromatografía de exclusión molecular, pero sin incluir en este caso la deslipidización por HPLC. Se extrajeron lípidos de disoluciones de proteína en PBS con una concentración 150 μ M y como control de contaminantes lipídicos en las soluciones empleadas, se extrajo igual volumen a partir de buffer PBS en paralelo. Para la extracción de lípidos se siguió la metodología descrita por Folch (Folch, Lees & Sloane Stanley, 1957) y modificada por (Obal, et al. 2012). 500 μ l de cada muestra se mezclaron con 3,5 ml de solución 2:1 de CHCl_3 : CH_3OH (dos partes cloroformo y una parte metanol), se agitó en vórtex y se dejaron durante toda la noche a -20°C . El sistema de solventes resultante asegura una buena extracción debido a que es lo suficientemente apolar como para que los lípidos se disuelvan en el mismo y, al mismo tiempo, tan polar y con la fuerza iónica necesaria como para vencer las fuertes fuerzas de asociación entre los lípidos y otros constituyentes celulares como las proteínas. Se logró la separación de fases por centrifugación a 1000 x g durante 15 min. La fase acuosa se descartó y la fase orgánica inferior que contiene los lípidos se secó mediante Speed-Vac, centrifugando en vacío. Las fracciones lipídicas se redisolviéron todas en 100 μ l de CHCl_3 y se almacenó a -20°C bajo atmósfera de N_2 hasta su análisis.

III.B.15 Cromatografía en Capa Fina (TLC)

El análisis de separación de los componentes lipídicos unidos a las proteínas Cb-FARs se realizó mediante cromatografía en capa fina (TLC, del inglés thin layer chromatography) que se basa en la propiedad física de adsorción/partición. Los lípidos se aplican sobre un gel de sílice que forma una fina capa (fase estacionaria) sobre un soporte sólido. La mezcla de solventes (fase móvil) se desplaza sobre la sílice por capilaridad, arrastrando los lípidos. Los grupos polares de los lípidos interactúan con la fase estacionaria y favorecen su retención mientras que las cadenas hidrofóbicas favorecen su solubilización y arrastre por la fase móvil. De esta manera, empleando una composición adecuada en la fase móvil, se logra una separación de los lípidos que se habrán desplazado de forma diferencial respondiendo a su partición entre ambas fases.

Las muestras estudiadas provienen de la extracción de lípidos realizada a proteínas purificadas Ce-FAR-8, Cb-FAR-08, Cb-FAR-40, Cb-FAR-41, controles y estándares. Todo fue sembrado manualmente con jeringa Hamilton en placas de TLC de Silica Gel de 20 x 20 cm previamente activadas a 100°C por 30 min. Se emplearon en la corrida condiciones de doble desarrollo que permitieron separar las diferentes clases de lípidos, siguiendo la metodología y sistema de solventes descrito por (Obal et al., 2012). Para la resolución de lípidos polares (PL) se empleó una fase móvil con la siguiente composición: acetato de metilo / isopropanol / cloroformo / metanol / 0.25% KCl (25:25:25:10:9, v/v/v/v/v). Para la separación de lípidos neutros (NL), el sistema de solventes empleado fue: hexano / dietil-éter / ácido acético (80:20:1, v/v/v). Las bandas de lípidos se visualizaron por pulverización de las placas con CuSO_4 8% (m/v) en solución acuosa de H_3PO_4 10% (v/v) y calentamiento a 140°C. La identificación de los componentes lipídicos se llevó a cabo mediante la comparación con patrones sembrados en la misma placa. Todo el procedimiento se realizó por duplicado.

En la corrida se incluyeron los siguientes controles: Extracción en blanco que sirve para verificar la ausencia de lípidos en los reactivos y solventes empleados (Ctr); muestra de una proteína que no une lípidos expresada y purificada del mismo sistema bacteriano de *E. coli* BL21; muestra de una extracción realizada al cultivo de *E. coli* BL21 sin transformar donde quedará evidenciado el entorno lipídico y controles de lípidos comerciales como ácido oleico (AO) y una mezcla de Fosfatidilcolina (PC) y Fosfatidiletanolamina (PE).

III.B.16 Dot Blot Lipídico

Para este ensayo se emplearon diferentes stocks de lípidos, todos en una concentración de 1 mM. Como ácido graso libre se utilizó ácido oleico en etanol y como fosfolípidos se utilizaron fosfatidilcolina, fosfatidilserina y cardiolipina en cloroformo. Sobre una membrana recortada de PVDF se dibujó un punto de siembra y se procedió a sembrar 1 nmol de lípido por cada punto. Cada siembra se realizó por triplicado y con una separación de 1 cm entre ellas. La siembra se realizó con jeringa Hamilton, dejando caer el volumen apropiado de acuerdo a las diferentes concentraciones de los stocks y se dejó secar.

A continuación se bloqueó la membrana con una solución de albúmina libre de ácidos grasos y 5 % leche, dejándose agitar por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se hicieron tres lavados sucesivos con PBS, por 10 minutos cada uno, y se incubó la membrana con una solución de la proteína a estudiar (Na-FAR-1 o S-31-D)

30 nM preparado en PBS-BSA 1%, por una hora a temperatura ambiente. Es importante notar que la albumina utilizada era libre de ácidos grasos (SIGMA). Luego se hizo un segundo paso de lavado, nuevamente tres veces con PBS 10 minutos cada uno, se incubó la membrana con un anticuerpo α -Na-far-1 (dilución 1/10000 en PBS-BSA 1%), por una hora temperatura ambiente. Seguidamente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS, y se incubaron las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos α -IgG de conejo, conjugado a peroxidasa (Sigma Aldrich), diluido en PBS-BSA 1%. Finalmente, luego de hacer 3 lavados de 10 minutos cada uno con buffer PBS, se agregó el sustrato comercial SuperSignal West/Pico Thermo Fischer Scientific y se revelaron las membranas con el equipo Chemidoc (Bio-Rad) (Munnik & Wierzchowiecka, 2013).

IV. RESULTADOS

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis. Al igual que el capítulo anterior, Materiales y Métodos, este está subdividido en dos secciones, *In Vivo* e *In Vitro*, para facilitar su lectura. La sección *In Vivo* incluye los resultados de los experimentos de desarrollo, fertilidad y longevidad realizados con cepas mutantes de *C. elegans* knock out para los genes *Ce-far-2*, *Ce-far-4* y *Ce-far-6*, el silenciamiento de gusanos con ARNi y por último las tinciones de los mutantes knock out con Oil Red O, para evaluar las reservas lipídicas de estos. En la sección *In Vitro* se muestran, por un lado la obtención de Na-FAR-1 y la proteína mutante S-31-D que simula el estado fosforilado de esta, junto con los ensayos de fluorescencia y dot blot lipídico que las caracterizan; y por el otro, la obtención, purificación y caracterización por emisión de fluorescencia, CD y TLC de Ce-FAR-8 junto a las proteínas FAR provenientes de *C. bovis*. Además, cada sección posee un apartado de discusión parcial, donde se evalúan los resultados obtenidos y estas luego aportarán a la discusión final del trabajo.

A- IN VIVO

IV.A.1 Desarrollo, fertilidad y longevidad

El envejecimiento es un proceso natural común a los organismos vivos, que implica el deterioro de los órganos en cuanto a su morfología y función. *C. elegans* ha resultado un modelo adecuado para el estudio de estos procesos por su “esperanza de vida” relativamente corta de aproximadamente 15 días. Existe un profundo entendimiento de los cambios que sufren los individuos de esta especie en el tiempo además de ser fáciles de estudiar y manipular genéticamente (Collins et al. 2007).

Como se comentó anteriormente, en el estadio L4 comienzan a producirse los espermatozoides que serán almacenados en la spermateca y resultan factor limitante para la correcta producción de huevos viables en los adultos (Scharf et al., 2021). En 65 hs este nematode alcanza la madurez sexual y comienza la postura de huevos, pasando por una alta capacidad reproductiva al principio, con un marcado aumento en la cantidad de huevos puestos al segundo día de adulto, seguida por un declive característico en los días posteriores, acompañado del envejecimiento de su sistema reproductor, cesando entre los días 6 – 9 de adulto, como se ve en la Figura 12. Según estudios realizados por Klass 1977 y Croll 1977, el pico y declive en la postura de

huevos fertilizados corresponde a una depleción del espermatozoides disponible en la “autofecundación” o “selfing”. En los hermafroditas, parte del proceso de maduración sexual implica que las primeras 300 células de la línea germinal se diferencian a espermatozoides, mientras que el resto lo hará a oocitos. La maduración de estos oocitos comienza en la línea germinal, ubicada al final de los brazos de la gónada, sufriendo varios procesos de desarrollo, división celular y apoptosis. Esta maduración es activada por señales producidas por los espermatozoides, que propician la supervivencia y meiosis de los oocitos. Una vez en la espermateca los oocitos son fertilizados, el embrión formado pasa por el útero y es expulsado a través de la vulva, gracias a señales nerviosas que provocan la contracción de los músculos asociados. Como consecuencia, la producción de progenie viable está limitada por el número de espermatozoides disponibles para autofecundarse (Scharf et al., 2021).

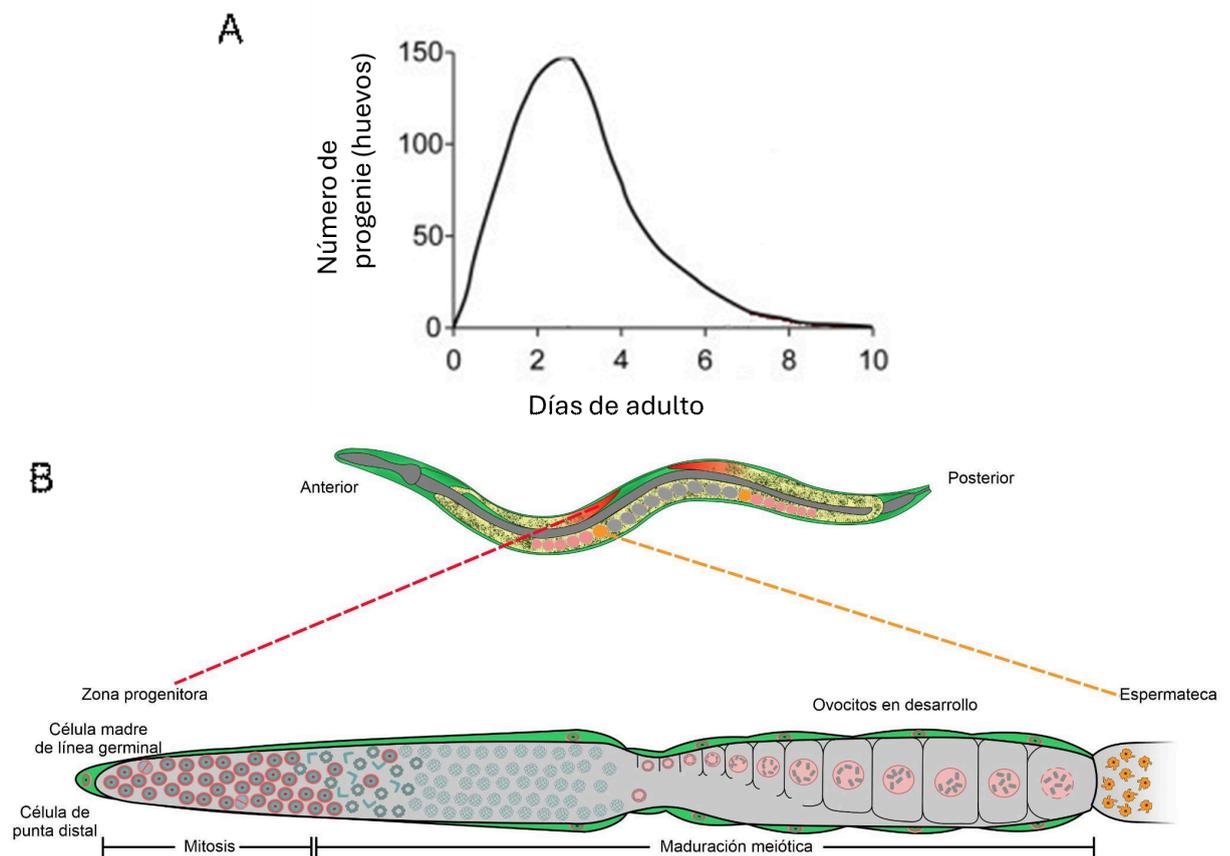


Figura 12: Envejecimiento reproductivo. Imágenes modificadas de Scharf et al. 2021 A) Curva de número de progenie por día, para *C. elegans*; B) Anatomía de gónada de un adulto de *C. elegans*. Desde la zona progenitora en rojo hasta la espermateca en amarillo. Se ven el pasaje de las células germinales hasta oocitos maduros.

● Ensayo de Fertilidad

Los resultados que se muestran a continuación, representan la cantidad de huevos que eclosionan por puesta, reflejando la fertilidad que presentan gusanos adultos para cada una de las cepas estudiadas y utilizando la cepa N2 como control. En la Figura 13 se puede observar gráficamente la tendencia del número de larvas eclosionadas por día, por adulto.

En primera instancia, todas las cepas se desarrollaron de acuerdo a lo esperado, con un aumento en el número de larvas eclosionadas en el día 2 de adulto y una disminución luego del día 3, como fue descrito anteriormente (Fig. 12). En los días 1, 3 y 5 no se vieron diferencias significativas en la fertilidad entre las diferentes cepas. Además, al finalizar el experimento, el número total de larvas puestas, calculado como la sumatoria de progenie de cada día, se mantuvo entre las diferentes condiciones y sin diferencias significativas, como puede verse en la Figura 14.

Sin embargo, en el día 2, las cepas *Ce-far-4* KO y *Ce-far-6* KO vieron reducida significativamente su capacidad de dejar descendencia; pero al día 4 estas mostraron un aumento en su fertilidad. Este efecto para las cepas *Ce-far-4* KO y *Ce-far-6* KO demuestra un cambio en la dinámica de postura, dado que hay una disminución en la altura del pico al segundo día de adultos y un aumento en el cuarto día con respecto a la cepa N2, teniendo en cuenta los tiempos evaluados en este experimento. La cepa *Ce-far-2* KO tuvo un comportamiento similar al de la cepa control N2.

El análisis estadístico aplicado fue el ensayo de Dunnett de comparaciones múltiples junto con el análisis de varianza de dos vías (2way ANOVA); tomando como grupo control a la cepa N2 y contrastando los datos obtenidos de las mutantes KO con esta. El número total de larvas de cada grupo fue comparado por el análisis de varianza de una vía (1way-ANOVA) y el ensayo de Dunnett.

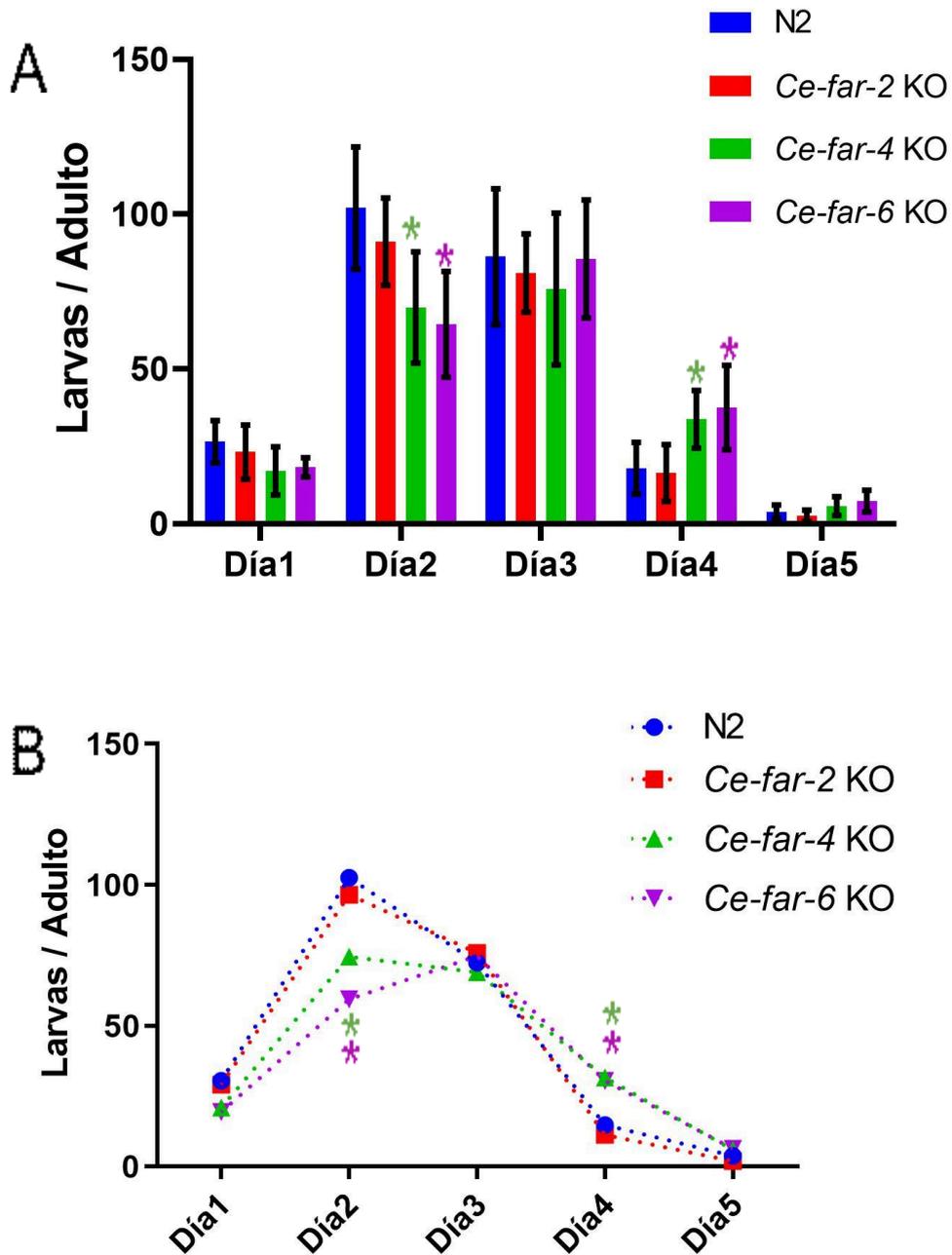


Figura 13 Ensayo de Fertilidad. Se grafica la fracción de progenie por cantidad de adultos por día. En Azul se muestra la cepa N2 que se utiliza como control, luego los mutantes KO para Ce-far-2 en rojo, para Ce-far-4 en verde y para Ce-far-6 en violeta. Los asteriscos indican diferencias significativas comparando con el control N2, donde se puede apreciar la disminución en la postura de huevos para los mutantes KO para Ce-far-4 y Ce-far-6 en el segundo día y su mayor postura al cuarto día, comparando con el control N2. Los mutantes KO para Ce-far-2 tuvieron un comportamiento similar al control. Los datos significativamente diferentes se destacan con asteriscos (Valor $P < 0.0001$). El experimento se realizó por triplicado, con 30 individuos iniciales por cada condición en cada experimento.

A) Representación de los resultados en forma de barra, con sus respectivas barras de error, correspondientes a la desviación estándar; B) Curva de fertilidad, donde los puntos representan la media de los datos, mientras que la línea punteada sería una proyección de lo ocurrido entre los diferentes días, lo que facilita su comparación con lo esperado.

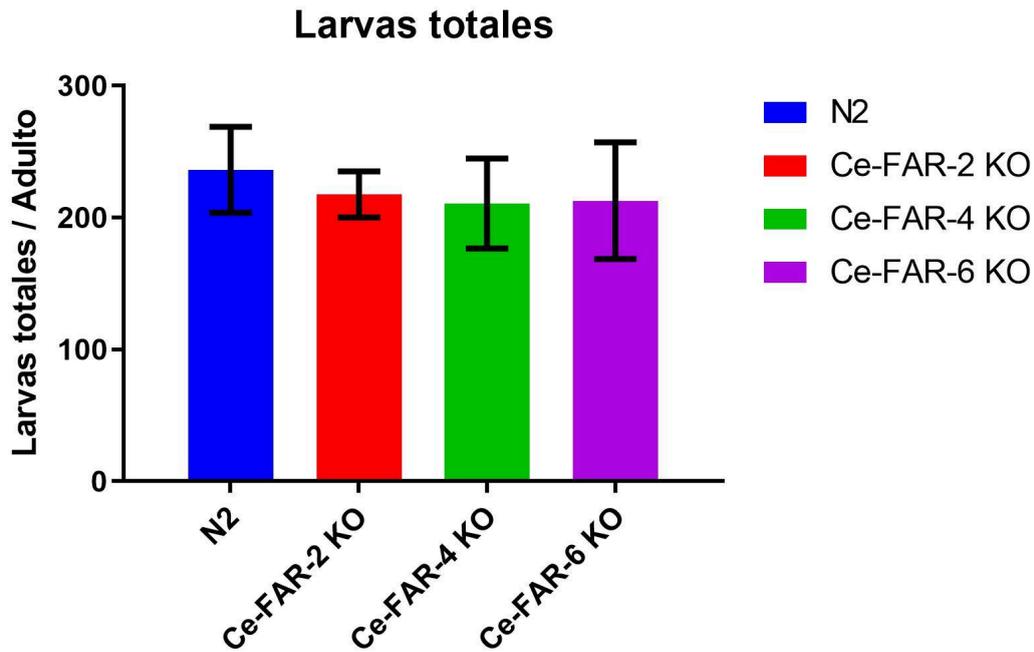


Figura 14 Total de progenie. Se grafica en forma de barras, la sumatoria total de larvas puestas por los adultos durante los cinco días que duró el experimento. Las barras se grafican con su desviación estándar. En Azul se muestra la cepa N2 que se utiliza como control, luego los mutantes KO para Ce-far-2 en rojo, para Ce-far-4 en verde y para Ce-far-6 en violeta. No hubo diferencias en el total de progenie producida entre todas las cepas, comparando con el control N2.

- **Ensayo de desarrollo**

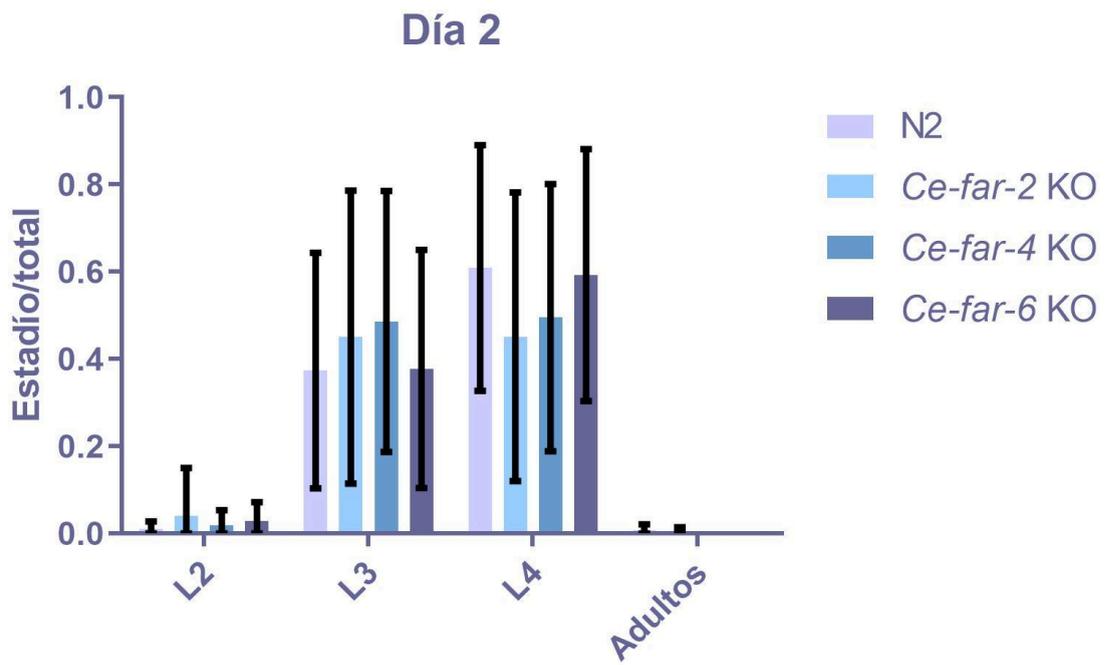
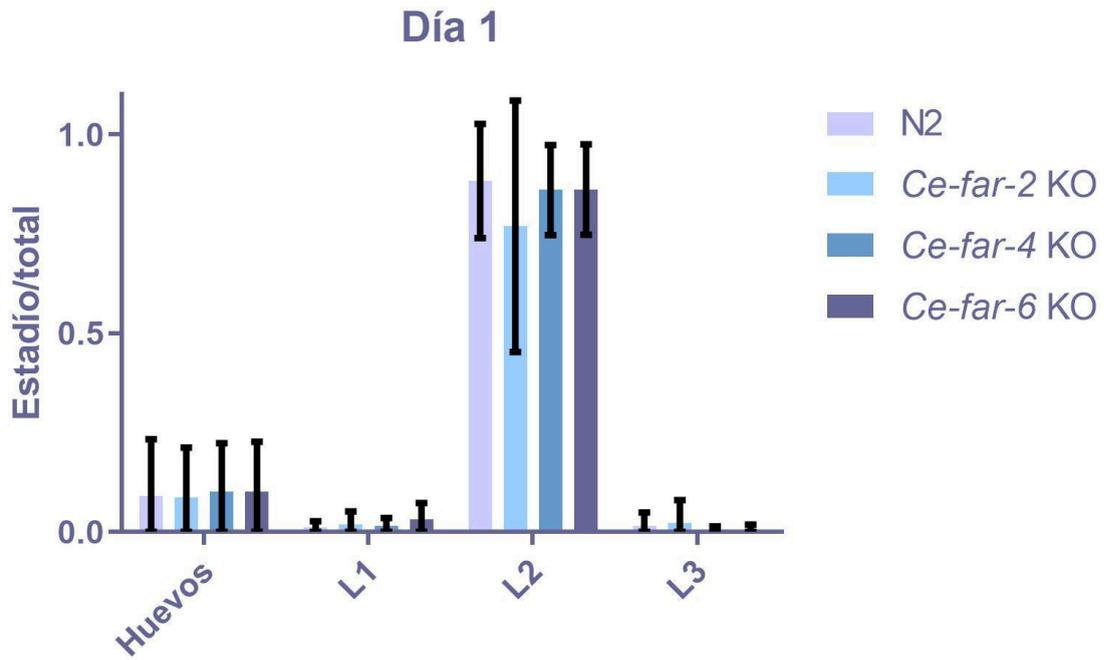
Al igual que en el ensayo anterior se trabajó con poblaciones sincronizadas, siendo el día 0 el día que eclosionan las larvas L1, aunque puede haber huevos que no eclosionan, lo cuales son excluidos del experimento luego de contabilizarlos en el día 1. A partir de ese punto se identificaron y contabilizaron diariamente los individuos de cada estadio para las diferentes cepas estudiadas, hasta que estos llegaron al estadio adulto. Este experimento se repitió cuatro veces y en cada oportunidad se hizo un duplicado biológico con dos placas. El recuento de cada estadio se hizo por triplicado, estos valores se promediaron y se relativizaron al total de gusanos contados por día, dividiendo el número de individuos de cada estadio por cepa por el total.

En la Figura 15 se muestra el número relativo de gusanos de cada cepa, en los diferentes estadios para cada uno de los cuatro días de experimentos. Al realizar el análisis de los datos presentados, no se vieron diferencias significativas en la proporción de cada estadio entre las cepas N2 y las cepas knock out para *Ce-far-2* y *Ce-far-6*, y la cepa control N2. La cepa *Ce-far-4* knock out no presentó diferencias en el

primer y segundo día de desarrollo pero sí una proporción diferente de adultos al tercer día. Además, todos los individuos llegaron al estadio adulto al cuarto día.

En el tercer día, al realizar el test de Dunnett para la cepa *Ce-far-4* knock out, esta arrojó una diferencia estadísticamente significativa para la población de adultos, en la cual la cepa mutante tenía aproximadamente un 23% menos individuos que la cepa N2. Si bien este fue el único dato que presentó diferencias con el control de la cepa N2, como los valores son proporciones del total, al estar disminuída la proporción de adultos de los mutantes *Far-4-KO*, es esperable que otra parte de la población de dicha cepa estuviera aumentada. En este caso la proporción de población que podría estar aumentada es la correspondiente a gusanos en estadio L4, dado que es la segunda más abundante y su diferencia con la media de la población control muestra una tendencia a estar aumentada, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. Es por esto que podría decirse que los individuos mutantes *Ce-far4* knock out ven enlentecido su desarrollo en el tercer día, que es el pasaje de L4 al estadio adulto.

