

“Herramientas de estudio de patógenos”

Tema 2: Herramientas moleculares básicas. Aplicaciones

Dra. Pilar Foronda Rodríguez

Dr. Basilio Valladares Hernández

Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias

Departamento de Obstetricia y Ginecología, Pediatría, Medicina Preventiva y Salud Pública,
Toxicología, Medicina Legal y Forense y Parasitología

Universidad de La Laguna

Fijación del material

Las herramientas de biología molecular son de una enorme utilidad en Ciencia. Tienen muchísimas aplicaciones, entre las que se encuentran la identificación de especies y genotipos.

- Para obtener unos resultados óptimos, es imprescindible que la fijación del material de estudio se realice en vivo.
- La fijación se puede hacer de diferentes maneras. Entre las más comunes están la congelación a -20°C , -80°C , y la fijación en productos como el etanol absoluto.



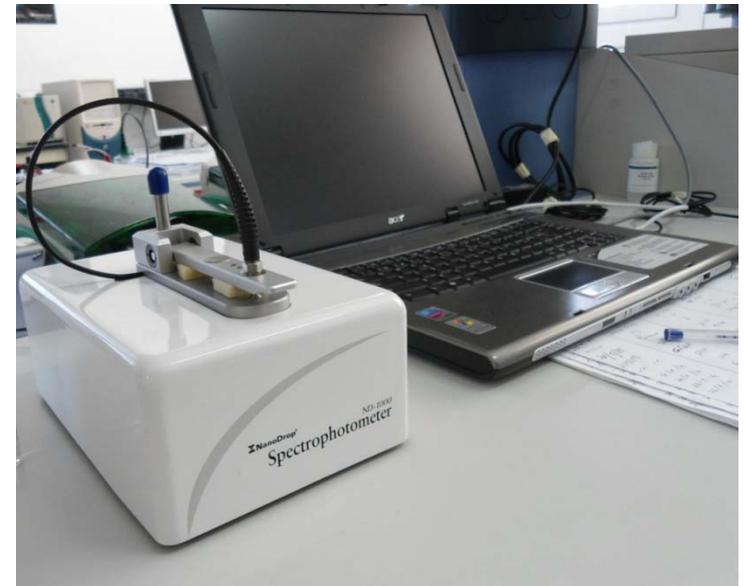
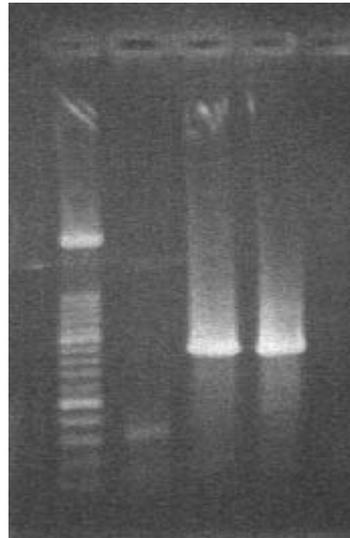
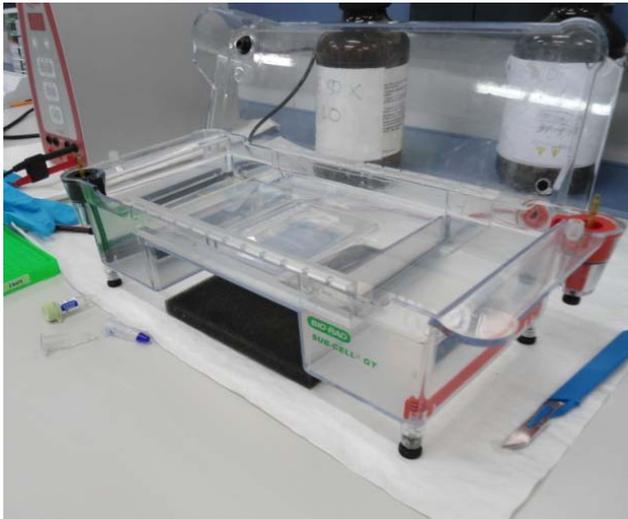
Extracción de ADN

- La extracción del ADN se puede realizar de diferentes maneras. En la actualidad hay una gran variedad de kits, que son cómodos y rápidos, aunque este método es en general menos económico.
- En el caso de tejidos o material difíciles de extraer el ADN, donde es necesario romper estructuras duras, como es el caso de quistes de protozoos, es necesario aplicar técnicas, como el choque térmico, o se puede hacer uso de equipos diseñados para ello, como los disruptores celulares.



