



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Caracterización genética y biomarcadores del nematodo parásito *Diectophyme renale*

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Fisiología y Biología Molecular y Celular

Lic. Lucas Federico Arce

Directora de tesis: Dra. Laura Kamenetzky

Co-Directora de tesis: Dra. Gisela Raquel Franchini

Consejero de Estudios: Dr. Alejandro Nadra

Lugar de trabajo – Primer periodo: Instituto de Biociencias, Biotecnología y Biología Traslacional, Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Lugar de trabajo – Segundo periodo: Instituto De Investigaciones Bioquímicas De La Plata "Prof. Dr. Rodolfo R. Brenner", Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, CONICET. La Plata, Buenos Aires, 2024.

Fecha de Defensa: 30 de junio de 2025

Título:

Caracterización genética y biomarcadores del nematodo parásito *Diectophyme renale*

Resumen:

Diectophyme renale es un nematodo parásito que produce infecciones debilitantes e incluso fatales en el riñón de mamíferos. En el litoral argentino hay numerosos reportes de este parásito en fauna doméstica y silvestre pero no hay conocimiento sobre patrones de dispersión entre ellos. A la vez, la falta de información molecular dificulta el desarrollo de métodos de diagnóstico efectivos. En este trabajo se utilizaron datos genómicos para desarrollar marcadores moleculares genéticos mitocondriales, COX1 y ND4, que permitieron profundizar el conocimiento eco-epidemiológico en el interfaz doméstico/silvestre y caracterizar la diversidad genética de este parásito en la región. Se observó, por primera vez, que *D. renale* provenientes de Sudamérica (Argentina y Brasil) poseen información genética diferencial respecto a parásitos provenientes de otras regiones. Asimismo, las 55 muestras analizadas de animales domésticos (*Canis lupus familiaris* y *Felis silvestris catus*) y fauna silvestre (*Chrysocyon brachyurus*, *Lycalopex gymnocercus* y *Galictis cuja*) hasta el momento no muestran estructuración poblacional ni por localidad geográfica ni por especie hospedadora. Además, con datos proteómicos obtenidos a partir de muestras de esófago y líquido de excreción/secreción, se identificaron 3 marcadores proteicos que, debido a su especificidad, podrían utilizarse como indicadores de infección con *D. renale*. Particularmente, la proteína P52, mostró reactividad diferencial entre sueros de animales infectados y no infectados siendo la mejor candidata para el diagnóstico de esta parasitosis.

Palabras clave:

Diectophyme renale, filogeografía, proteómica, mitogenoma, serodiagnóstico.

Title:

Genetic characterization and biomarkers of the parasitic nematode *Dioctophyme renale*

Abstract:

Dioctophyme renale is a parasitic nematode that causes severe and often fatal infections in the kidneys of mammals. Along the Argentinean coast, numerous reports document its presence in domestic and wild fauna, yet its distribution patterns across hosts remain unclear. Additionally, the lack of molecular information limits the development of effective diagnostic methods. This study leveraged genomic data to develop mitochondrial genetic markers, *COX1* and *ND4*, enabling a deeper understanding of the eco-epidemiology at the domestic-wildlife interface and characterizing the genetic diversity of *D. renale* in the region. For the first time, South American populations of *D. renale* (Argentina and Brazil) were shown to harbor distinct genetic profiles compared to those from other regions. However, analysis of 55 samples from domestic animals (*Canis lupus familiaris* and *Felis silvestris catus*) and wildlife (*Chrysocyon brachyurus*, *Lycalopex gymnocercus*, and *Galictis cuja*) revealed no population structure based on geographic location or host species. Furthermore, proteomic analysis of esophageal and excretory-secretory fluid samples identified three specific protein markers with diagnostic potential due to their specificity. Among these, the P52 protein exhibited differential reactivity between sera from infected and non-infected animals, making it the most promising candidate for the diagnosis of this parasitosis.

Key words:

Dioctophyme renale, phylogeography, proteomics, mitogenoma, serodiagnostic.

Agradecimientos

A mis directoras, Gise y Lau, por sus enseñanzas, guías y por nutrir mi tesis con su colaboración mutua.

A mis compas del BMHid: Marce, Euge, Pilar, Andrés, Lucas, Gabi, Hugo, Mati y Mara; por ser las caras que me recibieron en CABA y que me acompañaron y contuvieron durante mi tiempo ahí.

A mis compas del IB3 Lab 10: Maru, Nati e Ine; por su cariño y su apoyo en las transiciones difíciles, por mostrarme el “tivis”, por darme alegría.

A mis compas del INIBIOLP Lab Fondo: Delfi, Lucía, José, Ra, Luciana, Nati y Caro; por renovar las ganas de hacer ciencia en toda su magnitud, por enseñarme a cuidar mi bienestar, por hacer de mi lugar de trabajo una fiesta de todos los días, por recibirme en La Plata y hacerme feliz.

A mis amistades que estuvieron codo a codo en todo mi tránsito por CABA y La Plata, que me ayudaron a ser quien me gusta ser y me enseñaron a vivir con **ORGULLO**: Agus S., Emi, JuanMa couch, Maxi M., Omar, Dani, Maxi R., César, Fran, Rodri, Ari Gauche, Andy Tupé, el Tucu, Elián, Belu, Nati, Gabi, Juanjo, Fabri, Peter, Nico, Cathia, Mati, Marcão, Tibo, Mar, Juli, Iván y Juan.

A la gente del arte, que me mostró esta belleza de habitar un mundo distinto del científico y toda la belleza que se puede hacer con las incertidumbres, la subjetividad, lo incómodo. Gracias por hacerme más humano: Betta, David, Mica, Yami, Gabi, Martina, Charly, Aye, Juli, Mica, Manu, Cande, Noe I., Yani, Eze, Liz, Cata, Ceci, José, Jessi e Iván, Sole, mi gente de “Folcklore por Todes”, “Desobediencia Folk”, “El Estribo” y “Amor y Danza”.

A mi gente de la WDA, quienes me regalaron mi tema de máximo interés a través de nuestra diversidad cultural, sino un propósito: Fernando, Aricia, Cath, Anthi, Sarange, Sangjin, Berta, Andrea, Andrés Mauricio, Brenda, Roberto, Bruna, Sheyling, Valen, Nikté, el “WDA-LA Student Chapter”, Peri, Sonia y Andrew.

A la gente me viene acompañando desde vidas pasadas, y me sigue eligiendo en todas mis versiones: Desde Córdoba: Sele, Pau, Bren, Mati L., Mati Fig, Fede, Ángel, Mati L., Maca, Eli, Euge, Ale, Mati For, Nacho, Brian, Fau, Alejandro y Mica. Gracias por hacerme parte de las familias que están construyendo. Desde Puerto Madryn: Cami, Kevin, Ana, Sol, Debi, Bela, Day, Seba, Lu, Fran, Ale, Anto, Aldy, Facu, Cami M., Pau y Mica.

Al Basta Chicos, por darle esa magia poderosa a la radio y sacarme una sonrisa cada tarde de la escritura de esta tesis. Gracias por traerme Córdoba a cada lugar en el que he vivido.

A mi mi mamá, mi papá, mis hermanos, mi padrino, mi madrina, mis primos, mis tías; por haber creído en mí. A mis sobrines, todes, por inspirarme a ser mejor persona cada día.

A la Noé, la Mela y la Flor por su acompañamiento y su amor incondicional cada día de mi vida.

A mi amadísimo Carlos, gracias por un mundo de vos.

A quien lea esta tesis: ¡Vos podés!

Es inconmensurable la gratitud que siento por todo lo que se me dio para querer y amar estos años. Nunca podré reunir todos los nombres que merecen ser leídos ni resumir las palabras que tengo para decirles. Entonces, de la manera más sincera que puedo y con todo mi corazón tecleo:

¡GRACIAS!

Índice General

Introducción General.....	9
Nematodos: Un Phylum Por Explorar.....	10
Características Generales	10
Estrategias Evolutivas: El Parasitismo en los Nematodos	12
Historia Evolutiva de Los Nematodos.....	13
Posición de los Nemátods en el Arbol de la Vida	13
Primeras Filogenias Basadas en Datos Morfológicos	14
La Incorporación de Marcadores Moleculares.....	14
Calibración Temporal de Filogenias.....	19
Marcadores Moleculares en Nematodos.....	21
Biomarcadores: Definición y Aplicaciones	21
Marcadores basados en ADN	22
Marcadores Genéticos en la era de la Genómica.....	23
Marcadores mitocondriales en nematodos	24
Marcadores basados en proteínas	25
Dinámica proteica del LES durante el desarrollo	26
Aplicaciones de Biomarcadores Proteicos.....	27
El Nematodo Parásito <i>Diectophyme renale</i>	28
Orden Diectophymatida	28
Biología de <i>Diectophyme renale</i>	29
Infección por <i>D. renale</i> : La diectofimosis	31
Parte I: Diversidad Genética de <i>Diectophyme renale</i> en Regiones Endémicas de Argentina y Brasil	33
Introducción	34
Ecoepidemiología de <i>D. renale</i> en Sudamérica	34
Objetivos.....	36
Metodología	37
Material Parasitario.....	37
Extracción de ADN y genotipado	39
Análisis de secuencias	42
Estructura poblacional, dinámica demográfica y análisis espaciales	42
Filogenia y relaciones entre haplotipos.....	43
Resultados	44
Presencia de <i>D. renale</i> en Sur de Sudamérica	44
Marcadores mitocondriales y variabilidad genética en <i>Diectophyme renale</i>	45
Análisis filogenético COX1 y comparación con base de datos	47
Filogenia concatenada y asociaciones por hospedador y localidad.....	50
Relaciones genéticas y geográficas	55

Discusión.....	56
Marcadores Moleculares Genéticos para el estudio de <i>D. renale</i>	56
Delimitación de linajes de <i>D. renale</i>	58
Dinámica poblacional de <i>D. renale</i> en Sudamérica: efecto del hospedador y localidades.....	60
Parte II: Búsqueda e identificación de marcadores proteicos de <i>Diocetophyme renale</i>.	
Posible aplicación para estudios de diagnóstico.....	62
Introducción	63
Diagnóstico de diocetofimosis en perros	63
Potencial Serodiagnóstico	65
Perfil Proteico de Esófago y Respuesta Antigénica	68
Objetivos.....	70
Metodología	71
Perfil proteico Líquido de Excreción/Secreción.....	71
Obtención de Líquido de Excreción/Secreción.....	71
Concentración de Proteínas de LES.....	71
Electroforesis de Proteínas de LES mediante SDS Page	72
Western Blot de LES con S(+) y S(-)	74
Proteómica del líquido de excreción/secreción (LES)	76
Preparación de la muestra	76
Ensayo de Proteómica y Obtención de Resultados.....	77
Búsqueda de Proteínas Candidatas en Proteoma de LES y Esófago	78
Clonación y Expresión de Proteínas Seleccionadas.....	79
Vector de Clonación y Enzimas de Restricción	79
Células Competentes para la Expresión de Proteína	80
Diseño de primers para Clonación	81
Extracción de ARN	82
Amplificación de transcritos por RT-PCR.....	82
MiniPreparación (MiniPrep) de Plásmido pET28a(+)	83
Digestión con Enzimas de Restricción y Ligación	83
Transformación de bacterias BL21 (DE3)	84
Expresión de Proteínas a Gran Escala.....	85
Purificación de Proteínas por Cromatografía de Afinidad.....	85
Western Blot de las Proteínas Purificadas	86
Caracterización estructural <i>in silico</i>	87
Resultados	87
Perfil Proteico Líquido de Excreción/Secreción.....	87
Resultado de Proteómica Esófago y LES.....	90
Evaluación de Proteínas Candidatas por Especificidad y Antigenicidad	92
Revisión de Modificaciones Postraduccionales y Péptido Señal	99
Clonación y Expresión de las Proteínas Candidatas	101
Purificación de las proteínas candidatas	104
Western blot de proteínas recombinantes	105

Caracterización <i>in silico</i> de P52	107
Discusión.....	114
Conclusiones Generales.....	119
Apéndice.....	121
Colony PCR de proteínas clonadas	122
Screening de expresión de proteínas candidatas.....	124
Marcha de purificación de proteínas candidatas	126
Western blot de proteínas seleccionadas frente a sueros (+) y (-)	128
Referencias.....	130

Introducción General

Nematodos: Un Phylum Por Explorar

Características generales

El phylum Nematoda (del griego nema: hilo; eidos: con aspecto de), comprende organismos también conocidos como nematelmintos o nematodos, que constituyen actualmente el tercer grupo más diverso dentro de los metazoos, junto con Arthropoda y Mollusca (Navone et al., 2020). Se han descrito cerca de 30.000 especies, distribuidas en más de 3.000 géneros y 250 familias, aunque se estima que la diversidad real de nematodos podría alcanzar entre 100.000 y 10 millones de especies (Hodda, 2022). Su cuerpo presenta una estructura vermiforme constante, con especies de vida libre y parásitas, tanto generalistas como especialistas. En paralelo, numerosas especies parásitas afectan a plantas y animales, representando un impacto significativo en la salud humana, la agricultura y la producción animal. A pesar de su importancia ecológica, económica y científica, los nematodos poseen un registro fósil muy pobre, lo que limita en parte el estudio de su evolución (Kiontke et al., 2021).

Los nematodos presentan un cuerpo alargado, de simetría bilateral y ambos extremos aguzados. Su organización corporal puede describirse como un tubo dentro de otro tubo (Figura 1): el tubo interno incluye el intestino y las gónadas, rodeado por el tubo externo compuesto por la pared corporal que está conformada por músculos longitudinales dorsales y ventrales, epidermis y cutícula. Entre ambos se encuentra una cavidad corporal derivada del blastocele embrionario (o pseudoceloma), la cual está llena de fluido y se encuentra bajo presión, funcionando como un esqueleto hidrostático (Kiontke et al., 2021). Esta estructura les permite desplazarse mediante movimientos ondulatorios sinusoidales sobre un costado del cuerpo. Carecen de apéndices y segmentación corporal. No presentan cilios ni flagelos, con excepción de algunos órganos sensitivos que tienen cilios modificados. Todos los nematodos atraviesan cuatro estadios larvales, al final de los cuales sintetizan una nueva cutícula y mudan la anterior (Navone et al., 2020).

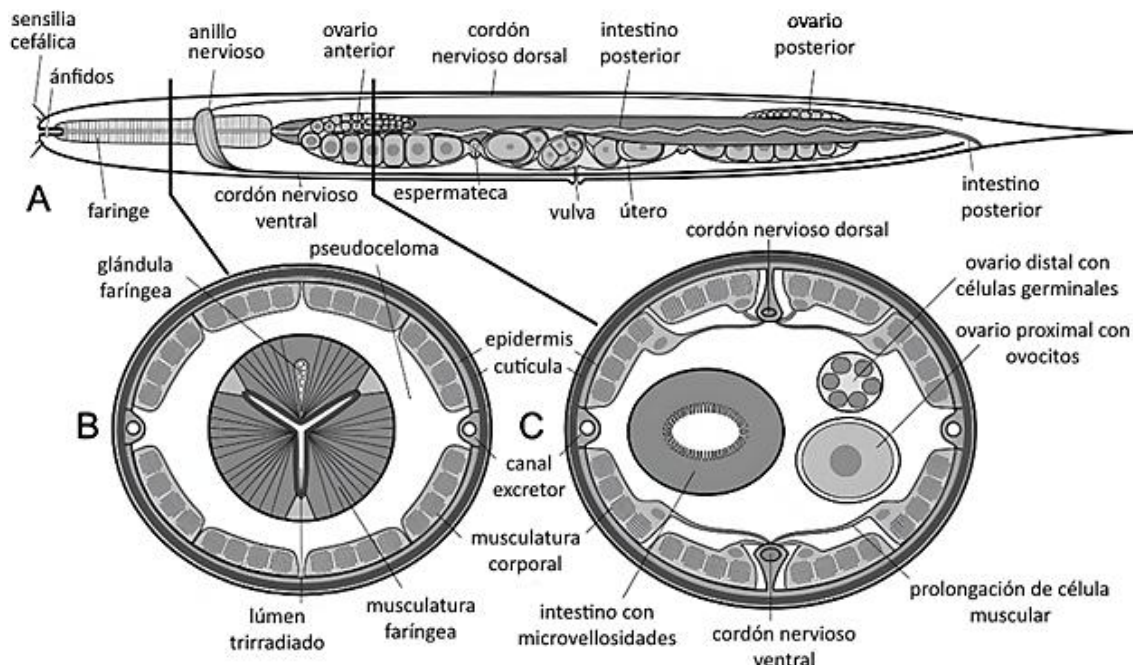


Figura 1. Esquema de la morfología general de un nematodo. (A) Vista lateral de una hembra típica de nematodo. (B) Corte transversal en la región del esófago. (C) Corte transversal cerca del brazo anterior de la gónada. Modificado de Kiontke y Fitch, 2013.

A pesar de las limitaciones que presenta su arquitectura corporal, relativamente conservada a lo largo de la evolución, los nematodos exhiben una notable diversidad biológica. Si bien comparten un plan corporal fundamentalmente invariable, presentan una amplia variación morfológica, fisiológica y ecológica (Kiontke y Fitch, 2013). Una de las diferencias más evidentes se relaciona con el rango de tamaños corporales, que, si bien en su mayoría corresponde a formas microscópicas, abarca desde especies diminutas como *Protorhabditis hortulana* (0,2 mm) (Abolafia y Peña-Santiago, 2016) hasta formas de gran tamaño como *Placentonema gigantissima*, que puede superar los 8 metros de longitud (Gubanov, 1951). Asimismo, se observan variaciones relevantes en las estructuras cuticulares y, en particular, en los aparatos de alimentación, que reflejan adaptaciones funcionales específicas. No obstante, la mayor diversidad se manifiesta a nivel fisiológico y en la amplitud de interacciones simbióticas que establecen con otros organismos. Los nematodos se encuentran presentes en todos los ecosistemas conocidos, incluyendo suelos desérticos, hielos polares, copas arbóreas, aguas termales, fondos oceánicos profundos y sedimentos anóxicos (Kiontke y Fitch, 2013).