Como se mencionó anteriormente, en el día 1 se puede apreciar que hay una fracción que corresponde a huevos no eclosionados. Para simplificar la interpretación de los resultados, se graficaron los estadios contabilizados y se excluyeron los huevos no eclosionados contados en el día 1. Todos los individuos que fueron contabilizados completaron su desarrollo hasta el estadio adulto.



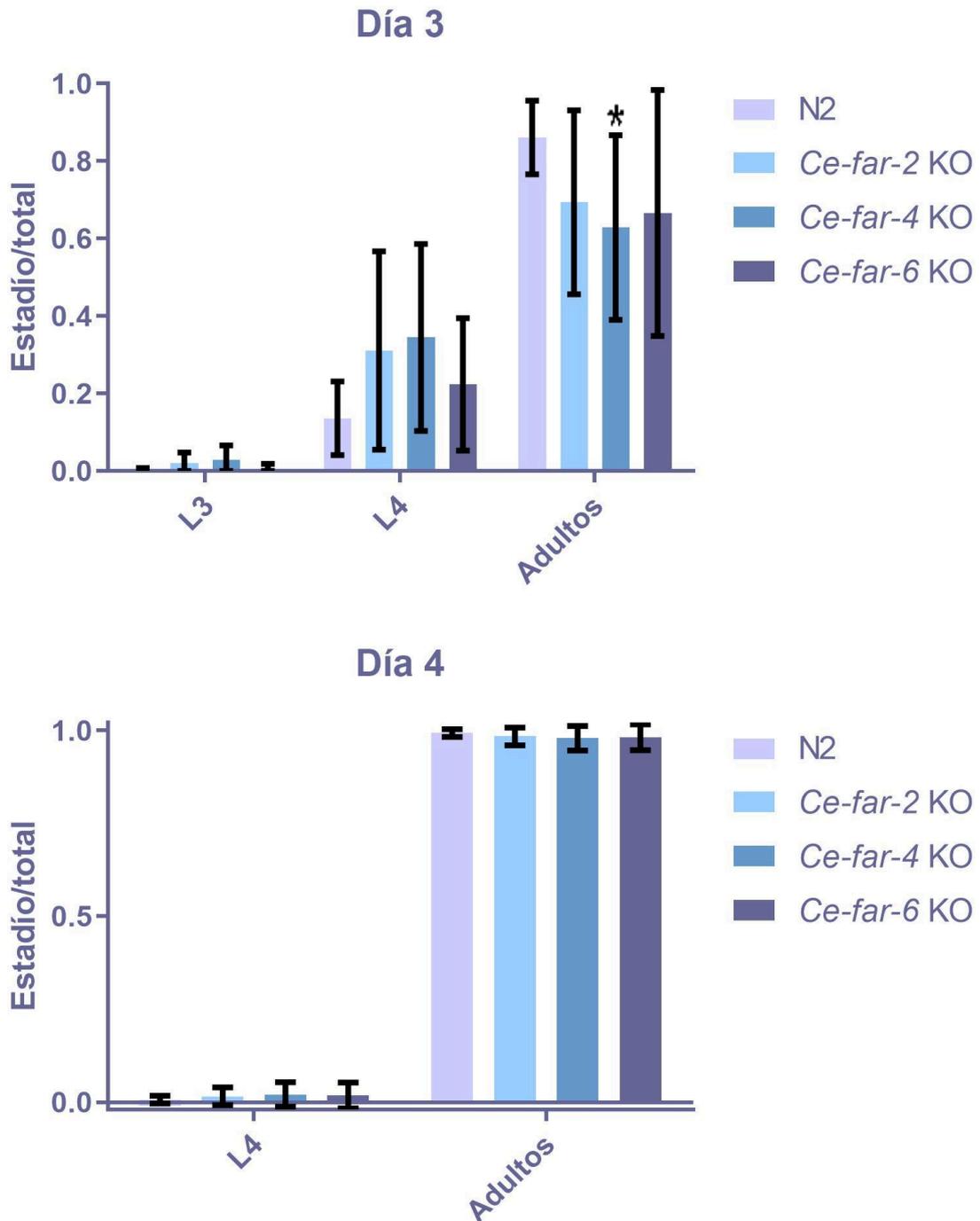


Figura 15 Ensayo de desarrollo. En estas imágenes se grafican en los días 1, 2, 3 y 4, la fracción de los diferentes estadios (huevos, larva 1 L1, larva 2 L2, larva 3 L3, larva 4 L4, adulto) contabilizados por el total de individuos contados, junto con sus barras de error, que indican la desviación estandar. se representan el control N2, y los mutantes KO para Ce-far-2, Ce-far-4 y Ce-far-6. Los datos se analizaron utilizando el programa GraphPad Prism, aplicando el ensayo de Dunnett de comparaciones múltiples junto con el análisis de varianza ANOVA en dos vías). Las diferencias significativas (Valor $p < 0.044$) entre las cepas mutantes y el grupo control N2 se indican con un asterisco. Este experimento se realizó por cuadruplicado, con un número aproximado de entre 60 y 100 gusanos iniciales para cada condición.

● Ensayo de longevidad

Con el objetivo de evidenciar diferencias en la esperanza de vida entre individuos de la cepa salvaje y cepas mutantes que no expresan las proteínas Ce-far-2, Ce-far-4 o Ce-far-6, partiendo de un cultivo sincronizado, se procedió a contabilizar los días de vida a partir de individuos en estadio adulto. Cada día se transfirieron los individuos adultos a placas nuevas, contabilizando el número de sobrevivientes, lo cual evita que las siguientes generaciones interfieran con el experimento. Es importante aclarar este detalle experimental dado que no se utilizaron compuestos que inhiban la postura de huevos como el FUDR (Curran, 2020). Se excluyeron del cálculo los gusanos no transferidos, por estar bajo el agar o en las paredes de la placa y no poder ser transferidos. El experimento continuó hasta registrar la muerte del último gusano o su exclusión. Como se ve en la Figura 16, se realizó un gráfico de supervivencia en función del tiempo del tipo Kaplan Meyer para cada una de las cepas analizadas. Se realizó el análisis estadístico de los resultados mediante el test Matel-Cox, utilizando Graph Pad Prism, obteniendo una vida mediana de 18 a 20 días para las cepas Ce-far-2 KO, Ce-far-4 KO y Ce-far-6 KO. En las condiciones ensayadas no se observaron diferencias significativas en la mortalidad entre las distintas cepas.

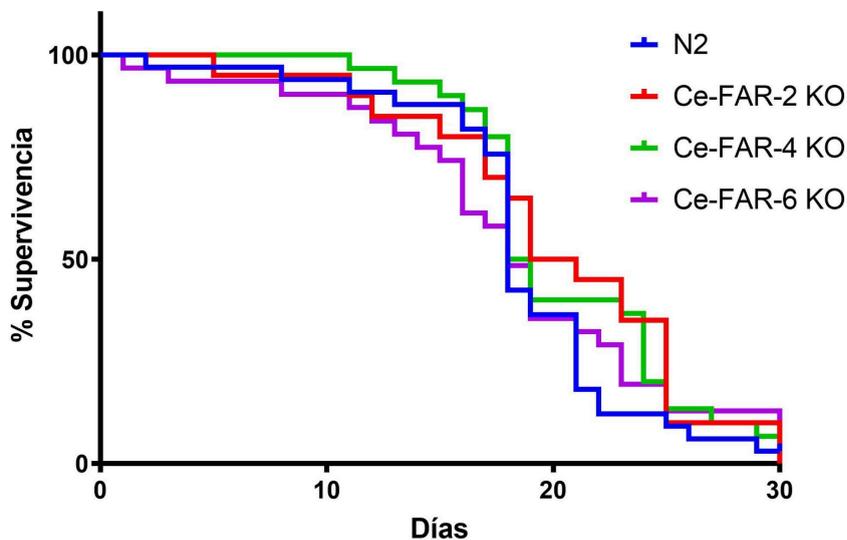


Figura 16. Ensayo de longevidad. Gráfico Kaplan Meyer del porcentaje de supervivencia versus días. Se grafican los eventos de muerte de cada individuo como el descenso de cada línea graficada; comenzando con el primer día de adulto, al día siguiente de colocar L4 en la placa y finalizando cuando no quedan individuos en la placa. Se graficaron los resultados de dos experimentos independientes, en los cuales se partió de un número inicial de aproximadamente 100 individuos. El experimento finalizó a los 30 días. En azul el control N2 y los mutantes knockout para Ce-far-2 en rojo, Ce-far-4 en verde, Ce-far-6 en Violeta. Los gusanos excluidos no se encuentran graficados. En el análisis estadístico de los resultados se obtuvo una vida mediana de 18 a 20 días para las cepas knock out Ce-far-2 KO, Ce-far-4 y Ce-far-6. La cepa control N2 tuvo una supervivencia media de 18 días. En las condiciones ensayadas no se observaron diferencias significativas en la mortalidad entre las distintas cepas.

IV.A.2 Silenciamiento de la expresión de genes far

Con el objetivo de evaluar los efectos de la disminución de la expresión de las proteínas FARs se realizaron experimentos de silenciamiento utilizando bacterias que expresaran ARNdH. Es importante destacar que existe un estudio previo de silenciamiento de estas proteínas en el trabajo de Kamath & Ahringer, 2003. En dicho trabajo se realizó un silenciamiento masivo donde lo único reportado fue que estos tratamientos no fueron letales, no provocaron defectos en la motilidad ni cambios morfológicos evidentes, excepto en el caso del silenciamiento de *Ce-far-1* para el cual se reportó un fenotipo “dumpy” o “regordete”. En este trabajo se buscó silenciar en forma individual cada isoforma y buscar, en primera instancia, defectos evidentes como cambios morfológicos, mortalidad y desarrollo.

Alimentando individuos de la cepa N2 con bacterias que expresan ARNdH específicos para cada secuencia génica, se lograron silenciar individualmente los genes *Ce-far-1*, *Ce-far-2*, *Ce-far-3*, *Ce-far-4*, *Ce-far-5*, *Ce-far-6*, *Ce-far-7* y *Ce-far-8*. Los controles utilizados fueron una cepa de bacterias con plásmido vacío L4440, es decir que no expresan dsARN, como control negativo y el silenciamiento del gen *elt-2* como control positivo, arrojando un fuerte fenotipo de arresto en estadio larval. En las condiciones ensayadas no se evidenció fenotipo alguno en el silenciamiento de *Ce-far-2*, *Ce-far-4*, *Ce-far-6*, *Ce-far-7* y *Ce-far-8*. Incluso tampoco se observó fenotipo en los experimentos de *Ce-far-1* para la cual se esperaba la aparición de un fenotipo tipo “regordete o dumpy” de acuerdo a lo reportado en Kamath & Ahringer, 2003, ver fotos en Anexo (S.2). Como puede observarse en la Figura 17, en el silenciamiento de *Ce-far-3*, los adultos parecían tener un digestivo más oscuro que el control, el cual podría deberse a un defecto en el metabolismo de lípidos, por lo que se continuó caracterizando esta condición. Con el tiempo, los adultos tendían a desarrollar “internal hatching”, condición en la cual los huevos eclosionaron dentro de los adultos y llevaban a la muerte de este; esto puede deberse a un stress de los gusanos, defectos en la vulva o falta de nutrientes (Hu, 2007). Si bien no se observaron defectos morfológicos en la vulva que puedan explicar esta retención de huevos, se requieren más experimentos para confirmar esta tendencia y buscar sus causas.

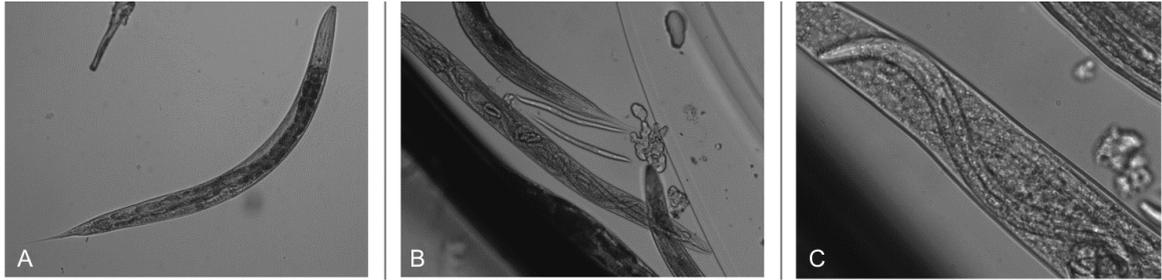


Figura 17 Silenciamiento de Ce-FAR-3 en *C. elegans* usando RNAi. A) control negativo L4440 (magnificación 40x); B) y C) Tratamiento con RNAi contra *Ce-far-3* (magnificación 40x y 100x, respectivamente).

IV.A.4 Morfología y tinción Oil red O

Para evaluar la relación entre las proteínas FARs y las reservas lipídicas de *C. elegans*, se utilizó la tinción con Oil red O de manera de evidenciar los lípidos neutros, principalmente triglicéridos de las gotas lipídicas (Wang & Ching, 2021). Esta técnica se aplicó a adultos de cultivos sincronizados para la cepa N2 y las mutantes knock-out para *Ce-far-2*, *Ce-far-4* y *Ce-far-6*. En la Figura 18 se presenta para cada cepa la imagen de un adulto sin teñir, para comparar la morfología previa a la tinción, y fotos de la tinción del mismo, representativo de lo observado en el resto. La foto individual fue tomada con un aumento 200X y luego se tomaron tres con aumento 400X; una de la porción anterior, otra de la porción media y la última de la sección posterior. La coloración rojo intensa observada corresponde a los depósitos de lípidos neutros. De forma cualitativa, no se vieron diferencias entre las distintas cepas mutantes, tanto en su morfología como en la tinción de sus depósitos lipídicos, pudiendo apreciarse en todos la morfología esperable y normal para adultos de *C. elegans* además de una tinción fuerte a ambos lados del intestino, particularmente en la zona media a la altura de la vulva y al final de la zona posterior.



N2

A



N2

B





Ce-FAR-2 KO

C



Ce-FAR-2 KO

D





Ce-FAR-4 KO

F



Ce-FAR-4 KO

G





Ce-FAR-6 KO

H



Ce-FAR-6 KO

I



Figura 18 Imágenes de adultos al microscopio con tinción Oil red O. Para todas las condiciones se muestra imágenes de adultos sin teñir y teñidos con una magnificación total de 200X y tres imágenes 400X de la porción anterior con boca faringe y comienzo del digestivo, porción media a la altura de la vulva, y porción posterior al final del digestivo. La coloración roja son las estructuras a las cuales se une el colorante y corresponden a reservas lipídicas en el gusano. Las imágenes son representativas de lo observado en los otros adultos. A) Adulto N2 B) Tinción de adulto N2 C) Adulto Ce-far-2-KO D) Tinción de adulto Ce-far-2-KO F) Adulto Ce-far-4-KO G) Tinción de adulto Ce-far-4-KO H) Adulto Ce-far-6-KO I) Tinción de adulto Ce-far-6-KO.

IV.A.5 Discusión parcial de los experimentos *in vivo*

La familia de las FARs es tan diversa como los nematodos, lo cual puede complicar su estudio y la interpretación de los resultados obtenidos en otros trabajos de investigación. Dentro de las publicaciones sobre estas proteínas pueden distinguirse grupos discretos, habiendo un claro foco en el estudio de las FARs de nematodos parásitos de plantas, luego aquellas FARs de parásitos de animales y por último, estudios sobre FARs de nematodos de vida libre. Evolutivamente, estas proteínas siguen un ordenamiento similar, ya que las FARs de parásitos de plantas parecen formar una familia estrechamente relacionada entre sí, pudiendo haberse especializado junto con la aparición del parasitismo en plantas dentro de phylum (Phani, 2017; Iberkleid, 2013).

Las FARs de parásitos de animales resultan interesantes por su implicancia en la salud y las infecciones así como por sus implicancias ecológicas y económicas en el caso de nematodos que parasitan a animales de ganadería. Sin embargo, los estudios de estas FARs son escasos, posiblemente por la carencia de un modelo experimental que reproduzca el ciclo completo de los parásitos y la dificultad de obtener ejemplares adultos o el estadio infectivo. Es por esto que el estudio de nematodos de vida libre puede resultar de interés para observar y estudiar las generalidades de las proteínas FARs e inferir sus posibles funciones. Por otro lado, el campo de estudio de proteínas FAR de los parásitos de plantas ha sido muy fructífero, gracias a la facilidad con que se pueden manipular las plantas hospedadoras, fácil infección y monitoreo, además del bajo riesgo que presentan estos nematodos para la salud humana. Varios trabajos en los que se ha realizado el silenciamiento o sobreexpresión de estas proteínas, las han asociado a funciones tales como desarrollo, fertilidad, disruptores de los sistemas de defensa y en consecuencia infectividad de los parásitos. Particularmente, se ha visto disminución en la postura de huevos y descendencia en individuos de las especies *Aphelenchoides besseyi*, *Bursaphelenchus mucronatus* y *Meloidogyne incognita*, entre otros (Prior, 2001; Zhou et al., 2016; Vieira, Kamo, & Eisenback, 2017; Phani et al., 2017; Ding et al., 2021; Parks et al., 2022). Estos hallazgos han despertado nuestro interés en evaluar parámetros similares en *C. elegans*, diseñándose experimentos para observar el desarrollo y fertilidad de las cepas mutantes knockout de *C. elegans* para los genes *Ce-far-2*, *Ce-far-4* y *Ce-far-6*.

Con respecto al análisis de los mutantes knockout de *C. elegans* no se vieron cambios en la longevidad. Con respecto a la postura de huevos, *Ce-far-2* KO se comportó como N2 presentando un pico al segundo día y un decaimiento de la actividad en los días

posteriores; mientras que los mutantes *Ce-far-4* KO y *Ce-far-6* KO tuvieron un pico menos pronunciado y pusieron más huevos que el control N2 en el cuarto día. Estos experimentos poblacionales son tediosos y largos en su realización, requiriendo un número grande de individuos y varias repeticiones para que las posibles diferencias se observen de forma significativa.

Lo observado en la postura de huevos es interesante ya que se ha reportado en FARs de parásitos de plantas, cómo el silenciamiento de estas afecta la fertilidad de los nematodos (Ding et al., 2021; Iberkleid Sela & Brown Miyara, 2015; Phani et al., 2017; Zhou et al., 2016), pudiendo ser un blanco importante para el diseño de tratamientos. Si bien no se vio un cambio en el total de huevos puestos, la frecuencia de postura es un proceso altamente regulado en *C. elegans*, determinado por las señales del medio que, ante condiciones adversas, pueden detener o retrasar la postura a la espera de condiciones más favorables (Mukhopadhyay & Tissenbaum, 2007). En las condiciones de laboratorio, la ausencia de *Ce-FAR-2* y *Ce-FAR-6* no afectaron la longevidad o desarrollo, pero nada descarta que estas proteínas funcionen en respuesta a ciertos estresores o la posibilidad de que su carencia esté siendo compensada por un aumento en la expresión de otras isoformas. Sin embargo, se vio un ligero retraso en el tercer día del desarrollo para los mutantes *Ce-far-4* KO. El pasaje de larva L4 a adulto es un punto clave en el desarrollo de la vida reproductiva de *C. elegans*, dado que durante el estadio L4 se desarrollan la vulva y la gónada, además de formarse los espermatozoides y la espermateca, procesos que culminarán luego ante el pasaje al estadio adulto (Hirsh, Oppenheim & Klass, 1976). Este estadio condice con el aumento de los niveles de ARN mensajero de *Ce-far-4* según lo reportado por Garofalo et al., 2002. Todos estos resultados se articulan con la hipótesis de que las proteínas FARs participan con la capacidad reproductiva de los nematodos, lo cual es un punto en común tanto para nematodos parásitos como para los de vida libre. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis refuerzan esta hipótesis pero no da la explicación molecular de cómo ejercen su efecto sobre el desarrollo y la reproducción.

Adicionalmente, este hallazgo puede relacionarse con lo encontrado para el silenciamiento de *Ce-far-3*, donde se observaron individuos con eclosión interna. Este es un proceso que puede ocurrir naturalmente, donde los gusanos adultos retienen los huevos y estos continúan desarrollándose en su interior. Al no observarse defectos en la morfología de la vulva, las causas de este fenómeno pueden deberse a estresores externos o a defectos en la comunicación nerviosa necesaria para la contracción de los músculos de la vulva que permiten la oviposición. Es importante mencionar que parte

del ARNdh para *Ce-far-3* se solapa con parte del gen para *Ce-far-5* y no podría descartarse un efecto superpuesto.

Por otra parte, el hecho de no observar diferencias en la tinción con Oil Red O entre los mutantes y la cepa N2 lleva a pensar que estas proteínas no alteran la capacidad de almacenar lípidos de estos gusanos, lo cual es importante no solo para su homeostasis bioenergética sino también para la formación de vitelo y nuevos huevos fértiles (Stein & Golden, 2018). Para poder afirmar que ninguna de las FARs de *C. elegans* tiene efectos en su metabolismo lipídico, haría falta el uso de otras tinciones y técnicas que permitan analizar las reservas lipídicas, así como también analizar los efectos de las FARs en otros estadios del ciclo de vida. No obstante, los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que este no es su mecanismo de acción, al menos no en las condiciones ensayadas.

Es importante remarcar que solo se observó un comportamiento diferente para la cepa knock out de *Ce-far-4* mientras que no se vieron diferencias significativas entre la cepa N2 y los mutantes knock out de *Ce-far-2* y *Ce-far-6*. Tampoco se vieron fenotipos fuertes en el silenciamiento de las FARs, excepto los resultados hallados para *Ce-far-3* y que el fenotipo “regordete” para el silenciamiento de *Ce-far-1* reportado en Kamath & Ahringer 2003 no se observó en ninguna repetición realizada. En principio, estas proteínas no tendrían efectos fuertes y evidentes en la homeostasis del *C. elegans*, por lo que sería importante hallar nuevas estrategias para su estudio, postulando nuevas hipótesis que involucren los niveles de expresión de estas proteínas y su secreción al medio. Adicionalmente, al existir diferentes isoformas, estas pueden cumplir funciones diferentes en distintas etapas del desarrollo del gusano, lo cual complejiza aún más su estudio.

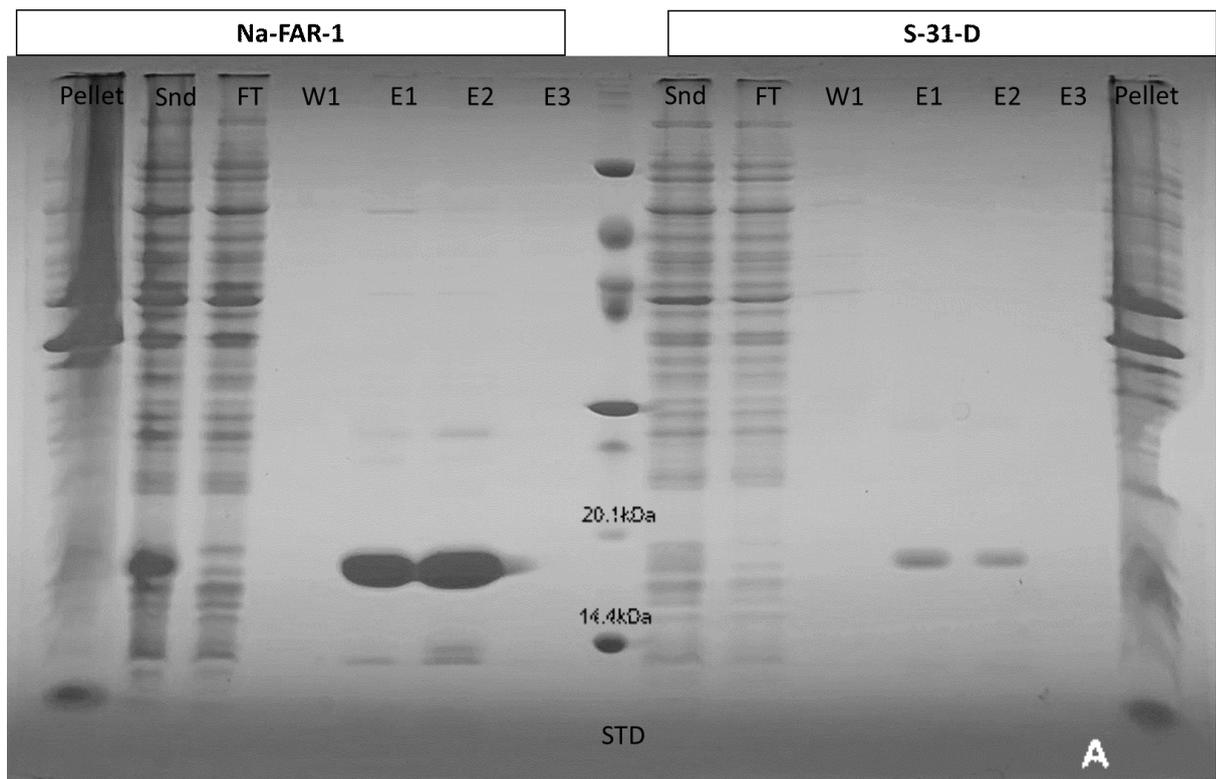
En conjunto estos resultados apoyan la hipótesis de que las FARs participan en los procesos de reproducción y comunicación con el exterior; pero estos procesos son complejos y los resultados son todavía preliminares como para concluir su mecanismo de acción molecular.

B- *IN VITRO* (Na-FAR-1 y S-31-D)

IV.B.1 Marcha de purificación de proteínas

Se logró expresar la proteína Na-FAR-1 a partir de glicerol stocks *E.coli* BL21 (ver Materiales y Métodos). Además, con el objetivo de evaluar los efectos en la interacción con ligandos que tiene la fosforilación del sitio específico de Na-FAR-1, conservado en la familia de las FARs, se realizó una mutación puntual aplicando la técnica de SLIM que provoca la sustitución de un residuo de serina en la posición 31 por un ácido aspártico, replicando lo realizado en Jordanova et al., 2009 con la proteína Ce-FAR-7.

En los geles de SDS-PAGE mostrados en las Figuras 19.A y 19.B puede apreciarse cómo la marcha de purificación empleada logró un alto grado de pureza de la muestra, acorde a lo requerido para los ensayos funcionales posteriores. Lamentablemente el rendimiento en la purificación de S-31-D fue menor comparado con Na-FAR-1.



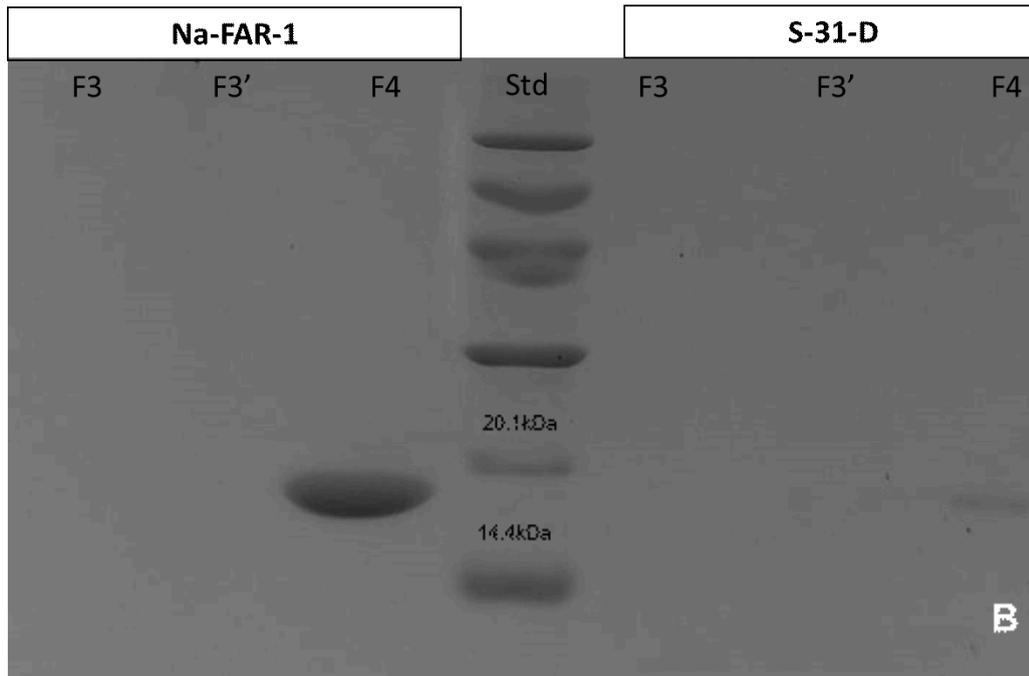


Figura 19. A) Gel SDS-PAGE de la marcha de purificación de Na-FAR-1 y S-31-D, cromatografía de afinidad. Las referencias corresponden a las fracciones colectadas a la salida de la columna; std: marcador de bajo peso molecular. Pellet: es la fracción precipitada luego del sonicado. Snd: sobrenadante; es la fracción soluble obtenida luego del sonicado. FT: es la fracción no retenida por la columna de afinidad. W1: fracción eluida luego de 10 volúmenes de columna de buffer de unión. W2: fracción eluida luego de 10 volúmenes de columna de buffer de lavado. E1-E3: fracciones eluidas con buffer de elución, donde se espera encontrar la proteína. B) Gel SDS-PAGE de la marcha de purificación de Na-FAR-1 y S-31-D, cromatografía de exclusión molecular de Na-FAR-1. La numeración F3 y F4 corresponde a los tubos que se colectaron a la salida de la columna; std: marcador de bajo peso molecular.