Cuantificación del ADN

- La cuantificación del ADN obtenido se puede hacer mediante electroforesis en geles de agarosa, o con espectrofotómetros, como el NanoDrop, donde se puede cuantificar con sólo 1 μl .



PCR (Polymerase Chain Reaction)

- La amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) del genoma es una de las herramientas más utilizadas
- El resultado es la obtención de un gran número de copias de un fragmento de ADN.

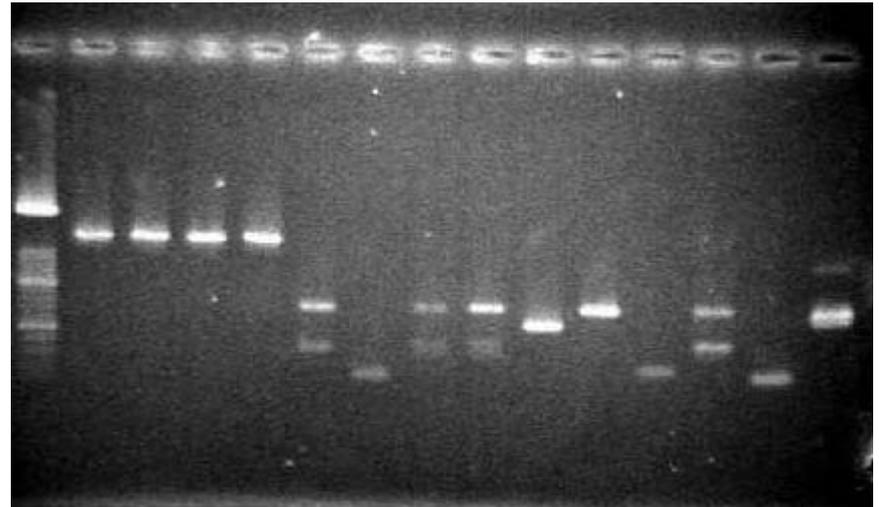
Componentes:

- Buffer: mantiene el pH
- Cl_2Mg : cofactores de la polimerasa
- dNTP: desoxirribonucleótidos-trifosfato
- cebadores
- DNA molde
- Agua
- Polimerasa



Gel de agarosa

- Los amplicones se pueden visualizar en geles de agarosa
- El gel se puede utilizar a diferentes concentraciones de agarosa (0.7%-2%) en función del tamaño del fragmento
- Para visualizar el ADN se puede utilizar, por ejemplo, bromuro de etidio y con luz UV.