Durante mucho tiempo, los zoólogos consideraron que la anatomía simple de los nematodos representaba un estado primitivo dentro del reino animal. Sin embargo, los estudios de filogenia molecular han respaldado consistentemente la inclusión del phylum Nematoda dentro del superphylum Ecdysozoa, un clado de protóstomos que comprende también a los artrópodos (Schmidt-Rhaesa, 2012). Esta clasificación sugiere que el cuerpo típicamente reducido de los nematodos no es una condición ancestral, sino más bien una forma altamente derivada y especializada. Haag et al. (2018) han interpretado al nematodo como un “microchip animal”, refiriendo a un animal de cuerpo simple y a su vez altamente eficiente, que habría evolucionado a partir de un ancestro de “más complejo” y de mayor tamaño.

Parasitismo en los nematodos

Los análisis filogenéticos han demostrado que el parasitismo en nematodos ha evolucionado múltiples veces de forma independiente. El parasitismo en plantas habría surgido al menos tres veces; en vertebrados, al menos cinco, y se han identificado al menos siete linajes parásitos o parasitoides de invertebrados (Kiontke et al., 2021; Kiontke y Fitch, 2013). El conocimiento de relaciones filogenéticas sólidas facilita avances en el campo biomédico. Si bien los taxones parásitos suelen ser difíciles de cultivar y estudiar, existen especies de vida libre estrechamente emparentadas que podrían actuar como modelos, al compartir rasgos fenotípicos relevantes (Blaxter et al., 1998; De Ley et al., 1995).

Los nematodos parasitan diferentes sistemas de órganos y cada especie posee requerimientos específicos en términos de localización. Las especies parásitas de invertebrados suelen alojarse en el intestino y en el hemocele. Entre los parásitos de vertebrados distintas especies pueden coexistir, por ejemplo, en colon o intestino, en virtud de sus diferentes necesidades de nutrientes y modos de alimentación (Navone et al., 2020).

En las principales especies parásitas descritas, en animales, el estadio infectivo corresponde al tercer estadio larval (L3); no obstante, algunos grupos utilizan la larva L1. Esta diferencia ha sido considerada como un carácter de relevancia taxonómica. En vertebrados, los nematodos que habitan el canal digestivo u otro órgano del hospedador tienen diferentes modos de transmisión. Estos pueden ser:

- **por penetración pasiva:** ya sea por ingesta de huevos o larvas infectivas que permanecen en el suelo o están en un hospedador intermediario.
- **por penetración activa:** a través de la pared del cuerpo del hospedador definitivo de las larvas infectivas que se encuentran en el ambiente.
- **por transmisión vectorial:** mediante un insecto hematófago que inocula la larva infectante.

Entre las especies parásitas de plantas pueden mencionarse las ectoparásitas (aquellas que se alimentan desde el exterior de la planta introduciendo solo el estilete), semi-endoparásitas (aquellas que al alimentarse introducen la parte anterior del cuerpo en los tejidos de la planta) y endoparásitas (aquellas que se introducen en distintos órganos de la planta), alterando su histología, y ocasionando la deformación de los vasos conductores (xilema y floema) (Navone et al., 2020).

Ciclos de vida

Los modos de parasitismo en los nematodos están estructurados en base a su ciclo de vida (Kiontke et al., 2021). En vertebrados, pueden presentar ciclos de vida complejos, donde puede haber:

- **hospedadores definitivos:** donde desarrolla el adulto
- **hospedadores intermediarios:** fundamentales para el desarrollo de uno o varios estadios larvales
- **hospedadores paraténicos:** en los que no hay desarrollo, pero funcionan como transporte del parásito (generalmente enquistado) y facilitando la llegada al hospedador definitivo.

Los ciclos, a su vez, pueden alternar generaciones de parásitos con sistemas reproductivos de autofecundación con generaciones que presenten reproducción cruzada. Al igual que otros parásitos, ciertos nematodos son capaces de modificar el comportamiento del hospedador para favorecer su transmisión (Kiontke y Fitch, 2013).

En términos genéricos, luego de la eclosión del huevo, los primeros dos estadios larvales son de vida libre y microbívoros. Luego la larva muda y retiene la cutícula que rodea al estadio L3. El mismo debe sobrevivir de reservas lipídicas y, en las especies en las que este es el estadio infectivo, debe penetrar o ser comido por un hospedador. Algunas larvas L3 penetran en el hospedador definitivo directamente y pierden sus envolturas durante este proceso; otros son ingeridos directamente ya sea vía un hospedador intermediario o paraténico y deben desenquistarse. Este proceso requiere de estímulos específicos (enzimáticos). La hipobiosis es una fase del desarrollo del parásito y representa una etapa de inactividad larval, ya sea del huevo o del estadio infectivo envainado. De esta manera, resisten condiciones adversas ya sean del ambiente o fisiológicas. Los ciclos de vida de los nematodos parásitos de vertebrados se pueden clasificar según los hospedadores involucrados en **monoxenos**: cuyos ciclos utilizan un único hospedador; **heteroxenos** cuyos ciclos presentan uno o más hospedadores intermediarios; y **autoheteroxeno** en el cual el hospedador definitivo también actúa como hospedador intermediario. Algunos nematodos pueden realizar migraciones por diferentes órganos del hospedador definitivo para alcanzar su localización definitiva, las cuales van acompañadas de crecimiento y desarrollo alcanzando la maduración del adulto (migración ontogenética). La penetración de una larva en un hospedador no habitual puede producir una reacción cutánea o visceral que se conoce con el nombre de *larva migrans* (Navone et al., 2020).

Historia Evolutiva de Los Nematodos

Posición de los nematodos en la filogenia de metazoos

Se estima que los nematodos divergieron de otros linajes animales entre 600 y 1200 millones de años (Ma) (Blaxter et al., 1998). Durante mucho tiempo, su posición filogenética fue incierta y estuvo sujeta a numerosas revisiones. Inicialmente, fueron incluidos dentro del grupo artificial Pseudocoelomata, junto con otros phyla de invertebrados con cavidad corporal no completamente revestida por mesodermo. Sin embargo, los fundamentos morfológicos de este agrupamiento eran débiles y se manifestaron serias dudas sobre su validez (Hyman, 1951).

A finales de la década de 1990, los estudios moleculares basados en secuencias de ARN ribosomal propusieron una reconstrucción radical ubicando los nematodos en un clado monofilético denominado Ecdysozoa, caracterizado por la muda periódica de la cutícula. Este superphylum también incluye a Onychophora, Arthropoda, Tardigrada y Priapulida, entre otros (Aguinaldo et al., 1997; Blaxter, 2009). A pesar de los conflictos con criterios morfológicos tradicionales, como la presencia de un celoma verdadero o segmentación metamérica, el agrupamiento Ecdysozoa ha sido respaldado por múltiples líneas de evidencia molecular y, en menor medida, morfológica, como mudas y epitelio ciliado (Giribet et al., 2000; Mallatt y Giribet, 2006; Peterson y Eernisse, 2001; Schmidt-Rhaesa, 2012).

En cuanto a su disposición dentro de Ecdysozoa, se ha propuesto que la presencia de un anillo nervioso que rodea el esófago constituye una sinapomorfía de un grupo denominado Cycloneuralia, que incluiría a Nematoda, Nematomorpha, Priapulida, Kinorhyncha y Loricifera. No obstante, esta agrupación no ha sido consistentemente recuperada en los análisis filogenéticos moleculares. En numerosos estudios, Nematoida (Nematoda + Nematomorpha) aparece como grupo hermano de Arthropoda, lo que respalda su inclusión dentro de Ecdysozoa, pero sin confirmar la monofilia de Cycloneuralia (Aguinaldo et al., 1997; Mallatt y Giribet, 2006). Si bien algunos

análisis moleculares han sugerido una relación filogenética cercana entre Tardigrada, Nematoda y Nematomorpha, esta hipótesis ha sido atribuida a posibles artefactos metodológicos, como homoplasias o sesgos en las sustituciones nucleotídicas (Campbell et al., 2011). La evidencia molecular actual respalda firmemente la validez del superphylum Ecdysozoa, aunque persisten incertidumbres en cuanto a las relaciones internas entre sus linajes constituyentes (Schmidt-Rhaesa, 2012).

Nematomorpha se mantiene consistentemente como el phylum hermano de Nematoda. Son parásitos obligados de artrópodos terrestres y marinos, con un ciclo de vida parasitoide: las larvas se desarrollan dentro del hospedador, al que matan al emerger, y los adultos son de vida libre. Su biología es similar a la de los nematodos Mermithida, lo que ha llevado a plantear la hipótesis de un ancestro nematodo originalmente parásito. No obstante, la evidencia molecular indica que los grupos de vida libre ocupan posiciones basales dentro de Nematoda, lo que sugiere que estas similitudes son producto de evolución convergente (Blaxter y Koutsovoulos, 2015).

Primeras filogenias basadas en datos morfológicos

La taxonomía de los nematodos ha enfrentado históricamente diversas dificultades. Por un lado, las clasificaciones fueron parcializadas debido a la especialización de los investigadores en grupos particulares (marinos, terrestres, parásitos de animales o plantas), lo que impidió una visión integradora. Por otro lado, la morfología externa relativamente uniforme de los nematodos, junto con una considerable homoplasia, dificultó la delimitación de clados (Kiontke et al., 2021).

Debido a sus caracteres morfológicos se propuso dividir el phylum Nematoda en dos grandes clases: Secernentea y Adenophorea (Chitwood y Chitwood, 1937). Adenophorea se caracteriza por presentar estructuras como esticosoma y trofosoma, escasas papilas caudales, sistema excretor ausente o con una única célula ventral sin canales laterales, ausencia de fasmidos y deiridos. Este grupo incluye tanto formas de vida libre como parásitas de plantas, invertebrados y vertebrados. Por su parte, Secernentea posee numerosas papilas caudales, sistema excretor con uno o dos canales laterales asociados a células glandulares, fasmidos presentes y, generalmente, también deiridos. Comprende tanto especies de vida libre como parásitas, siendo particularmente dominante entre los parásitos de vertebrados (Navone et al., 2020).

Incorporación de marcadores moleculares

La comprensión de las relaciones filogenéticas dentro del phylum Nematoda se ha modificado considerablemente gracias al uso de secuencias de ADN. Los análisis filogenéticos basados en la secuencia del gen del ARN de la subunidad menor del ribosoma (ADNr 18S), realizados inicialmente con 53 secuencias provenientes de nematodos parásitos y de vida libre, indicaron que la evolución morfológica convergente es considerable, requiriendo revisiones en la clasificación tradicional basada en caracteres morfológicos (Blaxter et al., 1998). Dichos estudios cuestionaron particularmente la división tradicional en dos clases, Adenophorea y Secernentea, sugiriendo que Adenophorea podría ser parafilético, ya que contiene ancestros de Secernentea, hipótesis apoyada también por análisis morfológicos previos (Riemann et al., 1994). La adición posterior de taxas al análisis no mostraron diferencias topológicas con lo observado (Aleshin et al., 1998). A su vez, estos estudios han permitido identificar

tres grandes grupos principales (Figura 2): Dorylaimia (Clado I), Enoplia (Clado II) y Chromadorea (que incluye Rhabditida o Secernentea). Rhabditida se subdivide además en Spirurina (Clado III), Tylenchina (Clado IV) y Rhabditina (Clado V) (Aleshin et al., 1998; M. L. Blaxter et al., 1998; De Ley y Blaxter, 2002, 2004). Los primeros estudios transcriptómicos mostraron consistencia con esta clasificación (Parkinson et al., 2004).

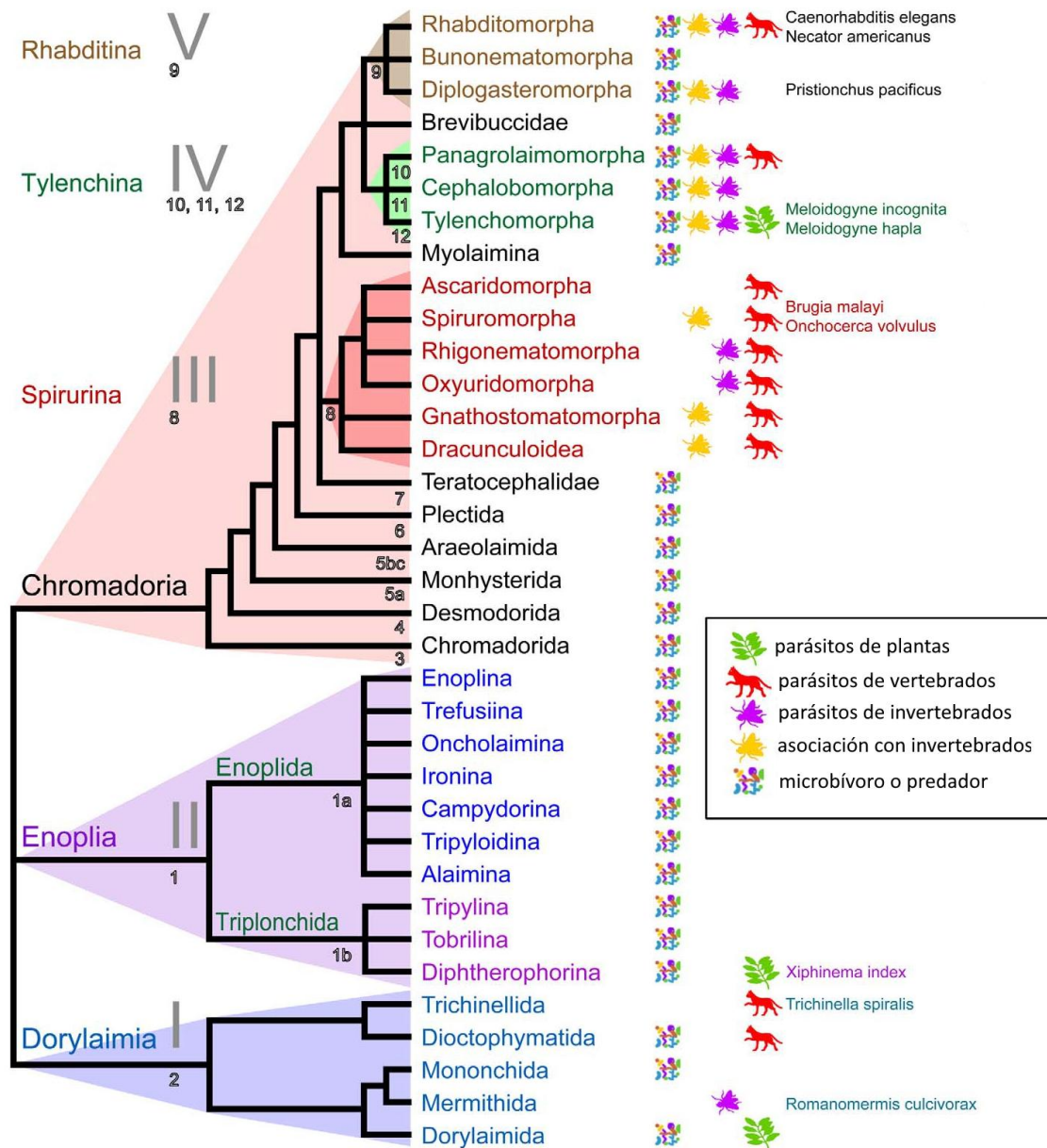


Figura 2. Relaciones filogenéticas dentro de Nematoda. Esta filogenia se basa en análisis moleculares del gen del 18S ARNr. Se presentan los nombres de taxones analizados por De Ley y Blaxter (2002), junto con la convención de nomenclatura por clados introducida por Blaxter et al. (1998). De forma complementaria, se incluye el esquema de nomenclatura numérica propuesto por Holterman et al. (2006), indicado mediante letras subclados. Íconos pequeños representan los modos de alimentación, así como asociaciones parasíticas de animales y plantas. Modificado de Blaxter (2011).

El **Clado I**, Dorylaimia, incluye especies terrestres depredadoras, importantes en las redes tróficas (Monochida), así como parásitos de insectos (Mermithida), animales vertebrados (Trichinellida y Dioctophymatida) y plantas (Dorylaimida).

El **Clado II**, Enoplia, reúne a Triplonchida (fitoparásitos y especies de vida libre) con Enoplida (vida libre), contradiciendo agrupaciones morfológicas previas (Riemann et al., 1994).

El grupo Chromadorida, principalmente microbívoros, se considera ancestral respecto a Secernentea (Riemann et al., 1994). Sin embargo, datos del 18S ARNr no apoyan su monofilia, sino una serie parafilética basal. La clasificación molecular reconoce tres clados principales dentro de Secernentea (III, IV y V), que no coinciden con las divisiones taxonómicas clásicas y combinan órdenes fitoparásitos y zooparásitos con taxones de vida libre.

El **Clado III**, Spirurina, agrupa parásitos de vertebrados y artrópodos, como Oxyuridomorpha, Rhigonematomorpha, Spiruromorpha, Ascaridomorpha, Gnathostomatomorpha y Dracunculoidea.

El **Clado IV**, Tylenchina, integra grupos que poseen representantes parásitos de invertebrados incluyendo Tylenchomorpha, Panagrolaimomorpha, Cephalobomorpha y Drilonematomorpha.

El **Clado V**, Rhabditina, incluye Rhabditomorpha (*Caenorhabditis elegans* junto al orden Strongylida parásito modelo de vertebrados), Bunonematomorpha y Diplogasteromorpha.

Las discrepancias entre la filogenia basada en ADNr 18S y las morfológicas previas podrían atribuirse a la evolución convergente. Por ejemplo, Steinernema y Heterorhabditis comparten procesos comunes en la entomopatogénesis, pero no un ancestro común exclusivo. Algo similar ocurre con similitudes faríngeas entre Tylenchida, Aphelenchida y Diplogasterida sugieren una convergencia estructural más que una relación filogenética cercana (Blaxter et al., 1998; Poinar, 1984).

Aunque el ADNr 18S es popular para reconstrucciones filogenéticas profundas, ha presentado limitaciones debido al escaso muestreo taxonómico de grupos marinos y de vida libre, insuficientes para resolver las relaciones basales de Nematoda (Holterman et al., 2006; Meldal et al., 2007; van Megen et al., 2009). Estudios recientes con secuencias más extensas tampoco lograron resolver con claridad las relaciones iniciales (Ahmed y Holovachov, 2021; Holterman et al., 2019).

