

Máster en Biotecnología Avanzada

Universidade de Vigo



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



## TÍTULO

# **Identificación de marcadores moleculares asociados a migraciones parasitarias de *Anisakis simplex***

## AUTOR

Rosa María García-Junco García

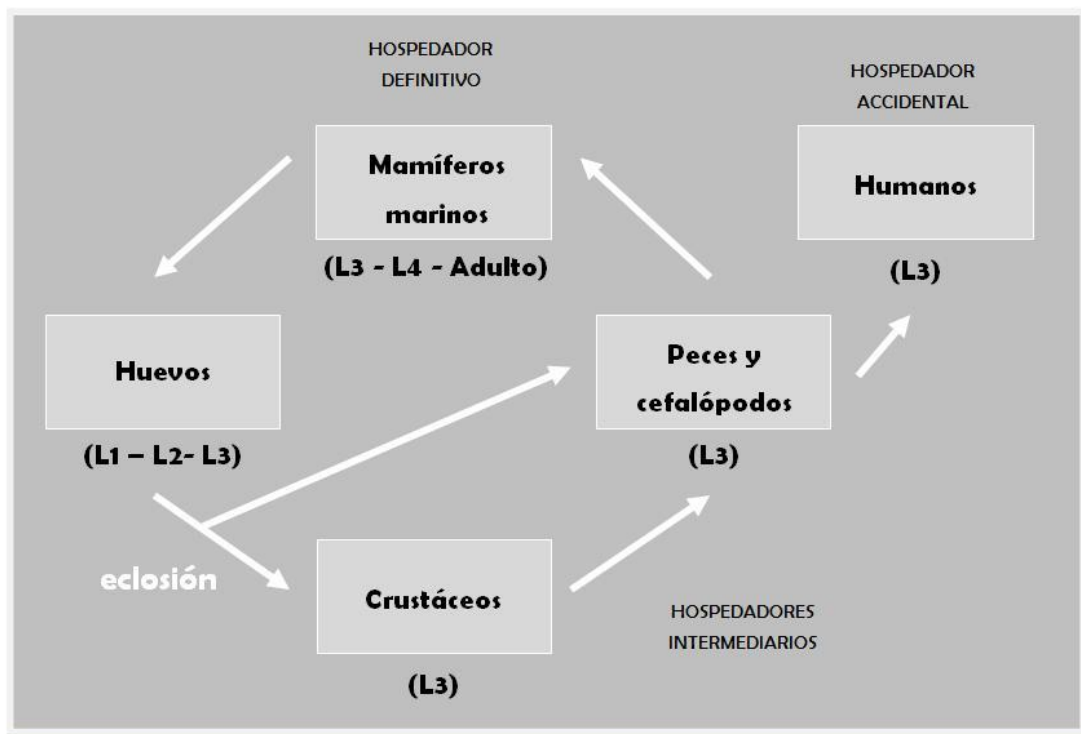
# Índice

<b>Introducción</b> .....	3
<b>Objetivos</b> .....	8
<b>Material y métodos</b> .....	9
Toma de muestras e identificación de <i>A. simplex</i> .....	9
Extracción de RNA total.....	9
Síntesis de cDNA .....	10
Genotecas de hibridación sustractiva (SSH).....	11
Clonación, PCR y secuenciación .....	11
Análisis de datos .....	11
<b>Resultados y discusión</b> .....	12
Extracción de RNA total.....	12
Síntesis de cDNA.....	13
Genotecas de hibridación sustractiva (SSH).....	13
Clonación, PCR y secuenciación .....	13
Análisis de datos .....	15
Diseño de primers .....	19
<b>Conclusiones</b> .....	21
<b>Bibliografía</b> .....	22

## Introducción

*Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809) es un nematodo perteneciente a la clase Chromadorea, orden Ascaridida, familia Anisakidae. Presenta una distribución mundial<sup>[1]</sup> y parasita a diferentes especies de crustáceos, cefalópodos, peces y mamíferos marinos (principalmente cetáceos)<sup>[2]</sup>, pudiendo ser hospedadores accidentales las aves piscívoras y el hombre.

Su ciclo biológico es complejo (**Figura 1**), atravesando cuatro estadíos larvarios antes de llegar al adulto<sup>[3]</sup>. La transición entre los tres primeros estadíos larvarios (L1-L2-L3) tiene lugar antes de la eclosión. Tras la eclosión, las larvas L3 son ingeridas por un hospedador intermediario. En peces, las larvas migran desde el tracto gastrointestinal hacia la cavidad abdominal, y es característica la formación de quistes (cápsula concéntrica de tejido fibroso desarrollada por el hospedador en torno a la larva) en vísceras y en el peritoneo. Cuando un hospedador intermediario infectado por larvas L3 de anisakis es ingerido por un mamífero marino, se induce la transición al siguiente estadío larvario L4 y finalmente al adulto, que se alojará en el tracto gastrointestinal del hospedador. Tras la reproducción, los huevos no embrionados son liberados al mar con las heces del hospedador.



**Figura 1.** Esquema del ciclo biológico de *A. simplex*.

El hombre puede convertirse en hospedador accidental de la larva L3 al consumir peces o cefalópodos parasitados por larvas L3 vivas<sup>[4]</sup>. Generalmente, estos casos de zoonosis (conocida como anisakiasis o anisakidosis) se derivan del consumo de pescado crudo o poco cocinado (ahumado en frío, salado o parcialmente cocido). Es significativo que el 90% de los casos de anisakiasis a nivel mundial hayan sido diagnosticados en Japón, país donde es habitual el consumo de pescado crudo y en salazón<sup>[5]</sup>.