IV.B.2 Caracterización Funcional: Capacidad de unión a ligandos

En esta sección se detallan los experimentos realizados con el objetivo de evaluar la capacidad de unión a ligandos de la proteína Na-FAR-1 y contrastar con los resultados que se obtuvieron para la mutante S-31-D, que simula la fosforilación de su sitio específico.

En este punto es importante notar que, a diferencia de lo que ocurre con otras proteínas, medir actividad biológica *in vitro* para proteínas que unen lípidos no es una tarea sencilla. No puede medirse una actividad de la proteína como ocurre con las enzimas, donde su función se evidencia por la aparición de producto o desaparición de sustrato, ya sea en forma directa o indirecta. Es por esto que para las LBP's se requiere medir una señal que sea indicativa de la unión de estas proteínas con un ligando hidrofóbico. En consecuencia, en esta tesis se han empleado distintos enfoques para caracterizar la función de la forma más completa posible y evaluar el impacto de la mutación propuesta en las capacidades de unión.

A continuación se detallan los experimentos que permiten el cálculo de constantes de disociación mediante ensayos de fluorescencia, que son la titulación directa seguida por unión a la sonda fluorescente DAUDA, la titulación directa seguida por la fluorescencia intrínseca de la proteína, y los ensayos de desplazamiento de la sonda DAUDA ante agregados de ácido oleico. Adicionalmente, se caracterizó la interacción de estas proteínas con diferentes ligandos hidrofóbicos evidenciada con anticuerpos específicos, utilizando la técnica inmunológica de Dot Blot Lipídico.

- **Espectroscopia de Fluorescencia**

Para determinar las posibles diferencias entre Na-FAR-1 y la proteína mutada S-31-D, con respecto a su preferencia por la unión de ácidos grasos se realizaron ensayos de unión empleando el análogo de ácido graso fluorescente, DAUDA.

La incubación de ambas proteínas con DAUDA provocó un desplazamiento del máximo de emisión de esta sonda hacia el azul, posicionándolo en 480 nm, y un marcado aumento en la intensidad de fluorescencia, indicando que ambas proteínas tienen la capacidad de unir este ligando (Figura 20). Es importante notar que la sonda libre en solución acuosa presenta una emisión baja con un máximo alrededor de los 540 nm.

El agregado de una alta concentración de ácido oleico, diez veces mayor a la de la sonda (concentración final AO= 10 μ M), desplazó la interacción con DAUDA, generando que la emisión de fluorescencia de la sonda vuelva a mostrar los parámetros característicos en solución (Figura 20). Estos cambios en el rendimiento cuántico de la sonda indican que ambas proteínas son capaces de unir ácidos grasos con una afinidad mayor que por la sonda fluorescente. Adicionalmente, esto demuestra la posibilidad de utilizar DAUDA para un ensayo de desplazamiento pudiendo calcular una constante aparente de disociación.

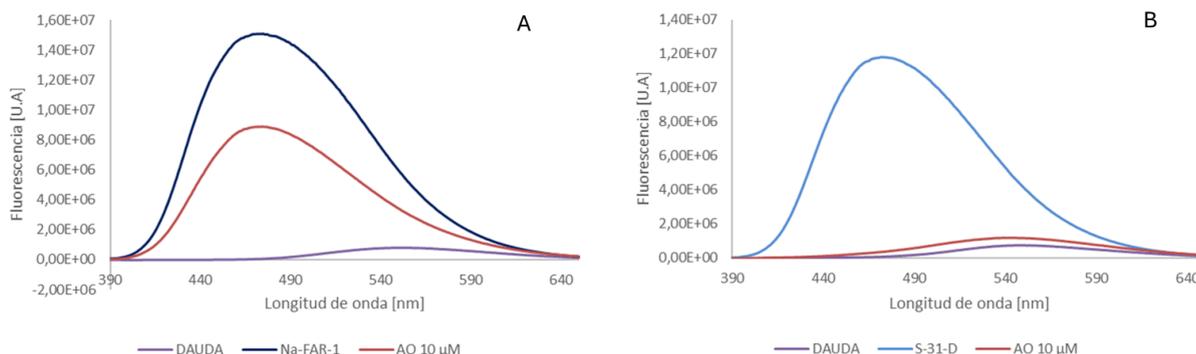


Figura 20 Unión de ligandos: DAUDA. Gráfico de emisión de Fluorescencia (unidades arbitrarias U.A) en función de la longitud de onda (nanómetros, nm). En ambos gráficos, DAUDA es la sonda en ausencia de proteína en buffer PBS a una concentración final de $1\mu\text{M}$. A) Na-far-1 o B) S-31-D es el agregado de cada proteína a la solución de DAUDA con una concentración final de $1\mu\text{M}$. AO es un agregado de ácido oleico a la solución anterior para una concentración final de $10\mu\text{M}$ en la cubeta.

- Titulación directa: DAUDA

El experimento de titulación directa nos permitió calcular una constante de afinidad para la sonda fluorescente DAUDA, tanto para Na-FAR-1 como de S-31-D. En la Figura 21 se puede observar cómo la señal de emisión describió una curva saturable de tipo sigmoideo para ambas proteínas. Estos resultados determinaron que se utilizara un modelo de tipo “Unión específica con pendiente de Hill - Un sitio de unión” (E.1) para el cálculo de las constantes de disociación.

La K_d calculada fue de $0,72\mu\text{M} \pm 0,046$ para Na-FAR-1 y $0,4891\mu\text{M} \pm 0,031$ para S-31-D. El análisis estadístico indica que no hay diferencias significativas entre estas constantes calculadas, lo cual indicaría que la mutación que simula el estado fosforilado de la proteína no alteró la capacidad de unión de Na-FAR-1 con la sonda fluorescente.

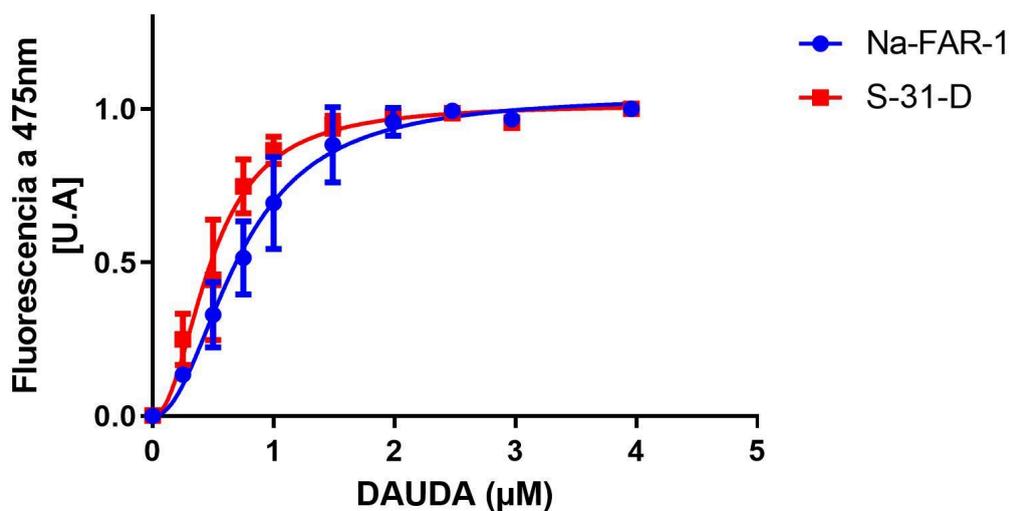


Figura 21 Titulación directa de Na-FAR-1 o S-31D con DAUDA. Este gráfico corresponde a tres experimentos y las barras de error representan la desviación estándar. Fluorescencia a 475 nm (Unidades arbitrarias) en función del agregado de cantidades crecientes de DAUDA (μM). Na-far-1 (azul) y la mutante S-31-D (rojo) aumentan su señal hasta llegar a una meseta.

- Titulación directa: Fluorescencia intrínseca

Estudios previos han demostrado que la emisión de los aminoácidos aromáticos presentes en Na-FAR-1 varían de acuerdo a la presencia de ligandos hidrofóbicos (Rey-Burusco et al., 2015). Esta propiedad nos permitió evaluar la interacción de las proteínas con ligandos hidrofóbicos siguiendo la fluorescencia intrínseca de las mismas. Al ser excitadas a 280 nm, emiten señal entre 290 nm y 390 nm con un máximo en los 305 nm. Esta señal se vió disminuida con los agregados sucesivos de una solución de ácido oleico, por lo que permite realizar un cálculo directo de la constante de disociación para la unión de este ligando (Figura 22).

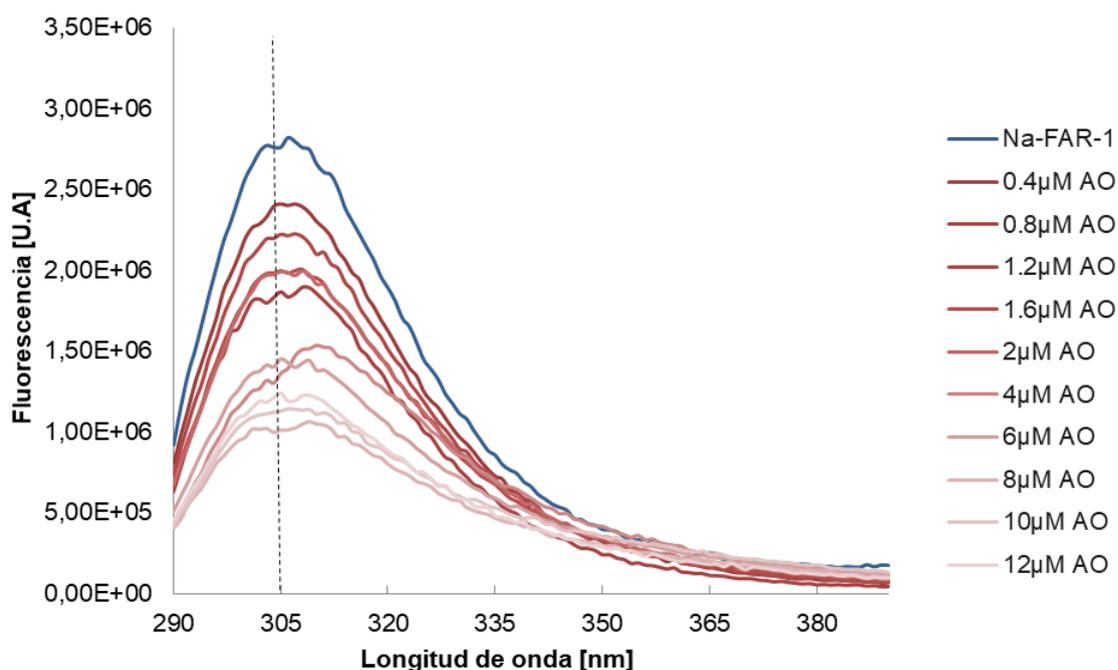


Figura 22 Titulación directa de Na-FAR-1 con ácido oleico monitoreado por fluorescencia intrínseca. En este gráfico se muestra un experimento representativo donde la emisión intrínseca de Na-FAR-1 (azul) a una concentración final de $1 \mu\text{M}$ se ve disminuida por el agregado de concentraciones crecientes de AO (rojo). Se marcó con línea punteada la longitud de onda 305 nm, donde la señal de la proteína es máxima

En la Figura 23 se muestran la emisión de fluorescencia a 307 nm de Na-FAR-1 o S-31-D para cada agregado de AO. Para el cálculo de las constantes de disociación se ajustó un modelo de unión específica con un sitio de unión (E.2). La K_d calculada fue de $9,8 \mu\text{M}$ para Na-far-1 $\pm 2,47$ y $9,68 \mu\text{M} \pm 1,8$ para S-31-D. El análisis estadístico indica que no hay diferencias significativas entre estas constantes calculadas.

Estos resultados concuerdan con lo observado en los experimentos de titulación directa utilizando DAUDA, indicando que la mutación que simula el estado fosforilado no ha generado variaciones en su afinidad por los ligandos hidrofóbicos ensayados y mostrando afinidades en el orden micromolar, lo cual concuerda con trabajos anteriores para el caso de Na-FAR-1 (Rey-Burusco et al., 2015).

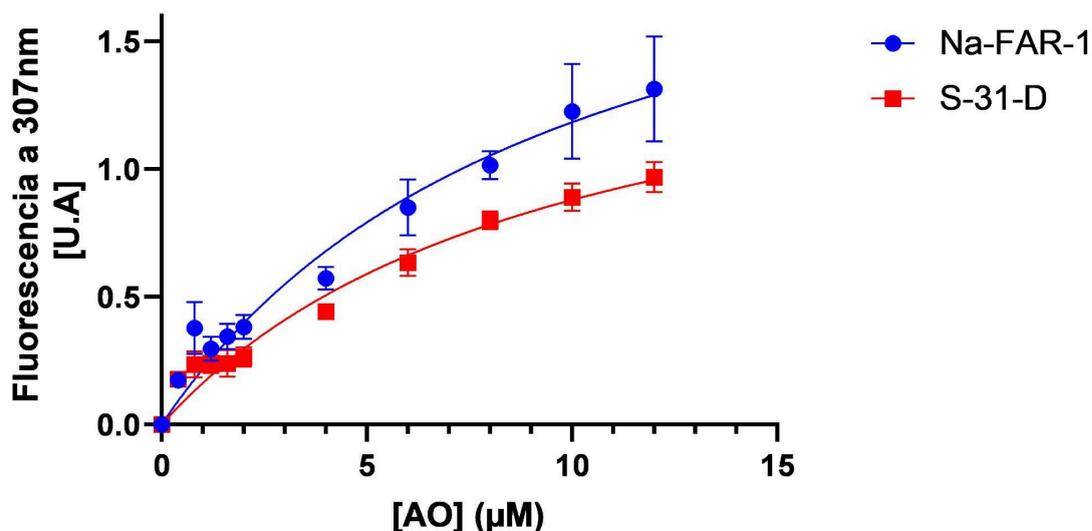


Figura 23 Titulación directa con AO de Na-FAR-1 y S-31D monitoreada por emisión de fluorescencia intrínseca. Este gráfico corresponde a tres experimentos y las barras de error representan la desviación estándar. Emisión de fluorescencia a 307 nm (unidades arbitrarias) en función del agregado de cantidades crecientes de ácido oleico (AO) (μM). Na-FAR-1 (azul) y la mutante S-31-D (rojo).

- Ensayos de desplazamiento

Los ensayos de desplazamiento se realizaron con el objetivo de seguir caracterizando a S-31-D con respecto a Na-FAR-1. Para ello, la unión entre DAUDA y las proteínas estudiadas en una relación 5:1, fue desplazada con agregados crecientes de una solución ácido oleico 1 mM (Figura 24). Esto permitió evidenciar de forma indirecta la capacidad de unir este ligando no fluorescente por parte de Na-FAR-1 y su mutante S-31-D, que simula el estado fosforilado de la misma. Se obtuvieron valores de K_{dapp} de $0,68 \mu\text{M} \pm 0,21$ para Na-far-1 y $0,35 \pm 0,15 \mu\text{M}$ para S-31-D. Para el cálculo de dichas constantes se aplicó el ajuste del modelo unión competitiva con ajuste de cuadrados mínimos (E.3), correspondiente a una hipérbola decreciente. El análisis estadístico indica que no hay diferencias significativas entre las constantes calculadas. Los resultados del ensayo de desplazamiento corroboraron lo observado por titulación directa.

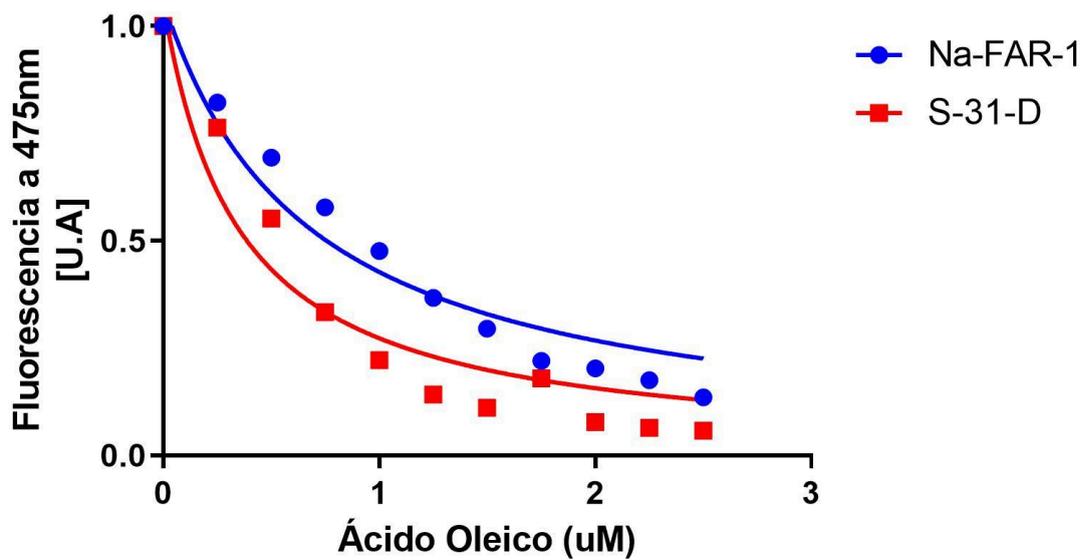


Figura 24. Ensayo de desplazamiento de sonda DAUDA por ácido oleico. A partir de una solución DAUDA:proteína (5:1) se monitoreó la emisión de fluorescencia a 475nm (Unidades arbitrarias) en función del agregado de cantidades crecientes de ácido oleico (AO) (μM). Na-FAR-1 (azul) y la mutante S-31-D (rojo). Se muestra un experimento representativo de dos.

A modo de resumen se representan en la Tabla 2 las constantes de disociación calculadas y sus respectivos errores estándares, para cada ligando y experimento.

Tabla 2. Resumen de constantes de disociación.				
Ligando	Experimento	Cantidad de repeticiones	Kd Na-far-1	Kd S-31-D
DAUDA	Titulación Directa	3	Kd=0,72 μM SE: $\pm 0,046$	Kd=0,49 μM SE: $\pm 0,031$
Ácido Oleico	Titulación Directa	3	Kd=9,82 μM SE: +/- 2,47	Kd=9,68 μM SE: $\pm 1,79$
Ácido Oleico	Desplazamiento	1	Kd _{app} =0,68 μM SE: $\pm 0,21$	Kd _{app} =0,35 μM SE: $\pm 0,15$

Tabla 2 Constantes de disociación para Na-FAR-1 y S-31-D obtenidas para cada experimento.

IV.B.3 Dot Blot Lipídico

En este ensayo bioquímico se utilizó la reacción específica antígeno-anticuerpo para evidenciar la interacción entre Na-FAR-1 y distintos tipos de lípidos, además de evidenciar posibles diferencias que podría presentar la mutante S-31-D.

Cabe mencionar, que las proteínas ensayadas se encontraban en su forma apo-, es decir sin lípidos unidos. Es por esto que la interacción evidenciada en este experimento resulta diferente a lo hallado en el análisis de extracción de los lípidos que una Na-FAR-1 en un entorno bacteriano de acuerdo a lo observado en Rey-Burusco et al., 2015.

En la Figura 25, se observa una clara señal que evidencia interacción con los fosfolípidos cardiolipina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina cuando la membrana fue incubada con Na-FAR-1. Con una intensidad menor se observa señal que podría indicar interacción con colesterol. Por otra parte, la proteína mutante S-31-D también demostró ser capaz de interaccionar con los mismos fosfolípidos, pero no mostró señal para el caso del colesterol. Notablemente, es la primera vez que se confirma la interacción entre una proteína FAR y fosfolípidos utilizando una técnica bioquímica alternativa. Adicionalmente, este resultado sugiere que la mutante S-31-D tiene una menor capacidad de interaccionar con estos lípidos pero no podemos descartar una menor sensibilidad en el anticuerpo primario.

Si bien es llamativo el hecho de que no hubo señal para ninguna de las proteínas en el spot de ácido oleico, esto podría interpretarse como una diferencia en el modo de interaccionar con los diferentes lípidos.

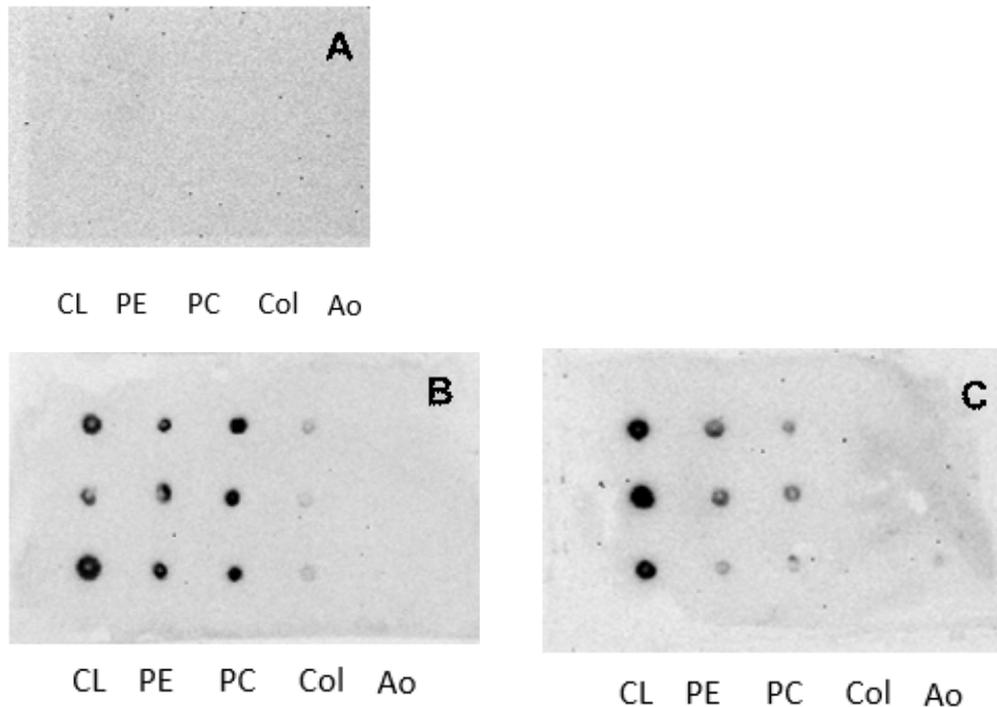


Figura 25 Dot blot lipídico . A) membrana control en la que se sembraron los lípidos a analizar en forma de spot, se incubó con solución de bloqueo y anticuerpo secundario, pero no con la proteína a analizar. B) Membrana incubada con la proteína Na-far-1, se ve señal positiva para cardiolípidina (CL), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidil serina (PS); una señal tenue para colesterol (Col) pero no para ácido oleico (Ao) . C) Membrana incubada con la proteína mutada S-31-D, se ve señal positiva para CL, PE, PS y no para Ao y Col. Esta es una imagen representativa de dos experimentos.

IV.B.4 Discusión parcial de los experimentos *in vitro*: Na-FAR-1

Las proteínas FARs presentan una baja identidad de secuencia dentro de la familia y un alto grado de conservación de su estructura terciaria rica en alfa hélice. Sin embargo, todas presentan una secuencia de 4 aminoácidos altamente conservados, que corresponden a un sitio de fosforilación para la caseína quinasa II (Parks 2022).

En este trabajo de tesis se logró introducir una mutación puntual en la secuencia codificante de Na-FAR-1, que sustituye una serina por un ácido aspártico y simula el estado fosforilado de la proteína. En el análisis comparativo realizado entre la proteína Na-FAR-1 y su mutante S-31-D se calcularon las constantes de disociación mediante diferentes estrategias de fluorescencia con los ligandos DAUDA y ácido oleico, pero no se encontraron diferencias significativas entre estas. Esto indicaría que la modificación del sitio de fosforilación no afecta la interacción entre la proteína Na-FAR-1 y ácidos grasos, lo cual coincide con los hallazgos para Ce-FAR-7 mostrados en Jordanova et al.

2009, donde también se exploró el estado fosforilado de la proteína. Sin embargo, cabe destacar que no fue explorada la interacción con otros ligandos importantes como el retinol, donde podría esperarse una diferencia significativa como se vió con Ce-FAR-7 (Jordanova et al., 2009).

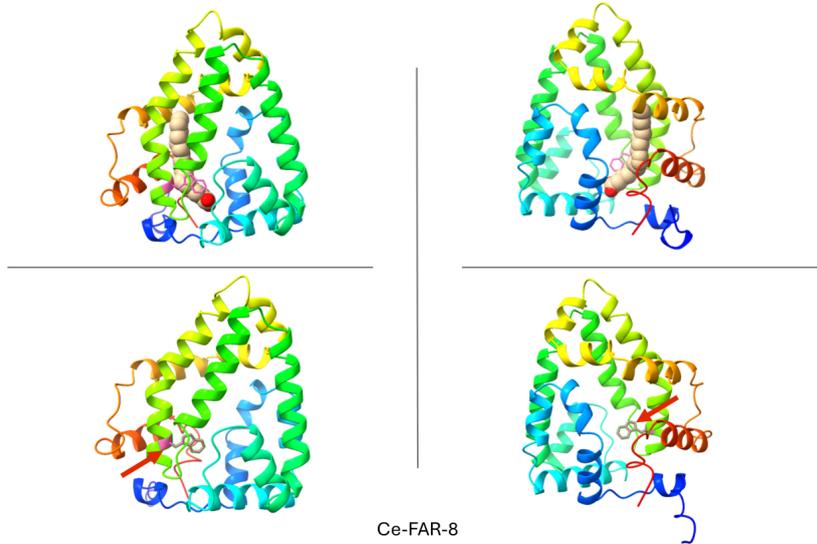
Por otro lado, en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio (Rey-Burusco 2015) mostraron que la proteína Na-FAR-1 copurifica con fosfolípidos además de ácidos grasos. El experimento de Dot Blot Lipídico reafirma este hallazgo, mostrando la reconstitución de la interacción a partir de proteína purificada deslipidizada y lípidos puros, en este caso fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, cardiolipina, colesterol y ácido oleico. Particularmente, se vio que tanto Na-FAR-1 y la mutante S-31-D interaccionan con PE, PC y CL; esto sugeriría que estas proteínas son capaces de interactuar con membranas lipídicas como posible mecanismo de entrega de su contenido, transportar fosfolípidos como señales celulares o bien secuestrarlos del medio como mecanismo de bloqueo de la respuesta inmune. Esta última posibilidad se puede relacionar con la evidencia de que las proteínas FARs, Sc-FAR-1 y Sc-FAR-2 del nematode entomopatógeno *Steinernema carpocapsae*, es capaz de modular la respuesta inmune en *Drosophila melanogaster* (Parks et al., 2021). En contraposición, no puede asegurarse que las proteínas Na-FAR-1 y S-31-D interaccionan con colesterol y ácido oleico. El caso del colesterol es esperable, ya que no se han hallado casos de extracciones de lípidos de estas proteínas que contengan colesterol. Pero la situación del ácido oleico desconcierta dado que este sería uno de los principales ligandos para esta familia de proteínas (Parks, 2022). Una de las posibilidades es que el sitio de unión para ácidos grasos se encuentra oculto en el centro de la proteína y esto dificulta su interacción con la superficie de la membrana de PVDF donde se encuentran fijados los lípidos; la interacción con el AO resultaría muy diferente en solución, como se ha mostrado anteriormente, frente a esta interacción en un soporte. Por otro lado, los fosfolípidos pueden tener un sitio de unión diferente o que estos interactúen con la superficie de las proteínas y esto favorezca su unión en este tipo de experimentos.