Los primeros estudios moleculares sobre la filogenia de nematodos, como los de Blaxter et al. (1998) y Aleshin et al. (1998), se vieron limitados por un muestreo taxonómico reducido, especialmente en especies de vida libre y marinas. Esto impidió resolver las ramas más basales del árbol filogenético del grupo. Análisis filogenéticos posteriores basados en 339 taxones de nematodos y secuencias de ADNr 18S identificaron **12 clados** principales, resolviendo más profundamente las relaciones de los clados I-V (Holterman et al., 2006) y propusieron a Enoplia como el linaje más basal. Sin embargo, esta posición no fue estadísticamente sólida, y junto con posteriores análisis, se evidenció las limitaciones del uso del 18S ARNr como único marcador. A pesar de su uso generalizado, este gen carece del poder resolutivo necesario para definir la estructura basal del árbol filogenético, resultando en filogenias con bajo soporte en su “esqueleto” principal y con numerosos linajes pobremente definidos (Ahmed y Holovachov, 2021; Blaxter y Koutsovoulos, 2015; Holterman et al., 2019; van Megen et al., 2009).

Los análisis filogenómicos basados en genomas completos o transcriptomas emergieron como una alternativa más robusta, debido al acceso de tecnologías de secuenciación masiva (Eisen y Fraser, 2003; Ahmed et al. 2022; Qing et al. 2025). Estos enfoques permiten discriminar mejor entre señales filogenéticas reales y ruido, aunque su impacto en el estudio de Nematoda ha sido limitado por el escaso muestreo de especies no modelo y/o de vida libre (Blaxter et al., 2016; Parkinson et al., 2004; Smythe et al., 2019; Wasmuth et al., 2008). Estos estudios

respaldan los tres grandes grupos observados por 18S ARNr (Dorylaimia, Enoplia y Chromadoria). Una amplificación significativa en el muestreo de Enoplia, incluyendo transcriptomas de ocho especies (una dulceacuícola y siete marinas), confirmaron su ubicación como taxón hermano del resto de los nematodos (Ahmed et al., 2022; Qing et al., 2025; Smythe et al., 2019). Estudios recientes mejoraron la resolución de los árboles filogenéticos del phylum Nematoda mediante el análisis detallado de los subárboles de Trichinellida, Spirurina, Tylenchina y Rhabditina, lo que permitió un abordaje más exhaustivo de estos grupos clave y un muestreo taxonómico equilibrado a nivel del phylum. En los mismos se identificó a Trichinellida y Dioctophymatida como grupo hermano de un linaje compuesto por Mononchida, Mermithida y Dorylaimida (Ahmed et al., 2022), en contraste con posiciones propuestas anteriormente (Meldal et al., 2007; van Megen et al., 2009). Además, en contraste con filogenias basadas en ADNr 18S y genomas mitocondriales, se han respaldado algunas hipótesis morfológicas clásicas, como un origen común del estilete en nematodos fitoparásitos (Ahmed et al., 2022). Si bien las filogenias mitogenómicas suelen ser consistentes con las obtenidas mediante ADNr 18S y análisis genómicos o transcriptómicos (Kern et al., 2020; Kim et al., 2017), se han detectado discrepancias topológicas relevantes en la subclase Chromadoria, que concentra la mayor cantidad de genomas mitocondriales secuenciados dentro del phylum. Las causas detrás de las diferencias entre las historias evolutivas de los genomas mitocondriales y nucleares en nematodos constituyen un campo de investigación incipiente (Ahmed et al., 2022). Por lo tanto, debido a dichas inconsistencias, se ha optado por revisar y modificar los clados originalmente propuestos por Blaxter et al. (1998) y Holterman et al. (2006), dando lugar a una nueva propuesta filogenética. La Figura 3 presenta la filogenia de nematodos más actualizada disponible hasta la fecha.

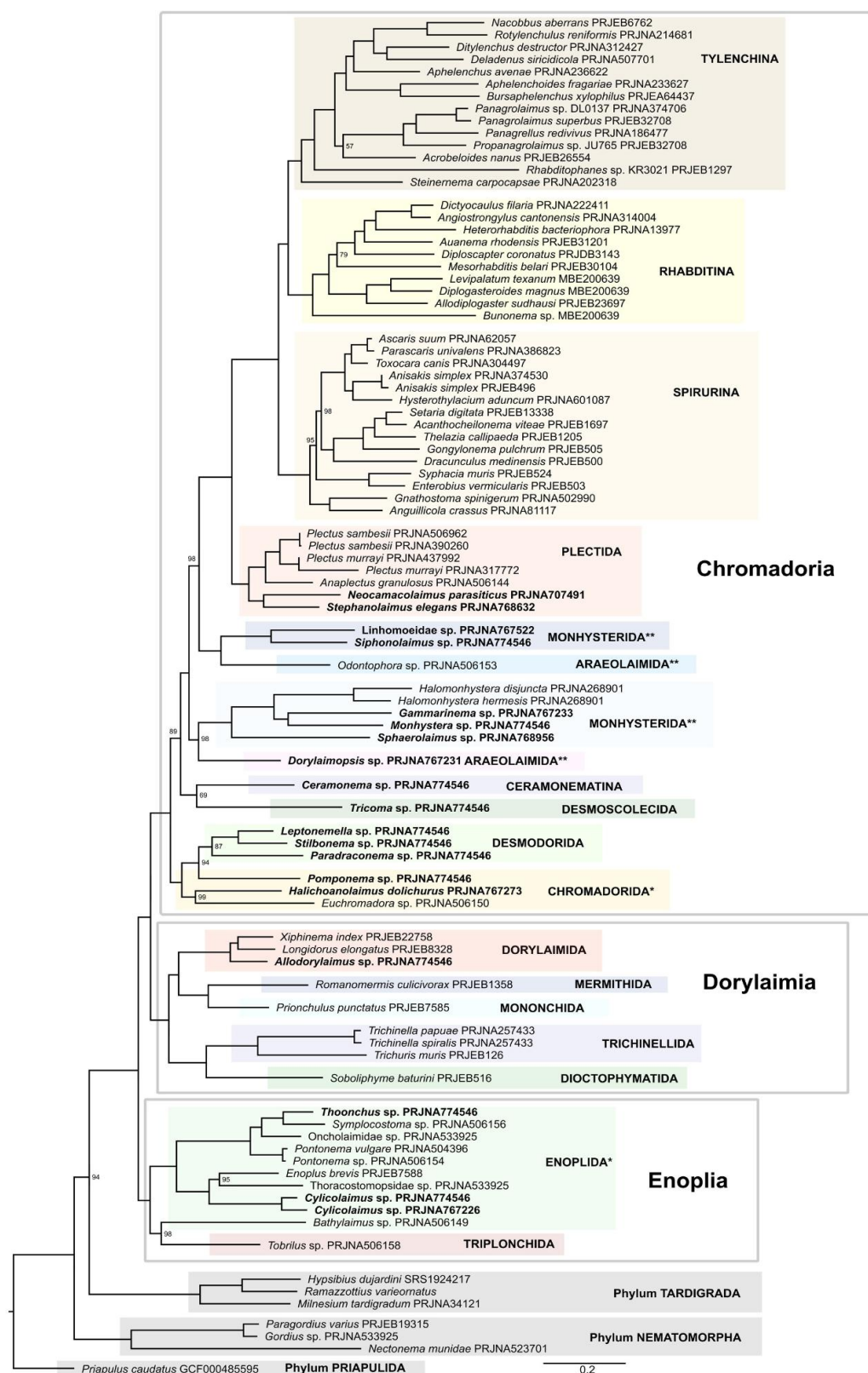


Figura 3. Filogenia de Nematoda basada en datos de 286 genomas y transcriptomas. Solo se indican los valores de soporte bootstrap en aquellos nodos que son inferiores al 100 %. Los órdenes parafiléticos están marcados con un asterisco (*), los órdenes polifiléticos con doble asterisco (**). Tomado de Ahmed et al. (2022).

Calibración temporal de filogenias

El registro fósil proporciona evidencia directa sobre la aparición, diversificación y extinción de distintos linajes a lo largo de la historia evolutiva de la Tierra. Cuando se identifica un fósil perteneciente a un grupo considerado ancestral de otros clados actuales, su antigüedad puede emplearse como punto de calibración temporal en análisis filogenéticos, permitiendo estimar con mayor precisión las fechas de divergencia entre linajes. Los fósiles de nematodos son raros y, en su mayoría, poco informativos respecto a relaciones evolutivas profundas. Se han identificado tres fuentes principales de fósiles de nematodos: ámbares (resina fosilizada de árboles), coprolitos y fósiles rocosos donde suelen encontrarse cuerpos de los nematodos (Poinar, 2015). Si bien, se dató el origen del phylum en el Precámbrico (>543 Ma), y los tres grupos principales (Dorylaimia, Enoplia y Chromadoria) habrían divergido tempranamente, se han estimado pocas fechas de divergencia para los nematodos. Se estima que los caenorhabdítidos divergieron de los Strongyloidea parásitos de vertebrados hace aproximadamente 380 Ma, y su divergencia de los Ascaridomorpha parásitos se sitúa en unos ~540 Ma (Blaxter, 2009).

En cuanto al aporte de datos moleculares, se han propuesto numerosas filogenias que permiten formular diversas hipótesis sobre el origen de los distintos grupos. Sin embargo, el conocimiento sobre la datación temporal de los nodos internos es aún limitado, debido a que pocos estudios han abordado específicamente este aspecto. Un patrón destacado en varios análisis filogenéticos, especialmente aquellos basados en 18S ARNr, es la marcada heterogeneidad en las tasas evolutivas entre linajes. En particular, el linaje que incluye al modelo *Caenorhabditis elegans* presenta una tasa de sustitución significativamente más elevada en comparación con sus parientes cercanos (Blaxter, 2009). Dadas las limitaciones metodológicas y los supuestos debatibles, los estudios que han intentado datar nodos clave en el árbol filogenético de los nematodos son escasos.

Se utilizaron secuencias de **citocromo c** y **globinas tipo nematodo** (también conocidas como nemoglobinas) para estimar la divergencia entre diversos grupos de nematodos y su relación con *C. elegans* (Vanfleteren et al., 1994). Los períodos evolutivos unitarios (tiempo correspondiente a un 1 % de divergencia en la secuencia proteica) se calcularon en 21 Ma para citocromo c y 5 Ma para globina, a partir de taxones principalmente vertebrados. Estas tasas fueron luego empleadas para estimar la divergencia entre *C. elegans* y *C. briggsae* (112 Ma), la del phylum Nematoda respecto de los otros animales (1200–950 Ma), y para reconstruir la divergencia entre clados dentro de este phylum (Blaxter, 2009) (Figura 4).

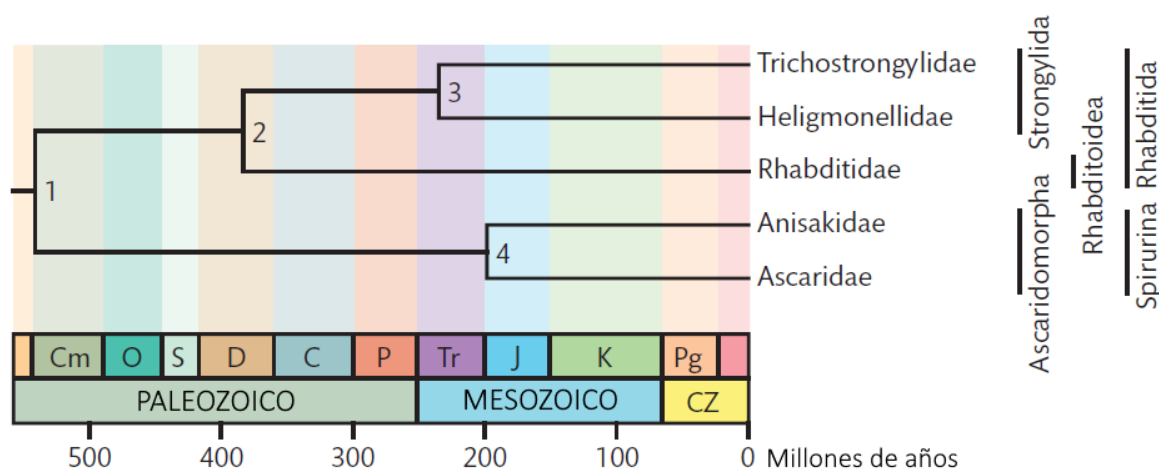


Figura 4. Árbol temporal (timetree) de Nematoda. Abreviaciones: C (Carbonífero), Cm (Cámbrico), CZ (Cenozoico), D (Devónico), J (Jurásico), K (Cretácico), O (Ordovícico), P (Pérmico), Pg (Paleógeno), S (Silúrico) y Tr (Triásico). Modificado de M. Blaxter (2009).

Un enfoque **multigénico** permitió estimar la divergencia entre *C. elegans* y *C. briggsae* entre 110 y 80 Ma, basado en 338 conjuntos de genes ortólogos codificantes de proteínas (Coghlan y Wolfe, 2002). En ese análisis se asumió una divergencia nematodos–artrópodos de entre 1000 y 800 Ma. Al considerar 800 Ma como punto de calibración, se obtuvo un intervalo de confianza del 95 % para la divergencia entre ambas especies de 97–78 Ma. Por otro lado, mediante estimaciones de **acumulación de mutaciones neutrales**, se sugirió un tiempo de divergencia menor a 30 Ma, más acorde con los valores obtenidos a partir de genes mitocondriales (Cutter et al., 2008; Denver et al., 2000). Si estas estimaciones, basadas en múltiples genes o acumulación de mutaciones, resultan más precisas, las dataciones obtenidas a partir de globinas podrían representar sobreestimaciones, especialmente en Chromadorida con tasas evolutivas aceleradas (Blaxter, 2009).

Enfoques **filogenómicos** han permitido profundizar estos estudios gracias al desarrollo de técnicas de secuenciación masiva de nueva generación (NGS) y la amplificación de genomas completos (WGA). Estos métodos, además, posibilitan el análisis independiente de las tasas evolutivas de distintos grupos y genes, lo que permite identificar aquellos con potencial utilidad como relojes moleculares. Estudios recientes estimaron la divergencia utilizando 156 genomas pertenecientes a ocho órdenes diferentes de nematodos, aplicando calibraciones basadas en ocho registros fósiles distintos. Este análisis, notablemente exhaustivo, no solo confirmó la posición y topología de ciertos grupos (como la monofilia de Dorylaimia y la parafilia de Enoplida), sino que también proporcionó estimaciones de divergencia a lo largo de distintos períodos geológicos, proponiendo que el phylum habría divergido hace aproximadamente 531 Ma. Los tiempos estimados para cada clado se presentan en la Tabla 1 (Qing et al., 2025).

Tabla 1. La estimación de los tiempos de divergencia en Nematoda se realizó utilizando información genómica de 156 especies. Tomado de Qing et al. (2025).

Clado	Estimaciones temporales (Ma)		
	Media (HPD)	95 % Menor (HPD)	95 % Mayor (HPD)
Nematoda	531	455	620
Chromadoria	482	408	561
Spirurina (Clado III)	323	259	388
Spiruromorpha	261	198	322
Ascaridomorpha	228	168	295
Oxyuridomorpha	148	66	224
Tylenchina (Clado IV)	361	302	427
Cephalobomorpha	105	45	178
Tylenchomorpha	305	254	364
Rhabditina (Clado V)	336	277	403
Diplogasteromorpha	240	185	296
Strongyloidea	120	90	154
Plectida	294	181	405
Linhomoeina	291	193	399
Monhysterina	325	238	413
Chromadorida	348	242	454
Desmodorida	345	238	456
Dorylaimia (Clado I)	446	367	537
Dorylaimida	290	219	363
Mononchida	210	148	278
Trichinellida	202	120	292
Enoplia (Clado II)	473	378	573
Enoplida	403	305	501
Triplonchida	304	194	420

La escasez de fósiles informativos y la dificultad para identificar marcadores moleculares con comportamientos reloj verificables han limitado el conocimiento sobre las fechas de divergencia en el phylum Nematoda. Los intentos de datación mediante puntos de referencia externos, como la congruencia entre filogenias de hospedadores y parásitos para transferir fechas robustas desde los hospedadores (por ejemplo, vertebrados), no han sido exitosos debido a la frecuente transmisión interespecífica de parásitos (Blaxter, 2003). Además, las calibraciones disponibles presentan sesgos, ya que la mayoría de las dataciones provienen de ámbares relativamente recientes, con una representación predominante de nematodos terrestres asociados a insectos, o de coprolitos, que reflejan principalmente parásitos de vertebrados y también corresponden a periodos recientes (Qing et al., 2025).

Marcadores Moleculares en Nematodos

Biomarcadores: definición y aplicaciones

Según el National Institutes of Health (NIH), los biomarcadores son caracteres biológicos objetivamente medibles, ya sean bioquímicos, antropométricos o moleculares, capaces de reflejar procesos fisiológicos o patológicos, así como la respuesta farmacológica a intervenciones terapéuticas (Torres Courchoud y Pérez Calvo, 2016). En cuanto a sus aplicaciones, los biomarcadores permiten monitorear el progreso de una enfermedad, predecir respuestas terapéuticas y reacciones adversas a fármacos, y diseñar tratamientos personalizados (Aronson y Ferner, 2017). Su versatilidad ha hecho de los biomarcadores herramientas clave tanto en la investigación clínica como en la epidemiología molecular y la medicina traslacional (Mayeux, 2004). Además, los biomarcadores tienen aplicaciones que van más allá del ámbito clínico, siendo empleados como indicadores ambientales en estudios ecosistémicos y como herramientas de detección temprana de plagas en sistemas agropecuarios (Cardoso et al., 2022; Faugere et al., 2020).