Además del riesgo de infección por las larvas vivas, se han descrito casos de reacciones alérgicas por exposición a larvas L3 ya muertas o a sus restos en el tejido del pescado<sup>[4,6]</sup>. La Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) reconoce a *A. simplex* como el único parásito asociado a productos pesqueros claramente implicado en procesos alérgicos. Los estudios realizados en España (el país europeo con mayor número de casos de alergia a *A. simplex* documentados, seguido de Países Bajos y Alemania) reflejan una elevada prevalencia de la sensibilización a *A. simplex* en determinadas regiones del territorio peninsular, como la comunidad de Madrid y Andalucía oriental, frente a la menor prevalencia en Galicia<sup>[7,8]</sup>.

En abril de 2010 el panel de riesgo biológico de la EFSA<sup>[9]</sup> emitió un informe que señalaba la necesidad de la realización de estudios que ampliasen la información acerca del *A. simplex*, tanto a nivel de su ciclo biológico e incidencia de la parasitación en especies marinas como a nivel de su repercusión en la industria pesquera y en la salud humana.

A raíz de este informe se plantea una línea de investigación en relación a las migraciones parasitarias post-mortem de la larva L3 de *A. simplex*.

Se ha documentado<sup>[10,11,12]</sup> la existencia de procesos migratorios post-mortem desde las vísceras al músculo (principalmente hacia la musculatura hipoaxial) en diferentes especies de peces como el arenque atlántico (*Clupea harengus*), el jurel (*Trachurus trachurus*), el lirio (*Micromesistius poutassou*) o la caballa (*Scomber scombrus*). Algunos autores<sup>[13]</sup> señalan que el tiempo transcurrido entre la captura y el procesado, así como las condiciones de temperatura, podrían favorecer las migraciones de las larvas hacia la musculatura. Sin embargo, otros estudios no detectaron fenómenos de migración post-mortem<sup>[14,15]</sup>. No se conocen las razones de las discrepancias entre los diferentes estudios, si bien las especies capturadas, su origen y las condiciones de manejo no fueron uniformes.

Como señala la EFSA, la falta de estudios que determinen bajo qué condiciones y en qué especies de peces se producen los fenómenos de migración post-mortem de las larvas

de *A. simplex*, ocasiona que no se puedan predecir las consecuencias de las prácticas de procesado sobre el riesgo al que se expone el consumidor<sup>[9]</sup>.

Como punto de partida para futuros estudios sobre los fenómenos de migración post-mortem, es necesario establecer criterios que permitan reconocer qué larvas encontradas en la musculatura del pez son resultado de procesos de migración larvaria post-mortem frente a las que se puedan encontrar en estado de latencia.

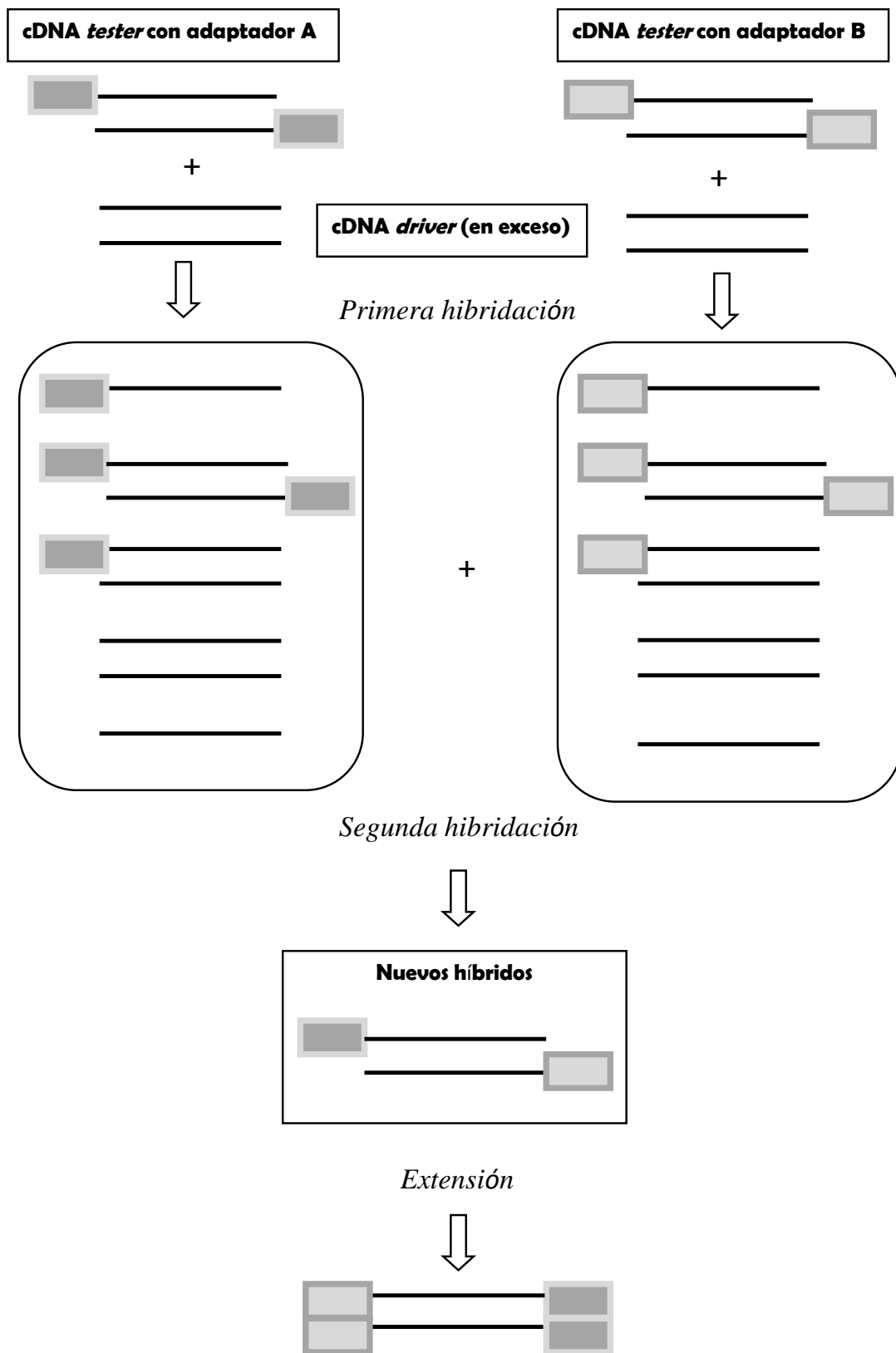
Para conseguir este objetivo se plantea la realización de genotecas de hibridación sustractiva (SSH) a partir de larvas de *A. simplex* procedentes de *T. trachurus* (jurel) y *M. merluccius* (merluza atlántica o pescadilla). Estas especies de hospedador fueron elegidas por su importancia económica, su presencia a lo largo de todo el año y su elevada carga parasitaria por *A. simplex*, superior al 70% <sup>[12]</sup>.