Esta es la primera confirmación de la interacción entre una FAR con fosfolípidos, lo cual abre la posibilidad de formular nuevas hipótesis sobre su función para todos los miembros de la familia de proteínas, ya sea pudiendo transportar fosfolípidos o interactuar con membranas lipídicas.

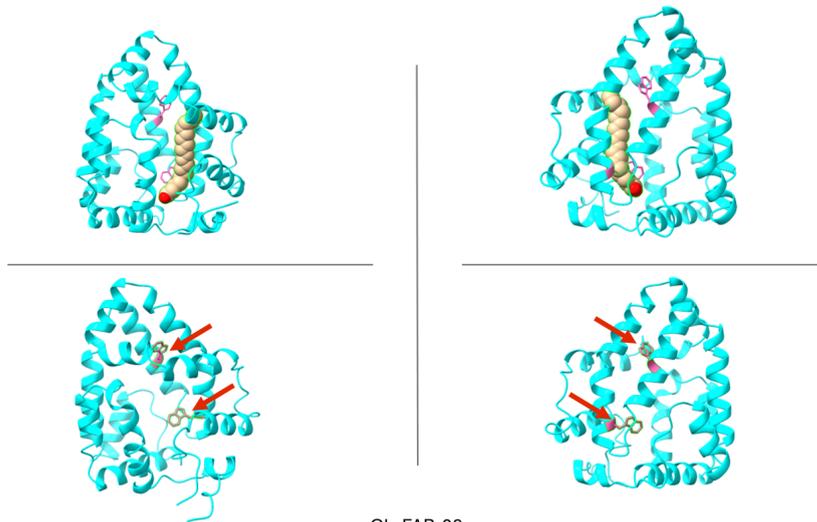
C- *IN VITRO* (Ce-FAR-8 y Cb-FARs)

IV.C.1 Predicción de las estructuras

Tener modelos hipotéticos de estructuras tridimensionales de proteínas para las cuales no hay información o sus homólogos son muy distantes, permiten el diseño de estudios funcionales. Es por esto que, haciendo uso de las secuencias nucleotídicas reportadas para *Ce-far-8* (WormBase-CELE_K02F3.3) y *Cb-fars* presentes en el genoma publicado por Stevens et al., 2020, se tradujeron a una secuencia aminoacídica y se predijo la posible estructura que tendrían en solución, empleando el programa AlphaFold 3.0 (Abramson et al. 2024). A su vez, este programa permite agregar al modelado la presencia de ligandos, por lo que también se predijeron las estructuras agregando al modelado el ligando hidrofóbico ácido oleico (AO). Como se observa en la Figura 26, los resultados obtenidos con AlphaFold 3.0 y visualizados con el programa ChimeraX, muestran la característica estructura globular rica en alfa-hélices de la familia de proteínas FAR, lo cual refuerza la hipótesis de que estas proteínas pertenecen a esta familia. Además, la ubicación del ligando AO en el interior de las estructuras sugiere que estas proteínas son capaces de unir ácidos grasos libres dentro de un bolsillo hidrofóbico. La predicción ubica al ligando cerca de aminoácidos aromáticos, particularmente triptofano en el caso de *Ce-FAR-8* y las *Cb-FARs*, lo cual permite proponer experimentos que evalúen los cambios en la emisión de fluorescencia intrínseca de estos aminoácidos para evaluar la interacción con ligandos o la desnaturalización de la proteína. Todos los modelos predichos mostraron un nivel de confianza alto para la totalidad de su estructura, excepto el N terminal que tuvo un nivel bajo de confianza (ver Anexo S3).



Ce-FAR-8



Cb-FAR-08

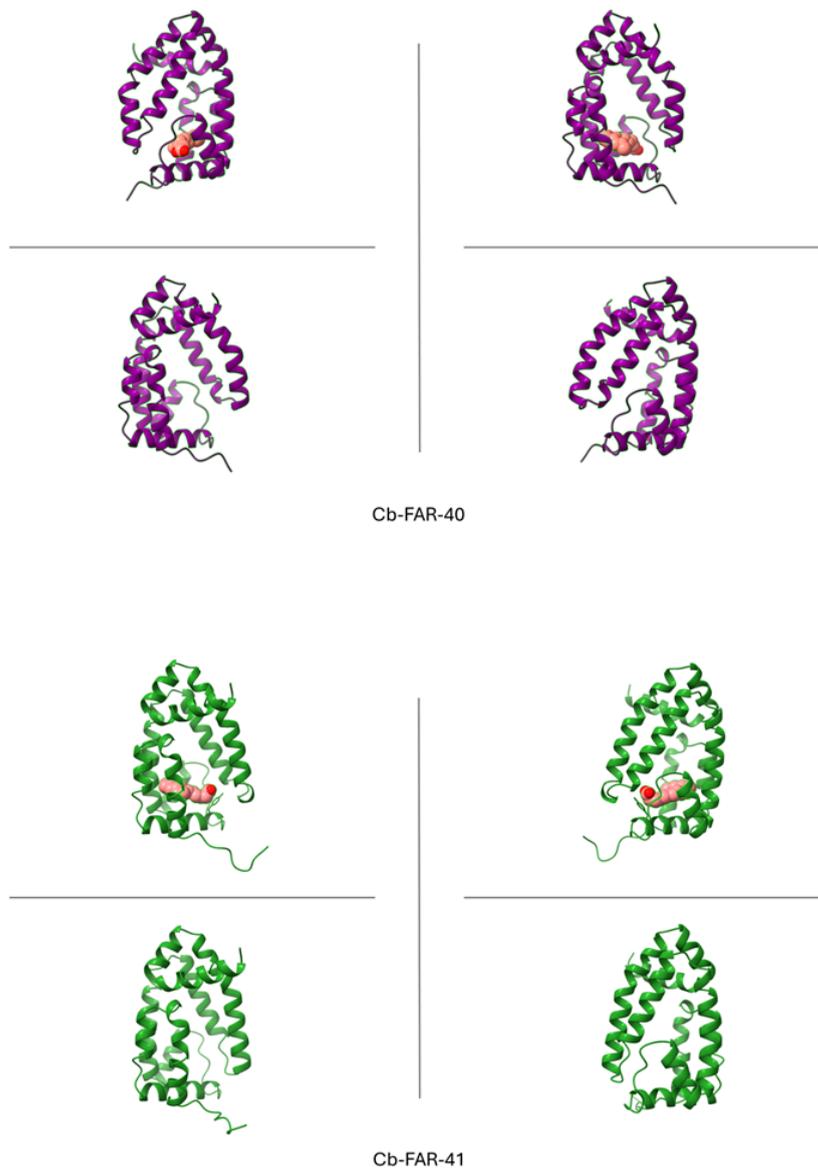


Figura 26. Estructuras 3D predichas por AlphaFold 3.0 de Ce-FAR-8, Cb-FAR-08, Cb-FAR-40 y Cb-FAR-41. Se representa el esqueleto polipeptídico con cintas mientras que el ligando ácido oleico está representado con esferas. En magenta y representado con varas se ven los grupos R de los triptofanos presentes en las proteínas, nótese que la proteína Cb-FAR-40 y Cb-FAR-41 carecen de estos aminoácidos.

IV.C.2 Marcha de purificación

Los resultados aquí presentados resultan novedosos porque esta es la primera vez que se realiza la purificación en forma recombinante de Ce-FAR-8 y las proteínas FAR de *C. bovis* predichas en Stevens 2020. Esto por un lado , completa los estudios de FARs de *C. elegans* realizados en Garofalo et al. 2002 y valida la anotación de FARs en el genoma de *C. bovis*.

A continuación se muestran las imágenes de geles de poliacrilamida como resultado del proceso de purificación de Ce-FAR-8 (Figura 27 y 28). Las correspondientes a Cb-FAR-08, Cb-FAR-40 y Cb-FAR-41 se encuentran en el Anexo (S4) . En estas puede apreciarse, desde el homogenato total hasta el pasaje por columna de exclusión molecular, cómo progresivamente se van obteniendo bandas únicas, que corresponden a proteínas aisladas con un alto grado de pureza.

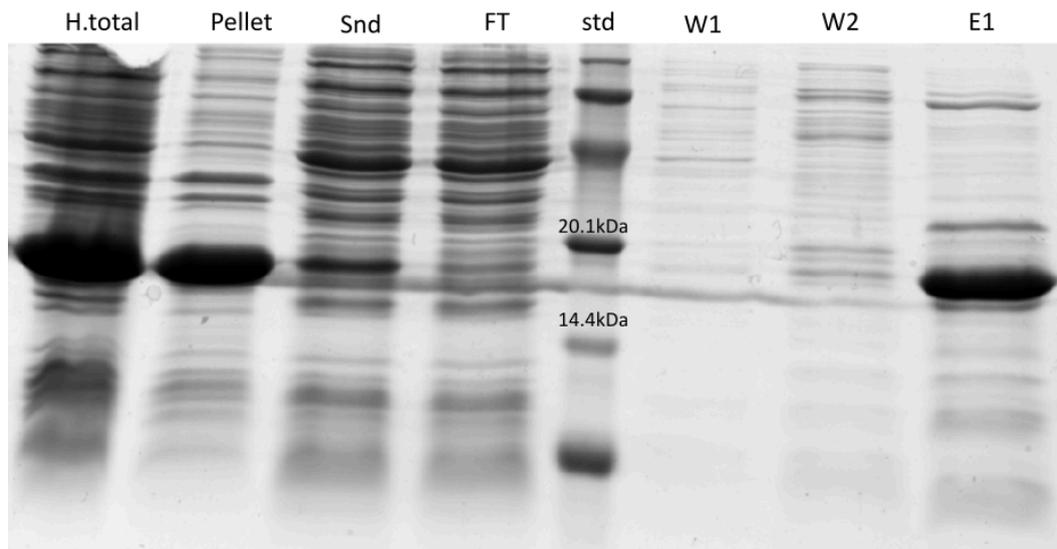


Figura 27 Marcha de purificación. SDS-PAGE de las distintas fracciones de la cromatografía de afinidad de Ce-FAR-8. Las referencias corresponden a los tubos que se colectan a la salida de la columna; H.total: Homogenato total de bacterias. std: marcador de bajo peso molecular. Pellet: es la fracción precipitada luego del sonicado. Snd: sobrenadante; es la fracción soluble obtenida luego del sonicado. FT: es la fracción no retenida por la columna de afinidad. W1: fracción eluida luego de 10 volúmenes de columna de buffer de unión. W2: fracción eluida luego de 10 volúmenes de columna de buffer de lavado. E1-E4: fracciones eluidas con buffer de elución, donde se espera encontrar la proteína.

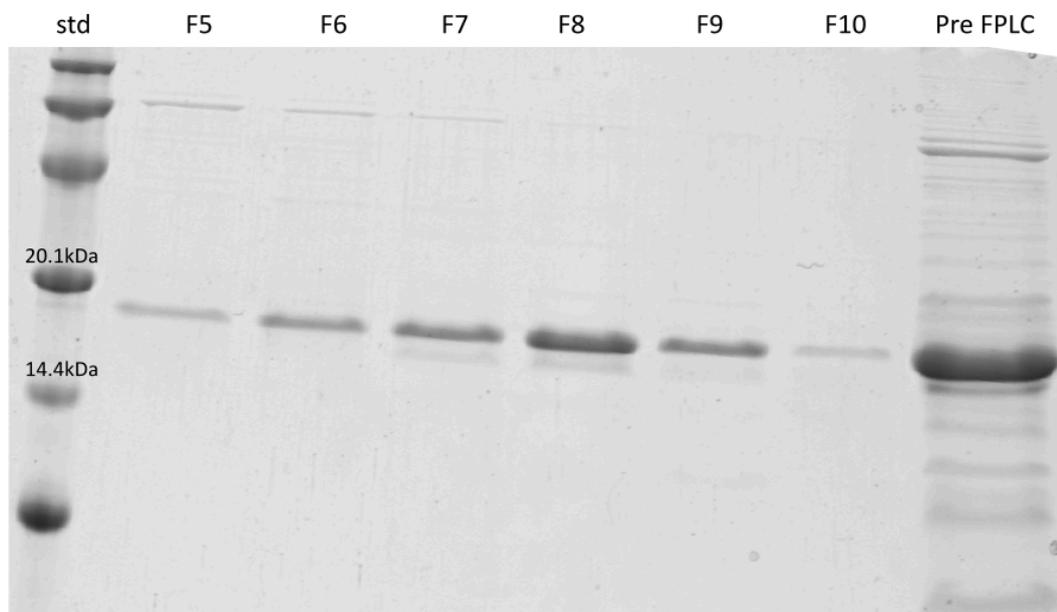


Figura 28 Marcha de purificación. SDS-PAGE de las distintas fracciones de la cromatografía de exclusión molecular de Ce-FAR-8. Las referencias corresponden a los tubos que se colectan a la salida de la columna; std: marcador de bajo peso molecular. E5-E10: fracciones eluidas colectadas en las que se detectó señal a 220nm y 280nm. Pre FPLC: fracción purificada por columna de afinidad, utilizada como muestra para la cromatografía de exclusión molecular

IV.C.3 Dicroísmo Circular

Los experimentos de dicroísmo circular ofrecen información importante sobre la estructura de las proteínas, midiendo espectros de absorción de luz circularmente polarizada en diferentes rangos de longitudes de onda de la zona ultravioleta (UV) del espectro. La estructura secundaria se analiza a partir de espectros resultantes de la absorción del enlace peptídico en regiones del UV lejano (190-260 nm), mientras que la zona del UV cercano (260-350 nm) da información sobre la estructura terciaria y el entorno de los aminoácidos aromáticos.

Los espectros colectados en el UV lejano mostrados en la Figura 29 confirmaron que tanto Ce-FAR-8 de *C. elegans* como sus homólogas de *C. bovis*, Cb-FAR-08, Cb-FAR-41 y Cb-FAR-40, poseen estructuras secundarias ricas en alfa hélice, coincidente con lo esperado para proteínas pertenecientes a la familia de las FARs. En todos los casos se observan dos picos negativos a 208 y 222 nm y uno positivo en 190 nm aproximadamente, evidencia de un alto contenido de alfa hélice.

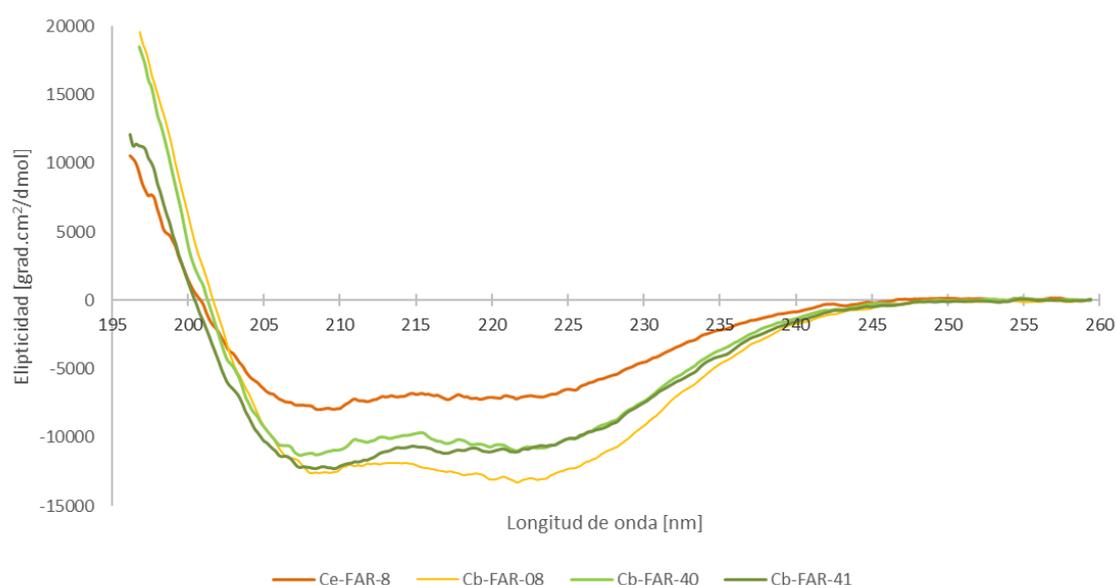


Figura 29 Espectros Dicroísmo Circular en el UV lejano. En los ejes se representa la Elipticidad molar versus la longitud de onda (nm).

Los espectros colectados en el UV cercano de estas proteínas, mostrados en la Figura 30, representan el plegamiento terciario y describen un patrón característico para cada una de ellas y les confiere identidad, evidenciando además que las proteínas de *C. bovis* son diferentes entre sí. En todos los casos se observa un espectro con estructura fina es decir coincidente con un plegamiento uniforme y estable para cada una de las proteínas ensayadas. Estos experimentos también contribuyen a validar las predicciones de los genes de *C. bovis* realizadas en Stevens et al., 2020.

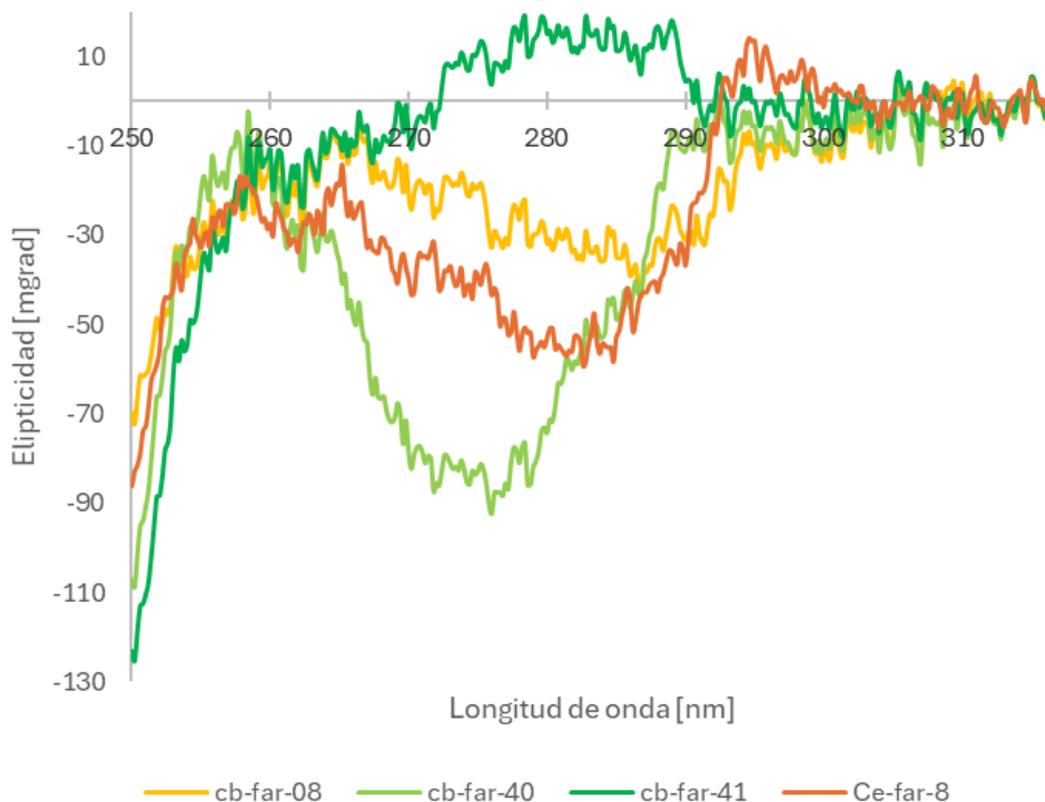


Figura 30 Dicroísmo Circular en el UV cercano. En los ejes se representa la Elipticidad en miligrados (mgrad) versus la longitud de onda (nm).

IV.C.2 Espectroscopía de Fluorescencia

- Ensayos de unión

Es importante recordar en este punto que en el trabajo de Garofalo et al, 2002 se consideró que la proteína Ce-FAR-8 podría no pertenecer a la familia, dada su gran diferencia en secuencia. Siendo que en este trabajo de tesis es la primera vez que se trabaja con Ce-FAR-8 recombinante, se abordó su estudio funcional para evaluar si esta era capaz de unir ácidos grasos. Para esto, se realizaron ensayos de unión usando el análogo de ácido graso DAUDA. Luego se procedió a agregar concentraciones crecientes de ácido oleico (AO), para evaluar si era capaz de desplazar la sonda y así confirmar la interacción entre estos dos ligandos y la proteína.

En la Figura 31 se observa que el DAUDA libre en solución tiene señal baja y con un máximo alrededor de los 540 nm. La incubación con la proteína Ce-FAR-8 genera un desplazamiento del máximo de emisión hacia los 480 nm y un marcado aumento en la intensidad de fluorescencia, ambos indicativos de un evento de unión. El agregado de concentraciones crecientes de ácido oleico desplazó por completo la interacción con

DAUDA, provocando que la emisión de fluorescencia de la sonda vuelva a mostrar las características en solución. Este resultado preliminar demuestra fuertemente que Ce-FAR-8 es capaz de unir ácidos grasos.

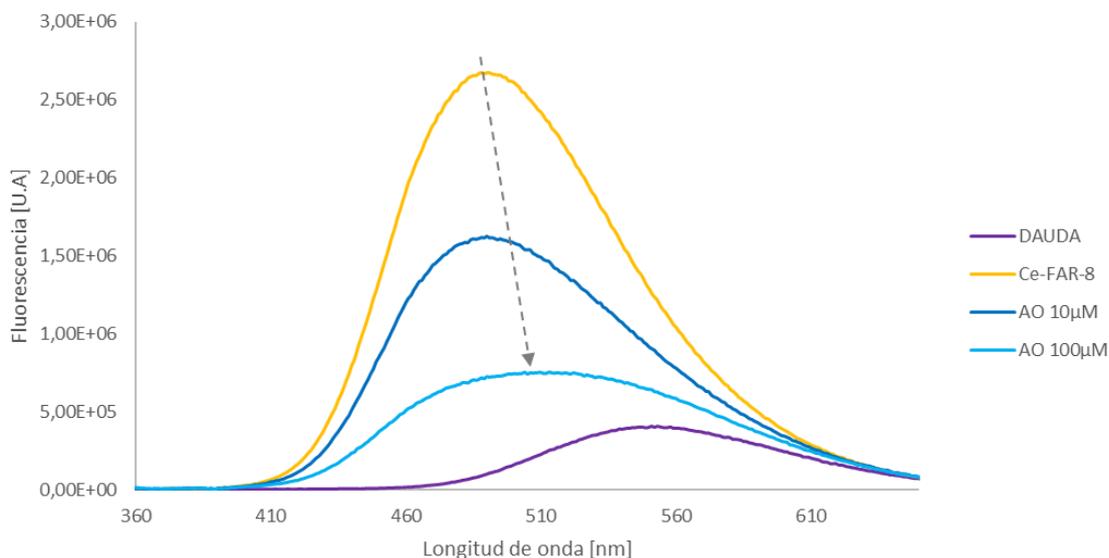


Figura 31: Ensayos funcionales utilizando DAUDA. Espectros de emisión de Fluorescencia (unidades arbitrarias) en función de la longitud de onda (nanómetros). En el gráfico puede apreciarse la sonda DAUDA (1 μM), el agregar la proteína Ce-FAR-8 (1 μM) que provoca el aumento de la emisión de la sonda al interactuar con ésta. Luego se aprecian los agregados de ácido oleico (10 μM y 100 μM) que desplazan la sonda y disminuyen la señal.

Como se vio en el modelado por AlphaFold, Ce-FAR-8 posee un triptofano ubicado hacia la cavidad de su estructura, por lo que fue factible postular un experimento que monitorea la fluorescencia del mismo excitando a 295 nm y ver cómo su emisión podría verse alterada ante el agregado de ácido oleico. En la Figura 32 se ve que la emisión es máxima aproximadamente a 340 nm y que la intensidad de señal disminuye con el agregado de ligando, no solo confirma la capacidad de Ce-FAR-8 de unir ácidos grasos sino también que estructuralmente el triptofano en la cavidad estaría implicado en esta interacción, lo cual valida el modelado predicho. Es importante notar que estos experimentos fueron realizados con la proteína en su forma apo-, es decir desprovista de lípidos. Además, esto corrobora que puede usarse la emisión del triptofano como sonda para próximos ensayos de unión. Notablemente el máximo de emisión del triptofano para esta proteína se encuentra inusualmente corrido hacia el rojo lo cual da indicios de encontrarse en un entorno acuoso. Esto último coincide con lo que se observa en la estructura 3D predicha.

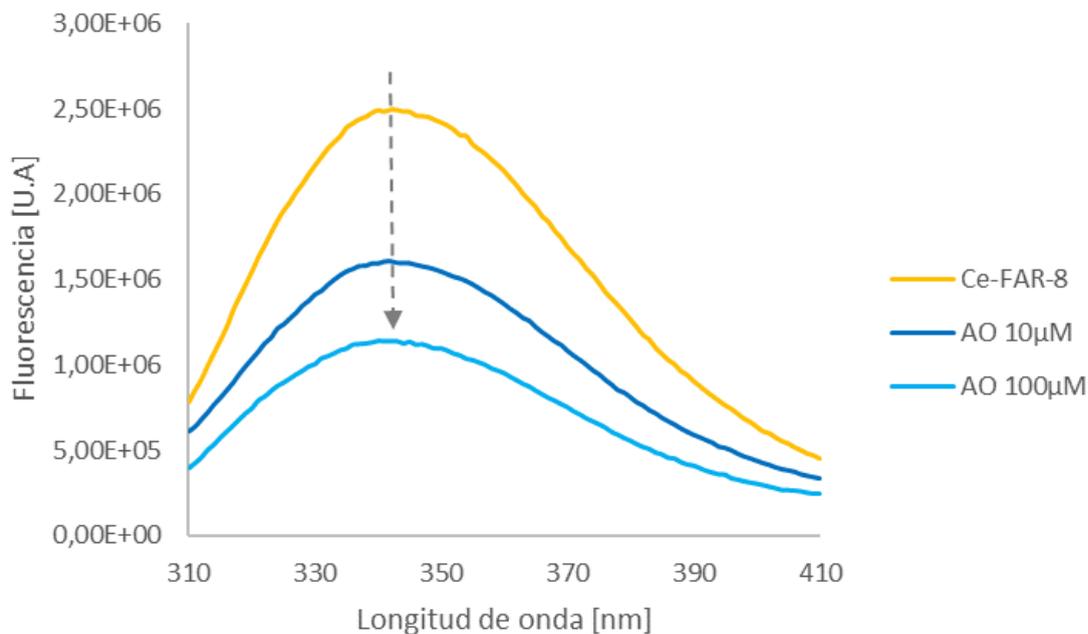


Figura 32: Ensayos funcionales utilizando fluorescencia intrínseca de Ce-FAR-8. En este gráfico se muestra cómo la emisión intrínseca de Ce-FAR-8 a una concentración final de $1\mu\text{M}$ se ve disminuida por el agregado de concentraciones crecientes de ácido oleico ($10\mu\text{M}$ y $20\mu\text{M}$), indicado por flecha gris.

IV.C.4 Curvas de desnaturalización medidas por fluorescencia

Con la finalidad de estudiar la estabilidad de estas proteínas se realizaron experimentos de desnaturalización monitoreando los cambios en la fluorescencia intrínseca y utilizando los agentes caotrópicos urea y guanidinio.

Las medidas de fluorescencia de la desnaturalización con urea, que se incluyen en el Anexo (S5), no mostraron un comportamiento de tipo cooperativo dado que no se observan las fases pre-transición, transición y post-transición.