El biomarcador ideal debe reunir una serie de características que aseguren su eficacia. Para ello, debe ser específico y sensible (capaz de detectar exclusivamente el proceso biológico de interés con alta precisión), ofrecer resultados de forma rápida y económica, estable tanto *in vivo* como *in vitro*, no invasivo y con suficiente relevancia como para influir en la toma de decisiones ya sean médicas, ambientales, experimentales, etc. Además, debe presentar una elevada relación señal/ruido, lo que permite distinguir variaciones significativas frente a fluctuaciones biológicas o errores técnicos. En aquellos casos en los que un único biomarcador no cumpla con todos los criterios requeridos, la combinación de múltiples biomarcadores complementarios puede constituir una estrategia útil para monitorear distintos aspectos del proceso clínico o del fenómeno biológico en estudio (Aronson y Ferner, 2017; Glasziou et al., 2008; Martín-Ventura et al., 2009).

Actualmente, entre los biomarcadores más empleados se encuentran los llamados marcadores moleculares, definidos como moléculas biológicas (como proteínas o fragmentos de ADN) presentes en sangre, tejidos u otros fluidos corporales, cuya detección indica la existencia de un proceso fisiológico, patológico o de una respuesta terapéutica (diccionario NCI, NIH). Entre estos marcadores moleculares, se destacan dos tipos principales: los marcadores genéticos, que se basan en la detección de alteraciones en el ADN (como mutaciones o polimorfismos), y los marcadores proteicos, que reflejan la presencia, abundancia o modificaciones funcionales de proteínas específicas asociadas a un proceso biológico o patológico.

Marcadores basados en ADN

Uno de los principales desafíos en el estudio de helmintiasis es la identificación precisa de especies, y más aún durante estadios infecciosos en los que el material disponible es escaso o se encuentra en formas difíciles de caracterizar. Tradicionalmente, la identificación se ha basado en criterios morfológicos, los cuales requieren especímenes completos o en estados de desarrollo específicos (huevo, larva y/o adulto). Sin embargo, este enfoque presenta limitaciones significativas, ya que no siempre permite la discriminación a nivel de especie, particularmente en casos de especies morfológicamente crípticas. Ante estas restricciones, la biología molecular ha ofrecido herramientas más versátiles para el diagnóstico y la caracterización taxonómica de nematodos. En particular, los marcadores genéticos han demostrado ser altamente eficaces tanto para la identificación específica como para el análisis filogenético, permitiendo superar las barreras impuestas por los métodos tradicionales (Bredtmann et al., 2017).

El estudio de la variación intraespecífica comenzó a abordarse mediante el análisis de diferencias morfológicas; sin embargo, este enfoque evidenció limitaciones asociadas a la influencia de factores como el sexo, la edad o el ambiente, lo que reducía su fiabilidad. Con el tiempo, se incorporaron enfoques moleculares que han evolucionado significativamente en las últimas décadas. Inicialmente, se emplearon metabolitos secundarios (como antocianinas y compuestos fenólicos) para diferenciar genotipos, pero su inestabilidad y limitada disponibilidad restringieron su aplicación (Grover y Sharma, 2016). Más adelante, los marcadores enzimáticos (alozimas e isoenzimas) ofrecieron una mejora relativa, aunque mostraron un bajo nivel de polimorfismo (Salas-Leiva et al., 2009). Además, muchos caracteres fenotípicos relevantes se expresan en etapas tardías del desarrollo o no se manifiestan en todos los tejidos, lo cual limita su valor como criterio de análisis. Frente a estas limitaciones, los marcadores basados en ADN han emergido como herramientas clave en el estudio de la variabilidad, gracias a su alta capacidad para detectar polimorfismos a nivel genómico y su independencia frente a factores ambientales (Grover y Sharma, 2016).

En este contexto, los marcadores basados en ADN ofrecen ventajas sustanciales: son altamente heredables, su análisis es técnicamente accesible y sus resultados no se ven afectados por condiciones ambientales. Estas propiedades los convierten en herramientas confiables para estudios de genética de poblaciones, filogenia, identificación específica y desarrollo de métodos diagnósticos de alta precisión (Montaldo y Meza-Herrera, 1998). No sólo son útiles para identificar organismos y genes y conocer su variabilidad, sino también para estudiar fenómenos demográficos y relaciones filogenéticas tanto a niveles microevolutivos como macroevolutivos. En el estudio filogenético de metazoos, se emplean con mayor frecuencia tres tipos de regiones del ADN: secuencias nucleares codificantes, ADN ribosómico y genes del genoma mitocondrial (Chan et al., 2021).

Uno de los *loci* más utilizados es el ADN ribosómico, que se encuentra organizado en repeticiones múltiples en el núcleo eucariota e incluye regiones codificantes (18S; 5,8S; 28S) intercaladas por los espaciadores internos transcritos ITS-1 e ITS-2. Estas regiones presentan alta conservación intraespecífica y variación interespecífica, lo que las convierte en marcadores diagnósticos eficaces (Bredtmann et al., 2017). Por ejemplo, en nematodos de la familia Strongylidae, se ha observado una baja variación intraespecífica (0–0,3 %) y diferencias interespecíficas marcadas (0,6–23,7 % en ITS-1; 1,3–56,3 % en ITS-2) (Hung et al., 1999).

Por otro lado, el ADN mitocondrial (ADNmt) ha cobrado especial relevancia en estudios de sistemática molecular debido a su elevada tasa de evolución. Esta característica lo hace útil no solo para distinguir entre especies, sino también para detectar variaciones intraespecíficas. De hecho, existen numerosas secuencias mitocondriales disponibles en bases de datos como GenBank (NCBI), incluyendo registros de diversos helmintos. La variabilidad genética mitocondrial ha sido ampliamente documentada en géneros de nematodos (Chan et al., 2021). Un

marcador ampliamente utilizado es el gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I (COX1). A pesar de su alta tasa de sustitución y polimorfismo intraespecífico, es una herramienta valiosa para detectar especies crípticas. En *Cylocyclus nassatus*, por ejemplo, se observó una variación en COX1 del 10.8 %, mientras que la región ITS-2 mostró muy poca variación (0,0–0,6 %), lo que sugiere la presencia de especies crípticas (Traversa et al., 2008). El uso combinado de distintos marcadores permite abordar estos casos con mayor resolución (De Ley et al., 2005; Floyd et al., 2002; Hung et al., 1999).

El estudio de marcadores basados en secuencia requiere conocer previamente la región genómica que se desea amplificar, diseñar primers específicos, realizar la amplificación y secuenciación correspondiente, y finalmente analizar los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, por su sigla en inglés single nucleotide polymorphisms). Aunque la mayoría de estos polimorfismos se localizan en regiones no codificantes del genoma, un subconjunto relevante corresponde a mutaciones en genes asociadas a enfermedades u otros fenotipos de interés. Una de las principales ventajas de los marcadores SNP frente a otros marcadores genéticos (como SSR, RFLP, AFLP o RAPD) es su capacidad para ser comparados directamente con secuencias obtenidas en otros estudios, lo que permite realizar análisis comparativos con información previa proveniente de otros individuos o incluso de otras especies. Además, son menos propensos a la homoplasia, más fáciles de ubicar en regiones de copia única del genoma y requieren una menor cantidad de variantes para definir haplotipos o detectar desequilibrio de ligamiento (Grover y Sharma, 2016).

Marcadores genéticos en la era de la genómica

Los avances en las tecnologías NGS han permitido la detección masiva y precisa de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), lo que ha incrementado significativamente la profundidad y resolución de los análisis genómicos. Estos métodos posibilitan la comparación detallada de variantes a lo largo de distintas regiones del genoma y han sido clave en estudios de diversidad genética y asociaciones genotipo-fenotipo.

Las tecnologías basadas en genomas presentan beneficios indiscutibles. Permiten la generación simultánea de miles de *loci* en cientos de individuos a un costo relativamente bajo, siempre que se optimicen los reactivos y las estrategias de multiplexado (Andrews et al., 2016; Sonah et al., 2013). Aunque contar con un genoma de referencia facilita la selección adecuada para su procesamiento en laboratorio y mejora la eficiencia de los alineamientos, su ausencia no limita la aplicabilidad de estos métodos (Liu et al., 2014). Sin embargo, la elección del marcador molecular más apropiado debe considerar múltiples factores, como la calidad y cantidad de ADN disponible, el acceso a herramientas bioinformáticas, el tamaño de la muestra, el presupuesto, la disponibilidad de información genómica y, fundamentalmente, la pregunta de investigación (Hodel et al., 2016). En la actualidad, muchos estudios adoptan enfoques integradores que combinan marcadores moleculares tradicionales (especialmente mitocondriales) con NGS, aprovechando la naturaleza complementaria de ambos tipos de datos. Los marcadores mitocondriales permiten comparar regiones o especies bien representadas en bases de datos, mientras que los enfoques genómicos multigénicos permiten detectar procesos como la selección natural o el desequilibrio de ligamiento, imposibles de identificar mediante un único marcador. Además, la comparación conjunta de datos mitocondriales y nucleares revela discordancias entre genealogías maternas y biparentales, lo cual no solo enriquece la interpretación de los patrones filogenéticos, sino que también proporciona un marco más robusto para la delimitación de especies y el estudio de procesos evolutivos complejos (Bucholz et al., 2022; Eme et al., 2023; Niemiller et al., 2022).

Marcadores mitocondriales en nematodos

En nematodos, donde la morfología suele ser altamente conservada, el uso de herramientas moleculares ha permitido identificar numerosas especies crípticas (Pérez-Ponce de León y Nadler, 2010). Entre los marcadores más utilizados se encuentran las secuencias del espaciador transcrito interno (ITS-1 e ITS-2), debido a su alta variabilidad nuclear y la disponibilidad de primers universales que funcionan en una amplia diversidad de especies (Gasser y Newton, 2000; Powers et al., 1997). Estas características hacen del ITS un excelente marcador diagnóstico, particularmente útil para distinguir especies ya conocidas, incluso en estadios difíciles de identificar morfológicamente. Sin embargo, cuando el objetivo es la prospección de especies potencialmente crípticas, especialmente a partir de un número reducido de individuos, las secuencias del ADNmt tienden a ser más informativas. Esto se debe a su mayor tasa de sustitución, lo que incrementa la probabilidad de detectar divergencias entre linajes no diferenciables morfológicamente (Blouin, 2002).

Dentro de los genes mitocondriales, los más comúnmente utilizados en nematología son COX1 y subunidad 4 de la nicotinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa (ND4), aunque presentan diferencias relevantes. COX1, perteneciente al grupo de los citocromos, es más conservado que ND4, del grupo de las NADH deshidrogenasas. En consecuencia, ND4 suele mostrar mayor divergencia interespecífica (promedio del 14 %) en comparación con COX1 (10 %), lo que lo convierte en una mejor opción para estudios de delimitación de especies (Blouin, 2002). No obstante, ND4 presenta ciertas desventajas prácticas: no existen primers universales para este gen en nematodos, lo cual complica su aplicación a gran escala. Además, es poco probable que los primers diseñados a partir de un único taxón de nematodos funcionen en todos los demás, especialmente considerando la aparente frecuencia de reordenamientos en la posición de los genes dentro del ADNmt de los nematodos (Lavrov y Brown, 2001).

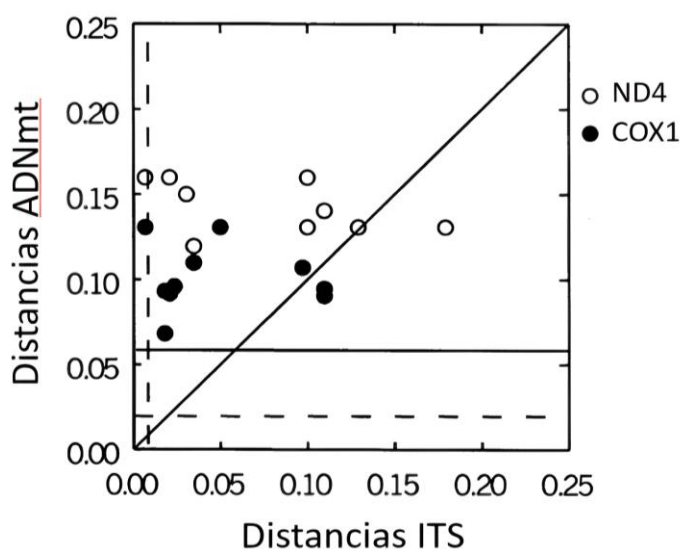


Figura 5. Comparación entre la distancia patristica de marcadores mitocondriales COX1 y ND4 y del espaciador interno ITS para pares de especies congéneres de nematodos. Una línea vertical discontinua indica el nivel de divergencia del ITS típicamente observado entre individuos de la misma especie (aproximadamente 1 %). Una línea horizontal discontinua indica el nivel promedio de divergencia del gen ND4 entre individuos conespecíficos en especies altamente diversas (alrededor del 2 %). Una línea horizontal continua representa la mayor distancia registrada entre un par de nematodos conespecíficos (6 %), estimada a partir del análisis de polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción del genoma mitocondrial completo. Modificado de Blouin et al. (2002).

Uno de los primeros estudios que evaluó la utilidad del gen mitocondrial COX1 como marcador para la identificación de especies en nematodos parásitos fue realizado por Hu et al. (2002). En este trabajo, se analizó la heterogeneidad de secuencias COX1 en anquilostomídeos: *Ancylostoma caninum* (Australia), *A. duodenale* (China) y *Necator americanus* (China y Togo). Las secuencias obtenidas revelaron variación genética intraespecífica de 0,5–8,6 % en *A. caninum*, 0,3–3,3 % en *A. duodenale* y 0,3–4,3 % en *N. americanus*. En contraste, las diferencias interespecíficas oscilaron entre 4,8 % y 12,9 %. El fragmento conocido como región de Folmer (M1–M6) del gen COX1 se ha convertido en el núcleo del enfoque de DNA barcoding debido a su eficacia en la identificación de especies metazoas, descrito inicialmente por Hebert et al. (2003). Sin embargo, esta región ha demostrado una resolución limitada en ciertos taxones como poríferos, antozoos, hongos y plantas, lo que ha motivado la propuesta de utilizar otras regiones del COX1, como I3–M11, o incluso genes nucleares como el ITS, en contextos donde la región de Folmer no resulta adecuada. En algunos grupos de nematodos, el uso de la región de Folmer ha mostrado tasas de amplificación muy bajas con los primers universales diseñados para invertebrados. En contraste, la región I3–M11 ha demostrado una tasa de amplificación mucho mayor en al menos tres complejos de especies pertenecientes a distintas familias (Monhysteridae, Rhabditidae y Leptosomatidae), y ha resultado útil para detectar diversidad críptica. No obstante, aún no está claro hasta qué punto esta región puede aplicarse de forma generalizada a otros grupos de nematodos (Derycke et al., 2010). En cuanto a nematodos parásitos, Elsasser et al. (2009) lograron amplificar exitosamente la región de Folmer en *Dracunculus* de América del Norte, mientras que Ferri et al. (2009) lograron amplificar simultáneamente las regiones de Folmer e I3–M11 utilizando un único par de primers en filarias y otros nematodos parásitos, como parte de un enfoque de taxonomía integrativa. En algunos casos se han amplificado secuencias nucleares no funcionales homólogas al gen mitocondrial original (numts), que pueden contener indels, codones de parada o mutaciones por cambio de marco de lectura. Aun así, algunos numts pueden ser muy similares al gen mitocondrial funcional, lo que complica su identificación. Aunque el número de numts en los genomas de nematodos parece ser bajo, su menor tasa evolutiva podría explicar casos en que la secuencia nuclear coincida con la mitocondrial, como se observó en el caso del género *Paracanthonus/Praeacanthonus* (Derycke et al., 2010).

En este contexto, el gen mitocondrial COX1 ha sido evaluado como un posible marcador universal para clasificación filogenética de nematodos. Al tratarse de una proteína conservada evolutivamente, presenta ciertas ventajas frente a los genes ribosómicos (Elsasser et al., 2009; Floyd et al., 2002). Prosser et al. (2013) desarrollaron un cóctel de primers que permite recuperar eficientemente secuencias COX1 de una amplia variedad de nematodos parásitos de vertebrados mediante plataformas de alto rendimiento, logrando resolución a nivel de especie. Este avance representa un paso importante hacia la estandarización del DNA barcoding en nematodos, especialmente en aquellos de interés parasitológico.

Marcadores basados en proteínas

A diferencia de predicciones genómicas, los análisis proteómicos ofrecen una ventaja clave: las proteínas son las moléculas funcionales del organismo, por lo que reflejan de manera más directa los procesos biológicos en curso (Bennuru et al., 2011). Además, la proteómica permite detectar modificaciones postraduccionales, como fosforilación, glicosilación, ubiquitinación o acetilación, entre otras, que generan distintas isoformas proteicas y aumentan la diversidad funcional del proteoma (van der Ree y Mutapi, 2015). Estas modificaciones son fundamentales para la vida del parásito y además, contribuyen con la evasión del sistema inmune del hospedador (Zhong et al., 2010).

Los parásitos tanto humanos como veterinarios interactúan con sus hospedadores a través de proteínas del líquido de excreción/secreción (LES) (Bernal et al., 2014; Marcilla et al., 2012). Las proteínas del LES comprenden tanto productos de desecho como biomoléculas activamente secretadas por helmintos vivos, y cumplen funciones clave en la interfaz hospedador-parásito, modulando directamente las respuestas inmunitarias del hospedador (Tiberti et al., 2024). El análisis proteómico de este fluido permite reconocer marcadores con potencial tanto en términos de herramientas diagnósticas (Martínez-Ibeas et al., 2013), como de nuevas intervenciones terapéuticas (Buck et al., 2014). Su relevancia ha sido confirmada en numerosas especies de helmintos, incluidos *Ancylostoma*, *Anisakis*, *Trichuris*, nematodos filariales y *Strongyloides*, aunque en este último aún se requiere mayor investigación. Si bien el LES incluye lípidos, carbohidratos y otras moléculas pequeñas, las proteínas son sus componentes funcionales predominantes. Debido a la existencia de mecanismos no convencionales de secreción, muchas proteínas secretadas no poseen los péptidos señal típicos de la vía clásica del retículo endoplásmico-Golgi, por lo que su predicción bioinformática resulta limitada. La variabilidad de las proteínas del LES no solo se observa entre especies, sino también entre estadios de desarrollo y entre sexos (Soblik et al., 2011). El estudio de esta fracción proteica resulta esencial no sólo para profundizar en la comprensión de la biología del parásito, sino también para el diseño de nuevas estrategias de diagnóstico, control y tratamiento de enfermedades parasitarias (Pan et al., 2014). Se ha demostrado, además, que algunas de estas proteínas inducen respuestas antiinflamatorias, lo que sugiere su potencial aplicación como agentes inmunorreguladores en el tratamiento de enfermedades autoinmunes (Cooper y Eleftherianos, 2016).