Se decidió realizar SSH por la eficacia que tiene la técnica a la hora de discriminar secuencias expresadas diferencialmente entre dos poblaciones de cDNAs a comparar.

La técnica se basa en que determinados cDNAs estarán presentes en una de las poblaciones de cDNAs, a la que denominaremos *tester*, pero ausente, o presente a menor nivel, en la otra población de cDNAs, denominada *driver*<sup>[16]</sup>.

Cada población de cDNA de doble hebra (*tester* y *driver*) es digerida con enzimas de restricción a fin de obtener fragmentos de extremos romos. La población de cDNAs *tester* se divide en dos alícuotas. En cada una de estas dos muestras *tester* se llevará a cabo una reacción de ligación en los extremos 5' de las hebras de cDNA con una breve secuencia nucleotídica denominada adaptador. En la primera muestra la ligación será con un adaptador A, mientras que en la segunda muestra la ligación será con un adaptador B.

A continuación se realizan dos hibridaciones (**Figura 2**). En la primera hibridación se añade un exceso de *driver* a cada muestra *tester*. Las mezclas son desnaturalizadas por calor y a continuación se permite su *annealing*. Ya que el proceso de *annealing* que genera cDNAs monohíbridos es más rápido para las moléculas más abundantes, los cDNAs de mayor abundancia hibridarán antes, de manera que solo una pequeña parte de estos cDNAs se incluirá en la fracción monohebra. En esta fracción monohebra del cDNA *tester* podremos encontrar en cantidad similar cadenas procedentes de cDNAs doble hebra tanto muy abundantes como poco abundantes. Por ello se considera que la fracción monohebra queda normalizada.



**Figura 2.** Esquema de la SSH

En la segunda hibridación, las dos muestras de la primera hibridación se mezclan y se vuelve a añadir cDNA *driver*. Esta vez solo la fracción monohebra proveniente de la primera hibridación es capaz de formar nuevos híbridos. Éstos son diferentes de los demás: los adaptadores de sus extremos 5' son distintos entre sí. Esto va a permitir la amplificación diferencial mediante PCR de la fracción sustraída y normalizada, empleando una pareja de *primers* cada uno de los cuales ancla en un adaptador. Antes de esta amplificación por PCR es necesario realizar en la muestra una reacción de extensión para completar los extremos de los híbridos correspondientes a la región adaptadora.

La amplificación por PCR sólo va a ser exponencial para estos híbridos, ya que la fracción monohebra y los híbridos entre cadenas de *driver* no son amplificados, los híbridos con solo un adaptador en uno de sus extremos tienen una amplificación lineal y los híbridos con un mismo adaptador en ambos extremos forman una horquilla por la presencia de repeticiones invertidas en los extremos de los adaptadores.

Así, obtenemos una muestra rica en cDNAs expresados sólo o con mayor abundancia en la población de cDNAs *tester*.

El análisis de las secuencias expresadas diferencialmente contenidas en esta muestra puede arrojar luz sobre los procesos metabólicos que están teniendo lugar en el organismo del que proviene la muestra y de su respuesta frente a unas condiciones ambientales determinadas.

En este trabajo interesa comparar qué genes son únicamente expresados en los procesos migratorios de las larvas frente a aquellos que son únicamente expresados en las larvas en fase de latencia (enquistadas), a fin de obtener información de los mecanismos moleculares relacionados con la movilidad de las larvas L3 de *A. simplex* así como secuencias candidatas a ser marcadores moleculares del tropismo larvario.

## Objetivos

- El presente proyecto de máster tiene como principal objetivo la identificación de marcadores moleculares asociados a migraciones post-mortem de larvas L3 del nematodo endoparásito *Anisakis simplex* en dos especies de peces de interés comercial: el jurel (*Trachurus trachurus*) y la pescadilla (*Merluccius merluccius*).
- Para ello, se realizarán genotecas de hibridación sustractiva (SSH) que permitirán conocer qué mRNAs son únicamente expresados en larvas L3 de *A. simplex* que experimentan procesos de migración post-mortem frente a aquellas que no han presentado movilidad, y viceversa.
- Las secuencias obtenidas son contrastadas frente a bases de datos nucleotídicas y de proteínas para intentar comprender el posible significado biológico de estas diferencias de expresión.
- Las secuencias expresadas de manera diferencial son candidatas a poder ser empleadas como marcadores moleculares de tropismo larvario, o de la ausencia del mismo. A partir de ellas se diseñan *primers* específicos que serán ensayados en futuros estudios de expresión.



## Material y métodos

### Toma de muestras e identificación de *A. simplex*

Esta tarea fue realizada por taxónomos colaboradores del grupo de investigación. Se realizaron dos muestreos, uno para jurel y otro para pescadilla. Las capturas de jurel se realizaron en caladeros gallegos, mientras que los ejemplares de merluza fueron capturados en aguas de Gran Sol. Los ejemplares de cada muestreo procedían de una misma copada, dividida en dos lotes. Uno de los lotes fue directamente congelado a bordo con nieve carbónica para evitar migraciones parasitarias, mientras que otro lote se conservó en hielo en escamas. Los ejemplares de este segundo lote se mantuvieron refrigerados a 4°C durante 48h en el laboratorio, a fin de permitir las migraciones parasitarias.