Clonación

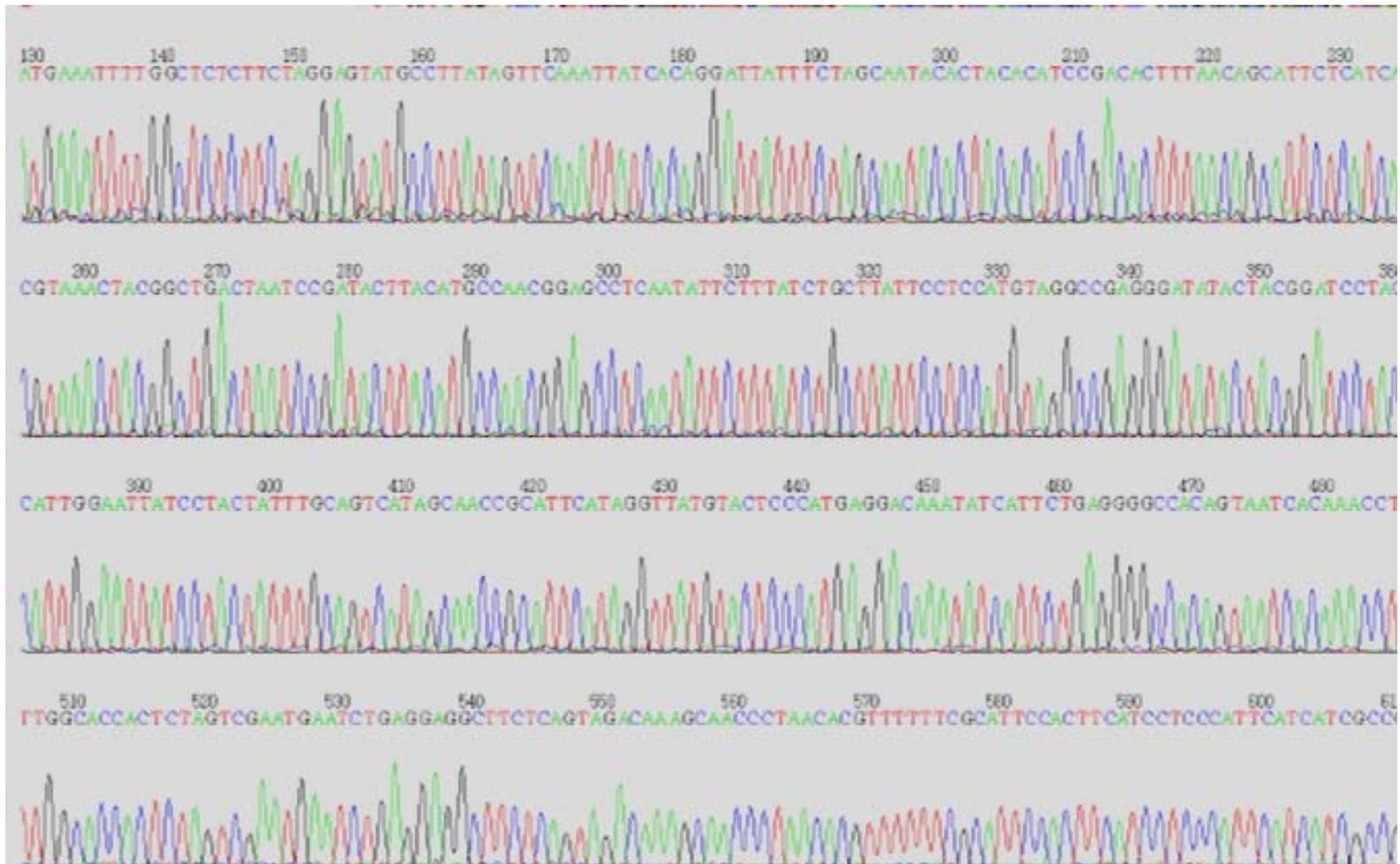
En casos necesarios, se puede proceder a métodos como la clonación para ampliar el número de copias.

Para realizar la clonación hay que seguir diferentes pasos.

El producto amplificado se puede primero ligar en vectores de clonación, y posteriormente incluir en células competentes mediante transformación. Las células se pueden incubar en medios de cultivo para su crecimiento. Posteriormente, se extraen los plásmidos para la secuenciación nucleotídica.

Secuenciación de ADN

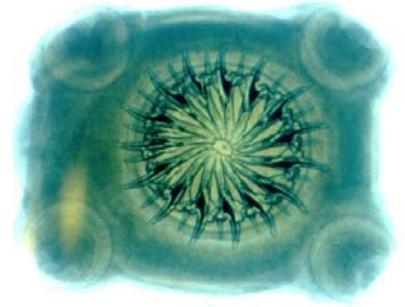
Finalmente se obtiene la secuencia nucleotídica del fragmento amplificado



APLICACIONES DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR

– Identificación de especies

Ejemplos:



***Taenia* spp.: 18S rDNA microsatellites for molecular systematic diagnosis.**

Journal of Helminthology, 2005

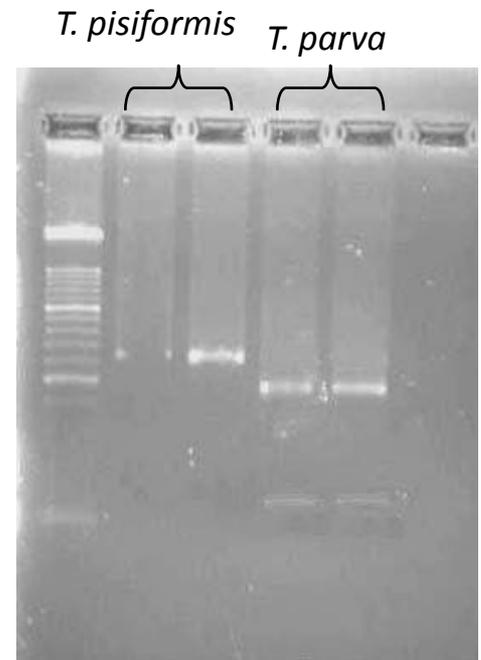
Foronda, P., Casanova, J. C., , Martínez, E., Valladares, B. & Feliu, C.

Las especies de *Taenia* son parásitos de mamíferos de gran interés médico y veterinario. En este trabajo, se detectó por primera vez para *Taenia*, una región de microsatélites que diferencia entre especies.