Estudios proteómicos recientes, mediante espectrometría de masas, han demostrado que el análisis de las proteínas del LES es factible en múltiples especies de nematodos, y que este enfoque posee un enorme potencial para la identificación de blancos terapéuticos y biomarcadores diagnósticos (Soleymani et al., 2024). Dado que los tratamientos convencionales, como los antihelmínticos, presentan limitaciones (incluyendo una corta duración del efecto y una alta probabilidad de reinfección), el LES, y en particular su componente proteico, representa una fuente prometedora de nuevas herramientas para interrumpir el ciclo de vida del parásito y reducir la carga de enfermedades parasitarias, especialmente en regiones del sur global donde estas patologías continúan siendo un grave problema de salud pública (Hotez et al., 2014; L'Ollivier y Piarroux, 2013; Pullan et al., 2014). Sin embargo, la caracterización molecular de las proteínas del LES aún enfrenta desafíos considerables. La recolección del LES en condiciones *in vitro* no siempre refleja fielmente los procesos que ocurren *in vivo*, y el análisis funcional de su variada composición proteica requiere un considerable esfuerzo en términos de tiempo, tecnología y recursos (Okakpu y Dillman, 2022).

Dinámica proteica del LES durante el desarrollo

La composición del LES varía notablemente entre las diferentes etapas del ciclo de vida de los helmintos, reflejando la necesidad del parásito de adaptarse a distintos nichos ecológicos a lo largo de su desarrollo (Sotillo et al., 2017). Las proteínas presentes en este líquido desempeñan funciones clave en la interacción con el hospedador: participan en la invasión de tejidos, la evasión del sistema inmune, la degradación de estructuras del hospedador y la captación de nutrientes esenciales para la supervivencia, el crecimiento y la reproducción del parásito (Marcilla et al., 2012; Vanhamme et al., 2020). Además, tienen la capacidad de modular o suprimir las respuestas inmunes del hospedador, favoreciendo así infecciones persistentes y crónicas (Gomez-Fuentes et al., 2020; Wangchuk et al., 2019).

Durante la fase inicial de infección, se secreta un repertorio complejo de proteínas mediante el LES. Estudios proteómicos han identificado proteasas implicadas en la lisis de la matriz extracelular, facilitando la penetración de las larvas. Posteriormente, se liberan proteínas inmunomodulatorias, incluyendo aquellas que degradan

componentes del sistema del complemento, como C3 y C4. Estas funciones pueden ser llevadas a cabo por proteínas distintas en especies del mismo género, como *Schistosoma mansoni* y *S. japonicum* (Ingram et al., 2011), aunque también se observan convergencias en especies filogenéticamente distantes, como *S. bovis* y *Fasciola hepatica* (De la Torre Escudero et al., 2011). Además, se han reportado cambios en la expresión de proteínas asociadas a un metabolismo aerobio por uno anaerobio, lo cual favorece la adaptación del parásito al ambiente del hospedador (Hong et al., 2013).

Una vez que el parásito se establece en su nicho definitivo, su maduración y reproducción dependen de señales del hospedador, entre ellas la respuesta inmunológica. En modelos murinos, se ha demostrado que la ausencia de linfocitos CD4⁺ o células B retrasa el desarrollo de *Schistosoma* spp. y afecta la producción de huevos (Tang et al., 2013). En nematodos filariales, la eosinofilia mediada por IL-5 acelera el desarrollo y aumenta la producción de microfilarias (Babayan et al., 2010). Se han identificado proteínas inmunogénicas en la cáscara del huevo y en el fluido de eclosión de *S. mansoni* (De Walick et al., 2011; Mathieson y Wilson, 2010). Estas proteínas, muchas de función aún desconocida, podrían representar candidatos vacunales prometedores. Sin embargo, se ha señalado que los huevos no corresponden al estadio infectivo, lo que podría limitar su utilidad como blancos terapéuticos.

Los adultos de especies variadas de helmintos secretan proteínas con funciones antioxidantes, enzimáticas y de unión a calcio que les permiten evadir las defensas del hospedador y neutralizar especies reactivas de oxígeno generadas por células inmunes. Este tipo de proteínas ha sido identificado en especies diversas como *Brugia malayi*, *Echinostoma caproni*, *Fasciola hepatica* y *Schistosoma mansoni*, lo cual sugiere la existencia de mecanismos evolutivamente convergentes para la evasión inmune entre distintos grupos parasitarios (Guillou et al., 2007; Hewitson et al., 2008).

Aplicaciones de biomarcadores proteicos

Vacunas: Los estudios proteómicos han permitido identificar numerosos candidatos vacunales en nematodos al revelar antígenos capaces de inducir respuestas inmunes protectoras (Mutapi, 2012). La combinación de múltiples antígenos se perfila como una estrategia más eficaz (Riveau et al., 2012).

Blanco de drogas y monitoreo de resistencia: El uso extensivo de antihelmínticos ha favorecido la aparición de cepas resistentes. La proteómica permite comparar la expresión y modificación de proteínas entre cepas sensibles y resistentes, identificando mecanismos de resistencia y posibles blancos terapéuticos (Soleymani et al., 2024). Además, ha propuesto mecanismos moleculares de esa resistencia, como la activación de rutas metabólicas alternativas para la producción de energía en respuesta a tratamientos con azoles (van der Ree y Mutapi, 2015). La identificación de biomarcadores de daño parasitario o de fracaso terapéutico (como para triclabendazol) resulta clave para el manejo racional de fármacos (Morphew et al., 2014). El desarrollo de pruebas no invasivas para detectar estos marcadores en orina o materia fecal representa una herramienta prometedora.

Diagnóstico de infección: La detección de helmintiasis es fundamental para los programas de control tanto médicos como veterinarios. Los métodos parasitológicos tradicionales (cuantificación de huevos) presentan baja sensibilidad en infecciones leves o no patentadas. Se requieren pruebas más sensibles, específicas, económicas y aplicables a gran escala. Aunque las pruebas serológicas existentes son sensibles (hasta 95 %), pueden dar falsos positivos o no distinguir entre infección activa y pasada. La identificación de marcadores proteicos específicos permitiría superar estas limitaciones y mejorar el manejo clínico (Ambe et al., 2024; Latrofa et al., 2021; Yang et al., 2015).

Otras aplicaciones: Más allá de los usos clínicos, los biomarcadores proteicos identificados mediante abordajes proteómicos están encontrando aplicaciones crecientes en otros sectores. En el ámbito agropecuario, avanza los estudios orientados al control de plagas, especialmente a través de la detección de biomarcadores en el suelo que permiten identificar la presencia de nematodos fitopatógenos así como su virulencia (Cardoso et al., 2022; Kapur-Ghai et al., 2014). Asimismo, en el campo ambiental, ciertas proteínas de nematodos están siendo utilizadas como indicadores sensibles de contaminantes específicos o de estrés ambiental, aportando herramientas valiosas para el monitoreo de la salud ecosistémica (Faugere et al., 2020; Jiang et al., 2016; Ma et al., 2009; Mahmood et al., 2014).

El Nematodo Parásito *Diectophyme renale*

Orden Diectophymatida

Los Diectophymatida son nematodos parásitos de vertebrados, que infectan principalmente mamíferos carnívoros y aves. En humanos pueden causar infecciones accidentales. El grupo incluye unas 20 especies y cuatro géneros (*Diectophyme*, *Eustrongylides*, *Hystrichis* y *Soboliphyme*), que presentan notables diferencias morfológicas entre sí, por lo que el taxón es considerado heterogéneo (Schmidt-Rhaesa, 2013). Este taxón se encuentra comprendido dentro del grupo Dorylaimia y dentro del Clado I según la categorización de Blaxter et al. (2011). El grupo más cercano descrito para este taxon es el orden Trichinellida que incluye, entre otros, dos géneros ampliamente estudiados y bien representados en las bases de datos moleculares: *Trichuris* spp. y *Trichinella* spp (Ahmed et al., 2022).

Morfología: El tamaño es variable con especies de 16 mm hasta otras que superan el metro. Los machos presentan una bursa copuladora musculosa y una espícula única y alargada. El extremo anterior posee papilas cefálicas dispuestas en dos anillos, y en algunos géneros se observa un patrón adicional de papilas laterales o ventrales. La cutícula está formada por 6 a 8 capas y muestra regiones delgadas posiblemente relacionadas con la absorción selectiva de nutrientes. Un rasgo distintivo es la musculatura somato-intestinal (mesenterios), bien desarrollada, con dos haces en la región faríngea y cuatro en la intestinal. La región faríngea presenta una elevada masa glandular. No presentan órganos excretores especializados. La alimentación se basa en exudados y productos de lisis tisular. Ambos sexos presentan un solo gonoducto. En hembras, el ovario es hologónico y sin raquis, lo que se asocia a la elevada producción de huevos. La vulva puede estar ubicada en la región posterior o anterior como el caso de (*Diectophyme*, *Soboliphyme*) o posterior (*Hystrichis*, *Eustrongylides*) (Schmidt-Rhaesa, 2013).

Reproducción y desarrollo: Los huevos son liberados en estadios tempranos de segmentación y requieren ambientes húmedos o acuáticos para su desarrollo. Son ingeridos por oligoquetos, que actúan como hospedadores intermediarios. La primera muda ocurre dentro del huevo (L1), mientras que las siguientes etapas (L2 y L3) se desarrollan en el interior del hospedador intermediario. El estadio infectivo es L3. Los hospedadores definitivos se infectan al ingerir oligoquetos o hospedadores paraténicos. El desarrollo hasta adulto ocurre en vertebrados, incluyendo mamíferos y aves (Schmidt-Rhaesa, 2013).

Filogenia y taxonomía: A pesar de sus diferencias morfológicas, los géneros *Diectophyme*, *Eustrongylides*, *Hystrichis* y *Soboliphyme* forman un grupo monofilético (Diectophymatida), respaldado por caracteres

compartidos como la musculatura mesentérica, la posición anterior del cerebro, la organización genital simple y la morfología de la espícula y la bursa. Estudios filogenéticos moleculares con ADNr 18S han confirmado esta monofilia y sugerido relaciones filogenéticas internas: *Soboliphyme* sería grupo hermano de (*Diectophyme* + *Eustrongylides*). Actualmente la clasificación consiste en dos familias: Familia Soboliphymidae (con el género *Soboliphyme*) y Familia Diectophymidae; que comprende las subfamilias Diectophyminae (*Diectophyme renale*) y Eustrongylinae (géneros *Eustrongylides* e *Hystrichis*).

Biología de *Diectophyme renale*

Diectophyme renale es un nematodo parásito zoonótico que infecta el riñón de mamíferos, principalmente del orden Carnívora. Este parásito tiene una distribución cosmopolita y se ha observado en varias especies, tanto domésticas como salvajes. En los perros (*Canis lupus familiaris*), la infección suele afectar al riñón derecho y, en muchos casos, provoca la pérdida unilateral del órgano. En algunos, la afectación bilateral puede provocar una insuficiencia renal total. Además, la obstrucción de los uréteres o de la pelvis renal por gusanos adultos puede provocar hidronefrosis. También pueden encontrarse gusanos adultos en la cavidad abdominal, el tejido subcutáneo, los ganglios linfáticos mesentéricos y otros órganos, como el útero y el ovario (Khullar et al., 2022). Los humanos pueden ser hospedadores accidentales y presentar síntomas clínicos inespecíficos, como dolor de espalda, fiebre, pérdida de peso, retención urinaria, hematuria y piuria. Las muertes son poco frecuentes, pero se han notificado en casos extremos debido a insuficiencia renal, sepsis o enfermedades coexistentes (Khullar et al., 2022; Norouzi et al., 2017).

El ciclo biológico descrito por Mace y Anderson (1975) comienza con el desarrollo del adulto en el riñón del hospedador definitivo, típicamente un mamífero del orden Carnívora. En el riñón, los parásitos copulan, y las hembras liberan huevos que son excretados al ambiente junto con la orina del hospedador. Una hembra de *D. renale* puede generar hasta 20 millones a lo largo de su vida. En el medio ambiente, las condiciones de temperatura permiten el desarrollo del embrión dentro del huevo. Los huevos embrionados son ingeridos por el hospedador intermediario, el oligoqueto *Lumbriculus variegatus*, donde ocurre la eclosión y tres mudas larvales, culminando en la formación de la larva infectiva, L3. Si este hospedador intermediario es ingerido por el hospedador definitivo, puede desarrollarse la infección. Sin embargo, es más común que otros animales, como peces y anfibios, se alimenten del invertebrado, actuando como hospedadores paraténicos. En estos hospedadores, el parásito no madura y la larva permanece enquistada en sus tejidos hasta que son ingeridos por el hospedador definitivo (Figura 6). Este ciclo implica necesariamente a *Lumbriculus variegatus* para el desarrollo del estadio infectivo. Este invertebrado tiene una distribución holártica, con solo dos informes en América del Sur: uno en la Patagonia argentina (Miserendino, 2007) y otro en Minas Gerais, Brasil (Marchese et al., 2015), y ninguno corresponde con regiones donde se haya evidenciado presencia de *D. renale*. Por lo tanto, el ciclo de vida aún no ha sido elucidado para esta región.

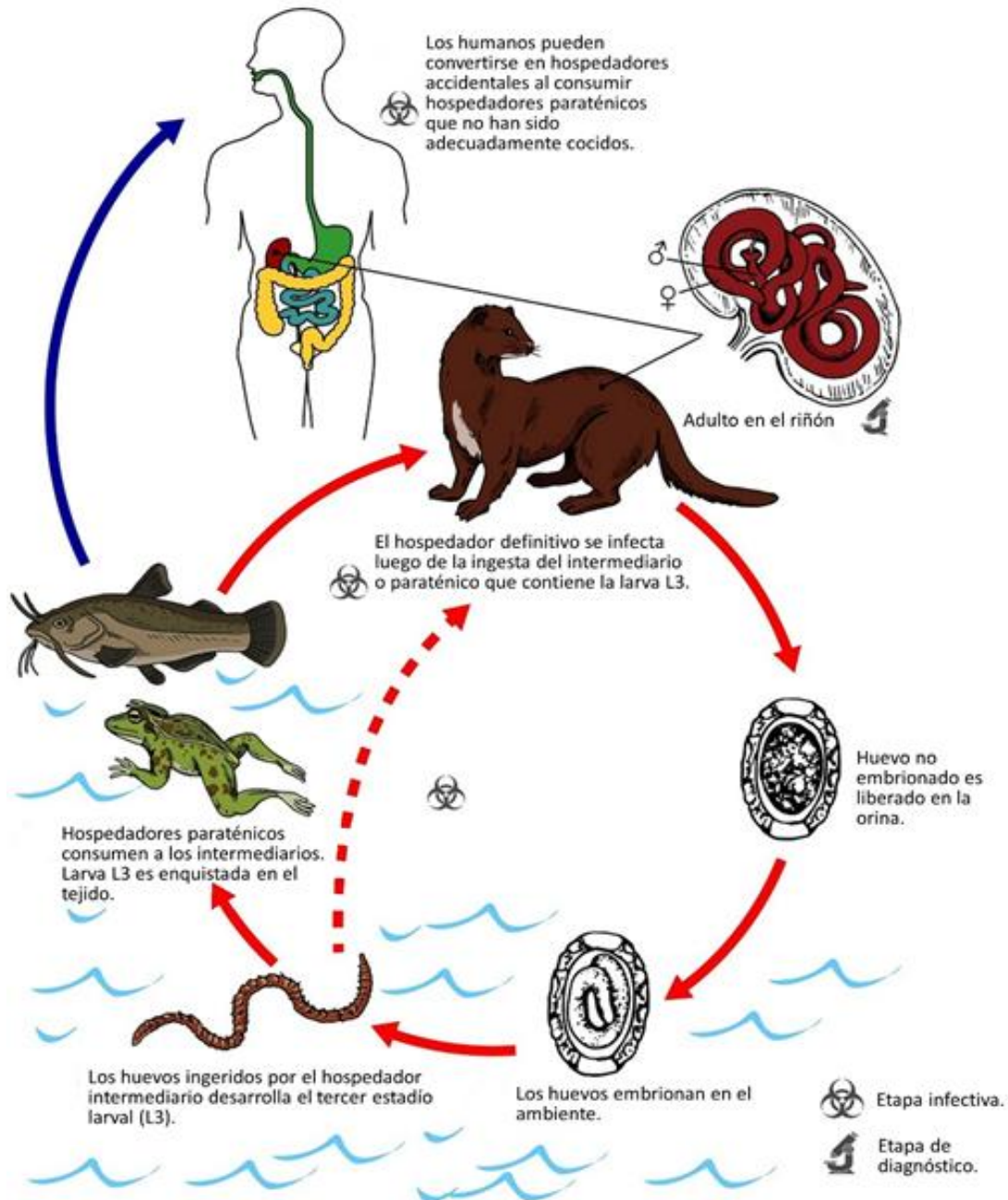


Figura 6. Ciclo de vida de *Dioctophyme renale* reportado para América del Norte con sus hospedadores intermediarios, paraténicos y difinitivos. El humano puede actuar como hospedador accidental. Modificado y traducido del sitio DPDx del CDC (<https://www.cdc.gov/dpdx/dioctophymiasis/index.html>).