Por otro lado, la utilización de concentraciones crecientes de guanidinio como agente desnaturalizante permitió observar una clara transición para las cuatro proteínas, como se ve en la Figura 33. Para estos casos se hizo un cálculo del centro de masa a concentración 0 M, es decir la estructura nativa en ausencia de desnaturalizante, y 6 M de guanidinio. Además, en la Figura 34 se muestra el cálculo de la concentración media (C_m) ajustando el modelo de extrapolación lineal (Santoro y Bole, 1988), a la cual la mitad de las moléculas de proteínas se encuentran en estado desplegado, tomando como referencia el cambio en la intensidad en la señal máxima para cada proteína (336 nm para Ce-FAR-8 y Cb-FAR-08 y 305 nm para Cb-FAR-40 y Cb-FAR-41). Estos resultados obtenidos por duplicado se muestran en la Tabla 3. En el caso de Ce-FAR-8

y Cb-FAR-08, ambas proteínas que contienen triptofano, se vio un corrimiento del centro de masa de aproximadamente 10 nm demostrando un aumento en el grado de exposición del triptofano en el estado desplegado con respecto al nativo. Por otra parte los centros de masa de los espectros obtenidos para Cb-FAR-40 y Cb-FAR-41 no presentan cambios, lo cual esperable dado que al carecer de triptofanos solo se trabajó con la emisión de tirosinas y fenilalaninas, las cuales no presentan corrimientos en el máximo de emisión pero sí disminución en la intensidad. Finalmente, es de destacar que todas las proteínas ensayadas mostraron una alta estabilidad en solución, los valores de C_m obtenidos son altos en relación a otras proteínas globulares estudiadas (Curto et al., 2005).

Tabla 3. Resumen desnaturalización con Gdn.HCl			
	C_m [M]	Centro de masa [nm]	
Proteínas		0 M Gdn.HCl	6 M Gdn.HCl
Ce-FAR-8	3,31	345,1	356,6
Cb-FAR-08	3,24	343,7	356,3
Cb-FAR-40	2,52	321,0	322,1
Cb-FAR-41	2,99	318,7	320,1

Tabla 3. Parámetros de desnaturalización con Guanidinio (Gdn.HCl). Para cada proteína se calculó la concentración media (C_m [M]) y el centro de masa [nm] a concentración 0 M y 6 M de Gdn.HCL. Los valores obtenidos son un promedio de dos experimentos.

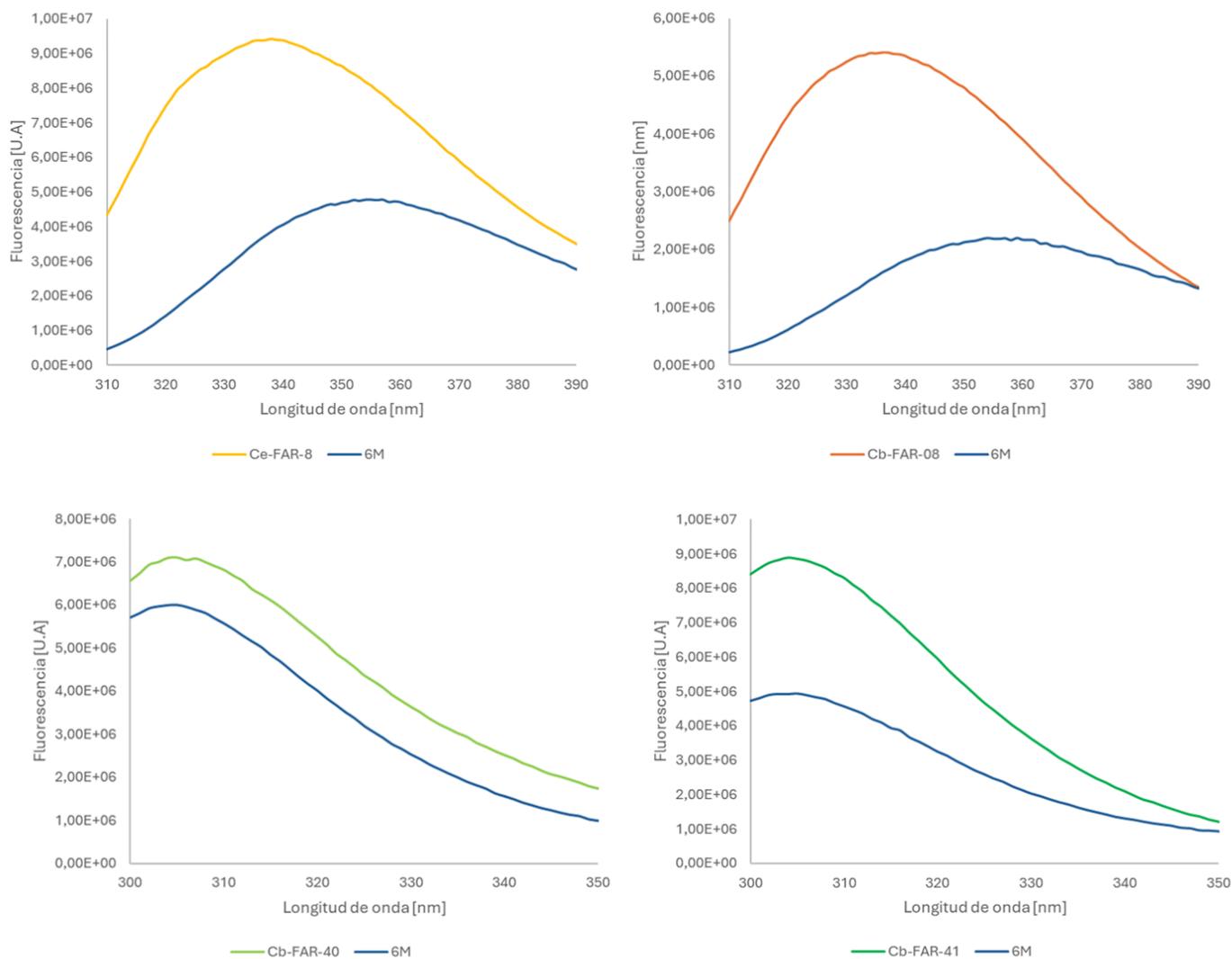


Figura 33 Desnaturalización de proteínas con Gnd.HCl C. Las imágenes mostradas son de un experimento representativo, donde se graficó el espectro de intensidad de fluorescencia [U.A.] para las concentraciones 0 M (estado nativo de la proteína) y 6 M Gnd.HCl. Para Ce-FAR-8 y Cb-FAR-08, se ve la emisión de los triptofanos con un máximo a 336 nm en el estado nativo. En los espectro de Cb-FAR-40 y Cb-FAR-41 se ve la emisión de las tirosinas con un máximo a 305 nm.

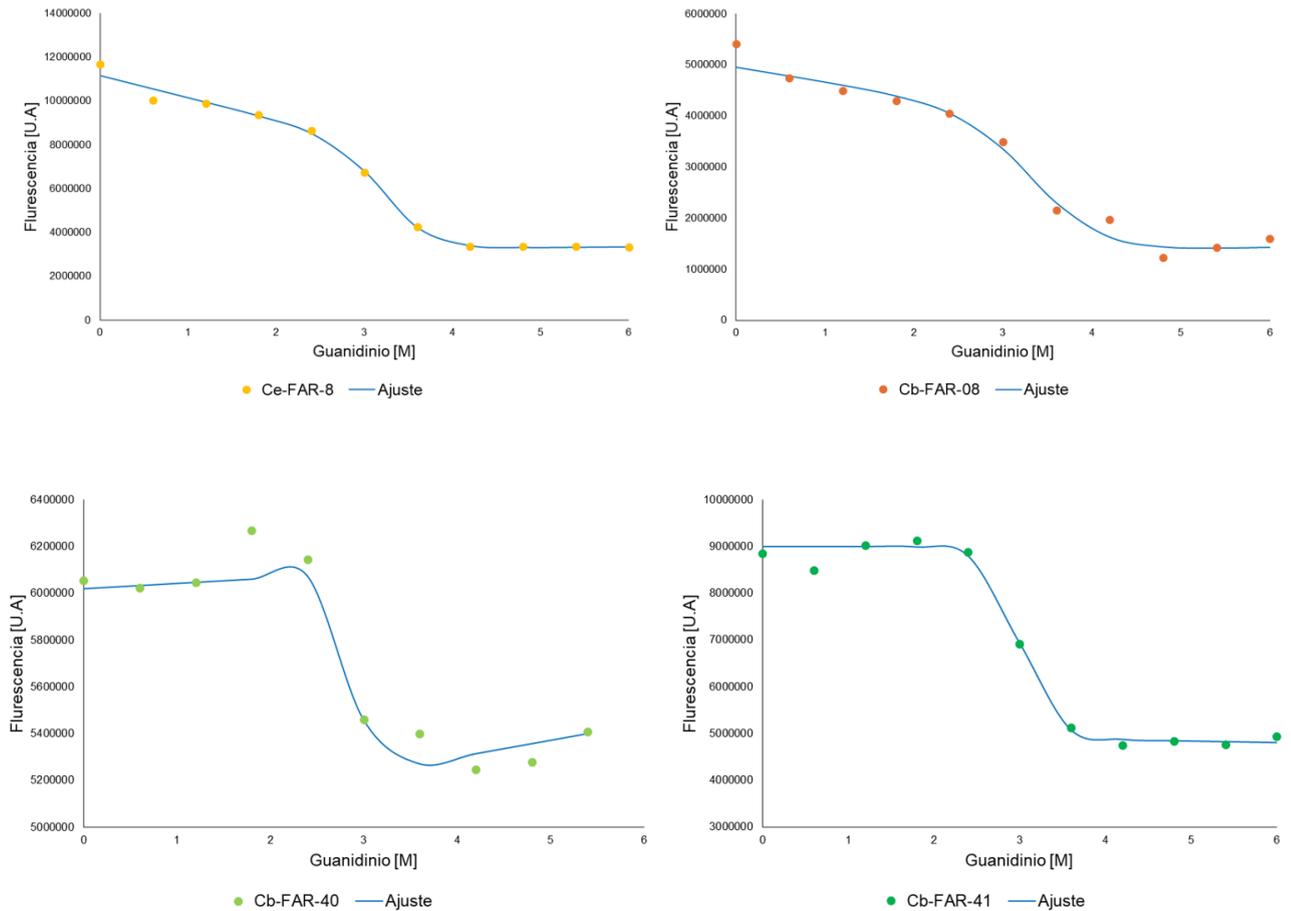


Figura 34 Cálculo de curva teórica de desnaturalización teórica. En esta figura se muestra uno de los dos cálculos realizados para este ensayo. Se graficó el cambio en la intensidad de fluorescencia [U.A] en función de la concentración de desnaturalizante Gnd.HCl [M] a 336 nm para Ce-FAR-8 y Cb-FAR-08 y a 305 nm Cb-FAR-40 y Cb-FAR-41. Los ajustes (azul) fueron obtenidos para cada uno de los dos experimentos realizados con la herramienta solver de Excel.

IV.B.5 Capacidad de unión de ligandos: TLC

Como experimento alternativo y con el objetivo de evidenciar si estas proteínas son capaces de unir lípidos desde un entorno biológico, se realizó una extracción con solventes orgánicos de las proteínas purificadas Ce-FAR-8, Cb-FAR-08, Cb-FAR-41 y Cb-FAR-40 así como también de bacterias sin transformar BL21, proteína tioredoxina de hierro-azufre de *Hymenolepis microstoma* (Hm-IST, proteína que no uniría lípidos) y buffer PBS, a modo de controles positivos y negativos, respectivamente. Además se sembraron como patrón estándares de ácido oleico y una mezcla de fosfolípidos comerciales (fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina) para comparar con las muestras corridas e identificar los lípidos presentes en estas. Como resultado, se puede ver en la Figura 35 que las cuatro proteínas estudiadas copurifican con ácidos grasos y fosfolípidos. Esto concuerda con resultados obtenidos para Na-FAR-1 en Rey Burusco, 2015 donde se postuló por primera vez la posibilidad que tienen estas proteínas de interaccionar con fosfolípidos. Además, para el caso de las proteínas Cb-FARs, estos resultados demuestran su capacidad de unir ácidos grasos, lo cual es sumamente novedoso y corrobora la función propuesta por Stevens 2020 al plantearlas como homólogas de Ce-FAR-8. Con respecto a la identidad de los fosfolípidos, podemos sugerir que unen fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina pero se requieren experimentos adicionales. Llamativamente, Hm-IST estaría copurificando con fosfolípidos lo cual debería ser estudiado con mayor profundidad.

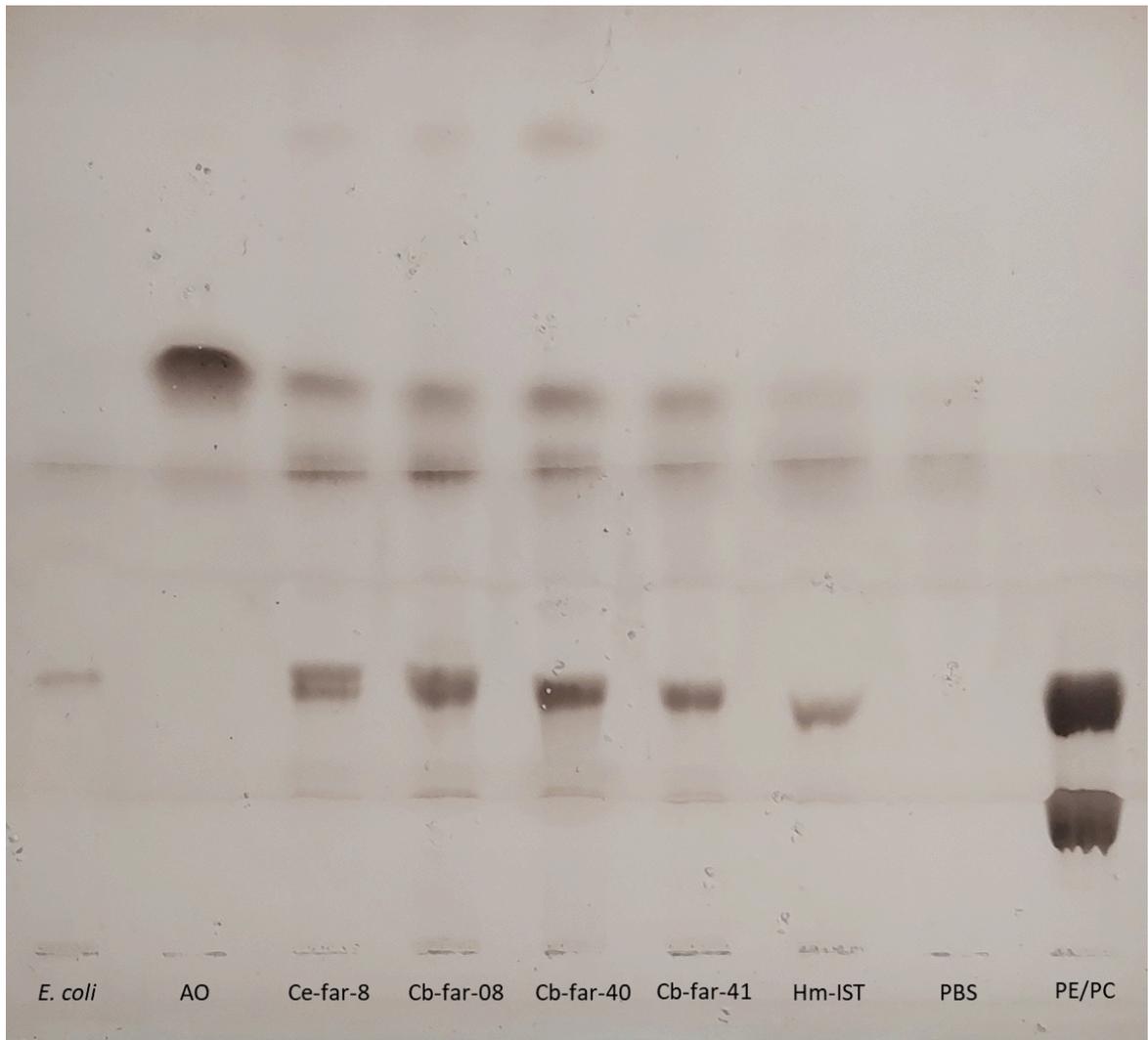


Figura 35 Corrida cromatográfica TLC en capa fina en doble desarrollo. *E. coli* estándar de lípidos extraídos de bacterias BL21 sin transformar. AO estándar de ácido oleico a partir de stock 10mM. Ce-FAR-8, Cb-FAR-08, Cb-FAR-40 y Cb-FAR-41, son las fracciones lipídicas extraídas a partir de 500 μ l de una solución proteínica purificada 150 μ M en PBS. Hm-IST proteína control sin capacidad de unir lípidos. PBS extracción de lípidos de 500 μ l de buffer PBS como control negativo. PE/PC mezcla de fosfolípidos fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina, agregando un total de 100 μ g de cada uno.

IV.B.6 Discusión parcial de los experimentos *in vitro*: Ce-FAR-8 y Cb-FARs

Las proteínas Ce-FAR-8, Cb-FAR-08, Cb-FAR-40 y Cb-FAR-41 se expresaron y purificaron exitosamente, lo cual demuestra que las mismas son capaces de ser producidas en forma recombinante y monomérica a partir de un cultivo bacteriano. Además, los espectros obtenidos por dicroísmo circular demuestran que las mismas poseen una estructura con un plegamiento estable y estructura secundaria rica en alfa hélices, como es lo esperable para proteínas de la familia de las FARs.

Los ensayos de desnaturalización con guanidinio lograron describir una transición de estado plegado a desplegado de las proteínas con valores de C_m altos, lo cual confirma que poseen estructuras muy estables en solución. Los cambios observados en la emisión de fluorescencia de triptofano ante el aumento de agente desnaturalizante, para Ce-FAR-8 y Cb-FAR-08, y el corrimiento del centro de masa de las mismas, indica que los aminoácidos aromáticos se encuentran comprometidos dentro de la cavidad de la proteína. Si bien Cb-FAR-40 y Cb-FAR-41 no poseen triptofanos, también se pudo observar una transición en este tipo de experimento. El hecho de no haber logrado describir la desnaturalización con urea podría deberse a que el poder caotrópico de este agente es menor que el del guanidinio y que las proteínas podrían ser más resistentes a la desnaturalización química. Esto último concuerda con el hecho de que presentan valores de C_m altos para guanidinio.

Gracias al modelado por AlphaFold3, se pudo apreciar que las estructuras predichas para las proteínas Ce-FAR-8, Cb-FAR-08, Cb-FAR-40 y Cb-FAR-41, serían proteínas globulares similares a otras FARs reportadas. Estas poseen una clara cavidad interior donde podrían unir sus ligandos. Particularmente el ácido oleico que fue el ligando incluido en el modelo, se uniría en el interior de esta cavidad y estaría en estrecho contacto con los residuos de triptofano. Esto ha permitido postular el hecho de que la emisión de fluorescencia de dicho residuo estaría afectada ante la presencia del ligando, lo cual se constató para Ce-FAR-8 y es altamente probable que también sea el caso de Cb-FAR-08.

La extracción de lípidos de estas proteínas purificadas y su posterior separación por cromatografía de capa fina evidenció que éstas copurifican con diferentes lípidos. En este caso se vio que las fracciones de Ce-FAR-8, Cb-FAR-08, Cb-FAR-40 y Cb-FAR-41 contenían ácido oleico, fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina. Esto refuerza la hipótesis de que estas proteínas serían capaces de unir lípidos variados en forma selectiva.

En Garofalo et al. 2002, donde se estudiaron por primera vez las proteínas FARs de *C. elegans* en forma exhaustiva, Ce-FAR-8 fue postulada como una proteína lejana dentro de la familia y fue excluida del análisis argumentando que posiblemente no pertenecía a esta familia. Sin embargo, los estudios estructurales y funcionales realizados en esta tesis demostraron lo contrario y Ce-FAR-8 debería ser considerada dentro de la familia de las FARs. Lo mismo ocurre para las nuevas proteínas FARs de *C. bovis*, las cuales deberían ser consideradas dentro de esta familia dada su gran similitud con Ce-FAR-8, tanto en estructura como en comportamiento. En un futuro, realizar ensayos de unión a ligando mediante técnicas fluorimétricas permitiría la obtención de constantes de unión que representen su afinidad por los diferentes lípidos y la confirmación de esta interacción.

Los estudios sobre las especies de *Caenorhabditis* se han centrado en el muestreo de hábitats de vegetación en descomposición, por lo que el mayor número de especies identificadas corresponden a estos nichos ecológicos. Las únicas especies asociadas a vertebrados son *Caenorhabditis plicata*, aislada de carroña y *C. bovis* aislado del canal auricular de Zebú. El análisis del genoma de *C. bovis* ha mostrado una reducción en el tamaño del mismo y una expansión en determinadas familias de proteínas, dentro de las cuales se encuentra la familia de las FARs (Stevens et al., 2020). Si bien aún no se ha confirmado que *C. bovis* sea una especie estrictamente parásita, su comportamiento y hábitat dista mucho de lo usual para el resto de los *Caenorhabditis* aislados. El surgimiento del parasitismo varias veces dentro del phylum y la conquista de diferentes ambientes ha sido una conquista de los nematodos, que se ha logrado gracias a la adaptación evolutiva implicando tanto cambios morfológicos como genéticos (Blaxter et al., 2015). En este trabajo de tesis se logró dar el segundo paso en la exploración del comportamiento particular de *C. bovis*, demostrando que las proteínas FARs de este son factibles de ser sintetizadas, adquieren una estructura en solución y copurifican con lípidos en forma comparable con lo observado para Ce-FAR-8. La diversidad y especialización de estas proteínas parece acompañar la capacidad de los nematodos a adaptarse a nuevos entornos, como lo muestran las proteínas de parásitos de plantas. Profundizar en su estudio podría dar información sobre la importancia de esta familia de proteínas en la adaptación y desarrollo de los nematodos.

V. DISCUSIÓN FINAL

En resumen, la investigación realizada en esta tesis contribuyó al estudio de las proteínas FARs en nematodos, centrándose en los mutantes knockout en *C. elegans*, la expresión y purificación de las proteínas FARs provenientes de *C. bovis* en sistemas bacterianos así como también Ce-FAR-8, la última FAR de *C. elegans* en ser descrita. Adicionalmente se abordó la caracterización funcional de la proteína FAR de *Necator americanus*, con el enfoque particular de la modificación del sitio de fosforilación en Na-far-1.

Las proteínas FARs continúan siendo un misterio y su función aún no puede precisarse. Por un lado, los estudios en *C. elegans* pueden sugerir que al menos Ce-FAR-4 cumpliría un rol específico en el desarrollo reproductivo dado los altos niveles de ARNm en el estadio L4 (Garofalo et al, 2002), el cambio en la curva reproductiva y el ligero retraso en la última etapa de desarrollo hasta el estadio Adulto. Si bien con Ce-FAR-6 también se vio un cambio en la curva de fertilidad, es difícil aseverar que se comporta de la misma manera que Ce-FAR-4. Al igual que ésta, presenta un aumento en su expresión en L4 pero los niveles de ARNm también están aumentados en L3 y en adultos machos y en menor nivel en L2 y adultos hermafroditas (Garofalo et al, 2002). Al no haberse visto cambios en el desarrollo de estos mutantes, podría discutirse que los efectos no afectarían el pasaje de L4 a Adulto, como puede ser el desarrollo de la espermateca, lo cual explicaría la diferencia en niveles de expresión entre adultos hermafroditas y machos.

La publicación del genoma de *C. bovis* fue una guía que despertó el interés en el estudio de la última de las FARs de *C. elegans*, Ce-FAR-8, que aún no había sido caracterizada e incluso era considerada como un miembro muy lejano de la familia. Sin embargo, el interés por esta proteína se reavivó ante el hallazgo que evolutivamente, comparando *C. bovis* con *C. elegans*, se habían perdido todos los genes ortólogos de las diferentes isoformas de FARs exceptuando a Ce-far-8 y que incluso está presentaba tres copias, Cb-far-08, Cb-far-40 y Cb-far-41. Esto podría ser en un futuro un punto clave para comprender la evolución molecular de los nematodos para la adaptación a nuevos nichos ecológicos, pudiendo dar herramientas para entender cómo ha surgido el parasitismo repetidas veces dentro del phylum. En esta tesis se presenta por primera vez la expresión, purificación y estudio de estas proteínas. Los estudios realizados en esta tesis muestran que estas proteínas, una vez obtenidas en formas recombinantes, se pliegan correctamente sin agregarse adquiriendo una conformación espacial rica en

alfa hélices y las mismas unen lípidos; particularmente Ce-FAR-8 y Cb-FAR-08 unen ácidos grasos libres además de PE y PC, mientras que Cb-FAR-40 y Cb-FAR-41 unen PE y PC. Ninguna de estas une colesterol. Además, dada la bibliografía estudiada, estas son las primeras proteínas FAR en ser desnaturalizadas por medios químicos y los resultados sobre su estabilidad son datos novedosos, pudiendo tener incluso repercusión los enfoques futuros sobre el estudio de esta familia de proteínas. Todos los resultados expuestos apoyan fuertemente la hipótesis de que las proteínas de *C. bovis* Cb-FAR-08, Cb-FAR-40 y Cb-FAR-41 pertenecen a la familia de las FARs y que Ce-FAR-8 de *C. elegans* también se debería incluir en la misma.

Por último, los estudios de Na-FAR-1 y la mutante que emula el estado fosforilado de esta proteína, S-31-D mostraron que esta modificación no afecta a la constante de disociación para ácido oleico. Sin embargo, este cambio podría estar afectando la interacción con otros lípidos como fosfolípidos o retinol, los cuales por motivos de tiempos no han podido ser estudiados en esta tesis. Se evidenció la interacción de estos con diferentes fosfolípidos, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y cardiolipina lo cual confirma la hipótesis y sugiere que estas proteínas podrían ejercer su función mediante la interacción con membranas.

VI. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos con el modelo *C. elegans*, utilizando modelos knock out, demuestran que la proteína Ce-FAR-4 es una proteína que se relaciona con su desarrollo madurativo en la muda de Larva 4 a adulto y con su reproducción, sin afectar el número total de postura pero retardando el ritmo reproductivo de este gusano. A su vez, Ce-FAR-6 tendría un rol similar en la reproducción, pero no así en el desarrollo de los gusanos. También se ve una tendencia de Ce-FAR-3 de afectar el envejecimiento reproductivo de los adultos, ante el silenciamiento de este gen y observar la presencia de eclosión interna por retención de huevos. Al no haber visto efectos similares en el knock out de Ce-FAR-2 o en el silenciamiento de los otros genes de FARs, se puede inferir que su función se relacionaría con otros procesos.

Con respecto al estado fosforilado de la proteína FAR del nematode parásito *N. americanus*, Na-far-1 con una sustitución de la serina 31 por un ácido aspártico, se puede decir que la proteína es capaz de unir ligandos hidrofóbicos en ambos estados, pero la simulación no modifica la afinidad que posee esta proteína por el ácido oleico o la sonda DAUDA. Por otro lado, se evidenció que esta proteína es capaz de interactuar con fosfolípidos, lo cual refuerza lo hallado en otras proteínas FARs de parásitos, pudiendo ser este el mecanismo para modular las respuestas inmunes de hospedadores.

La evidencia de esta tesis confirma que Ce-FAR-8 es miembro de las proteínas FARs dada su estructura rica en alfa hélice, determinado por modelado por Alphafold y dicróismo circular, y capacidad de unir ácido oleico y fosfolípidos, determinado por TLC. Más aún, se puede asegurar que las proteínas homólogas presentes en *C. bovis* (Cb-FAR-08, Cb-FAR-40, Cb-FAR-41) lograron expresarse y purificarse en forma recombinante y juntamente con lo hallado para Ce-FAR-8 se ha confirmado por dicróismo circular y cromatografía en capa fina que poseen estructuras ricas en alfa hélices y unen ácidos grasos y fosfolípidos. Además, estas proteínas presentaron una alta estabilidad en solución.

VII. PERSPECTIVAS

Por todo lo dicho en la presente tesis, pueden postularse varias proyecciones sobre las cuales trabajar para enriquecer el conocimiento de las proteínas FAR.

En primera instancia, se propone profundizar sobre el estudio del sitio de fosforilación conservado en esta familia de proteínas. Dado que se cuenta con la proteína Na-FAR-1 y la proteína mutada S-31-D que simula la fosforilación de la misma, se demostró que esta modificación no habría variado la interacción con ácidos grasos, pero aún queda por explorar lo que sucede con otros ligandos como el retinol y si esta modificación afecta la estabilidad de la proteína.