Se diseñaron unos cebadores que flanquean la zona del microsatélite, en base a una región conservada en Cestodos (Programa Gene-Runner). Los tamaños de los amplificados diferenciaban perfectamente las dos especies de *Taenia* estudiadas.

Además, se identificó una enzima de restricción, *SphI* endonucleasa (2 U, en buffer, a 37°C 4 h), que cortaba el fragmento de manera diferente en función de la especie.



SphI



APLICACIONES DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR

- Identificación de especies en estadíos larvarios

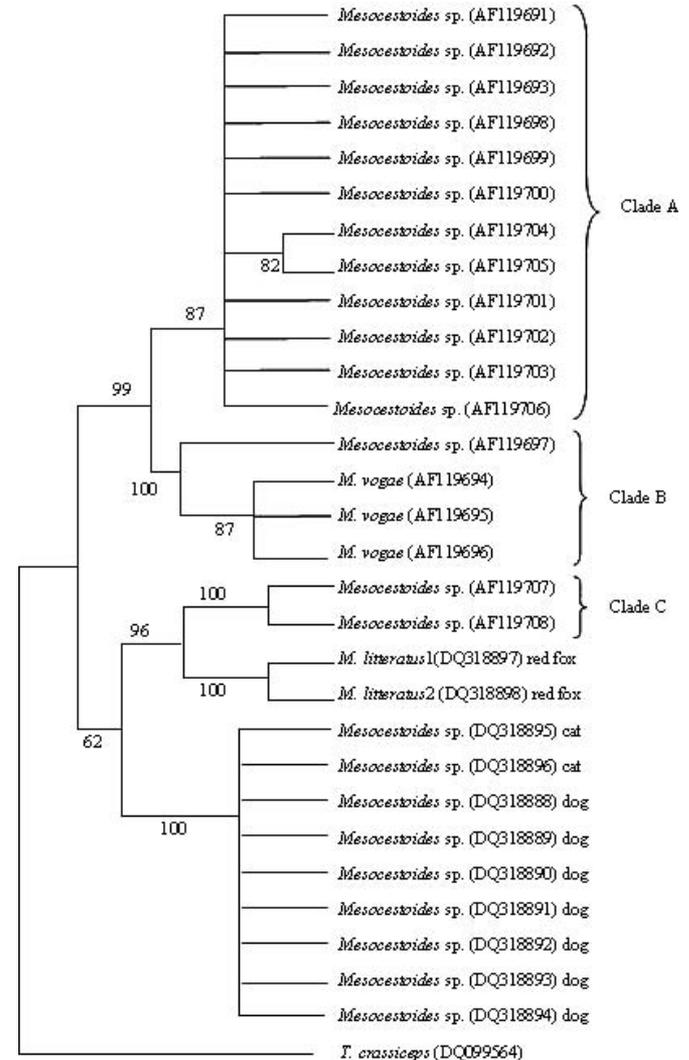
Ejemplos:

First larval record of *Mesocestoides* in carnivora of Tenerife (Canary Islands).

Journal of Parasitology, 2007

Foronda, P., Pérez Rivero, A., Santana Morales, M.A., Kabdur, A., González, A.C., Quispe Ricalde, M.A., Feliu, C., & Valladares, B.

En este estudio se confirmó la identificación de estadíos larvarios de parásitos presentes en carnívoros, como *Mesocestoides*.



APLICACIONES DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR

-Esclarecer posiciones sistemáticas y relaciones de filogenia

Ejemplos:

Systematic relationships of *Mosgovoyia* Spasskii, 1951 (Cestoda: Anoplocephalidae) and related genera inferred from mitochondrial and nuclear sequence data.

***Systematic Parasitology*, 2010**

Voitto Haukisalmi, Lotta M. Hardman, Pilar Foronda, Carlos Feliu & Heikki Henttonen

En este trabajo se utilizó secuencias nucleotídicas del gen 28S rDNA y NaD1, para el estudio sistemático de especies del género *Mosgovoyia* y géneros relacionados.