De cada uno de los 4 lotes se examinaron 15 individuos, recogándose 50 larvas musculares de *A. simplex*. A fin de evitar la rápida degradación del mRNA, estas larvas fueron fijadas en el reactivo RNAlater RNA Stabilization Reagent de Qiagen en varios tubos Eppendorf, con cinco larvas en cada uno.

Las larvas procedentes de los lotes mantenidos en nieve carbónica estaban encapsuladas y no habían experimentado procesos de migración post-mortem. Estas larvas fueron consideradas como grupo control.

Las larvas procedentes de los lotes mantenidos en hielo en escamas y conservados a 4°C durante 48h no estaban encapsuladas y presentaban movilidad. Estas larvas fueron consideradas como grupo prueba.

### Extracción de RNA total

Se prepararon dos *pools* con dos larvas cada uno, dos *pools* con cinco larvas y dos *pools* con diez larvas para cada uno de los cuatro grupos de estudio: jurel control, jurel prueba, merluza control y merluza prueba.

Cada *pool* de larvas fue congelado con nitrógeno líquido y triturado en un mortero estéril mantenido en hielo hasta obtener un polvo fino. Para la extracción del RNA se empleo el Aurum Total RNA Mini Kit de Bio-Rad, siguiéndose el protocolo especificado por el fabricante para extracción de RNA total procedente de tejido animal, mediante

centrifugación. El RNA fue eluído en un volumen final de 40µl y recogido en un tubo Eppendorf, para su almacenamiento a -20°C.

El contenido de RNA en cada tubo fue cuantificado y visualizado por la unidad de biología molecular de los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de la Coruña, con un bioanalizador Agilent 2100 de Agilent Technologies. Las concentraciones obtenidas no siempre fueron proporcionales al número de larvas en cada *pool* y oscilaron entre los 0,3ng/µl y los 175ng/µl.

### Síntesis de cDNA

Se utilizó el kit SMARTer Pico PCR cDNA Synthesis Kit de Clontech y se siguieron las especificaciones del fabricante.

Para la selección del RNA empleado para la síntesis del cDNA y la posterior elaboración de las genotecas de sustracción, se tuvo en cuenta la concentración, pureza y grado de degradación del RNA de cada uno de los tubos extraídos, información determinada por el bioanalizador. Como indicador del grado de degradación se tuvo en cuenta la relación entre las bandas ribosomales 28S y 18S y el RIN (RNA Integrity Number).

Para la síntesis de la primera hebra cada una de las muestras se llevó a una concentración final de 20ng de RNA en 106µl de mezcla de reacción (0,19ng/µl), excepto el control positivo que se llevó a una concentración de 100ng/µl. Como control positivo se empleó una disolución de RNA de hígado de ratón (stock 1000 ng/µl) Todas las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador MyCycler de Bio-Rad.

Tras la síntesis de la primera hebra, se realizó una purificación de los fragmentos de cDNA resultantes con el kit NucleoSpin Extract II de Macherey-Nagel.

Una vez obtenido el cDNA de doble hebra, se sometió a digestión con la endonucleasa RsaI para obtener extremos romos que permitan la unión de adaptadores necesarios para la hibridación sustractiva en un paso posterior. Tras la digestión, los fragmentos fueron purificados con el QIAquick PCR Purification Kit de Qiagen, siguiendo el protocolo para microcentrífuga especificado por el fabricante.

### Genotecas de hibridación sustractiva (SSH)

Para la elaboración de estas genotecas se empleó el kit PCR-Select de Clontech.

Se decidió diseñar la sustracción en ambas direcciones, es decir, se realizaron sustracciones *forward* y *reverse* para las muestras de jurel y merluza. La denominada sustracción *forward* consistió en la hibridación de las muestras prueba ligadas a adaptadores con las muestras control como *driver*, mientras que la sustracción *reverse* consistió en la hibridación de las muestras control ligadas a adaptadores con las muestras prueba como *driver*. Paralelamente se realizó un control positivo de la sustracción con cDNA de músculo esquelético de ratón.

### Clonación, PCR y secuenciación

Los cDNAs generados tras el proceso de sustracción permiten la clonación directa en cualquier vector de extremos T/A. Se ensayaron tres kits comerciales: TOPO TA Cloning Kit de Invitrogen, StrataClone PCR Cloning Kit de Agilent Technologies y yT&A Cloning Kit de Yeastern Biotech. En los tres kits la transformación está basada en choque térmico y los recombinantes se seleccionan por resistencia a ampicilina (100ng/ml) y  $\alpha$ -complementación.

Se realizó un análisis por PCR de las colonias transformantes para confirmar la presencia del inserto en el plásmido y conocer su tamaño aproximado, para el cual se empleó la pareja de *primers* universales M13 *forward* y *reverse*. A continuación, se procedió a la extracción del DNA plasmídico empleando el kit Qiaprep Spin Miniprep Kit de Qiagen. Las muestras obtenidas se enviaron a secuenciar a la unidad de biología molecular del SAI de la Universidad de la Coruña.

### Análisis de datos

Se realizó una búsqueda de similitud de secuencias (BLAST<sup>[17]</sup>) de las secuencias obtenidas contra las bases de datos del NCBI<sup>[18]</sup>, del EMBL-EBI<sup>[19]</sup> y del NEMBASE4<sup>[20,21]</sup>.