Infección por *D. renale*: La dioctofimosis

Se conoce como dioctofimosis a la enfermedad causada en el hospedador definitivo debido a una infección por *D. renale*. El cuadro inicia con la ingesta de L3 que podría estar presente en el hospedador intermediario (aún no descrito para la región), o más comúnmente enquistada en hospedadores paraténicos como pueden ser peces y ranas (Mace y Anderson, 1975). Se han reportado casos en todas las regiones del mundo, con una distribución limitada en el continente africano (restringida a Egipto) y una amplia distribución en América (Figura 7). En la mayoría de los países, los registros corresponden principalmente a fauna, aunque también se han documentado algunos casos en humanos. En ciertos países, como Chile y Australia, los reportes se limitaron exclusivamente a casos humanos (Carra Perera et al., 2021).

Luego de la ingesta, la larva, protegida por su cutícula, recorre el tubo digestivo, lo atraviesa y migra pudiendo afectar localidades anatómicas variadas. Lo más frecuente es que el parásito resida en el riñón derecho del hospedador definitivo. Es uno de los pocos parásitos que afectan principalmente al riñón. Sin embargo, se cree que la localización final de su infección estará dada por el sitio de penetración de la larva dentro del tracto digestivo. Si la larva atraviesa la pared del duodeno, el sitio más probable de crecimiento sería el riñón derecho; en caso de penetrar la curvatura mayor del estómago, sería el riñón izquierdo; y de penetrar la curvatura menor, sería el hígado la localidad más probable. Cuando el parásito alcanza el órgano blanco, da lugar a un gran incremento de respuesta inflamatoria, mayormente dentro del parénquima renal. Esto da lugar a la destrucción del mismo y a la distensión de la cápsula del riñón, pudiendo resultar en la pérdida total de función. El riñón no afectado tiende a hipertrofiarse compensando la función (hidronefrosis). El movimiento y migración del gusano puede causar fuerte dolor lumbar, imitando un cólico renal. La presencia del gusano libre en cavidad puede causar peritonitis y formación de adhesiones (Khullar et al., 2022).

En humanos las presentaciones clínicas de dioctofimosis son variadas. Más del 80 % de los casos humanos involucran al riñón, pero también hay reportes de parasitismo ectópico involucrando la cavidad retroperitoneal y tejidos subcutáneos. El individuo afectado puede no presentar sintomatología específica, incluyendo dolor lumbar, abdominal, pérdida de peso, retención de orina, hematuria y piuria. En el 59,5 % de los casos el síntoma observado fue dolor lumbar y hematuria. Puede también aparecer dolor severo asociado a la migración del parásito a través del canal uretral. Hay reportes de casos fatales debido a falla renal, sepsis o en presencia de comorbilidades (Carra Perera et al., 2021; Khullar et al., 2022).

En animales los cuadros clínicos varían según la especie. El perro es el hospedador más reportado mundialmente. El riñón derecho es la localidad más afectada. Los casos en riñón izquierdo y bilaterales son poco frecuentes. El parásito progresivamente daña el parénquima cortical y medular y si se observa obstrucción uretral que puede resultar en falla renal total. La fibrosis periglomerular, tubular, infiltración del tejido intersticial por el conectivo, cálculos y calcificación de células necróticas fueron reportados en hurones. La hidronefrosis puede devenir en el bloqueo de la pelvis renal por el gusano adulto. También hay alta frecuencia de reportes de gusanos adultos libres en cavidad abdominal. De entrar a la cavidad peritoneal podría mostrar síntomas de peritonitis. Se lo ha encontrado enquistado en cavidad abdominal, tejido subcutáneo y otros órganos como útero y ovario (Khullar et al., 2022). En muchos casos, los animales infectados permanecen asintomáticos. Sin embargo, cuando se presentan signos clínicos, la hematuria y el dolor renal son los más frecuentes. Algunos animales muestran discomfort generalizado, como arqueado de la espalda, dolor abdominal, reticencia a caminar, poliuria, estrangulamiento, vómitos y progresiva pérdida de peso, entre otros (Carra Perera et al., 2021).

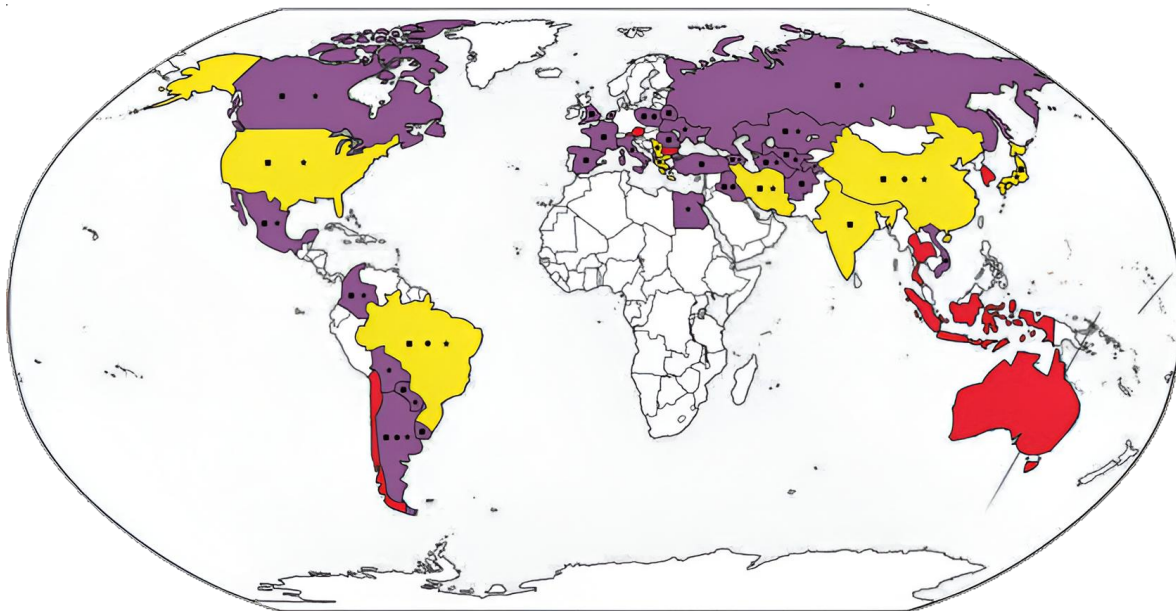


Figura 7. Distribución geográfica actual de casos reportados de dirofimosis en humanos y animales. Los países en **rojo** indican reportes en humanos, en **púrpura** reportes en animales, y en **amarillo** reportes tanto en humanos como en animales. Los íconos señalan el tipo de hospedador afectado: ■ perros, ● gatos, y ★ fauna silvestre. Tomado de Carra Perera et al. (2021).

Dada la problemática que este parásito representa para la salud animal y humana, y la escasa información disponible en la región, a pesar de tratarse de una de las áreas con mayor número de casos a nivel mundial, en el presente trabajo de tesis se abordará esta parasitosis desde dos ejes complementarios mediante el desarrollo y la aplicación de diferentes tipos de marcadores moleculares. Por un lado, se emplearán marcadores genéticos para estudiar patrones eco-epidemiológicos asociados a la infección. Por otro, se investigarán marcadores proteicos con potencial diagnóstico, enfocados en proteínas secretadas y excretadas por el parásito. Este enfoque integrado permitirá una caracterización molecular de *D. renale* y generar conocimientos de base para su monitoreo y control.

Parte I: Diversidad Genética de *Dioctophyme renale* en Regiones Endémicas de Argentina y Brasil

Introducción

Ecoepidemiología de *D. renale* en Sudamérica

Se han documentado 49 especies de animales no humanos como hospedadores definitivos de *D. renale*, con los casos concentrados en el continente americano (Figura 1.1). Argentina es el país con el mayor número de casos descritos, con un total de 1414, seguido por Brasil con 1145 casos (Eiras et al., 2021). Diferentes unidades biogeográficas convergen en la región que abarca el noreste de Argentina y el sur de Brasil, específicamente los dominios sub-brasileño, paranaense y chaqueño. Estos dominios, que abarcan más de 16 distritos biogeográficos, albergan una variedad de ecosistemas que incluyen pantanos y ciénagas, campos y matorrales, pampas, bosques en galería, espinal, bosque chaqueño y selva paranaense (Arana et al., 2021). En esta zona coexisten ciudades, pueblos rurales y áreas naturales protegidas, todas ellas con diferentes niveles de influencia antrópica. En todos estos sistemas se pueden observar animales afectados por dirofilosis. En cuanto a las áreas urbanas, el hospedador doméstico más común es el perro, con prevalencias que oscilan entre el 0,03 y el 35,3 % (Burgos et al., 2015). En la zona ribereña del Río de la Plata se ha reportado una prevalencia del 30,7 % (Radman et al., 2017). Además, también hay informes de *D. renale* en gato (*Felis silvestris catus*) (Bitencourt Vidal et al., 2021; Butti et al., 2019; Zanchett y Pedrassani, 2020). En cuanto a los ecosistemas salvajes, recientemente hemos informado de la primera caracterización molecular de *D. renale* en el zorro de las pampas (*Lycalopex gymnocercus*) (Facelli Fernández et al., 2024). Además, hay informes de casos en otros mamíferos salvajes, incluidos el aguará guazú (*Chrysocyon brachyurus*), el gato montés sudamericano (*Leopardus geoffroyi*), el lobito de río (*Lontra longicaudis*), el perro de monte (*Speothos venaticus*), el zorro cangrejero (*Cerdocyon thous*), el hurón menor (*Galictis cuja*), el coatí (*Nasua nasua*), el mono capuchino (*Cebus apella*), el perezoso de dos dedos (*Choloepus hoffmanni*), entre otros (Echenique et al., 2018; Khullar et al., 2022; Pinto et al., 2011; Trindade et al., 2018). Se observó una alta prevalencia de esta parasitosis en las especies aguará guazú, hurón menor y coatí, con niveles del 81,2 %, 36,6 % y 72,4 %, respectivamente (Eiras et al., 2021). En el aguará guazú, al igual que en los perros, la mayoría de los parásitos se han encontrado en el riñón derecho (85,7 % de los casos), seguido de la cavidad abdominal (28,6 %). Por otro lado, en los coatíes el sitio más común donde se encontraron los gusanos fue la cavidad abdominal, representando el 66,66 % de los casos (Milanelo et al., 2009).

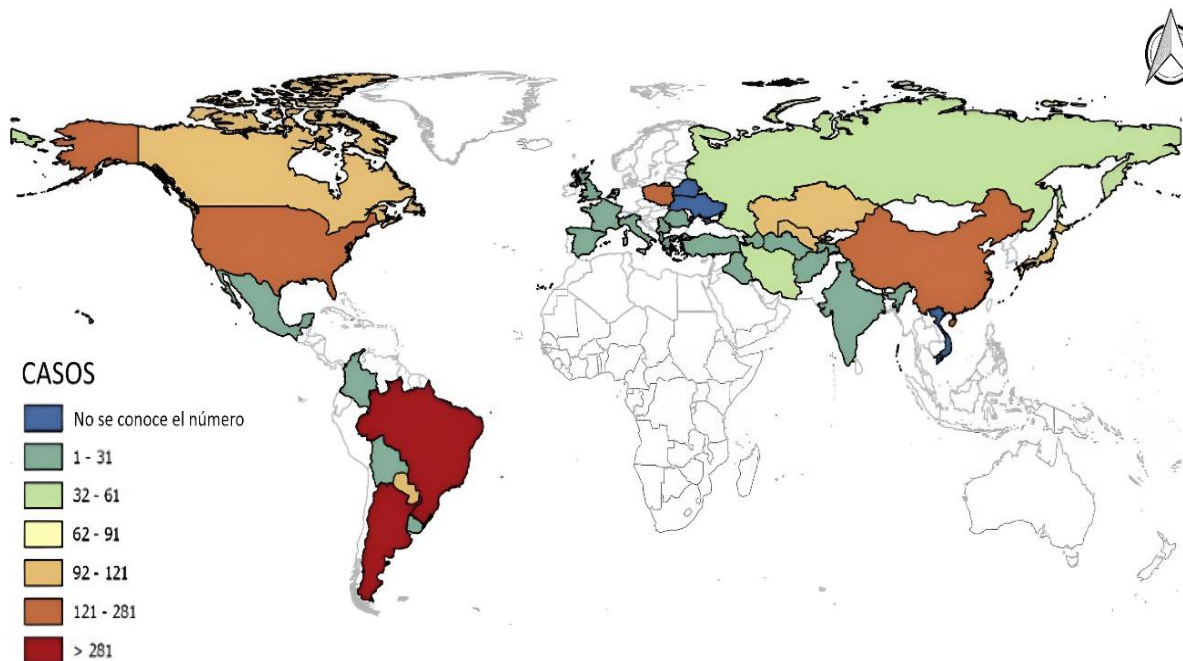


Figura 1.2. Mapa de calor que muestra el número de casos reportados de diotrofimosis en fauna por país. Los países en azul presentan casos descritos, pero no se conoce el número. Los que están en blanco no presentan casos reportados. Modificado de Eiras et al. (2021).

En general, no hay signos clínicos asociados a esta infección (Di Nucci et al., 2020; Mattos Varzone et al., 2008). Sin embargo, el impacto real del parásito en las poblaciones naturales sigue siendo poco conocido. En la actualidad, no se dispone de información sobre si los mamíferos domésticos y salvajes de esta región están infectados por los mismos linajes filogenéticos ni sobre si existen variantes genéticas específicas de hospedador y/o lugar. Además, hay muy pocas secuencias de este parásito en las bases de datos. Uno de los motivos es que la obtención de muestras del mismo en fauna silvestre suele ser a través de necropsias de fauna atropellada donde se toma el parásito del órgano afectado luego de varios días de descomposición. Eso afecta seriamente la calidad de la muestra comprometiendo los estudios moleculares sobre la misma. *D. renale* pertenece al clado I dentro del phylum Nematoda (Blaxter y Koutsovoulos, 2015; Koehler, Hoberg, Torres-Pérez, et al., 2009), un grupo poco representado en términos de información molecular. La información genómica del clado I solo está disponible para unas pocas especies de los géneros *Trichinella* spp., *Trichuris* spp., *Romanomermis* spp. y *Sobolophyme* spp. (Wormbase Parasite), sin datos genómicos para *D. renale*. En GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) solo hay 27 entradas para *D. renale* en la base de datos de nucleótidos, correspondientes a tres genes: ARNr 18S, una dorylipophorina (proteínas de unión a lípidos específica de nematodos) y COX1. El escaso conocimiento molecular sobre este parásito dificulta su identificación precisa, su caracterización genética, el seguimiento de brotes y el estudio de las interacciones entre diferentes especies hospedadoras. Aún no se conoce con certeza si existe transmisión entre fauna doméstica y silvestre, y la falta de información sobre hospedadores intermediarios limita las estrategias de prevención de contagios. Además, se desconoce si las altas prevalencias registradas en Sudamérica se deben a la introducción del parásito junto con la fauna doméstica, o si ya estaba presente en la fauna autóctona. Esta información es clave para diseñar estrategias efectivas de vigilancia y control de esta parasitosis. En este trabajo utilizamos datos genómicos generados *de novo* para desarrollar nuevos marcadores moleculares que permitan estudiar la dinámica poblacional de *D. renale*, un parásito zoonótico prevalente cuyo ciclo biológico permanece poco comprendido en Sudamérica.

Objetivos

Objetivo general: Describir la diversidad genética de *Dioctophyme renale* en el sur sudamericano estableciendo relaciones entre las localidades de Argentina y Brasil donde se observan casos y entre especies de hospedadores.

Objetivos específicos:

- Diseñar marcadores genéticos para el estudio de poblaciones de *D. renale*.
- Genotipificar adultos provenientes de fauna doméstica y silvestre de distintas localidades litorales de Argentina y Brasil.
- Realizar estudios filogeográficos sobre las secuencias obtenidas y realizar aproximaciones evolutivas y demográficas del parásito en la región.

Hipótesis: Al igual que ocurre con un gran número de parásitos y microorganismos, *D. renale* llegó a Sudamérica junto con animales de compañía. Al encontrar un nicho vacante se produjo una expansión poblacional por las zonas del litoral de Argentina y Brasil e incluso se transmitió a fauna silvestre representando un riesgo incipiente para el ecosistema regional.

Metodología

Material Parasitario

Se realizó el análisis molecular de un único ejemplar parásito del conjunto hallado en cada hospedador, todos conservados en etanol al 70 %. Entonces, se procesaron un total de 73 adultos de *D. renale* recolectados de individuos hospedadores diferentes. Las muestras fueron mantenidas en cámara fría a 8 °C hasta el momento de su procesamiento. Para cada ejemplar se registró la coordenada geográfica, la especie del hospedador, la localidad anatómica en la que se halló el parásito y el sexo del mismo.

Del total, 57 muestras fueron obtenidas a partir de intervenciones quirúrgicas realizadas en mamíferos domésticos atendidos en clínicas veterinarias, mientras que las 16 restantes se recolectaron durante necropsias practicadas a ejemplares de fauna silvestre hallados atropellados. Las cirugías y necropsias se efectuaron conforme a los protocolos aprobados por las autoridades competentes: Oficina Técnica de la Administración de Parques Nacionales (NEA 423 Rnv ex DCM 483 Dispo 23/2015) y el Ministerio de Ambiente y Cambio Climático de la Provincia de Santa Fe (Exp. 02101-022465-3, Resolución N.º 025). Las muestras provenientes de fauna doméstica presentaron, en general, un menor grado de descomposición en comparación con las obtenidas de animales silvestres (Figura 1.2).



Figura 1.2. Muestras de *Diotophyme renale* adultos recibidos y analizados en este trabajo. A y B hembra y macho de necropsia de aguará guazú (*Chrysocyon brachyurus*) y zorrito pampeano (*Lycalopex gymnocercus*) respectivamente en Santa Fe. C y D hembra y macho, respectivamente, hallados en cirugías veterinarias de perros domésticos en la ciudad de La Plata. Se aprecia la diferencia en el estado de conservación de las muestras provenientes de cirugías veterinarias y de necropsias de fauna silvestre atropellada.

Las muestras se recolectaron de localidades ubicadas en las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Chaco y Corrientes en Argentina, así como de los estados de Paraná, Rio Grande do Sul y Santa Catarina en Brasil. Los parásitos se hallaron en diversas especies hospedadoras, incluyendo mamíferos domésticos como el perro y el gato, y especies silvestres como el hurón menor, el aguará guazú y el zorro pampeano (Tabla 1.1). Los sitios de muestreo se detallan en la Figura 1.3.