Un resultado novedoso ha sido la confirmación de la interacción de estas proteínas con fosfolípidos, como se vio para el caso de Na-FAR-1, S-31-D, Ce-FAR-8 y las FARs de *C. bovis*. Esto abre un nuevo campo de estudio para las proteínas FAR, sobre el cual se pueden realizar experimentos de interacción proteínas-membranas. Además puede evaluarse el desplazamiento de la interacción con sonda fluorescente con diferentes fosfolípidos para comprobar si estos se unen a los mismo sitios donde se unen los ácidos grasos.

Los resultados obtenidos en esta tesis con las proteínas FARs de *C. bovis*, han sido los primeros en su campo y confirman las anotaciones de estas proteínas en el genoma de *C. bovis*. Continuar su caracterización estructural y funcional, con ensayos de unión a sondas fluorescentes, ácidos grasos y retinol, serán resultados novedosos que reforzarán los hallazgos de esta tesis.

Por último, del universo de las proteínas FARs de *Caenorhabditis* creo importante completar los estudios sobre la proteína Ce-FAR-8, utilizando ensayos *in vitro* para determinar su afinidad por retinol, estabilidad térmica, posibles diferencias entre formas con y sin ligando (holo- y apo-), además de explorar esta proteína utilizando el modelo *C. elegans*, midiendo sus niveles de expresión en cada estadio de desarrollo, analizando en detalle el silenciamiento de su expresión o empleando cepas mutantes knock out disponibles.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abramson, J., et al. (2024). Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*.
- Altun, Z.F. and Hall, D.H. 2024. Handbook of *C. elegans* Anatomy. In *WormAtlas*. <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/hermaphroditehomepage.htm>
- Barletta, G. P., Franchini, G., Corsico, B., & Fernandez-Alberti, S. (2019). Fatty Acid and Retinol-Binding Protein: Unusual Protein Conformational and Cavity Changes Dictated by Ligand Fluctuations. *Journal of chemical information and modeling*, 59(8), 3545–3555. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00364>
- Barrett J. Developmental aspects of metabolism in parasites. *Int J Parasitol.* 1987 Feb 1;17(1):105–10.
- Basavaraju, S. V., Zhan, B., Kennedy, M. W., Liu, Y., Hawdon, J., & Hotez, P. J. (2003). Ac-FAR-1, a 20 kDa fatty acid- and retinol-binding protein secreted by adult *Ancylostoma caninum* hookworms: gene transcription pattern, ligand binding properties, and structural characterisation. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 126(1), 63–71. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(02\)00253-0](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(02)00253-0)
- Bělař, K. (1923). Über den Chromosomenzyklus von parthenogenetischen Erdnematoden. *Biol. Zbl.*, 43, 513-518.
- Bělař, K. (1924). Die Cytologie der Merospermie bei freilebenden *Rhabditis*-Arten. *Z. f. Zellen und Gewebelehre*, 1, 1-21.
- Blaxter, M. L. (2003). *Nematoda*: genes, genomes and the evolution of parasitism. *Advances in Parasitology*, 54, 101-195. doi: 10.1016/s0065-308x(03)54003-9. PMID: 14711085.
- Blaxter, M. L., De Ley, P., Garey, J. R., Liu, L. X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J. R., Mackey, L. Y., Dorris, M., Frisse, L. M., Vida, J. T., & Thomas, W. K. (1998). A molecular evolutionary framework for the phylum *Nematoda*. *Nature*, 392(6671), 71–75. <https://doi.org/10.1038/32160>
- Blaxter, M., & Koutsovoulos, G. (2015). The evolution of parasitism in *Nematoda*. *Parasitology*, 142, S26–S39. <https://doi.org/10.1017/S0031182014000791>
- Bosch, F., Palmeirim, M. S., Ali, S. M., Ame, S. M., Hattendorf, J., & Keiser, J. (2021). Diagnosis of soil-transmitted helminths using the Kato-Katz technique: What is the influence of stirring, storage time and storage temperature on stool sample egg counts? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(1), e0009032. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009032>
- Boulin, T., Etchberger, J. F., & Hobert, O. (2006). Reporter gene fusions (April 5, 2006). *WormBook*, ed. *The C. elegans Research Community*. WormBook doi/10.1895/wormbook.1.106.1 <http://www.wormbook.org>.
- Bradley, J. E., Nirmalan, N., Kläger, S. L., Faulkner, H., & Kennedy, M. W. (2001). River blindness: a role for parasite retinoid-binding proteins in the generation of pathology?. *Trends in parasitology*, 17(10), 471–475. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(01\)02036-0](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(01)02036-0)
- Braeckman, B. P., Houthoofd, K., & Vanfleteren, J. R. (2009). Intermediary metabolism. *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology*, 1–24. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.146.1>
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1), 71-94. doi: 10.1093/genetics/77.1.71. PMID: 4366476; PMCID: PMC1213120.
- Brenner, S. (1988). Foreword. In *The Nematode Caenorhabditis elegans*, W. B. Wood (Ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. ix-xiii.
- Brenner, S. (2009). In the beginning was the worm. *Genetics*, 182(2), 413-415. doi: 10.1534/genetics.109.104976. PMID: 19506024; PMCID: PMC2691750.
- Brooker, S., Bethony, J., & Hotez, P. J. (2004). Human hookworm infection in the 21st century. *Advances in parasitology*, 58, 197–288. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(04\)58004-1](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(04)58004-1)
- Brooker, S., Hotez, P. J., & Bundy, D. A. (2008). Hookworm-related anaemia among pregnant women: a systematic review. *PLoS neglected tropical diseases*, 2(9), e291. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000291>

- Burbelo, P. D., Leahy, H. P., Iadarola, M. J., & Nutman, T. B. (2009). A four-antigen mixture for rapid assessment of *Onchocerca volvulus* infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(5), e438. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000438>
- Caenorhabditis elegans Center acknowledging (<https://cgc.umn.edu/>): “Some strains were provided by the CGC which is funded by NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440).”
- Cardona, J., González, M., & Álvarez, J. (2010). Otitis bovina por *Rhabditis bovis* en Córdoba, Colombia. Reporte de dos casos. *Revista MVZ Córdoba*, 15(3). <https://doi.org/10.21897/rmvz.311>
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148), 802–805. <https://doi.org/10.1126/science.8303295>
- Chiu, J., March, P. E., Lee, R., & Tillett, D. (2004). Site-directed Ligase-Independent Mutagenesis (SLIM): a single-tube methodology approaching 100% efficiency in 4 h. *Nucleic Acids Research*, 32(21), e174. <https://doi.org/10.1093/nar/gnh172>
- Cobb, N. A. (1914). Contributions to a science of nematology. Williams & Wilkins Co. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/60573>
- Collins, J. J., Evason, K., Pickett, C. L., Schneider, D. L., & Kornfeld, K. (2008). The anticonvulsant ethosuximide disrupts sensory function to extend *C. elegans* lifespan. *PLoS Genetics*, 4(10), e1000230. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000230>
- Collins, J. J., Huang, C., Hughes, S., & Kornfeld, K. (2008). The measurement and analysis of age-related changes in *Caenorhabditis elegans*. *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology*, 1–21. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.137.1>
- Cook, S. J., Jarrell, T. A., Brittin, C. A., Wang, Y., Bloniarz, A. E., Yakovlev, M. A., Nguyen, K. C. Q., Tang, L. T., Bayer, E. A., Duerr, J. S., Bülow, H. E., Hobert, O., Hall, D. H., & Emmons, S. W. (2019). Whole-animal connectomes of both *Caenorhabditis elegans* sexes. *Nature*, 571(7763), 63–71. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1352-7>
- Corsi, A. K., Wightman, B., & Chalfie, M. (2015). A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 200(2), 387–407. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.176099>
- Cox, F. E. (2004). History of human parasitic diseases. *Infectious Disease Clinics of North America*, 18(2). <https://doi.org/10.1016/j.idc.2004.01.001>
- Croll, N. A., Smith, J. M., & Zuckerman, B. M. (1977). The aging process of the nematode *Caenorhabditis elegans* in bacterial and axenic culture. *Experimental Aging Research*, 3(3), 175–189. <https://doi.org/10.1080/03610737708257101>
- Curran, S. P. (Ed.). (n.d.). Aging methods and protocols. <http://www.springer.com/series/7651>
- Ding, S., Xu, C., Chen, C., Li, J., Wang, J., & Xie, H. (2021). Novel functions of the fatty acid and retinol binding protein (FAR) gene family revealed by fungus-mediated RNAi in the parasitic nematode *Aphelenchoides besseyi*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 10057. <https://doi.org/10.3390/ijms221810057>
- Dyballa, N., & Metzger, S. (2009). Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *Journal of Visualized Experiments*, (30), 1431. doi: 10.3791/1431. PMID: 19684561; PMCID: PMC3149902.
- Escorcía, W., Ruter, D. L., Nhan, J., & Curran, S. P. (2018). Quantification of lipid abundance and evaluation of lipid distribution in *Caenorhabditis elegans* by Nile Red and Oil Red O staining. *Journal of Visualized Experiments*, (133), 57352. doi: 10.3791/57352. PMID: 29553519; PMCID: PMC5931440.
- Fairfax, K. C., Vermeire, J. J., Harrison, L. M., Bungiro, R. D., Grant, W., Husain, S. Z., & Cappello, M. (2009). Characterisation of a fatty acid and retinol binding protein orthologue from the hookworm *Ancylostoma ceylanicum*. *International Journal for Parasitology*, 39(14), 1561–1571. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.06.005>
- Fay, D. S. (2013). Classical genetic methods. In The *C. elegans* Research Community (Ed.), *WormBook*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.165.1>
- Feinberg, E. H., Vanhoven, M. K., Bendesky, A., Wang, G., Fetter, R. D., Shen, K., & Bargmann, C. I. (2008). GFP reconstitution across synaptic partners (GRASP) defines cell contacts and

- synapses in living nervous systems. *Neuron*, 57(3), 353–363. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.11.030>
- Félix, M. A. (2008). RNA interference in nematodes and the chance that favored Sydney Brenner. *Journal of Biology*, 7(9), 34. <https://doi.org/10.1186/jbiol97>
- Ferris, H., Griffiths, B. S., Porazinska, D. L., Powers, T. O., Wang, K. H., & Tenuta, M. (2012). Reflections on plant and soil nematode ecology: past, present and future. *Journal of Nematology*, 44(2), 115–126.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497–509.
- Franchini GR, Curto LM, Caramelo JJ, Delfino JM. Dissection of a beta-barrel motif leads to a functional dimer: the case of the intestinal fatty acid binding protein. *Protein Sci*. 2009 Dec;18(12):2592-602. doi: 10.1002/pro.273. PMID: 19844951; PMCID: PMC2821277.
- Franchini GR, Pórfido JL, Ibáñez Shimabukuro M, Rey Burusco MF, Bélgamo JA, Smith BO, Kennedy MW, Córscico B. The unusual lipid binding proteins of parasitic helminths and their potential roles in parasitism and as therapeutic targets. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2015 Feb;93:31-6. doi: 10.1016/j.plefa.2014.08.003. Epub 2014 Aug 28. PMID: 25282399.
- Frézal, L., & Félix, M. A. (2015). *C. elegans* outside the Petri dish. *eLife*, 4, e05849. <https://doi.org/10.7554/eLife.05849>
- Garofalo, A., Kläger, S. L., Rowlinson, M. C., Nirmalan, N., Klion, A., Allen, J. E., Kennedy, M. W., & Bradley, J. E. (2002). The FAR proteins of filarial nematodes: secretion, glycosylation, and lipid binding characteristics. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 122(2), 161–170. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(02\)00097-x](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(02)00097-x)
- Garofalo, A., Rowlinson, M. C., Amambua, N. A., Hughes, J. M., Kelly, S. M., Price, N. C., Cooper, A., Watson, D. G., Kennedy, M. W., & Bradley, J. E. (2003). The FAR protein family of the nematode *Caenorhabditis elegans*: Differential lipid binding properties, structural characteristics and developmental regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 8065–8074. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206278200>
- Gasbarre, L. C. (2014). Anthelmintic resistance in cattle nematodes in the US. *Veterinary Parasitology*, 204(1-2), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.017>
- Giorello, A. N. (2023). *Identificación y caracterización de proteínas específicas del nematode parásito Dioctophyme renale*. Búsqueda de marcadores diagnósticos. Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Ciencias Biológicas. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/162083>
<https://doi.org/10.35537/10915/162083>
- Ghodeif, A. O., & Jain, H. (2023). Hookworm. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Hart, A. (2006a). Behavior. *WormBook*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.87.1>
- Hart, A. (2006b). Behavior of the *C. elegans*. *WormBook*, 1–67. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.87.1>
- Hertwig, P. (1922). Beobachtungen über die Fortpflanzungsweise und die systematische Einteilung der Regenwurm-nematoden. *Z. wiss. Zool.*, 119, 539-558.
- Hewitson, J. P., Grainger, J. R., & Maizels, R. M. (2009). Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 167(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.04.008>
- Hirsh, D., Oppenheim, D., & Klass, M. (1976). Development of the reproductive system of *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 49(1), 200–219. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(76\)90267-0](https://doi.org/10.1016/0012-1606(76)90267-0)
- Honda, H. (1925). Experimental and cytological studies on bisexual and hermaphrodite free-living nematodes with special reference to problems of sex. *J. Morph. Physiol.*, 40, 191-233.
- Hu, P. J. (2007). Dauer. In *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology* (pp. 1–19). <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.144.1>

- Husson, S. J., Gottschalk, A., & Leifer, A. M. (2013). Optogenetic manipulation of neural activity in *C. elegans*: from synapse to circuits and behaviour. *Biology of the Cell*, 105(6), 235–250. <https://doi.org/10.1111/boc.201200069>
- Iberkleid, I., Vieira, P., de Almeida Engler, J., Firester, K., Spiegel, Y., & Horowitz, S. B. (2013). Fatty acid-and retinol-binding protein Mj-FAR-1 induces tomato host susceptibility to root-knot nematodes. *PLoS One*, 8(5), e64586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064586>
- Iberkleid, I., Sela, N., & Brown Miyara, S. (2015). *Meloidogyne javanica* fatty acid- and retinol-binding protein (Mj-FAR-1) regulates expression of lipid-, cell wall-, stress-, and phenylpropanoid-related genes during nematode infection of tomato. *BMC Genomics*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1426-3>
- Jarrell, T. A., Wang, Y., Bloniarz, A. E., Brittin, C. A., Xu, M., Thomson, J. N., Albertson, D. G., Hall, D. H., & Emmons, S. W. (2012). The connectome of a decision-making neural network. *Science*, 337(6093), 437–444. <https://doi.org/10.1126/science.1221762>
- Jordanova, R., Groves, M. R., Kostova, E., Woltersdorf, C., Liebau, E., & Tucker, P. A. (2009). Fatty acid- and retinoid-binding proteins have distinct binding pockets for the two types of cargo. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(51), 35818–35826. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.022731>
- Kamath, R. S., & Ahringer, J. (2003). Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods*, 30(4), 313–321. [https://doi.org/10.1016/s1046-2023\(03\)00050-1](https://doi.org/10.1016/s1046-2023(03)00050-1)
- Kelly, S. M., Jess, T. J., & Price, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1751(2), 119–139. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.06.005>
- Kennedy, M. W., Garside, L. H., Goodrick, L. E., McDermott, L., Brass, A., Price, N. C., Kelly, S. M., Cooper, A., & Bradley, J. E. (1997). The Ov20 protein of the parasitic nematode *Onchocerca volvulus*: a structurally novel class of small helix-rich retinol-binding proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(47), 29442–29448. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.47.29442>
- Kerr, R. A., & Schafer, W. R. (2006). Intracellular Ca²⁺ imaging in *C. elegans*. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 351, pp. 253–264). <https://doi.org/10.1385/1-59745-151-7:253>
- Kitvatanachai, S., Taylor, A., Rhongbuttsri, P., & Taylor, W. R. J. (2019). Modified Harada-Mori and simple wet mount to determine hookworm infections in Yo Island urban area, Songkhla, Southern Thailand. *Tropical Medicine and Health*, 47, 27. doi: 10.1186/s41182-019-0156-7. PMID: 31049017; PMCID: PMC6480842.
- Kiontke, K., & Sudhaus, W. (2006). Ecology of *Caenorhabditis* species. *WormBook*. doi: 10.1895/wormbook.1.37.1. PMID: 18050464; PMCID: PMC4780885.
- Klass, M. R. (1977). Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*: major biological and environmental factors influencing life span. *Mechanisms of Ageing and Development*, 6(6), 413–429. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(77\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0047-6374(77)90043-4)
- Kozubsky, L., & Costas, M. E. (2017). Parasitología humana para bioquímicos: Parásitos intestinales. La Plata, Argentina: Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).
- Krüger, E. (1913). Fortpflanzung und Keimzellenbildung von *Rhabditis aberrans* nov. sp. *Z. wiss. Zool.*, 105, 87-124.
- Kuang L, Colgrave ML, Bagnall NH, Knox MR, Qian M, Wijffels G. The complexity of the secreted NPA and FAR lipid-binding protein families of *Haemonchus contortus* revealed by an iterative proteomics-bioinformatics approach. *Mol Biochem Parasitol*. 2009 Nov;168(1):84-94. doi: 10.1016/j.molbiopara.2009.07.001. Epub 2009 Jul 15. PMID: 19615410.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lakowicz, J. R. (1999). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Lee, D. L. (Ed.). (2002). *The Biology of Nematodes* (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b12614>
- Logan, J., Pearson, M. S., Manda, S. S., Choi, Y. J., Field, M., Eichenberger, R. M., Mulvenna, J., Nagaraj, S. H., Fujiwara, R. T., Gazzinelli-Guimaraes, P., Bueno, L. L., Mati, V., Bethony, J. M., Mitreva, M., Sotillo, J., & Loukas, A. (2020). Comprehensive analysis of the secreted proteome

- of adult *Necator americanus* hookworms. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(5), e0008237. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008237>
- Loukas, A., Hotez, P. J., Diemert, D., Yazdanbakhsh, M., McCarthy, J. S., Correa-Oliveira, R., Croese, J., & Bethony, J. M. (2016). Hookworm infection. *Nature reviews. Disease primers*, 2, 16088. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.88>
- Lu, H., Olsen, A., Ben-Yakar, A., Furger, A. M., Tan, M., Adelaide, C., Lyon, L., Schroeder, F., Sluder, A., Christian, G., Golden, A., & Fisher, A. (2005). All registered worm labs.
- Luo, C., Poinar, G. O., Xu, C., Zhuo, D., Jarzembowski, E. A., & Wang, B. (2023). Widespread mermithid nematode parasitism of Cretaceous insects. *eLife*, 12, e86283. <https://doi.org/10.7554/eLife.86283>
- Meng, E. C., Goddard, T. D., Pettersen, E. F., Couch, G. S., Pearson, Z. J., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2023). UCSF ChimeraX: Tools for structure building and analysis. *Protein Science*, 32(11), e4792. doi: 10.1002/pro.4792. PMID: 37774136; PMCID: PMC10588335.
- Menghi, C., Iuvaro, F., Dellacasa, M., & Gatta, C. (2007). Survey of intestinal parasites among an aboriginal community in Salta. *Medicina*, 67, 705–708.
- Msolla, P., Semuguruka, W. D., Kasuku, A. A., & Shoo, M. K. (1993). Clinical observations on bovine parasitic otitis in Tanzania. *Tropical Animal Health and Production*, 25(1), 15–18. <https://doi.org/10.1007/BF02236880>
- Mukhopadhyay, A., & Tissenbaum, H. A. (2007). Reproduction and longevity: secrets revealed by *C. elegans*. *Trends in Cell Biology*, 17(2), 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.12.004>
- Munnik, T., & Wierchowicka, M. (2013). Lipid-binding analysis using a fat blot assay. *Methods in Molecular Biology*, 1009, 253–259. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-401-2_23
- Neher, D. A. (2010). Ecology of plant and free-living nematodes in natural and agricultural soil. *Annual Review of Phytopathology*, 48, 371–394. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114439>
- Nigon, V. M., & Félix, M. A. (2017). History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms. *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology*, 2017, 1–84. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.181.1>
- Nirmalan, N., Cordeiro, N. J., Kläger, S. L., Bradley, J. E., & Allen, J. E. (1999). Comparative analysis of glycosylated and nonglycosylated filarial homologues of the 20-kilodalton retinol binding protein from *Onchocerca volvulus* (Ov20). *Infection and Immunity*, 67(12), 6329–6334. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.12.6329-6334.1999>
- Obal, G., Ramos, A. L., Silva, V., Lima, A., Batthyany, C., Bessio, M. I., Ferreira, F., Salinas, G., & Ferreira, A. M. (2012). Characterisation of the native lipid moiety of *Echinococcus granulosus* antigen B. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(5), e1642. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001642>
- Park, H. H., Jung, Y., & Lee, S. V. (2017). Survival assays using *Caenorhabditis elegans*. *Molecules and Cells*, 40(2), 90–99. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0017>
- Parks, S. C., Nguyen, S., Boulanger, M. J., & Dillman, A. R. (2022). The FAR protein family of parasitic nematodes. *PLoS Pathogens*, 18(4), e1010424. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010424>
- Parks, S. C., Nguyen, S., Nasrolahi, S., Bhat, C., Juncaj, D., Lu, D., Ramaswamy, R., Dhillon, H., Fujiwara, H., Buchman, A., Akbari, O. S., Yamanaka, N., Boulanger, M. J., & Dillman, A. R. (2021). Parasitic nematode fatty acid- and retinol-binding proteins compromise host immunity by interfering with host lipid signaling pathways. *PLoS Pathogens*, 17(10), e1010027. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010027>
- Periago, M. V., Diniz, R. C., Pinto, S. A., Yakovleva, A., Correa-Oliveira, R., Diemert, D. J., & Bethony, J. M. (2015). The right tool for the job: Detection of soil-transmitted helminths in areas co-endemic for other helminths. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(8), e0003967. doi: 10.1371/journal.pntd.0003967. PMID: 26241329; PMCID: PMC4524677.
- Phani, V., Shivakumara, T. N., Davies, K. G., & Rao, U. (2017). *Meloidogyne incognita* fatty acid- and retinol-binding protein (Mi-FAR-1) affects nematode infection of plant roots and the attachment of *Pasteuria penetrans* endospores. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2122. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02122>

- Prior, A., Jones, J. T., Blok, V. C., Beauchamp, J., McDermott, L., Cooper, A., & Kennedy, M. W. (2001). A surface-associated retinol- and fatty acid-binding protein (Gp-FAR-1) from the potato cyst nematode *Globodera pallida*: lipid binding activities, structural analysis, and expression pattern. *The Biochemical Journal*, 356(Pt 2), 387–394. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3560387>
- Raizen, D. M., Zimmerman, J. E., Maycock, M. H., Ta, U. D., You, Y. J., Sundaram, M. V., & Pack, A. I. (2008). Lethargus is a *Caenorhabditis elegans* sleep-like state. *Nature*, 451(7178), 569–572. <https://doi.org/10.1038/nature06535>
- Rey-Burusco, M. F. (2014). *Diversidad en las estructuras y sitios de unión de ligandos de las proteínas de unión a ácidos grasos y retinol de nematodos reveladas por Na-FAR-1 de Necator americanus*. Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/34308>. <https://doi.org/10.35537/10915/34308>
- Rey-Burusco, M. F., Ibáñez-Shimabukuro, M., Gabrielsen, M., Franchini, G. R., Roe, A. J., Griffiths, K., Zhan, B., Cooper, A., Kennedy, M. W., Córscico, B., & Smith, B. O. (2015). Diversity in the structures and ligand-binding sites of nematode fatty acid and retinol-binding proteins revealed by Na-FAR-1 from *Necator americanus*. *The Biochemical Journal*, 471(3), 403–414. <https://doi.org/10.1042/BJ20150068>
- Rual, J. F., Ceron, J., Koreth, J., Hao, T., Nicot, A. S., Hirozane-Kishikawa, T., Vandenhaute, J., Orkin, S. H., Hill, D. E., van den Heuvel, S., & Vidal, M. (2004). Toward improving *Caenorhabditis elegans* phenome mapping with an ORFeome-based RNAi library. *Genome Research*, 14(10B), 2162–2168. <https://doi.org/10.1101/gr.2505604>
- Sambrook, J. P., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Vol. 1, 2, and 3). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santoro, M. M., & Bolen, D. W. (1988). Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry*, 27(21), 8063–8068. <https://doi.org/10.1021/bi00421a014>
- Scharf, A., Pohl, F., Egan, B. M., Kocsisova, Z., & Kornfeld, K. (2021). Reproductive aging in *Caenorhabditis elegans*: From molecules to ecology. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 718522. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.718522>
- Servián, A., Repetto, S. A., Lorena Zonta, M., & Navone, G. T. (2022). Human hookworms from Argentina: Differential diagnosis of *Necator americanus* and *Ancylostoma duodenale* in endemic populations from Buenos Aires and Misiones. *Revista Argentina de Microbiología*, 54(4), 268–281. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2022.05.005>
- Smith, L. (2011). The Kahun Gynaecological Papyrus: ancient Egyptian medicine. *The Journal of Family Planning and Reproductive Health Care*, 37(1), 54–55. <https://doi.org/10.1136/jfprhc.2010.0019>
- SnapGene® software (from Dotmatics; available at snapgene.com)
- Socías, M. E., Fernández, A., Gil, J. F., & Krolewiecki, A. J. (2014). Geohelminthiasis en la Argentina. Una revisión sistemática [Soil transmitted helminthiasis in Argentina. A systematic review]. *Medicina*, 74(1), 29–36.
- Stein K.K., Golden A. The *C. elegans* eggshell. (August 2, 2018), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.179.1, <http://www.wormbook.org>.
- Stevens, L., Rooke, S., Falzon, L. C., Machuka, E. M., Momanyi, K., Murungi, M. K., Njoroge, S. M., Odinga, C. O., Ogendo, A., Ogola, J., Fèvre, E. M., & Blaxter, M. (2020). The genome of *Caenorhabditis bovis*. *Current Biology*, 30(6), 1023–1031.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.01.074>
- Stiernagle, T. (2006). Maintenance of *C. elegans*. *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology*, 1–11. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.101.1>
- Storey, D. M. (1982). Vitamin A deficiency and the development of *Litomosoides carinii* (Nematoda: Filarioidea) in cotton rats. *Zeitschrift für Parasitenkunde (Berlin, Germany)*, 67(3), 309–315. <https://doi.org/10.1007/BF00927666>
- Strydom, T., Lavan, R. P., Torres, S., & Heaney, K. (2023). The economic impact of parasitism from nematodes, trematodes, and ticks on beef cattle production. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 13(10), 1599. <https://doi.org/10.3390/ani13101599>