## Resultados y discusión

### Extracción de RNA total

Las concentraciones de RNA obtenidas a partir de cada uno de los *pools* de larvas preparados fueron bajas, especialmente en el caso de las extracciones de las muestras de jurel control. Esto podría deberse a una degradación del RNA en el lapso de tiempo (entre 2 y 3 días) existente entre los muestreos y el procesado de las muestras, si bien este efecto debería verse minimizado gracias a la conservación de las muestras en RNAlater. Otra posible razón es que el número de individuos empleado para realizar cada uno de los *pools* fuese demasiado bajo como para conseguir unas concentraciones de RNA mayores. En el caso de los *pools* de jurel control, lo más probable es que las diferencias en la cantidad de RNA extraído se deban al proceso de extracción en sí y a la falta de pericia a la hora de procesar las primeras muestras.

Sin embargo, ya que la concentración obtenida en todos los casos superaba a la requerida para la síntesis de cDNA, y dada la dificultad de conseguir nuevas muestras, se decidió continuar con el proceso de síntesis de cDNA, seleccionando los *pools* que presentaban mejor calidad de RNA. Se considera indicador de una calidad óptima un valores cercano a 2 para la relación entre las bandas ribosomales 28S y 18S, recomendándose trabajar siempre con relaciones iguales o superiores a 1,2. Del mismo modo, valores de RIN entre 9 y 10 se asocian a un RNA prácticamente intacto, mientras que valores inferiores a 6 indican su degradación. Para concentraciones de RNA bajas (inferiores a 10 ng/ $\mu$ l) no es posible obtener estos valores. Los datos correspondientes a las muestras que se seleccionaron para la síntesis de cDNAs se recogen en la **Tabla 1**.

Muestra	Concentración (ng/ $\mu$ l)	28S/18S	RIN
Control jurel	3,88	n/a	n/a
Prueba jurel	174,28	1,84	9,1
Control merluza	75,25	1,31	7,2
Prueba merluza	79,45	1,79	9,5

**Tabla 1.** Valores de concentración, relación 28S/18S y RIN para las muestras de RNA seleccionadas.

## Síntesis de cDNA

Para la síntesis de la segunda hebra fue necesaria la optimización del número de ciclos de PCR para cada muestra por separado. Se aplicó un programa básico a todas las muestras, consistente en una desnaturalización inicial a 95°C durante 1 minuto seguida de 15 ciclos a 95°C durante 15 segundos, 65°C durante 30 segundos y 68°C durante 3 minutos. Las muestras prueba jurel y control merluza fueron sometidas a 12 ciclos adicionales (27 ciclos en total), mientras que las muestras restantes control jurel, prueba merluza y control fueron sometidas a 25 ciclos adicionales (40 ciclos en total).

## Genotecas de hibridación sustractiva (SSH)

La puesta a punto de la técnica fue un proceso laborioso y lento, debido en gran medida a los dilatados tiempos de incubación. Uno de los puntos más conflictivos fue la ligación de los adaptadores a los cDNAs muestra, ya que los análisis de ligación indicaban una baja eficiencia del proceso. Fue necesario repetir la ligación hasta tres veces para cada muestra, a fin de conseguir una concentración apropiada de cDNA *tester* para realizar las hibridaciones posteriores. Del mismo modo se presentaron dificultades durante la primera hibridación de *tester* y *driver*, ya que debido a los pequeños volúmenes de reacción con los que trabajamos, las muestras se evaporaban durante la desnaturalización. Este problema se contrarrestó depositando una gota de aceite mineral sobre la mezcla de reacción antes de introducir las muestras en el termociclador.

## Clonación, PCR y secuenciación

Como se ha indicado con anterioridad, se ensayaron tres kits comerciales: TOPO TA Cloning Kit de Invitrogen, StrataClone PCR Cloning Kit de Agilent Technologies e yT&A Cloning Kit de Yeastern Biotech.

Para el caso del TOPO TA Cloning Kit, que utiliza un vector pCR 2.1-TOPO, se ensayaron tiempos de incubación de los cDNAs con el vector de 5, 10, 20 y 30 minutos. No se obtuvieron diferencias significativas en la eficiencia de la transformación. Así mismo, se ensayaron diferentes tiempos de incubación (2, 4, 12 y 24 horas) en medio líquido (LB, ampicilina 100 ng/ml) a 37°C en agitación, antes de la siembra en placa (LB-agar, ampicilina 100ng/ml, X-gal 40 µg/ml IPTG 0,2 mM) de una alícuota de 25µl. Tras

24h de incubación en una estufa a 37°C, para los tiempos de cultivos en medio líquido de 2h y 4h no se obtuvo crecimiento bacteriano. A 12h se obtuvieron valores entre 0 y 6 unidades formadoras de colonia (CFU). A 24h se obtuvieron céspedes bacterianos y fue necesario realizar aislamiento por estría.

Para el caso del StrataClone PCR Kit, que utiliza un vector pSC-A-amp/kan, se ensayaron tiempos de incubación de los cDNAs con el vector de 5, 10, 15 y 30 minutos y no se obtuvieron diferencias significativas en la eficiencia de la transformación.

Se ensayaron las mismas condiciones y tiempos de incubación en medio líquido que para el caso del TOPO TA Cloning Kit, si bien se omitió el IPTG en las placas, y los resultados en cuanto a recuento de CFUs fueron similares, obteniéndose a las 24h céspedes bacterianos a partir de los que se realizó un aislamiento por estría.

En último lugar, se ensayó el yT&A Cloning Kit. Se empleó un tiempo de incubación de los cDNAs con el vector de 5 minutos. Tras la transformación se procedió a su siembra en placa de manera inmediata. Se obtuvieron valores entre 0 y 4 CFUs. También se incubó un cultivo en medio líquido (LB, ampicilina 100ng/ml) a 37°C en agitación, durante 24h, antes de la siembra en placa (LB-agar, ampicilina 100ng/ml, X-gal 40 µg/ml IPTG 0,2 mM) de una alícuota de 25µl. Tras 24h en una estufa a 37°C se obtuvieron céspedes bacterianos y fue necesario realizar aislamiento por estría.