Tabla 1.1. Número de muestras analizadas de *D. renale* por localidad de muestreo y especie hospedadora. Se indica además el número de muestras para las cuales se logró tipificar exitosamente cada marcador génico utilizado en el estudio. *Secuencia de Facelli Fernández et al. (2024).

Hospedador	Provincia/Estado	País	Muestras recibidas	COX1-S	COX1-XL	ND4
Perro	Buenos Aires	Argentina	28	19	17	12
	Santa Fe	Argentina	11	10	10	10
	Chaco	Argentina	1	1	1	1
	Rio Grande do Sul	Brasil	6	5	5	5
	Parana	Brasil	4	2	2	1
	Santa Catarina	Brasil	4	2	2	1
Gato	Parana	Brasil	1	1	0	0
	Santa Catarina	Brasil	2	1	0	0
Total Domésticos	-	-	57	41	37	30
Aguará guazú	Corrientes	Argentina	7	6	4	4
	Santa Fe	Argentina	4	4	4	4
	Chaco	Argentina	2	2	2	2
Zorro pampeano	Santa Fe	Argentina	1	1*	1	1
Hurón menor	Santa Catarina	Brasil	2	1	0	0
Total Silvestres	-	-	16	14	11	11
TOTAL	-	-	73	55	48	41

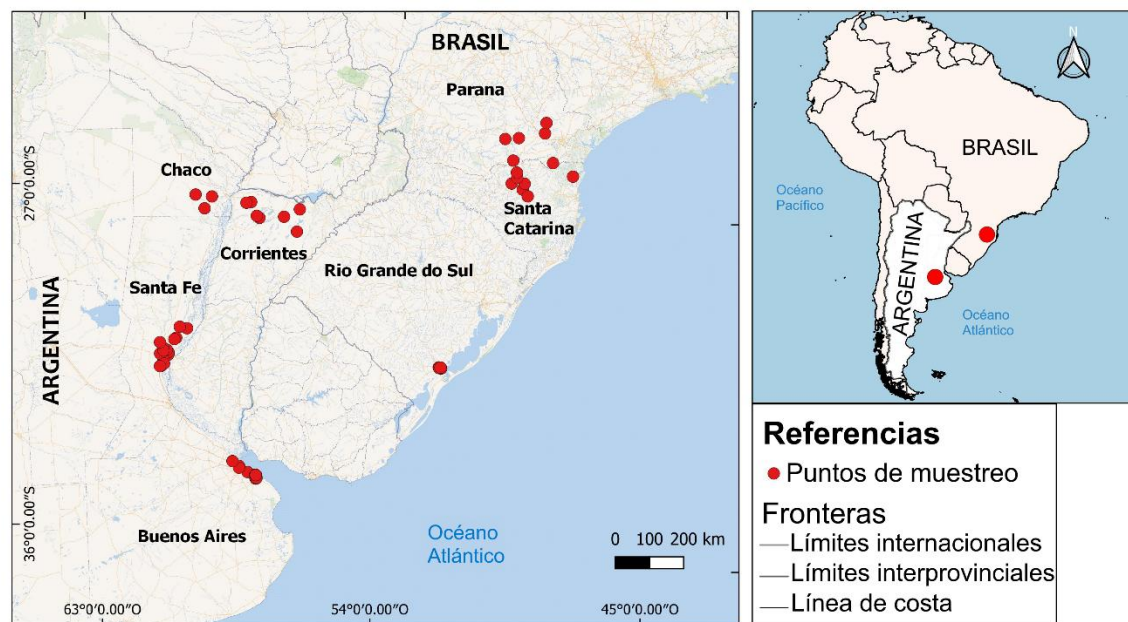


Figura 1.3. Distribución geográfica de las muestras de *Dioctophyme renale*. Los mapas fueron elaborados en QGIS versión 3.16.3 (OSGeo) utilizando el sistema de referencia de coordenadas EPSG:4326 - WGS 84. Los sitios de muestreo están señalados con círculos rojos. Modificado de Arce et al. (2024).

Extracción de ADN y genotipado

Para cada muestra de parásito se cortó una sección transversal, y se lisaron 20 mg de tejido (sin cutícula) utilizando nitrógeno líquido. El ADN genómico total fue extraído mediante el kit DNeasy® Blood y Tissue (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración del ADN extraído fue estimada mediante espectrofotometría con NanoDrop, observándose, en general, mayores concentraciones en las muestras provenientes de hospedadores domésticos que en las recolectadas de fauna silvestre. Los extractos de ADN fueron almacenados a -20°C hasta su utilización.

A partir del genoma mitocondrial de *D. renale* v1, que se encuentra en etapa avanzada de desarrollo en el laboratorio donde se llevó a cabo esta parte de la tesis (Macchiaroli et al., en preparación), se seleccionaron dos marcadores mitocondriales para su análisis (Figura 1.4). El primero fue el gen COX1, ampliamente utilizado en estudios taxonómicos de metazoos en general (Gonçalves et al., 2021). Es el único gen mitocondrial que tiene registro para esta especie. Se utilizaron cuatro pares de primers para amplificar diferentes regiones del gen COX1: dos de ellos (116 y 382 pb) corresponden a regiones previamente descritas por Koehler et al. (2009) y Tokiwa et al. (2014), respectivamente; un tercer par fue diseñado para una región de 687 pb no utilizada anteriormente en esta especie; y un cuarto par abarcó las tres regiones (incluyendo la totalidad del *barcode*), generando un amplicón de 1133 pb. Se utilizaron marcadores de distintos tamaños no sólo por su disponibilidad y eficacia previamente reportada, sino también porque el estado de conservación de las muestras no siempre permite amplificar regiones largas. En este sentido, el uso de marcadores más cortos facilita la obtención de un mayor número de registros moleculares de este parásito en diferentes localidades y hospedadores. Por sus tamaños se

llamó a los genes COX1-S, COX1-M, COX1-L y COX1-XL (Figura 1.4). Se tomaron en cuenta dos regiones estandarizadas de COX1 en nematodos: la región I3-M11 (denominada según los segmentos de la proteína codificada que abarca, Erpenbeck et al., 2006) y la región M1–M6 (Folmer et al., 1994; Hebert, Cywinska, et al., 2003; Stoeckle, 2003). La primera está contenida en la región que en este estudio se denominó COX1-M, mientras que la segunda, ampliamente reconocida como secuencia *barcode* en metazoos (Gonçalves et al., 2021), se encuentra parcialmente incluida en la región designada aquí como COX1-L.

Dado que el gen COX1 es ampliamente utilizado para discriminar entre especies, se buscó un segundo marcador más variable que permita registrar con mayor sensibilidad la variación intraespecífica. Como no hay otro marcador mitocondrial conocido para esta especie, se confeccionó un listado de genes mitocondriales previamente utilizados en estudios poblacionales de nematodos incluyendo subunidad 1, 3 y 4 de la nicotinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa (ND1, ND3 y ND4, respectivamente), subunidad 6 de la ATP sintetasa (ATP6), la subunidad 39S del ARNr (rrnL) y el Citocromo b (Cyt b). Posteriormente, se comparó la diversidad observada para esos marcadores (junto con COX1) entre diferentes individuos de *Trichuris* spp. (GenBank: AP017703.1, AP017704.1, GU070737.1, GU385218.1, KT449822.1–KT449826.1, LC050561.1, NC_017747.1, NC_017750.1, NC_018596.1, NC_018597.1, NC_028621.1). Como resultado, se seleccionó el gen ND4 ya que presentó una mayor distancia genética media (d Tamura = 0,53) en comparación con COX1 (d Tamura = 0,30), así como un mayor porcentaje promedio de sitios variantes (76 % frente a 39 %, respectivamente), lo que sugiere una mayor capacidad resolutive para estudios filogenéticos y que presenta antecedentes en estudios de genética de poblaciones de nematodos parásitos (Blouin et al., 1998; Gharamah et al., 2012; Koehler et al., 2009; Nguyen et al., 2019). Los primers de ND4 comprendieron un target de 354 pb dentro de la secuencia codificante del gen.

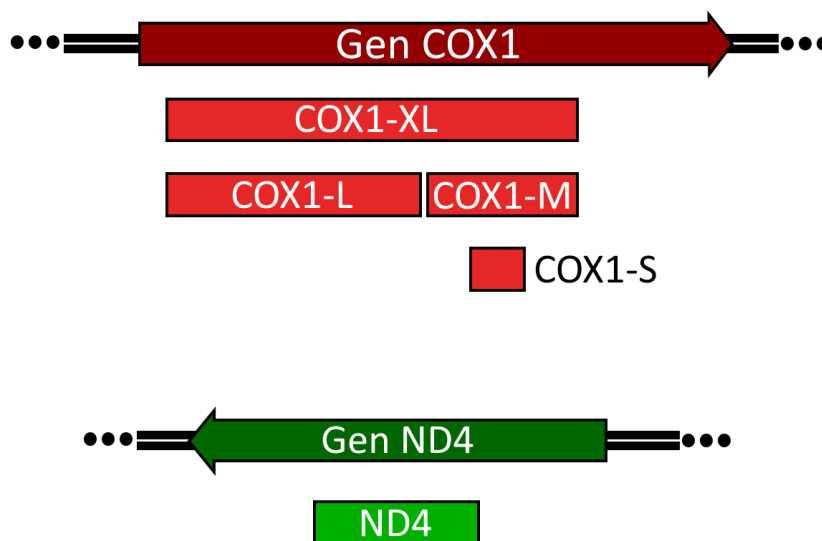


Figura 1.4. Mapa con los marcadores utilizados en este estudio. Las flechas indican el sentido de la secuencia codificante y las barras corresponden al producto de PCR esperado. Modificado de Arce et al. (2024).

El diseño de los primers se basó en la identificación de regiones homólogas conservadas mediante búsquedas con BLASTn en la base de datos del GenBank. Si bien se contaba con un ensamblado preliminar del genoma mitocondrial obtenido a partir de un único individuo, era necesario descartar la presencia de polimorfismos en los sitios de hibridación de los oligonucleótidos. Por ello, se incorporaron secuencias de genes mitocondriales homólogos de otras especies para mejorar la robustez del diseño. Dado que las secuencias nucleotídicas mostraban escasa conservación entre especies, se tradujeron utilizando el código genético mitocondrial para invertebrados, lo que permitió realizar alineamientos de las secuencias aminoacídicas y detectar regiones conservadas a nivel proteico. A partir de esas regiones, se identificaron las posiciones correspondientes en las secuencias de ADN, sobre las cuales se diseñaron los primers. Las propiedades termodinámicas, temperatura de melting (T_m), estructuras secundarias y formación de dímeros, fueron evaluadas con la herramienta OligoAnalyzer (IDT).

Para garantizar la especificidad de los primers, se realizaron análisis *in silico* mediante tres estrategias complementarias: (1) Búsquedas BLAST en GenBank para descartar potenciales amplificaciones de secuencias pertenecientes a los hospedadores debido a que las muestras pueden presentar contaminación con ADN de hospedadores, en especial en los quistes; (2) comparación contra la base de datos WormBase (Sternberg et al., 2024) para evitar amplificaciones inespecíficas en otros nematodos parásitos; y (3) alineamientos con el genoma nuclear preliminar de *D. renale* v1, que también se encuentra en etapas avanzadas de desarrollo en el laboratorio donde se realizó esta parte de la tesis (Maldonado et al., en preparación). Este último paso resultó esencial para descartar la amplificación de pseudogenes nucleares derivados de secuencias mitocondriales (conocidos como *numts*), cuya existencia ha sido documentada en diversos nematodos y que podría comprometer la validez de los resultados (Derycke et al., 2005).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ l por tubo, conteniendo entre 20 y 500 ng de ADN genómico, 0,22 mM de cada dNTP (Pharmacia LKB, Uppsala, Suecia), 1,66 mM de $MgCl_2$, 0,55 μ M de cada primer (Tabla 1.2) y 0,04 U/ μ l de Taq Pegasus ADN polimerasa en su buffer de reacción (Productos Bio-Lógicos, Argentina). En cada corrida se incluyeron controles negativos, en los cuales el ADN molde fue reemplazado por agua ultrapura en la misma proporción, y un control positivo, consistente en una muestra previamente identificada con alta calidad y concentración de ADN purificado, que había mostrado amplificación exitosa con todos los pares de primers seleccionados y resultados de secuenciación adecuados. Las condiciones del ciclo térmico fueron: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min; 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 60 s, hibridación a 50 °C durante 60 s y extensión a 72 °C durante 60 s; y una extensión final a 72 °C durante 10 min.

Los productos de PCR fueron evaluados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %, teñidos con GelRed®, y visualizados en un transiluminador UV. Los amplicones que presentaron el tamaño y la intensidad esperados fueron almacenados a -20 °C y posteriormente secuenciados mediante el método de Sanger, en ambos sentidos (*forward* y *reverse*), a través del servicio brindado por Macrogen.

Tabla 1.2. Primers diseñados para la amplificación de marcadores mitocondriales de *D. renale*.

Gen	Nombre del primer	Secuencia del primer 5'-3'	Tamaño esperado del product de PCR (pb)	Fuente
ND4	DRND4F	AGAAGAGGATCATATCTTAT	354	Este trabajo.
	DRND4R	GCTACGAATTTTTAATGTCG		
COX1-S	DRCOX1-SF	TGGTGTGCTTGGTTGTTTTG	116	Modificado de Tokiwa et al., (2014)
	DRCOX1-SR	AACCTGCCACCATACAAAG		
COX1-M	DRCOX1-MF	CATCCWGAGGTTTATATTYTAGC	382	Modificado de Koehler et al., (2009)
	DRCOX1-MR	ASWAAGAACAWARTGRAATGACC		
COX1-L	DRCOX1-LF	CTTCAGTTATTGGTGGGTGT	687	Este trabajo.
	DRCOX1-LR	GTTGGAATAGAACAGGGTCA		
COX1-XL	DRCOX1-LF	CTTCAGTTATTGGTGGGTGT	1133	Este trabajo y modificado de Koehler et al., (2009)
	DRCOX1-MR	ASWAAGAACAWARTGRAATGACC		

Análisis de secuencias

Las secuencias crudas obtenidas fueron editadas en BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999), eliminando los primers y las regiones de baja calidad localizadas en los extremos de cada lectura. Las secuencias *forward* y *reverse* fueron ensambladas mediante el algoritmo CAP Contig Assembly (Huang, 1992) para obtener una secuencia consenso por muestra. Las secuencias consenso generadas en este estudio se encuentran disponibles en GenBank bajo los números de acceso comprendidos de OP208282.1 a OP208330.1 y de OP204915.1 a OP204944.1.

Los alineamientos múltiples se realizaron con el algoritmo ClustalW (Thompson et al., 1994), y posteriormente fueron inspeccionados manualmente para asegurar la calidad y coherencia de los sitios alineados. Aquellas regiones que presentaban baja calidad de lectura fueron filtradas, y los sitios con indels (gaps) fueron excluidos de los análisis posteriores.

A partir de los alineamientos individuales por marcador, se calcularon parámetros de diversidad genética, incluyendo: número de haplotipos, diversidad de haplotipos (H_d ; Nei y Tajima, 1981), número de sitios segregantes, número total de mutaciones, proporción de sitios polimórficos, diversidad nucleotídica promedio (θ_π ; Nei y Li, 1979) y el estimador de Watterson (θ_w ; Watterson, 1975).

Estructura poblacional, dinámica demográfica y análisis espaciales

La estructura genética de las poblaciones fue evaluada mediante un análisis de varianza molecular (AMOVA, Excoffier et al., 1992) en Arlequin v3.5 (Excoffier et al., 2005), utilizando como criterios de agrupación la condición

del hospedador (doméstico o silvestre) y la región geográfica (provincia o estado). Las muestras de Santa Catarina y Paraná se excluyeron debido a su bajo tamaño muestral ($n = 1$). La matriz de distancias genéticas se generó bajo el modelo Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993) y la significancia se estimó con 10.000 permutaciones.

Se evaluó el aislamiento por distancia mediante un test de Mantel (Mantel y Valand, 1970), comparando la matriz de distancias genéticas (calculada con MEGA v11; Tamura et al., 2021) con una matriz de distancias geográficas basada en las coordenadas de muestreo, procesadas en QGIS v3.22 (OSGeo). Este análisis se implementó en R v4.2.0 siguiendo el protocolo propuesto por Banta et al. (2007).

Bajo el marco de la filogeografía probabilística y la hipótesis de coalescencia, se aplicaron pruebas estadísticas para detectar señales de expansión poblacional o desviaciones respecto al modelo neutro. Se calcularon los índices D de Tajima (1989), F de Fu (1997) y R_2 de Ramos-Onsins y Rozas (2002) sobre los datos de los marcadores mitocondriales COX1 y ND4. La significancia estadística se evaluó mediante 1.000 simulaciones coalescentes según el método de Hudson (1990), utilizando DnaSP v6.12.03 (Rozas et al., 2017). Debido a que cada marcador mitocondrial evoluciona a un ritmo distinto, las señales que conservan pueden reflejar eventos demográficos ocurridos en diferentes escalas temporales. Por este motivo, los análisis se realizaron por separado para ND4, COX1 y para la matriz concatenada, con el objetivo de detectar huellas de expansión, contracción o estabilidad poblacional en distintos momentos del pasado evolutivo de *D. renale*.

Filogenia y relaciones entre haplotipos

Se reconstruyeron relaciones filogenéticas entre haplotipos utilizando máxima verosimilitud (ML) e inferencia bayesiana (IB). La selección del modelo evolutivo y esquema de partición se realizó con PartitionFinder2 (Lanfear et al., 2017), aplicando el criterio de información de Akaike corregido (AICc). Los modelos seleccionados fueron TN93 (Tamura y Nei, 1993) para COX1 y GTR (Tavare, 1984) para ND4.