- Los análisis filogenéticos Bayesianos fueron de utilidad para confirmar:
 - el cambio de género de la especie *M. ctenoides*
 - la validez del género *Neoctenotaenia*
 - que *Mosgovoyia sensu* Beveridge (1978) no es un grupo monofilético

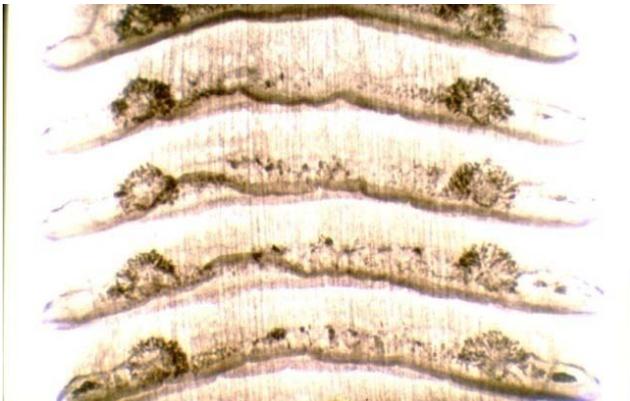
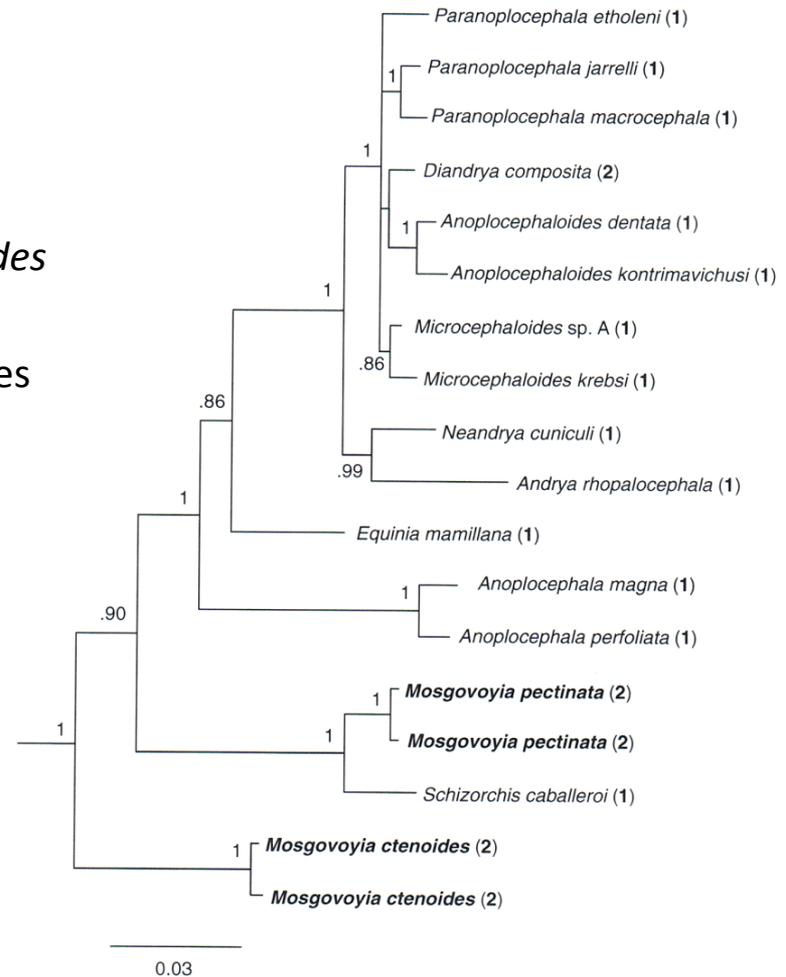


Fig. 1 Bayesian inference tree of phylogenetic relationships of *Mosgovoyia* spp. and other anoplocephaline cestodes of mammals based on sequences of partial 28S ribosomal RNA. *Railletina sonini* and *Dilepis undula* were used as outgroups. Posterior probabilities (when $\geq 80\%$) indicated at nodes. Number of genitalia per proglottid (one or two) in parentheses after the species names

- Los análisis filogenéticos confirman las divergencias morfológicas detectadas entre *M. pectinata* y *N. ctenoides*
- Útero :
 - *M. pectinata* no supera los canales ventrales
 - *N. ctenoides* si sobrepasa
- Bolsa del cirro:
 - *M. pectinata* larga y atraviesa los canales ventrales. Se abre anterior a la mitad del margen de la proglótide
 - *N. ctenoides* corto, oval se abre posterior a la mitad del margen de la proglótide
- Este último carácter es de interés a nivel genérico en los Anoplófálidos sensu Rausch, 1946