- Sturchler, D., Wyss, F., & Hanck, A. (1981). Retinol, onchocerciasis and *Onchocerca volvulus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(4), 617. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(81\)90230-3](https://doi.org/10.1016/0035-9203(81)90230-3)
- Tabara, H., Grishok, A., & Mello, C. C. (1998). RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science*, 282(5388), 430–431. <https://doi.org/10.1126/science.282.5388.430>
- Tanaka, T., Ikita, K., Ashida, T., Motoyama, Y., Yamaguchi, Y., & Satouchi, K. (1996). Effects of growth temperature on the fatty acid composition of the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *Lipids*, 31(11), 1173–1178. <https://doi.org/10.1007/BF02524292>
- Tanaka, T., Izuwa, S., Tanaka, K., Yamamoto, D., Takimoto, T., Matsuura, F., & Satouchi, K. (1999). Biosynthesis of 12-dieicosapentaenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine in *Caenorhabditis elegans*. *European Journal of Biochemistry*, 263(1), 189–195. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00480.x>
- Timmons, L., Court, D. L., & Fire, A. (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, 263(1-2), 103–112. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(00\)00579-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(00)00579-5)
- Tree, T. I., Gillespie, A. J., Shepley, K. J., Blaxter, M. L., Tuan, R. S., & Bradley, J. E. (1995). Characterisation of an immunodominant glycoprotein antigen of *Onchocerca volvulus* with homologues in other filarial nematodes and *Caenorhabditis elegans*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 69(2), 185–195. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(94\)00204-z](https://doi.org/10.1016/0166-6851(94)00204-z)
- Trompoukis, C., German, V., & Falagas, M. E. (2007). From the roots of parasitology: Hippocrates' first scientific observations in helminthology. *The Journal of Parasitology*, 93(4), 970–972. <https://doi.org/10.1645/GE-1178R1.1>
- Vieira, P., Kamo, K., & Eisenback, J. D. (2017). Characterization and silencing of the fatty acid- and retinol-binding *Pp-far-1* gene in *Pratylenchus penetrans*. *Plant Pathology*, 66(7), 1214–1224. <https://doi.org/10.1111/ppa.12664>
- Wang, F. Y., & Ching, T. T. (2021). Oil Red O staining for lipid content in *Caenorhabditis elegans*. *Bio-protocol*, 11(16), e4124. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4124>
- Watts, J. L., & Ristow, M. (2017). Lipid and carbohydrate metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 207(2), 413–446. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300106>
- White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N., & Brenner, S. (1986). The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 314(1165), 1–340. <https://doi.org/10.1098/rstb.1986.0056>
- Global report on neglected tropical diseases 2024: executive summary. Geneva: World Health Organization; 2024. <https://doi.org/10.2471/B09040>
- Wiscovitch-Russo, R. A., Santiago-Rodriguez, T. M., & Toranzos, G. A. (2023). Deciphering diets and lifestyles of prehistoric humans through paleoparasitology: A review. *Genes*, 14(2), 303. <https://doi.org/10.3390/genes14020303>
- Wood, C. L., & Johnson, P. T. J. (2015). A world without parasites: Exploring the hidden ecology of infection. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 13(8), 425–434. <https://doi.org/10.1890/140368>
- Zhou, L., Chen, F., Pan, H., Ye, J., Dong, X., Li, C., & Lin, F. (2016). Identifying virulence-associated genes using transcriptomic and proteomic association analyses of the plant parasitic nematode *Bursaphelenchus mucronatus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1492. <https://doi.org/10.3390/ijms17091492>

VIII. ANEXO

S1.Secuenciados obtenidos de las diferentes construcciones plasmídicas empleadas en esta tesis:

>Na-FAR-1_T7promoter (1070 bp)

GAGGAGACGTCGTTCCCTCTAGAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATA
CCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATAGCAGCGGTCATATGTTCAAATA
CGAAGATATTCCGGCAGATTATCGTGATCTGATGCCACCGGAAGCGCGTGATTT
TCTGCAGAACCTGTCTGATGGCGATAAAACCGTGCTGAAAGAAGTGTTTAAAGC
GGGTCCGTATAAAAACACCGAAGAAAGCATTGCGGCACTGAAAAAAAAATCTCC
GGAAGTGGGTGCGAAAGTGAAAAACTGCACGCAATGGTGAAAAGCAAATTG
CAGCGCTGGGTCCGGAAGCGAAAGGCTTTGCGGAAAAAAGCATTGAAATTGCG
CGTGGCATTAAAGCGCGTTATTATACCGGCAACGAACCGACCAAAGATGATCTG
AAAGCGAGCGTGAAAGAAGTGCTGAAACTGTATAAAGCCATGTCTGATGCGGG
TAAAGCGGATTTTGGCAAACAGTTTCCGTTTCTGGCCAAAGTGTTTCGAAAGCGG
CAAAGCGGCAAATTCGCGGGTGAAAACATAAGGATCCGGCTGCTAACAAAG
CCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAA
CCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAAC
TATATCCGGATATCCCGCAAGAGGCCCGGCAGTACCGGCATAACCAAGCCTATG
CCTACAGCATCCAGGGTGACGGTGCCGAGGATGACGATGAGCGCATTGTTAGA
TTTCATACACGGTGCCTGACTGCGTTAGCAATTTAACTGTGATAAACTACCGCAT
TAAAGCTTATCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTCTTGAAGACGAAAGGGC
CTCGTGATACGCCTATTTTTATAGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACG
TCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCT
AAATACATTCAAAAAGGTATCCCGCTCATGAGAACAATAACCC

>S31D_T7promoter (1246 bp)

TGTTGAAACGGTCATTTCCCTCTAGAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATA
TACCATGGGCAGCAGCCATCATAAGCATCATCATAGCAGCGGTCATATGTTCAA
TACGAAGATATTCCGGCAGATTATCGTGATCTGATGCCACCGGAAGCGCGTGAT
TTTCTGCAGAACCTGGATGATGGCGATAAAACCGTGCTGAAAGAAGTGTTTAA
GCGGGTCCGTATAAAAACACCGAAGAAAGCATTGCGGCACTGAAAAAAAAATCT
CCGGAAGTGGGTGCGAAAGTGAAAAACTGCACGCAATGGTGAAAAGCAAAT
TGCAGCGCTGGGTCCGGAAGCGAAAGGCTTTGCGGAAAAAAGCATTGAAATTG
CGCGTGGCATTAAAGCGCGTTATTATACCGGCAACGAACCGACCAAAGATGATC

TGAAAGCGAGCGTGAAAGAAGTGCTGAAACTGTATAAAGCCATGTCTGATGCG
GGTAAAGCGGATTTTGGCAAACAGTTTCCGTTTCTGGCCAAAGTGTTTCGAAAGC
GGCAAAGCGGCAAATTCGCGGGTGAAACTAATAGGATCCGGCTGCTAACAA
AGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCAT
AACCCCTTGGGGCCTCTAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGA
ACTATATCCGGATATCCCGCAAGAGGCCCGGCAGTACCGGCATAACCAAGCCTA
TGCCTACAGCATCCAGGGTGACGGTGCCGAGGATGACGATGAGCGCATTGTTA
GATTTACATACCGGTGCCTGACTGCGTTAGCAATTTAACTGTGATAAACTACCGC
ATTAAAGCTTATCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTCTTGAAGACGAAAGG
GCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGA
CGTCAGGTGGCACTTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTT
TCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCT
TCAATAATATTGAAAAAGGGAAAAATTTTGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCT
TATTCCTTTTTTTCGGGCATTTTGCCTCCCGTTTTTGCACCCAGAAACC
TGGGGAAAAATAAAAAAACTTAGAAAACCTTGTGGGGGCCAAAAGGGGGGGA

>Ce-far-8_T7 (1252 bp)

ATGTTGGAACGGTACATTCCCTCTAGAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGAT
ATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCG
CGCGGCAGCCATATGGCTAGCCGCCCGCTGAAGAACAAATGACCGAGAAGG
ATTTTACAACTTGGTGTTCACTGTGGAGAAGTTTGATCAAATTTGAAGGCCTA
TTCTGAATACAAACAATTCATGCCTTCTTACGTTCTGGAACCACTTGATAACATCA
CCGACGAACAGAAAACCTCAGGCAGTTCAGATGGTGAATGACTATCACGCAGGC
AAGTTTGAGCCGAAGAAGTACGATGAGTACATCGCAATCATGAAGAAGAGCTAT
CCAGCATTGGCAGGTCCATATGAGACAATGTACAACAAGTACAAAGAAGAGGTT
GCCAAATTGGGACCAAAGGGACAAGAATATTGCAATGGGCTCGAAGCTCAAATG
TACACCGATGCCTCCCCTGACCGTGTTGTCTGGGCTTGCCATATCTTCAACAAT
GCCAAGTCCGCAGTTAGTGGAGCAAAGCTCTTCTTCCAGGATGATTCGGAAGC
GGCAAAGATTGAAGAAGCATTCCAGAGGCTGTGAACTTCTTAATAGCAAAAA
ATTTGAAGCCTACTCGATTATCGTTAACAACCTGAAACCATTGGATTGCGTCAAG
GATCGTGAGCAAGTCTTCAATACTATCAAATTGATGGATAAGCAAAGTGTGCTCA
CCAATAATTGAGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACT
CGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAG
GAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGG
GGCCTCTAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGG
ATTGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGG
TGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCC

TTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCT
CTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCAATTAATGCTTTACGGCACTCGACCC
CAAAAACCTTGATTAGGGGGATGGTTCACGTAATGGGCCCTCGCCCTGAAGAAC
GGTTTTCGCCCTTTGAC

>Cbovis4008_pET-28a(+) (5978 bp)

TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGGGTGTGGTG
GTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTT
CGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCT
AAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCC
CAAAAACCTTGATTAGGGTGTATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGAC
GGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTT
CAAACCTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGAT
TTTGCCGATTTCCGCCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACG
CGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTACAGGTGGCACTTTTCGGGGAAAT
GTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCT
CATGAATTAATTCTTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTC
ATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGA
AAACTCACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGAT
TCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGG
TTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAA
AGTTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCAT
CAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGA
GACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCA
ACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGAT
ATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACC
ATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCCGAAGAGGCATAAATTC
CGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCT
TTGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATAACAATCGATAG
ATTGTGCGCACCTGATTGCCCGACATTATCGCGAGCCATTTATACCCATATAAATC
AGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTAGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAAT
ATGGCTCATAACACCCCTTGATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTT
ATGACCAAATCCCTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTA
GAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCT
TGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGATCAAGAG
CTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCCAGCAGAGCGCAGATAACCAAT
ACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCA
CCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGC

GATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCG
CAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGA
ACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCAC
GCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGA
ACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAG
TCCTGTCTGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTC
AGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTC
CTGGCCTTTTGTGGCCTTTTGTCCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATT
CTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCC
GAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGA
TGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATATGGTGC
ACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCT
ATCGCTACGTGACTGGGTCATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCT
GACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGT
GACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAAC
GCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCGTGAAGCGATTACACA
GATGTCTGCCTGTTTCATCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAAGCGTTAA
TGTCTGGCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTCTGTTTGGT
CACTGATGCCTCCGTGTAAGGGGGATTCTGTTTCATGGGGTAATGATACCGAT
GAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTTACTGATGATGAACATGCCCGGT
TACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACACTGGCGGTATGGATGCGGCGGGACCAG
AGAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGTGTT
CCACAGGGTAGCCAGCAGCATCCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTGCA
GGGCGCTGACTTCCGCGTTTTCCAGACTTTACGAAACACGGAAACCGAAGACCA
TTCATGTTGTTGCTCAGGTCGCAGACGTTTTGCAGCAGCAGTCGCTTACGTTCC
GCTCGCGTATCGGTGATTCATTCTGCTAACCGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTA
GCCGGGTCCTCAACGACAGGAGCACGATCATGCGCACCCGTGGGGCCCGCAT
GCCGGCGATAATGGCCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCAGTG
ACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAAGCGACAGGC
CGATCATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCCCTCGCCGAAAATGACCCAGAG
CGCTGCCGGCACCTGTCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGC
GGCGACGATAGTCATGCCCCGCGCCACCCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAAG
GCTCTCAAGGGCATCGGTGAGATCCCGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTTAC
ATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTGCTGCC
AGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGG
CGCCAGGGTGGTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCT
TCACCGCCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTTGCC

CAGCAGGCGAAAATCCTGTTTGATGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGAGCT
GTCTTCGGTATCGTCGTATCCCCTACCGAGATATCCGCACCAACGCGCAGCCC
GACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCA
GCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTAGCATTGTCATGGTTTGTGAAAAC
CGGACATGGCACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGC
GAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCAGACGCGCCGAGACAGAACTT
AATGGGCCCCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCCAATGCGACCAGATGCTC
CACGCCAGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGT
CTGGTCAGAGACATCAAGAAATAACGCCGGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCA
CAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCCTGACGC
GTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCCGCTTCGT
TCTACCATCGACACCACCGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATC
GCCGCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACG
CCAATCAGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAAT
GTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCGCGTTTTTCGCAGAAAC
GTGGCTGGCCTGGTTCACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGGCA
TACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTCACATTCACCACCCTGAATTGAC
TCTCTTCCGGGCGCTATCATGCCATACCGCGAAAGGTTTTGCGCCATTCGATGG
TGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCC
CAGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCGCAAGGAATGGTGCATGC
AAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCA
CGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCATC
GGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATG
CCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTA
ATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAA
TTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCA
TCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGCAGCCATATGAGGCCCGCTGAATCA
ATGATAGAGGAAGAATTCGCTAAATACCAGATGACCCCGGAGAAGATCAGCGAC
ATCCTGAAAGCTTACGAGCACTACAAAGAATTTATCCCAGAGTCCGTGTATAACA
TTCTGGCCAATTTGTCCGACGAAACCAAGGCTCAAATTGCGCAAATGATTAACG
ACTACCACAGCGGTAAATTCGAGACGCCGAAAGACGTTAATGGCCTGCTCTCG
ATCATCAAGAAGGACTACCCGCTTATCTCTCCGGCAGCGACTGGCATTAAATGATT
TTTATCGCCAGAACTGGCGCTGTTGGGCCCTAAGGCGCAAGAGTTGTTCAAC
AAATGGGAAGCACAAAGTTACGCCGATGCGAACCCGGATAAGATTTTATGGGCA
TGTCATCTGTTCAACAACATCCCGACCATTGTTAGCGAACTGCAGGGTCTGCTG
CAAGATAGCGACGAGGCGGAAAAGATCGATGAGCAGTTTCCGGAATTGCAGAA
GTTCTGCATAGCAAAGAATATGAGGCGTATACCATTGTCGTGAAACAGATGAAG

ACCCTGGACTGCGAAAAGGACCGTGATCAGGTTTTTAATACCATCAAGTTGTTCC
GATATGCACAACGTGCTGACGACCAAAGAGTAAGGATCCGAATTCGAGCTCCGT
CGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCG
GCTGCTAACAAAGCCCAGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGC
AATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGC
TGAAAGGAGGAACTATATCCGGAT

>4_Cbovis12440_pET-28a(+) (5834 bp)

TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGGTGTGGTG
GTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTT
CGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCT
AAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCC
CAAAAACTTGATTAGGGTGTGGTTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGAC
GGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCC
CAAACCTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGAT
TTTGCCGATTTCCGCCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACG
CGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTACAGGTGGCACTTTTCGGGGAAAT
GTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCT
CATGAATTAATTCTTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTC
ATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGA
AAACTCACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGAT
TCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGG
TTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAA
AGTTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCAT
CAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGA
GACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCA
ACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGAT
ATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACC
ATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTTCGGAAGAGGCATAAATTC
CGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCT
TTGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAATCGATAG
ATTGTGCGACCTGATTGCCCGACATTATCGCGAGCCATTTATACCCATATAAATC
AGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTAGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAAT
ATGGCTCATAACACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTCC
ATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTA
GAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCT

TGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGGATCAAGAG
CTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATAACCAAAT
ACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCA
CCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGC
GATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCG
CAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGA
ACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCAC
GCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGA
ACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAG
TCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTC
AGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTC
CTGGCCTTTTGTGGCCTTTTGTCTACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATT
CTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCC
GAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGA
TGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATATGGTGC
ACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCT
ATCGCTACGTGACTGGGTCATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCT
GACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGTTACAGACAAGCTGT
GACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAAC
GCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCGTGAAGCGATTACA
GATGTCTGCCTGTTTCATCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAAGCGTTAA
TGTCTGGCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTTCCTGTTTGGT
CACTGATGCCTCCGTGTAAGGGGGATTTCTGTTTCATGGGGGTAATGATACCGAT
GAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTTACTGATGATGAACATGCCCGGT
TACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACCTGGCGGTATGGATGCGGCGGGACCAG
AGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGTGTT
CCACAGGGTAGCCAGCAGCATCCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTGCA
GGGCGCTGACTTCCGCGTTTCCAGACTTTACGAAACACGGAAACCGAAGACCA
TTCATGTTGTTGCTCAGGTCGCAGACGTTTTGCAGCAGCAGTCGCTTACGTTT
GCTCGGTATCGGTGATTCAATTCTGCTAACCAGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTA
GCCGGGTCCTCAACGACAGGAGCACGATCATGCGCACCCGTGGGGCCGCCAT
GCCGGCGATAATGGCCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCAGTG
ACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAAGCGACAGGC
CGATCATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCTCGCCGAAAATGACCCAGAG
CGCTGCCGGCACCTGTCCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGC
GGCGACGATAGTCATGCCCGCGCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTGAAG
GCTCTCAAGGGCATCGGTGAGATCCCGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTTAC

ATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCC
AGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGG
CGCCAGGGTGGTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCT
TCACCGCCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTGCCC
CAGCAGGCGAAAATCCTGTTTGATGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGAGCT
GTCTTCGGTATCGTCGTATCCCACTACCGAGATATCCGCACCAACGCGCAGCCC
GGACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCA
GCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTAGCATTGTCATGGTTTGTGAAAAC
CGGACATGGCACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGC
GAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCAGACGCGCCGAGACAGAACTT
AATGGGCCCCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCCAATGCGACCAGATGCTC
CACGCCAGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGT
CTGGTCAGAGACATCAAGAAATAACGCCGGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCA
CAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCACTGACGC
GTTGCGCGAGAAAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCCGCTTCGT
TCTACCATCGACACCACCACGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATC
GCCGCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACG
CCAATCAGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAAT
GTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCGCGTTTTTCGCAGAAAC
GTGGCTGGCCTGGTTCACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGGCA
TACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTTACATTCACCACCCTGAATTGAC
TCTCTTCCGGGCGCTATCATGCCATACCGCGAAAGTTTTGCGCCATTCGATGG
TGTCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCC
CAGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCGCAAGGAATGGTGCATGC
AAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCA
CGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCATC
GGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATG
CCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTA
ATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAA
TTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCA
TCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGCTCAAGAAGTTGCA
GTAGAGAAAATAAATTCTGTTCTGGAACATCTGAGCGATTCCAAGAAGTATATCC
CGGAGTACATCTACAACACCCTGCAGGATATGAATCAGGAGACGCGTGCACAAA
TTGCTCAACTTGTGAACGACGTTTCATGAGAAAAAGTTTGGTCCGCCACGTAATA
TGGAAGACATGCTGGCGACCCTCAACAAAGAATACCCGCTGGTCGCCCAAGTT
GCCAACAGTTGAACACTTTCTACCGCCAGCGTCTGGGCAATCTGGGTCCGAA
AGCACAGGAGTTCTTTAATCGTTATGAGGCGCACACCTTTGAAACCTTGGGCGA

TGACGCTAGCGAAATTGAAGCGAACATTGCGAACCACGCGGAACAATTGGCGA
ACGACTTCAAAGAGTTGTACGAGGACCCGGAGGAAGCGGCAAAGCTGGATGA
ACAGTTTCCGGAGTTCCGCAACATCTATAACGAGCTGGTGAATGAAAATCACTA
AGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCA
CCACCACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGT
TGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAAC
GGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGAGGAACTATATCCGGAT

>Cbovis12441_pET-28a(+) (5843 bp)

TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTG
GTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTT
CGCTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTCCGCCGCTTTCCCGTCAAGCTCT
AAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCC
CAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGAC
GGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTT
CAAACCTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTATAAGGGAT
TTTGCCGATTTCCGCCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACG
CGAATTTAACAAAAATTAACGTTTACAATTTCAAGTGGCACTTTTCGGGGAAAT
GTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCT
CATGAATTAATTCTTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTC
ATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGA
AAACTCACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGAT
TCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGG
TTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAA
AGTTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCAT
CAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGA
GACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCA
ACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGAT
ATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACC
ATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCCGGAAGAGGCATAAATTC
CGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCT
TTGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATAACAATCGATAG
ATTGTGCGACCTGATTGCCCGACATTATCGCGAGCCATTTATACCCATATAAATC
AGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTAGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAAT
ATGGCTCATAACACCCCTTGTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTT
ATGACCAAATCCCTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTA

GAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCT
TGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGATCAAGAG
CTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCCAGCAGAGCGCAGATACCAAAT
ACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAAGTCTGTAGCA
CCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGC
GATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCG
CAGCGGTCCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGA
ACGACCTACACCGAAGTGAAGTACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCAC
GCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGA
ACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAG
TCCTGTCCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTC
AGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACCGCGCCTTTTTACGGTTC
CTGGCCTTTTGTGGCCTTTTGTGCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCCTGATT
CTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCC
GAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGA
TGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATATGGTGC
ACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCT
ATCGCTACGTGACTGGGTGATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCT
GACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGT
GACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAAC
GCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCGTGAAGCGATTCACA
GATGTCTGCCTGTTTATCCCGCTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAAGCGTTAA
TGTCTGGCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTCTGTTTGGT
CACTGATGCCTCCGTGTAAGGGGGATTTCTGTTTATGGGGTAATGATACCGAT
GAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTTACTGATGATGAACATGCCCGGT
TACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAAGTGGCGGTATGGATGCGGCGGGACCAG
AGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGTGTT
CCACAGGGTAGCCAGCAGCATCCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTGCA
GGGCGCTGACTTCCGCGTTTTCCAGACTTTACGAAACACGGAAACCGAAGACCA
TTCATGTTGTTGCTCAGGTCCGAGACGTTTTGCAGCAGCAGTCGCTTACGTTT
GCTCGCGTATCCGTGATTCATTCTGCTAACCAGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTA
GCCGGGTCCCTCAACGACAGGAGCACGATCATGCGCACCCGTGGGGCCCGCCAT
GCCGGCGATAATGGCCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCAGTG
ACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAAGCGACAGGC
CGATCATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCCCTCGCCGAAAATGACCCAGAG
CGCTGCCGGCACCTGTCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGC
GGCGACGATAGTCATGCCCGCGCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTGAAG

GCTCTCAAGGGCATCGGTTCGAGATCCCGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTTAC
ATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCC
AGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGG
CGCCAGGGTGGTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCT
TCACCGCCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTGCCC
CAGCAGGCGAAAATCCTGTTTGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGAGCT
GTCTTCGGTATCGTCGTATCCCACTACCGAGATATCCGCACCAACGCGCAGCCC
GGACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCA
GCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTAGCATTGTCATGGTTTGTGAAAAC
CGGACATGGCACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGC
GAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCAGACGCGCCGAGACAGAACTT
AATGGGCCCGCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCCAATGCGACCAGATGCTC
CACGCCCAGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGT
CTGGTCAGAGACATCAAGAAATAACGCCGGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCA
CAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCAGTACGCG
GTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCCGCTTCGT
TCTACCATCGACACCACCGCTGGCACCCAGTTGATCGGGCGGAGATTTAATC
GCCGCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACG
CCAATCAGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAAT
GTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCGCGTTTTTCGCAGAAAC
GTGGCTGGCCTGGTTCACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGGCA
TACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTTACATTCACCACCCTGAATTGAC
TCTCTTCCGGGCGCTATCATGCCATACCGCGAAAGTTTTGCGCCATTCGATGG
TGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCC
CAGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCGCAAGGAATGGTGCATGC
AAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATAACCA
CGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCATC
GGTGTGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATG
CCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTA
ATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAA
TTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCA
TCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGCGGCACAAGAGGAT
AGGCTAACAGCTGAAACGATCACCGAGGCGATTGGTCGTTTGGCGAACAGCAA
ACCGTATATCCCGGAATACGTGTATAACGTTATTCTGGCTATGGATAGCGAAACC
AAGACGGAACTGGCGCAATTATGCAATGACTACTTCGACGGCAAGATCGAGACA
CGGAAAAACATTGAGGAGCTGATGACCATGCTCAACGCCGATTACTCGCTGGT
GGCGAGCACCTTTGCAAAAATCAACATCTTTTATCGTCAACGCCTGGGCAATTT

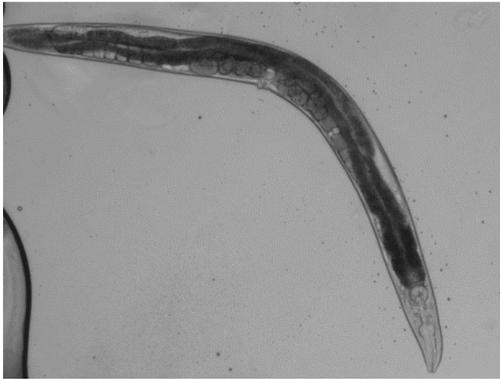
GGGTCCGAAGTCCAGAGAATTCCTGAACAATGTTGAACGTCGTTTGTGGATGC
AGCGAATAACGACACTGGTAAGCTGCGTGATAATCTGGCTACCGCAATTGAGCA
GGCTCAGAGCGATTTTCGCCAGTTGTACGACGATGACGACGAGGCGACCAAAC
TGGACGAGCAATTCCCACAGTTCCGCAACATTTACAACCTCTCTGGAAAAAATCG
CCGCGTAAGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGA
GCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAG
CTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCC
TCTAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGGAT

S2. Experimentos de RNAi

- Silenciamiento de Ce-far-1



- Control L4440

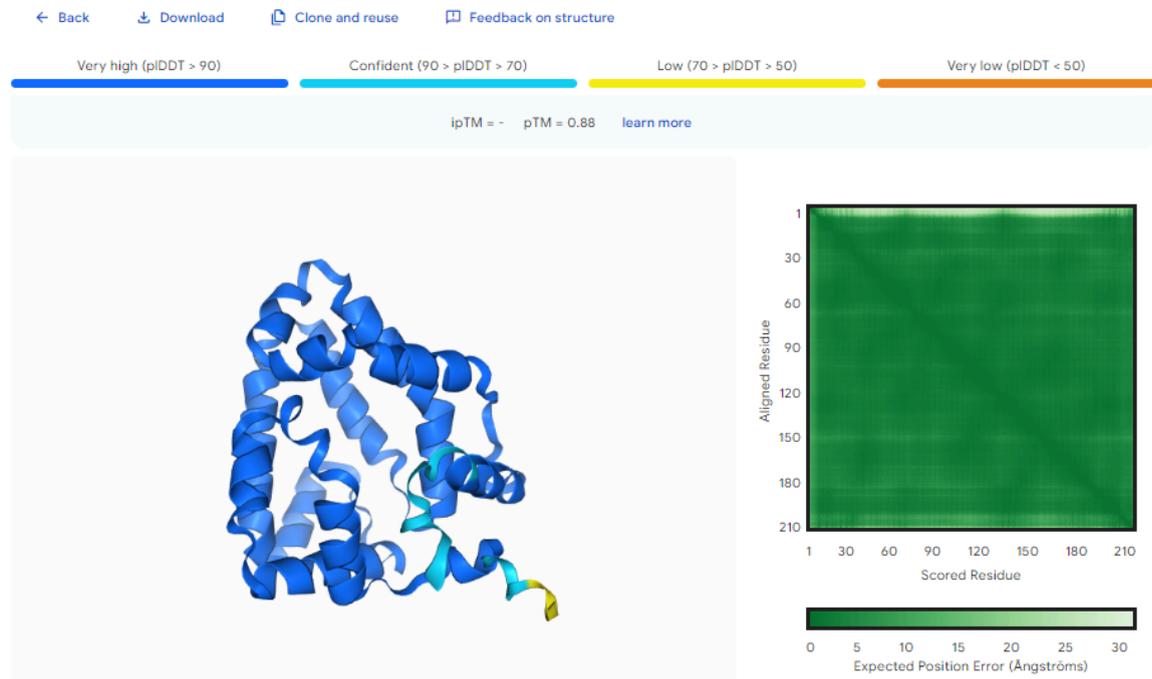


- dpy-11



S3 Predicciones estructurales por Alphafold3.0

Ce-FAR-8 apo



Cb-FAR-08 Apo

[← Back](#) [↓ Download](#) [📄 Clone and reuse](#) [🗉 Feedback on structure](#)

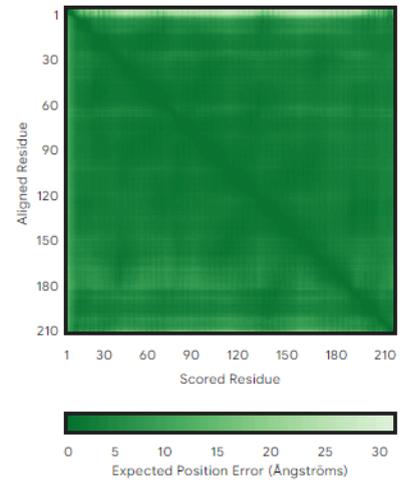
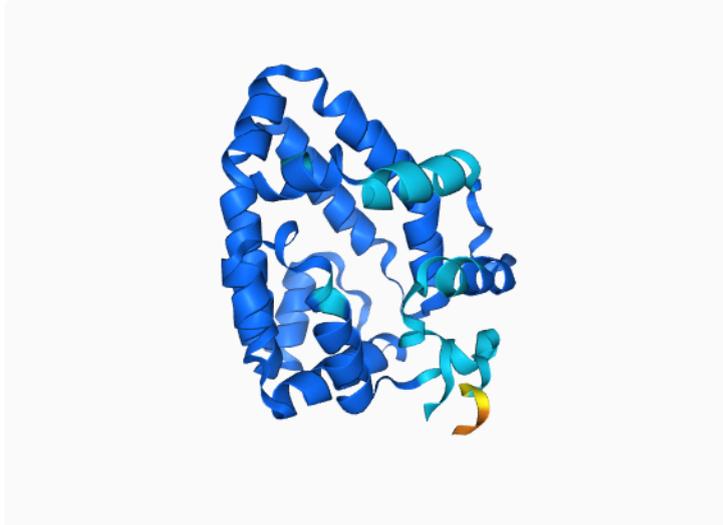
Very high (pLDDT > 90)