Se seleccionaron entre 1 y 15 colonias blancas por placa y se realizó una PCR de colonia a fin de confirmar la presencia de inserto antes de la extracción del DNA plasmídico para secuenciación.

El tamaño esperado de los fragmentos de cDNAs procedentes de las SSH oscila entre los 300 y los 1500 pares de bases (bp). Sin embargo, tras realizar una electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR, en la mayoría de los casos no se apreciaba inserto. Esto indica que el sistema de  $\alpha$ -complementación no ha funcionado con normalidad y no ha permitido una correcta selección de los transformantes. A pesar de ello se decidió seleccionar algunos de estos clones para secuenciación. Se pudo confirmar que portaban inserto, pero que se trataba de fragmentos inferiores a 50 bp. También se encontraron insertos superiores a los 2000 bp que, tras secuenciación, resultaron ser fragmentos de vector.

Cabe destacar que en la amplia mayoría de los casos en los que la selección de transformantes fue incorrecta el kit de clonación empleado había sido el StrataClone PCR Kit.

En total, se enviaron a secuenciar 72 muestras resultado de extracciones de DNA plasmídico, pero aproximadamente el 10% de las mismas no pudo ser leído, posiblemente debido a una concentración de DNA en estas muestras inferior a 100 ng/ $\mu$ l.

### Análisis de datos

En total se obtuvieron 59 secuencias válidas para el análisis. El número de secuencias obtenidas a partir de cada reacción de sustracción está recogido en la **Tabla 2**, que se muestra a continuación.

<b>Reacción de sustracción</b>	<b>Nº de secuencias</b>
Control jurel	20
Prueba jurel	19
Control merluza	12
Prueba merluza	8

**Tabla 2.** Número de secuencias obtenidas para cada reacción de sustracción.

Al compararlas con la base de datos de secuencias nucleotídicas del NCBI (GenBank), 49 de ellas presentaron una elevada similitud de secuencia con genes caracterizados presentes en la base de datos. Estos genes fueron la subunidad I de la Citocromo C Oxidasa (*COI*) del genoma mitocondrial de *A. simplex*, y los genes ribosomales 28S, 18S y 5,8S de *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum*, *Brugia malayi* y *Contraecum rudolphii*, que son especies filogenéticamente próximas a *A. simplex*.

En concreto, 16 de las secuencias procedentes de la sustracción prueba jurel, 7 de las secuencias de la sustracción prueba merluza y 2 de la sustracción control merluza fueron las que presentaron alto grado de similitud con los genes ribosomales de las especies antes citadas, mientras que las 20 secuencias procedentes de la sustracción control jurel, 3 de las

secuencias de la sustracción control merluza y 1 de la sustracción prueba merluza presentaron alto grado de similitud con el genoma mitocondrial de *A. simplex*.

A continuación se realizó un Blastx en los seis posibles marcos de lectura con la base de datos de proteínas del EMBL-EBI (UniProt) para las diez secuencias que no habían podido ser identificadas con anterioridad. Cabe destacar, que todas las secuencias menos una presentaban colas poli-A. Los resultados detallados figuran en la **Tabla 3**.

En el caso de las tres secuencias procedentes de la sustracción prueba jurel no se obtuvo ningún tipo de similitud. Estas tres secuencias tampoco habían presentado similitud nucleotídica entre sí. Podemos considerarlas como secuencias candidatas a marcadores moleculares de tropismo larvario.

En el caso de las siete secuencias restantes procedentes de la sustracción control merluza, cinco (que presentaban entre sí similitud de secuencia nucleotídica) presentaron cierta similitud con proteínas putativas sin función conocida de *Caenorhabditis elegans*, *Caenorhabditis briggsae*, *Caenorhabditis remanei* y *Caenorhabditis brenneri*, mientras que las otras dos secuencias no presentaron ningún tipo de similitud. Si bien género *Caenorhabditis* no está demasiado próximo filogenéticamente a *A. simplex*, sin duda alguna es el género de nematodos más ampliamente estudiado y con mayor número de genes caracterizados. Por ello, la cantidad de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas disponibles en las bases de datos es inmensa en comparación a la de otras especies filogenéticamente más próximas a *A. simplex*. Aunque la similitud no sea muy elevada, encontrar correspondencias entre nuestras secuencias y las de *Caenorhabditis* es esperable. En un principio, también podríamos considerar este grupo de secuencias como candidatas a marcadores moleculares de tropismo larvario.

Finalmente, todas las secuencias se contrastaron con los EST de la larva L3 de *A. simplex* de la base de datos de NEMBASE4. Se obtuvo similitud de secuencia con el genoma mitocondrial, y también con algunas regiones correspondientes con posibles genes ribosomales, lo que viene a confirmar la información obtenida a partir de la base de datos del GenBank.

Conviene señalar que el genoma completo de *A. simplex* no está secuenciado. Actualmente el número de genes identificados y caracterizados disponibles en el GenBank para esta especie es 38, 12 de los cuales se corresponden con genes mitocondriales. Teniendo en cuenta que uno de los objetivos de las genotecas de sustracción es eliminar