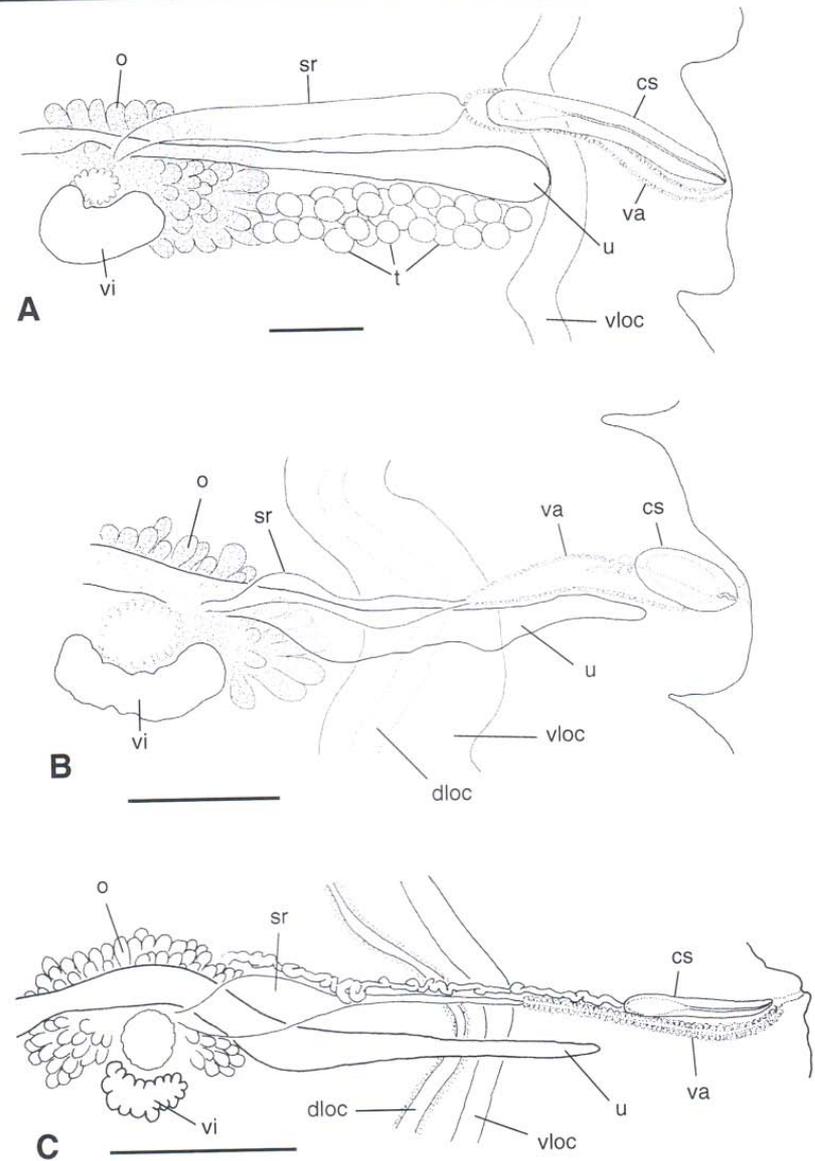


Fig. 3 Poral part of mature proglottids in *Mosgovoyia pectinata* (A), *Neoctenotaenia ctenoides* (B) and *N. variabilis* (C). C redrawn from Beveridge (1978). Abbreviations: o, ovary; vi, vitellarium; sr, seminal receptacle; va, vagina; u, uterus; t, testes; cs, cirrus-sac; vloc, ventral longitudinal osmoregulatory canal; dloc, dorsal longitudinal osmoregulatory canal. Scale-bars: 0.30 mm

APLICACIONES DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR

-Esclarecer posiciones sistemáticas y relaciones de filogenia

Ejemplos:

Systematic relationships of hymenolepidid cestodes of rodents and shrews inferred from sequences of 28S ribosomal RNA.

***Zoologica Scripta*, 2010**

Voitto Haukisalmi, Lotta M. Hardman, Pilar Foronda, Carlos Feliu, J Laakkonen, J Niemimaa, J T. Lehtonen & Heikki Henttonen