Confident (90 > pLDDT > 70)

Low (70 > pLDDT > 50)

Very low (pLDDT < 50)

ipTM = - pTM = 0.88 [learn more](#)



Cb-FAR-40

[← Back](#) [↓ Download](#) [📄 Clone and reuse](#) [🗉 Feedback on structure](#)

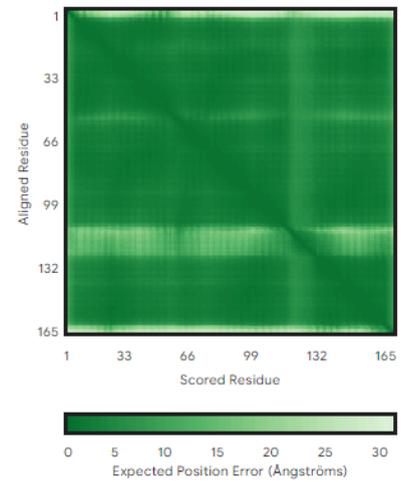
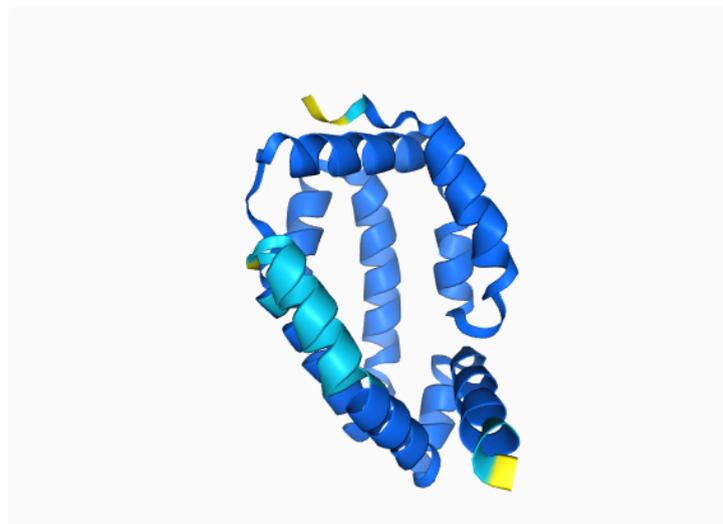
Very high (pLDDT > 90)

Confident (90 > pLDDT > 70)

Low (70 > pLDDT > 50)

Very low (pLDDT < 50)

ipTM = - pTM = 0.84 [learn more](#)



Cb-FAR-41

[← Back](#) [Download](#) [Clone and reuse](#) [Feedback on structure](#)

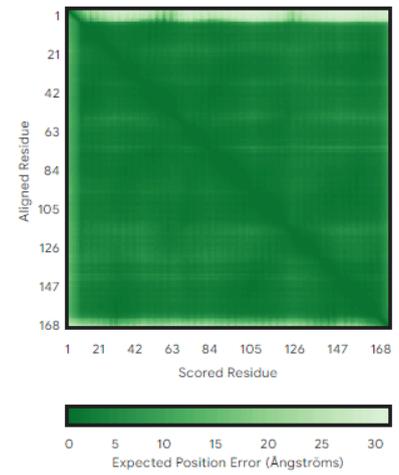
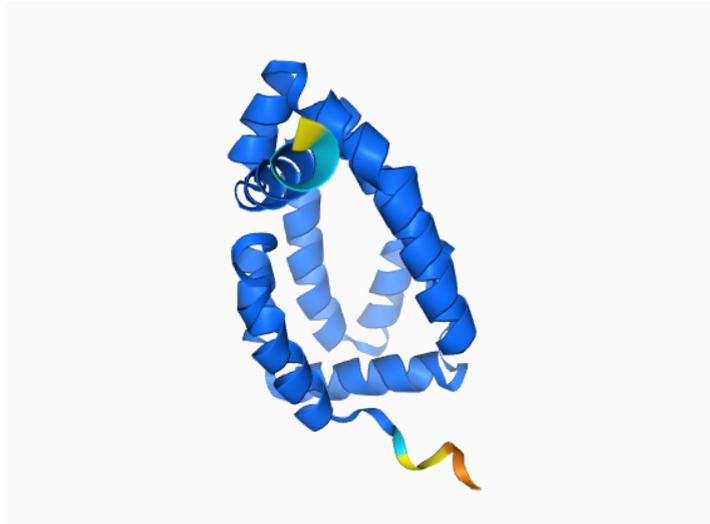
Very high (pLDDT > 90)

Confident (90 > pLDDT > 70)

Low (70 > pLDDT > 50)

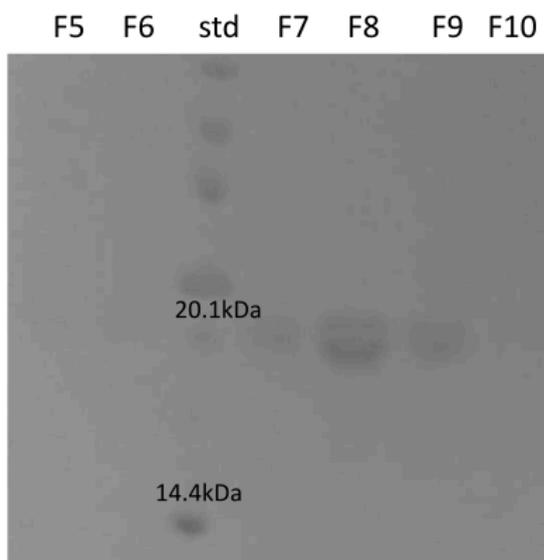
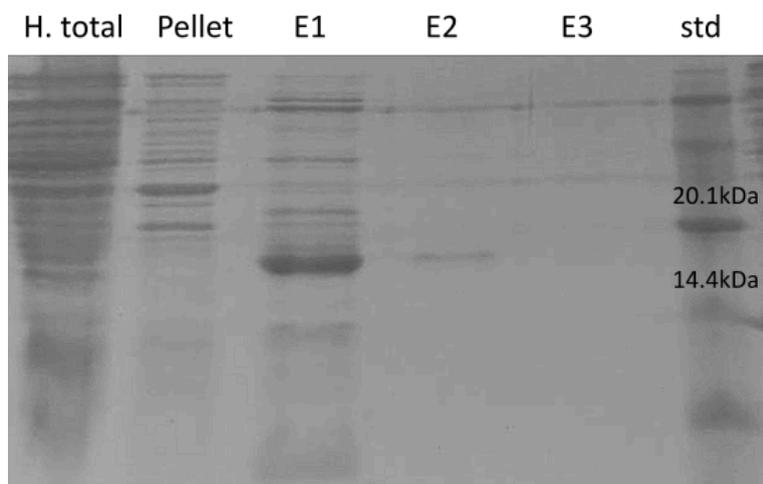
Very low (pLDDT < 50)

ipTM = - pTM = 0.87 [learn more](#)

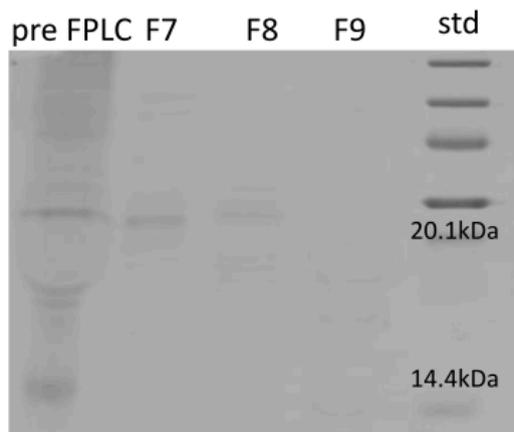
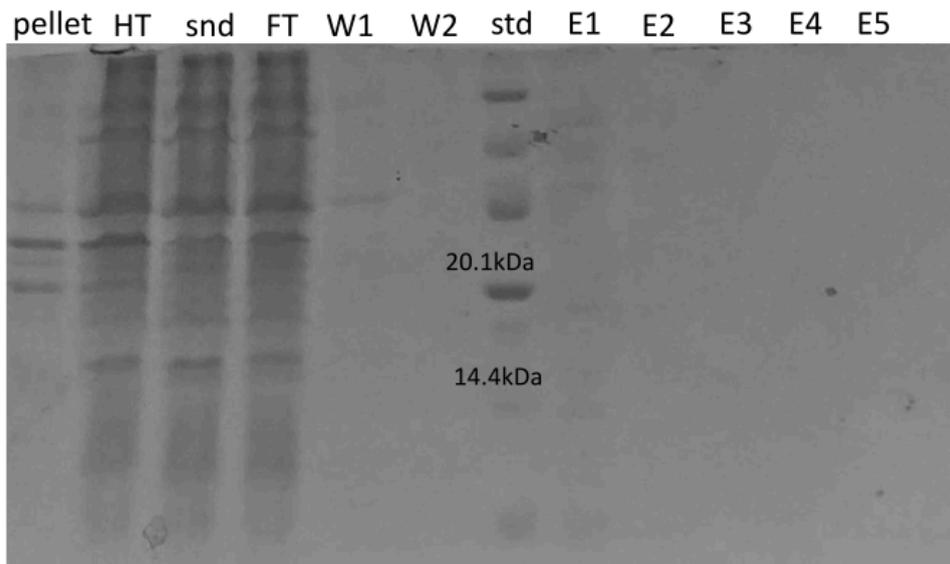


S4. Geles SDS-PAGE mostrando marcha de purificación de Cb-FAR-08, Cb-FAR-40 y Cb-FAR-41.

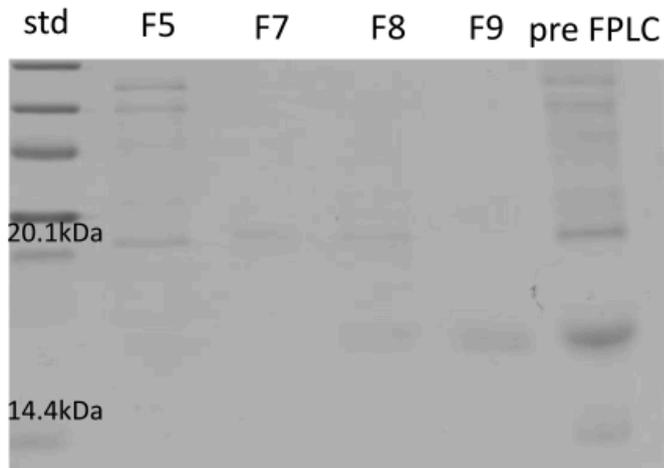
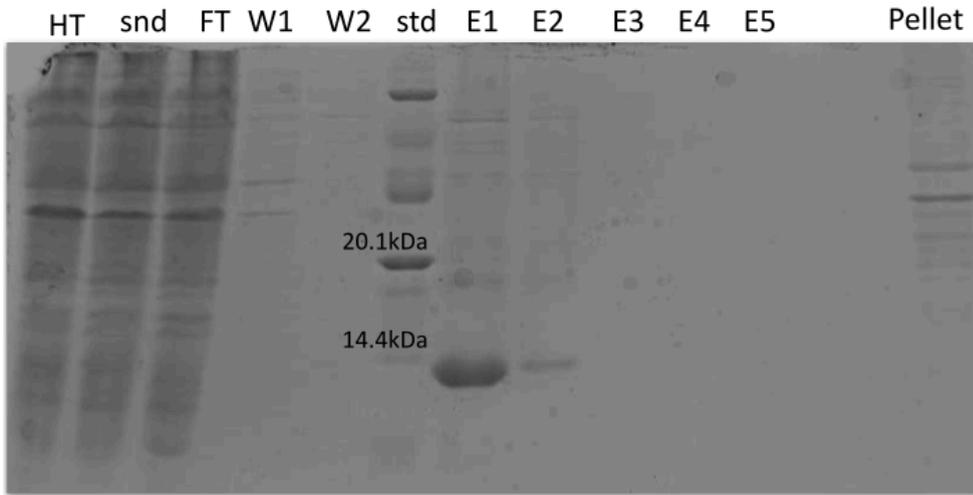
- Cb-FAR-08



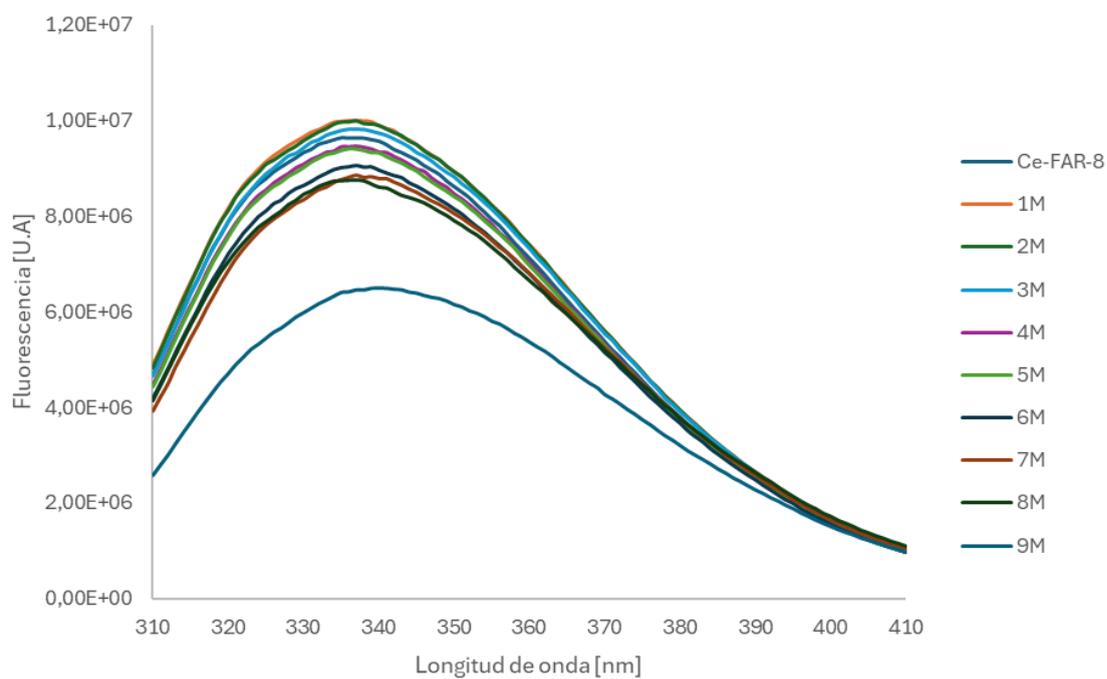
- Cb-FAR-40



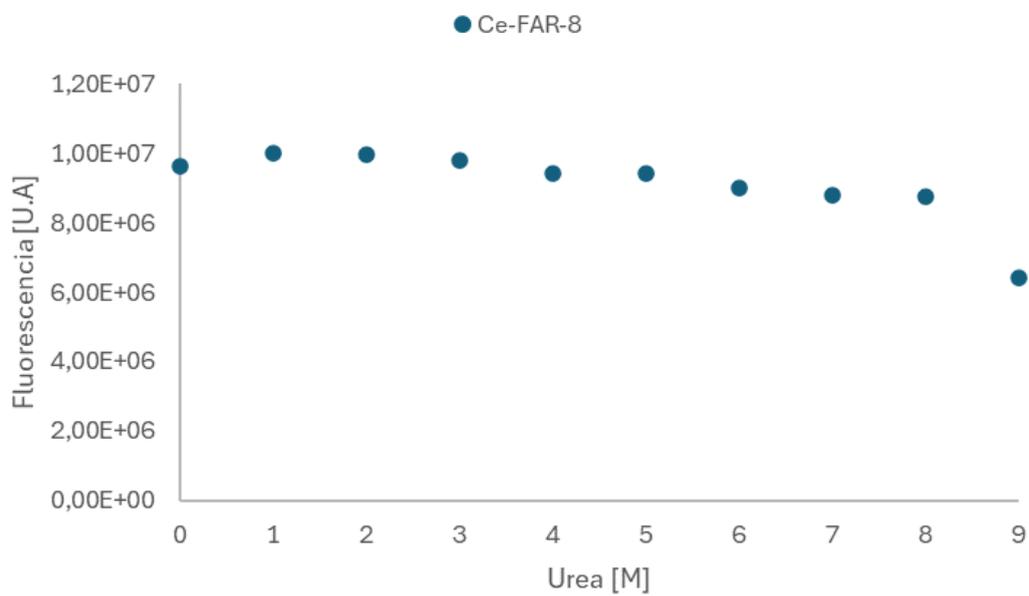
- Cb-FAR-41

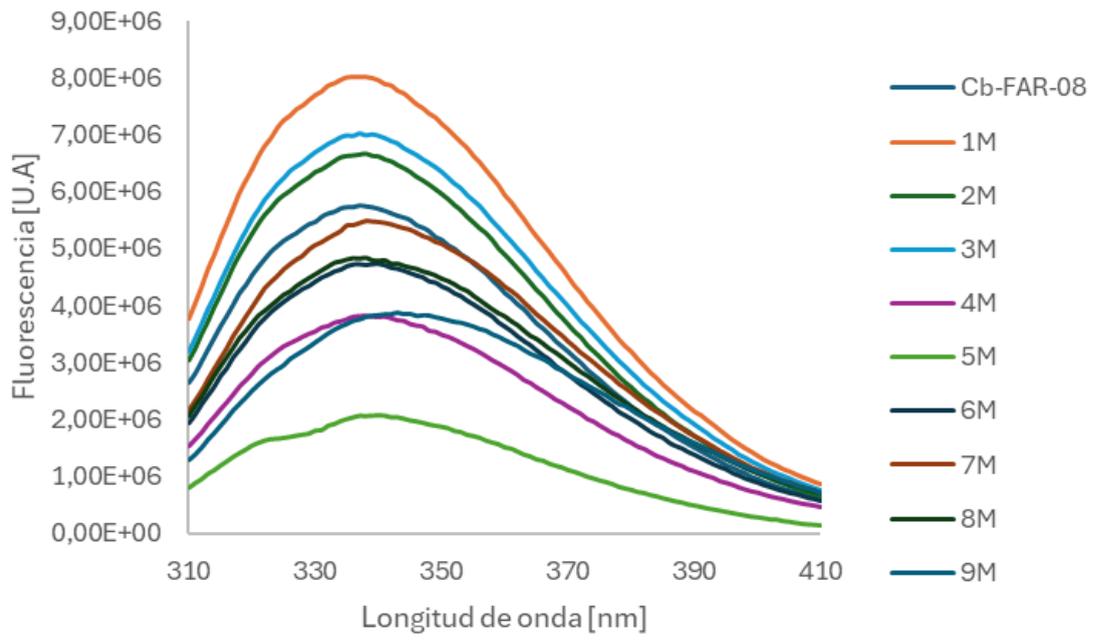


S5. Desnaturalización con Urea de Ce-FAR-8, Cb-FAR-08, Cb-FAR-40 y Cb-FAR-41.

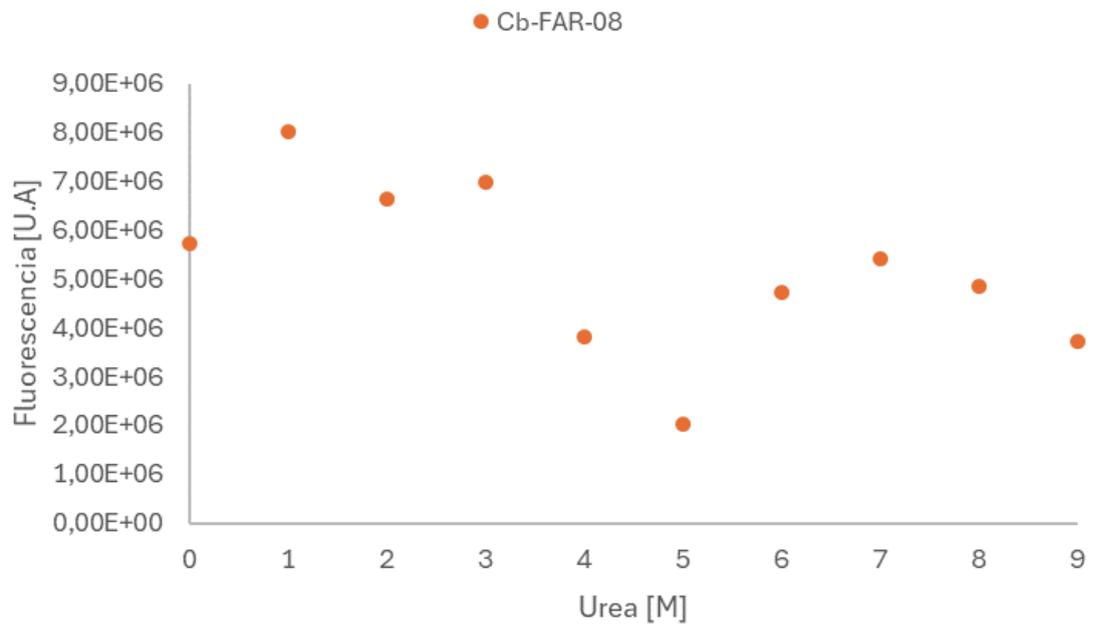


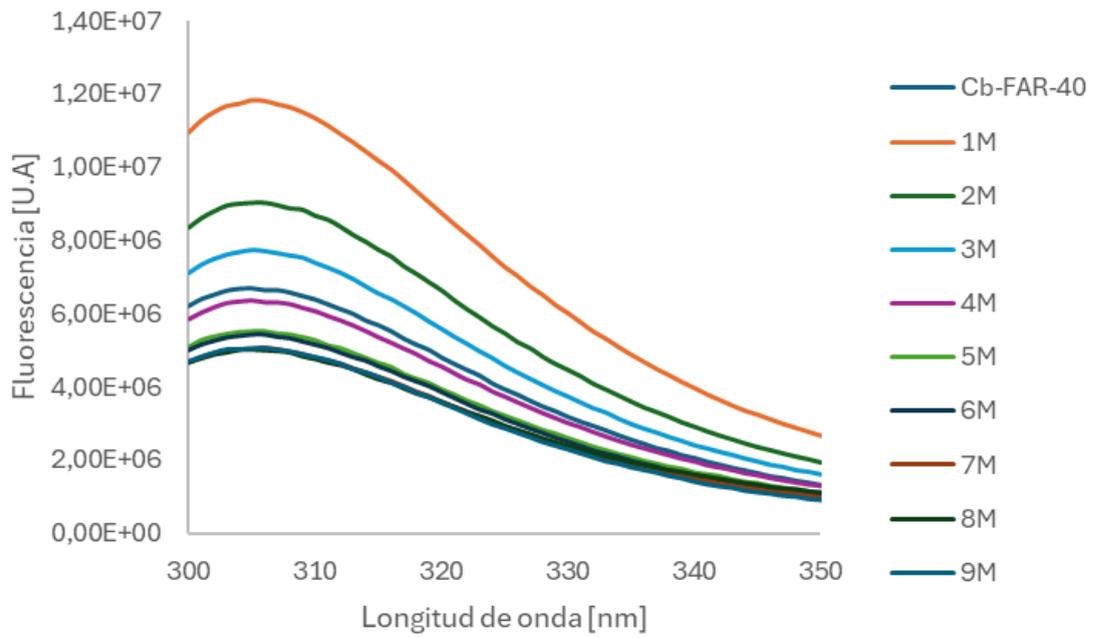
- Señal a 336 nm



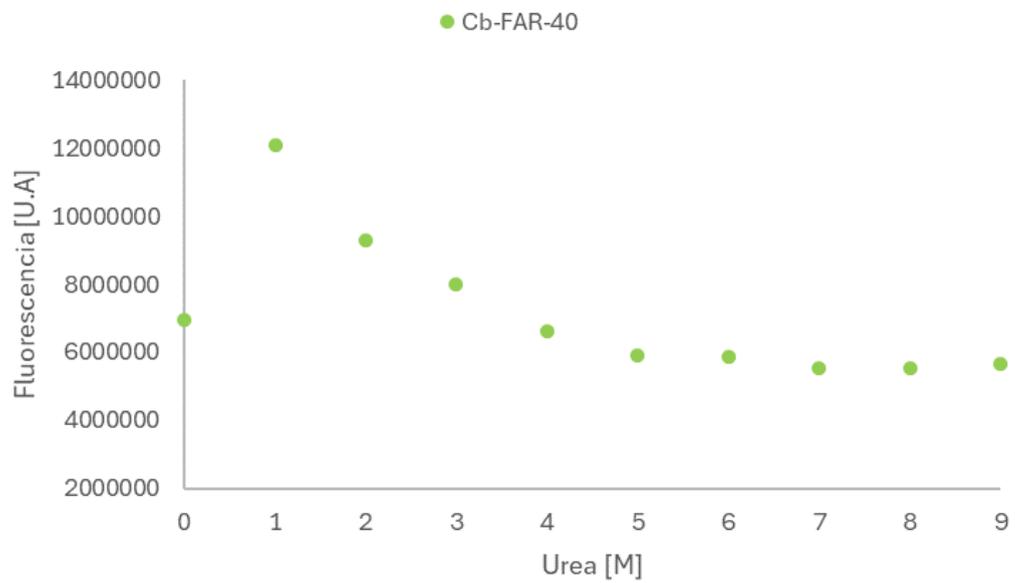


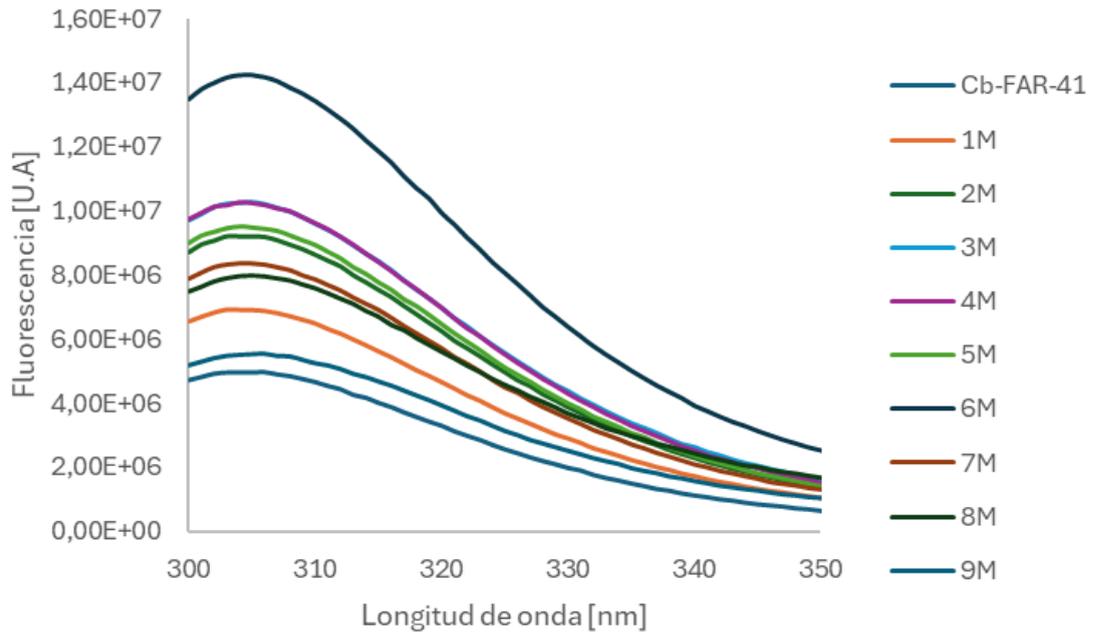
- Señal a 336nm





- Señal a 305 nm





- Señal a 305 nm