Secuencia	Sustracción de origen	Nº de nucleótidos	Cola Poli-A	Nº aminoácidos máximo	Coincidencias con UniProt
MC.10	Control merluza	462	Sí	64	CBN-ABU-11 protein ( <i>C. brenneri</i> ), Protein ABU-11 ( <i>C. elegans</i> ), Putative uncharacterized protein ( <i>C. brenneri</i> ), CRE-ABU-1 protein ( <i>C. remanei</i> ).
MC.11	Control merluza	463	Sí	64	CBN-ABU-11 protein ( <i>C. brenneri</i> ), Protein ABU-11 ( <i>C. elegans</i> ), Putative uncharacterized protein ( <i>C. brenneri</i> ), CRE-ABU-1 protein ( <i>C. remanei</i> ).
MC.13	Control merluza	462	Sí	64	CBN-ABU-11 protein ( <i>C. brenneri</i> ), Protein ABU-11 ( <i>C. elegans</i> ), Putative uncharacterized protein ( <i>C. brenneri</i> ), CRE-ABU-1 protein ( <i>C. remanei</i> ), Protein M02G9.1 ( <i>C. elegans</i> ).
MC.21	Control merluza	687	Sí	74	CBN-ABU-11 protein ( <i>C. brenneri</i> ), Protein ABU-11 ( <i>C. elegans</i> ), Putative uncharacterized protein ( <i>C. brenneri</i> ), CRE-ABU-1 protein ( <i>C. remanei</i> ).
MC.24	Control merluza	462	Sí	64	CBN-ABU-11 protein ( <i>C. brenneri</i> ), Protein ABU-11 ( <i>C. elegans</i> ), Putative uncharacterized protein ( <i>C. brenneri</i> ), CRE-ABU-1 protein ( <i>C. remanei</i> ).
MC.28	Control merluza	252	No	52	No
MC.44	Control merluza	300	Sí	41	No
EJ.11	Prueba jurel	267	No	75	No
EJ.23	Prueba jurel	177	No	49	No
EJ.27	Prueba jurel	164	No	No se encontraron ORFs	No

**Tabla 3.** Resultados obtenidos en los análisis Blastx.

los genes que se expresan de manera constitutiva en un organismo, no resulta extraño entonces que un número elevado de las secuencias obtenidas con la genoteca de sustracción no hayan presentado coincidencias con las secuencias existentes para *A. simplex* en la base de datos.

Sin embargo, resulta sorprendente el elevado número de secuencias que presentan similitud con el genoma mitocondrial y con genes ribosomales. Estos genes tienen expresión constitutiva, por lo que en un principio esperábamos eliminarlos al realizar la hibridación sustractiva, o al menos reducir considerablemente su número.

Se proponen dos posibles explicaciones de esta situación:

- En primer lugar, que la sustracción haya fallado. Esto significaría que las muestras no han sido enriquecidas en secuencias expresadas diferencialmente y que por el contrario las secuencias presentes tanto en los *tester* como en los *driver* son muy abundantes. Sin embargo, los controles realizados a lo largo del proceso de sustracción señalan esta opción como poco probable, puesto que se ha confirmado mediante electroforesis la fuerte amplificación de los híbridos con adaptadores distintos entre sí en sus extremos.
- En segundo lugar, que haya una expresión diferencial de estos genes entre larvas migrantes y larvas latentes. En el caso de los genes ribosomales, la mayoría de las secuencias pertenecían a las sustracciones prueba tanto de jurel como de merluza, es decir, que provendrían de larvas migrantes. Si asumimos que la migración larvaria implica un incremento de la actividad metabólica del organismo frente a un teórico estado basal de la larva latente, es lógico que se produzca un incremento de los mRNAs ribosomales, ya que como se incrementarían los niveles de síntesis de proteínas con objetivo de inducir el tropismo larvario, es conveniente que el número de ribosomas también aumente. Sin embargo, esto no explicaría por qué la mayoría de secuencias obtenidas asociadas a larvas latentes, especialmente en el caso del jurel, presentan similitud con genes mitocondriales.

En cualquier caso, ni los genes ribosomales ni los mitocondriales nos resultan válidos como marcadores moleculares del tropismo larvario. De cara a encontrar nuevas secuencias candidatas a convertirse en marcadores moleculares de la migración parasitaria, se plantean dos estrategias a seguir. Por una parte, sería posible la secuenciación masiva de clones de las genotecas. Si bien esperamos obtener un elevado porcentaje de secuencias

que presentarán similitud con genes mitocondriales y ribosomales, si esperaríamos poder conseguir un pequeño porcentaje de secuencias distintivas de cada muestra sustraída. La segunda opción consistiría en realizar *colony-blot*<sup>[22]</sup>, una técnica basada en la hibridación de una sonda de DNA marcada, por ejemplo con un fluorocromo, que es complementaria a una determinada secuencia de interés, lo que permite discriminar de una manera relativamente rápida qué colonias de una placa contienen dicha secuencia. Para ello, se extiende una membrana de nailon sobre una placa con crecimiento bacteriano, a fin de obtener una réplica de las colonias de la placa en la membrana. A continuación se hibrida la sonda sobre la membrana, de manera que queda unida sólo en aquellos puntos en los que se halle la secuencia complementaria. Esta técnica es frecuentemente empleada para el *screening* de genotecas. Sería posible diseñar sondas que nos permitiesen detectar los genes ribosomales o mitocondriales de *A. simplex*, a fin de evitar la selección de esos clones para secuenciación. De esta manera esperaríamos incrementar el número de secuencias candidatas a marcadores moleculares del tropismo o latencia de las larvas L3 de *A. simplex*.

#### Diseño de *primers*

Una vez seleccionado un número determinado de secuencias, se diseñarán *primers* específicos que permitan ensayar su potencial como marcadores moleculares. Se pretende realizar estudios de expresión basados en la técnica de PCR cuantitativa (qPCR).

Por el momento, se han diseñado tres parejas de *primers* para tres de las secuencias obtenidas de la sustracción control merluza (**Tabla 4**). En función de los resultados obtenidos tras los ensayos, podremos identificar cuáles de las secuencias seleccionadas son válidas como marcadores moleculares de tropismo larvario.