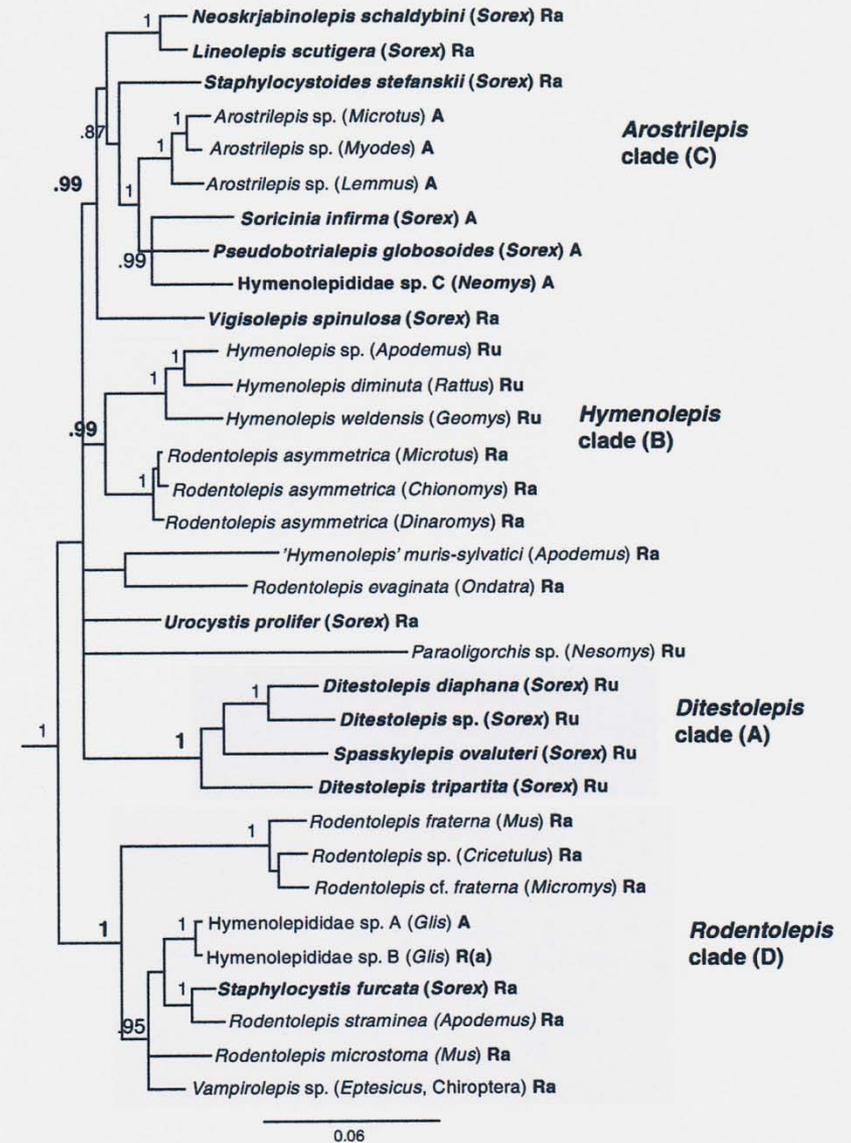
En este trabajo se utilizó secuencias nucleotídicas del gen 28S rDNA para el estudio sistemático y fiologenético de especies de la familia Hymenolepididae. Estos helmintos son parasitan de mamíferos y aves.

El género *Hymenolepis* había sufrido muchas modificaciones. *Hymenolepis* y *Rodentolepis* son los géneros con más especies de los roedores.

- La especie tipo *H. diminuta* y otras del género se caracterizan por tener rostelo/saco rostellar rudimentario o inerme. Sin embargo, *Rodentolepis* tiene rostelo armado
- *Rodentolepis*: engloba casi todos los hymelepididos de roedores, armados; pero también de marsupiales, murciélagos y primates.



- Con este trabajo se consiguió elucidar relaciones sistemáticas de cestodes hymenolepididos de roedores, musarañas y murciélagos.
- Se observó que ni los hymenolepis de musarañas ni los de roedores son monofiléticos. Además que el género *Rodentolepis* no es monofilético
- Y finalmente, que los roedores murinos y arvicolinos han sido colonizados por hymenolepidids al menos dos ocasiones independientes