<b>Secuencia</b>	<b>Longitud del primer (nucleótidos)</b>	<b>T<sub>m</sub></b>	<b>Nº nucleótidos amplificados</b>
MC.10F 5' - TTCG TTCATAACATTCATGCGTC-3'	23	61,9°C	102
MC.10R 5' - GTTGTGCAGTCGAATGGAATATG-3'	23	62,1°C	
MC.28F 5' - TTTTCAATTCTTATTTGATGTCAACGT-3'	27	62,2°C	115
MC.28R 5' - TCATCTTCGAGTATTTCCACTGG-3'	23	61,9°C	
MC.44F 5' - CAGATTTGTCAAGATGCGTGG-3'	21	61,7°C	109
MC.44R 5' - GCCAGATCGTTTTTACAGC-3'	19	61,3°C	

**Tabla 4.** Diseño de los *primers* para tres de las secuencias procedentes de la sustracción control de merluza.

## Conclusiones

- Se ha realizado una puesta a punto de la técnica de construcción de genotecas de hibridación sustractiva.
- Se han obtenido un total de 59 secuencias procedentes de cuatro sustracciones diferentes. Tras su análisis se ha encontrado que 49 de ellas se corresponden con genes de expresión constitutiva, por lo que en un principio se descartan como candidatas a marcadores moleculares. Las 10 secuencias restantes sí se han considerado como candidatas a marcadores moleculares de tropismo larvario/latencia de la larva L3 de *A. simplex*.
- Se plantea la posible existencia de una expresión diferencial de los genes ribosomales entre las larvas móviles y las que se encuentran en estado de latencia.
- Es necesaria la obtención de más secuencias candidatas a marcadores moleculares antes de comenzar con los ensayos de expresión. Para ello se plantea aplicar técnicas de *colony-blot* para el *screening* de las genotecas, que nos permitan evitar la selección de clones con insertos correspondientes a genes ribosomales o mitocondriales.
- Para 3 de las secuencias candidatas a marcadores moleculares de tropismo larvario se han diseñado *primers* que amplifican regiones de alrededor de 150 bp a fin de emplearlos en estudios de expresión basados en qPCR.

## Bibliografía

- [1] Kuhn T, García-Márquez J, Klimpel S (2011) Adaptive Radiation within Marine Anisakid Nematodes: A Zoogeographical Modeling of Cosmopolitan, Zoonotic Parasites. *PLoS ONE* 6(12): e28642.
- [2] Mattiucci S, Nascetti G (2006) Molecular systematic, phylogeny and ecology of anisakis nematodes of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845: An update. *Parasite*, 13, 99-113.
- [3] Koei M, Berland B, Burt M (1995) Development to third-stage larvae occurs in the egg of *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Anisakoidea, Anisakidae). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52, 134-139.
- [4] Audicana MT, Kennedy MW (2008) *Anisakis simplex*: from Obscure Infectious Worm to Inducer of Immune Hypersensitivity. *Clinical Microbiology Reviews*, 21, 360–379.
- [5] Hak SY, Sang KP, Keun HL, Sun JL, Sun HC, Mee SO, Hae JJ (2007) *Anisakis simplex*: Analysis of expressed sequence tags (ESTs) of third-stage larva. *Experimental Parasitology* 117, 51-56.
- [6] Del Pozo MD, Moneo I, Fernández de Corres L, Audicana MT, Muñoz D, Fernández E, Navarro JA, García, M (1996) Laboratory determinations in *Anisakis simplex* allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 97, 977-984.
- [7] AESAN (2009) Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre la incidencia de la eliminación del pescado o partes del mismo en relación con la reducción de la prevalencia de la anisakiosis humana. *Revista del comité científico*, 10, 19-25.
- [8] Puente P, Anadon AM, Rodero M, Romaris F, Urbeira FM, Cuellar C (2008) *Anisakis simplex*: the high prevalence in Madrid (Spain) and its relation with fish consumption. *Experimental Parasitology*, 118, 271-274.
- [9] EFSA Panel on Biological Hazards (2010) Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products. *EFSA Journal*, 8, 1543.
- [10] Van Thiel PH (1962) Anisakiasis. *Parasitology* 52, 16-17.

- [11] Smith JW, Wootten R (1975) Experimental studies on the migration of *Anisakis* sp larvae (Nematoda: Ascaridia) into the flesh of herring, *Clupea harengus* L. International Journal for parasitology 5, 133-136.
- [12] Abollo E, Gestal C, Pascual S (2001). *Anisakis* infestation in marine fish and cephalopods from Galicia waters: an updated perspective. Parasitology Research, 87, 492-499.
- [13] Hauck AK (1977) Occurrence and survival of the larval nematode *Anisakis* sp. in the flesh of fresh, frozen, brined, and smoked pacific herring, *Clupea harengus pallasii*. Journal of Parasitology, 63, 515-519.
- [14] Cattán PE, Carvajal J (1984) A study of the migration of larval *Anisakis simplex* (Nematoda: Ascaridida) in the Chilean hake, *Merluccius gayi* (Guichenot). Journal of Fish Biology, 24, 649-654.
- [15] Karl H, Roepstorff A, Huss HH, Bloemsma B (1995) Survival of *Anisakis* larvae in marinated herring fillets. International Journal of Food Science & Technology, 29, 661-670.
- [16] Diatchenko L, Laut YC, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. (1996) Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 93, 6025-6030.
- [17] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, 215, 403-410
- [18] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> – National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. (27-01-2012)
- [19] <http://www.ebi.ac.uk/> - European Bioinformatics Institute, European Molecular Biology Laboratory. (27-01-2012)
- [20] <http://www.nematodes.org/nembase4/> - NEMBASE4, Blaxter Lab, Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. (27-01-2012)
- [21] Elsworth B, Wasmuth J, Blaxter M (2011) NEMBASE4: the nematode transcriptome resource. International Journal for Parasitology, 41, 881-894

[22] Maniak M, Saur U, Nellen W (1989) A colony-blot technique for the detection of specific transcripts in eukaryotes. *Analytical Biochemistry*, 176, 78-81.