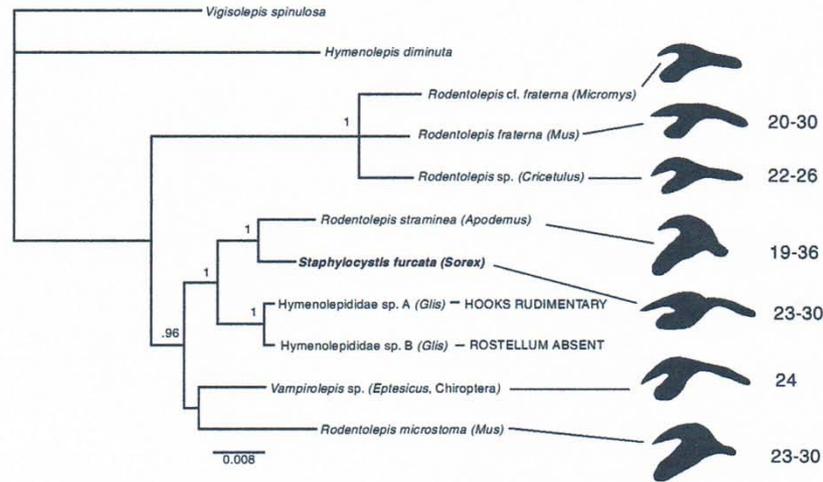


Fig. 2 Bayesian inference tree of phylogenetic relationships within the 'Rodentolepis' clade of hymenolepidid cestodes. Typical shape of rostellar hooks and their number (when known) indicated for each armed species with normal (functional) hooks. The hook of *Rodentolepis fraterna* has been redrawn from Baer & Tenora (1970); other illustrations are original. Labels as in Fig. 1.

- El análisis del clado de *Rodentolepis* mostró una división principal entre el divergente subclado de *R. fraterna*-like cestodos y el resto de las especies.

Los resultados moleculares coinciden con caracteres morfológicos, como por ejemplo:

- El clado C: con rostelo ausente
- El clado A: con escólex no armado, o rostelo rudimentario

- Sin embargo, los otros clados mostraron combinación de caracteres escólex armados y no armados y no armados (con o sin rostelo).
- Las especies basales sin clara conexión incluyen escólex armados y no armados.
- Esto indica 3 inequívocas pérdidas de rostelos

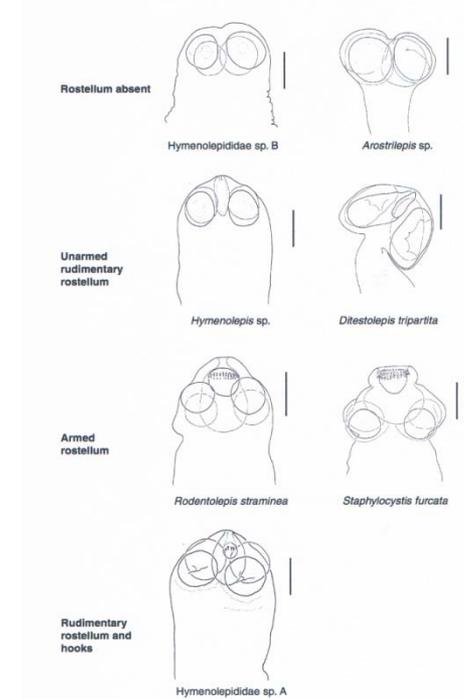


Fig. 1. Diagrams of main types of scolex and rostellum in hymenolepidid cestodes of rodents and shrews. Scale-bars 0.1 mm.

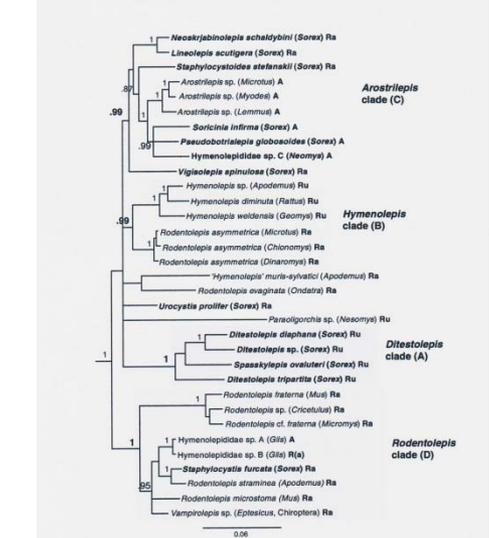


Fig. 2. Bayesian inference tree of phylogenetic relationships among hymenolepidid cestodes of rodents, shrews and bats. The tree is rooted and shows four main clades: Arostrileps clade (C), Hymenolepis clade (B), Ditestolepis clade (A), and Rodentolepis clade (D). Scale-bars 0.02 substitutions per site.

APLICACIONES DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR

- Genotipado

Ejemplo:

Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human isolates in Egypt.

Parasitology Research, 2010

Foronda P., Bargues M. D., Abreu-Acosta N., Periago M. V., Valero M. A., Valladares B., Mas-Coma S.

En este trabajo se genotipó el protozoo *Giardia intestinalis*, demostrando la presencia del genotipo típico de ganado en muestras humanas, por primera vez.