El análisis ML fue realizado en MEGA v11 (Tamura et al., 2021), con soporte de ramas evaluado mediante 1.000 réplicas bootstrap. La IB se realizó en BEAST v2.6.7 (Bouckaert et al., 2019), bajo un modelo de reloj molecular estricto. Se utilizó una tasa de sustitución de $0,0259 \times 10^{-6}$ sustituciones/sitio/año, previamente estimada para el género *Trichinella* spp. (Zarlenga et al., 2006), debido a su cercanía filogenética con *D. renale* y considerando la limitada disponibilidad de tasas de sustitución calibradas en nematodos. La cadena de MCMC fue ejecutada durante 10 millones de generaciones, con muestreo cada 10.000 iteraciones. Se consideró un burn-in de 500.000 iteraciones con el fin de excluir la fase inicial de la cadena MCMC y asegurar que el análisis se base únicamente en muestras representativas del estado estacionario. La convergencia y el tamaño efectivo de muestra para cada parámetro ($ESS > 200$) fueron verificados en Tracer v1.7 (Rambaut y Drummond, 2003).

Para COX1 se incluyeron todas las secuencias disponibles en GenBank para *D. renale* (AB854727.1, EU394733.1, MH178399.1, MH178400.1, MH178401.1, MH181826.1, MT246537.1), que fueron identificadas morfológicamente en hospedadores silvestres y domésticos de Asia y América del Norte. Como outgroup se utilizó la secuencia de *Soboliphyme baturini* (EU394157), perteneciente también al orden Dioctophymatida. En el caso de ND4 y del análisis con los marcadores concatenados, se utilizó como outgroup una secuencia de *Trichuris trichiura* (NC_017750), seleccionada por tratarse de una especie del clado I con mitogenoma completo de referencia disponible, dado que *S. baturini* no posee datos de ND4 en GenBank.

Con el objetivo de explorar la delimitación de linajes moleculares entre las secuencias generadas en este estudio y aquellas disponibles en bases de datos, se utilizaron alineamientos del gen mitocondrial COX1 y se aplicaron dos enfoques basados en distancias genéticas: ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery, Puillandre et al., 2012), con un rango de valores *a priori* de partición de $P_{min} = 0,001$ a $P_{max} = 0,1$ (10 pasos); y ASAP (Assemble Species by Automatic Partitioning, Puillandre et al., 2021), estableciendo una probabilidad de corte de 0,001 y conservando los 10 mejores particionamientos. ABGD analiza distribuciones de distancias genéticas por pares para identificar automáticamente el barcode gap óptimo, y propone grupos o unidades taxonómicas operativas (MOTUs) correspondientes a potenciales linajes independientes o especies. Complementariamente, el algoritmo ASAP (Assemble Species by Automatic Partitioning), método más reciente que explora múltiples particiones posibles basadas en una matriz jerárquica de distancias genéticas, fue utilizado como validación independiente. ASAP no asume necesariamente un gap, sino que propone particiones optimizadas según criterios estadísticos. Ambos análisis se realizaron mediante la plataforma SpartExplorer (<https://spartexplorer.mnhn.fr/>), utilizando la distancia patrística como métrica, conforme a lo recomendado para *barcode* COX1 de nematodos según Gonçalves et al. (2021).

Las redes de haplotipos se construyeron mediante el método Median Joining (Bandelt et al., 1999), utilizando el software PopArt v1.7 (<http://popart.otago.ac.nz>). Se generaron redes tanto para cada marcador por separado como para los datos concatenados, con el objetivo de evaluar si las diferencias en las tasas de sustitución entre los marcadores influyen en la topología. La matriz concatenada incluyó un total de 1.198 caracteres y 41 taxones.

Resultados

Presencia de *D. renale* en Sur de Sudamérica

Se analizaron un total de 73 registros de infección por *D. renale*, correspondientes a un parásito adulto por hospedador (Tabla 1.1). El hospedador doméstico más frecuente el perro, con 54 casos registrados. Además, se incluyeron tres muestras provenientes de gatos, totalizando 57 infecciones detectadas en fauna doméstica. Entre los hospedadores silvestres, *Chrysocyon brachyurus* fue la especie más representada, con 13 casos. También se identificaron ejemplares adultos de *D. renale* en *Galictis cuja* y *Lycalopex gymnocercus*, alcanzando un total de 16 registros en fauna silvestre (Tabla 1.1). Este último constituye el primer informe documentado de infección en *L. gymnocercus* (Facelli Fernández et al., 2024). En Argentina, las muestras se recolectaron en cuatro provincias donde hay hospedadores domésticos y silvestres de *D. renale*. En Brasil, se obtuvieron ejemplares de animales domésticos provenientes de tres estados distintos, mientras que los parásitos de fauna silvestre fueron recolectados exclusivamente en el estado de Santa Catarina (Figura 1.3).

Del total de 73 ejemplares analizados, el 44 % correspondió a machos y el 56 % a hembras, con proporciones idénticas entre hospedadores domésticos y silvestres. El sitio anatómico más frecuentemente afectado fue el riñón derecho (50 %), seguido por la cavidad abdominal (23 %). En el 19 % de los casos se registró infección simultánea en ambas localizaciones, mientras que el 4 % afectó exclusivamente el riñón izquierdo y otro 4 % la cavidad torácica. Entre los casos más llamativos se encuentra un aguará guazú de la provincia de Santa Fe que albergaba 39 ejemplares adultos localizados en el riñón derecho y la cavidad abdominal. También se registró un perro doméstico de la misma provincia con infección múltiple que incluía riñón derecho, cavidad abdominal, riñón izquierdo y cavidad torácica. De los 44 hospedadores para los cuales se contó con información sobre carga

parasitaria total, se recuperaron 174 ejemplares de *D. renale*. Si bien la media es de 4 parásitos por hospedador, la mediana fue de dos parásitos por hospedador, lo que indica que la mayoría de los individuos presentó infecciones de baja intensidad (un parásito por hospedador), mientras que un pequeño número mostró cargas parasitarias excepcionalmente elevadas.

Marcadores mitocondriales y variabilidad genética en *Diocotophyme renale*

Se amplificaron 55 muestras con el par COX1-S y 48 con COX1-XL (Tabla 1.1). Del total de muestras, hubo 10 que únicamente pudieron ser tipificadas con el marcador COX1-S. Entre estas muestras se identificaron tres nuevos registros en hospedadores domésticos (gato) y silvestres (hurón menor), lo que permitió ampliar la representación genética del parásito en estas especies hospedadoras. Las secuencias obtenidas mostraron alta similitud con otras de *D. renale* depositadas en GenBank, con identidades que oscilaron entre el 91,78 % y el 100 % (AB854727.1 y MN304733.1). En cambio, las identidades con especies relacionadas como *Sobolophyme baturini* y *Trichuris muris* fueron considerablemente menores (81,94 % y 84,93 %, MZ675607.1 y EU394157.1, respectivamente).

Se estimaron seis métricas de diversidad genética para cada marcador mitocondrial (Tabla 1.3). El número total de mutaciones y de sitios segregantes aumentó proporcionalmente con la longitud del fragmento de COX1 analizado, pero la proporción relativa de sitios polimórficos fue mayor en COX1-M, consistente con su localización en la región más variable del gen. Esta región también presentó los valores más elevados de diversidad nucleotídica, tanto en términos de la proporción promedio de diferencias entre pares de secuencias ($\theta\pi$) como del número de sitios segregantes ajustado por tamaño muestral (θw). El fragmento COX1-XL, al abarcar todos los sitios variables presentes en los fragmentos más cortos, mostró la mayor riqueza haplotípica y, por ende, la mejor resolución filogenética. En adelante, salvo que se aclare lo contrario, se hará referencia a este marcador simplemente como COX1.

En consistencia con las predicciones basadas en *Trichuris* spp. y con lo propuesto por Blouin (2002), el marcador ND4 presentó la mayor proporción absoluta de sitios polimórficos (0,0650). Además, mostró una diferencia marcada entre los valores de θw (0,01519) y $\theta\pi$ (0,01048), lo que podría reflejar un exceso de polimorfismos raros, consistente con un proceso de expansión poblacional reciente o selección purificadora. Por el contrario, COX1 presentó valores similares para ambas métricas ($\theta\pi = 0,00731$; $\theta w = 0,00854$), como se esperaría bajo condiciones de equilibrio neutro.

El análisis concatenado de las secuencias COX1 y ND4 mostró que la provincia de Santa Fe presentó el mayor número de haplotipos ($N = 15$), seguida por Buenos Aires ($N = 12$) (Figura 1.5). Sin embargo, Buenos Aires exhibió una mayor diversidad nucleotídica ($\theta\pi = 0,00856$ vs. $0,00798$) y haplotípica ($Hd = 0,985$ vs. $0,848$). Sólo dos haplotipos (H13 y H14) fueron compartidos entre ambas localidades. Este patrón podría sugerir una mayor antigüedad de la población presente en Buenos Aires, aunque no es posible establecer con certeza la dirección o el origen de la dispersión entre regiones. Tampoco se observaron diferencias marcadas en la diversidad haplotípica al comparar países ni tipos de hospedador.

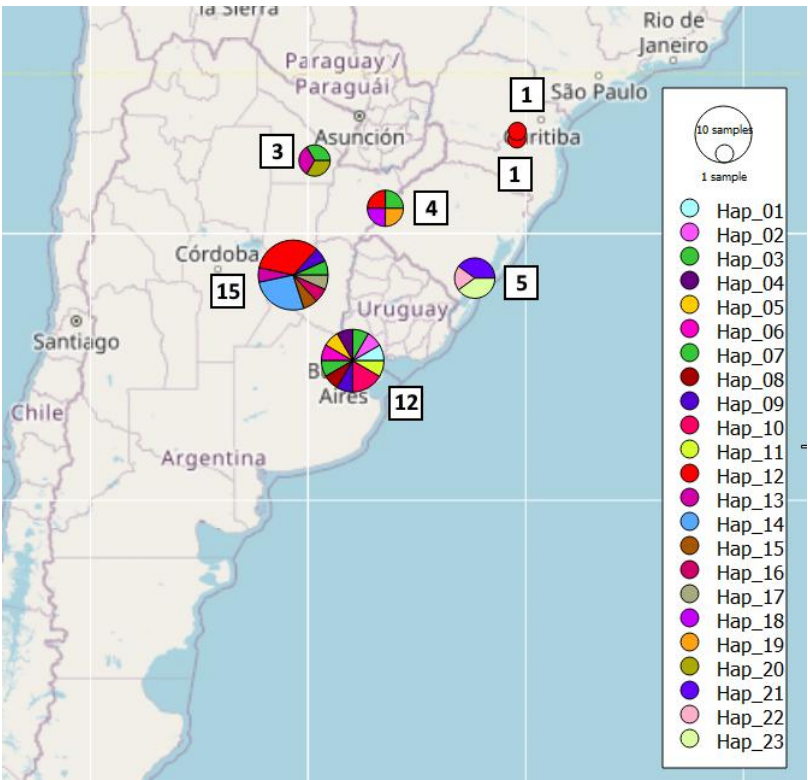


Figura 1.5. Distribución de los diferentes haplotipos COX1-ND4 concatenados entre las localidades analizadas. El número de muestra por localidad se muestra en cada recuadro. Tomado de Arce et al. (2024).

Tabla 1.3. Medidas de diversidad genética empleadas para los diferentes marcadores mitocondriales. Eta: Número de mutaciones, S: Número de sitios segregantes, Ro: Proporción de sitios polimórficos, Hd: Diversidad haplotípica, $\Theta\pi$: Diversidad nucleotídica de Nei (1987), Θw : Diversidad nucleotídica de Watterson (1975).

Marcador	Tamaño de la muestra	Tamaño de la secuencia (pb)	N° de haplotipos	Eta (mutaciones)	S (sitios segregantes)	Ro (sitios polimórficos)	Hd (diversidad haplotípica)	$\Theta\pi$	Θw
COX1-S	55	74	4	2	2	0,027	0,488	0,0073	0,0059
COX1-M	52	259	14	13	12	0,0463	0,869	0,0099	0,0103
COX1-L	49	586	16	21	20	0,0341	0,878	0,006	0,0077
COX1-XL	48	987	20	34	32	0,0324	0,909	0,0073	0,0085
ND4	41	354	13	23	23	0,065	0,881	0,0105	0,0152
COX1+ND4	41	1343	23	56	54	0,0402	0,945	0,0085	0,0106

Análisis filogenético COX1 y comparación con base de datos

El marcador mitocondrial COX1-M fue utilizado para el análisis filogenético con parásitos de otras regiones debido a que representa el mayor número de secuencias homólogas disponibles en GenBank para *D. renale* (COX1-L y ND4 no presentan homólogos para esta especie). La topología del árbol resultante muestra que las secuencias generadas en este estudio (provenientes de Argentina y Brasil) se agrupan con una muestra de Perú (MT246537.1), conformando un clado sudamericano bien definido, con alto soporte estadístico (probabilidad posterior = 1). Este clado incluye 14 haplotipos de hospedadores domésticos y silvestres de distintas regiones geográficas, que se encuentran entremezclados en varios subclados e incluso comparten secuencias idénticas. En un clado separado se agrupan las secuencias de Irán (MH178300.1, MH181826.1, PP326859.1, MH178400.1 y MH178401.1), mientras que la secuencia procedente de Canadá (EU394733.1) ocupa una posición más externa. Esta agrupación también cuenta con alto soporte (probabilidad posterior = 0,98).

Al aplicar la tasa de sustitución descrita para *Trichinella*, se propone una hipótesis preliminar de divergencia entre estos clados, estimada en aproximadamente 3 Ma. Dentro del clado sudamericano no se observa una estructura filogenética asociada a la especie hospedadora ni a la localidad geográfica. Un patrón similar se observa en el árbol construido con las secuencias COX1-S (Figura A1, Apéndice), con la inclusión adicional de una muestra proveniente de Japón reportada por Tokiwa et al. (2019).

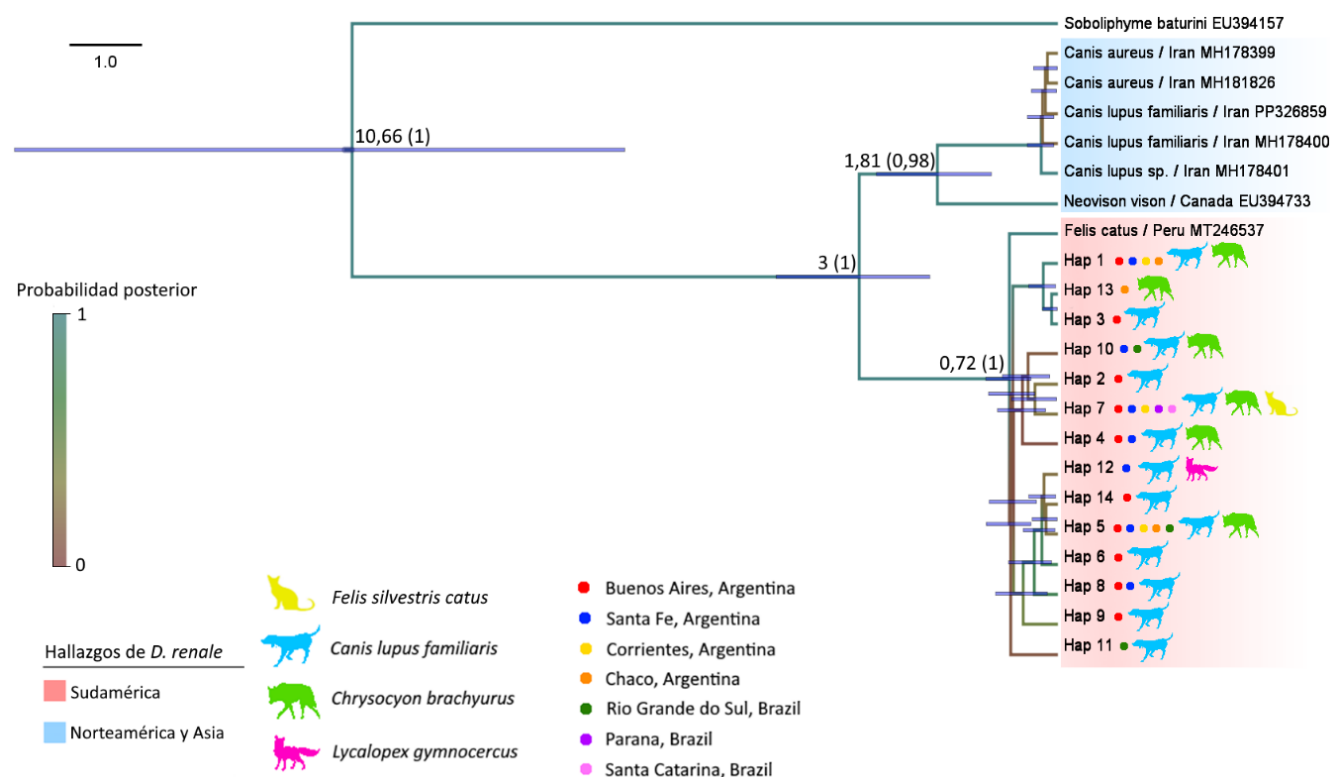


Figura 1.6. Filogenia para la región COX1-M por inferencia bayesiana obtenida con software BEAST v2.6.7 y graficada con herramienta online iTOL utilizando los haplotipos encontrados en este estudio y disponibles en la base de datos del GenBank para *Diocetophyme renale*. La secuencia de *Soboliphyme baturini* fue incluida como outgroup. Los nodos muestran el tiempo en Ma y entre paréntesis la probabilidad posterior. Modificado de Arce et al. (2024).

En este estudio, la diversidad genética observada para COX1 entre las secuencias generadas y los registros moleculares previos mostró distancias genéticas patrísticas promedio del 1,4 %, con un máximo de 2,7 % y un mínimo de 0,4 %, considerando únicamente las secuencias sudamericanas, incluida la de Perú. Entre estas, se identificaron 13 sitios polimórficos: 13 transiciones, una transversión y todos los cambios fueron sinónimos. En contraste, al comparar con las secuencias procedentes de Canadá e Irán, la distancia genética promedio fue del 10,4 %, con un valor máximo de 11,6 % y un mínimo de 9,3 %. El alineamiento con estas secuencias reveló 42 sitios polimórficos, incluyendo 37 transiciones, seis transversiones y tres polimorfismos no sinónimos.

Con el objetivo de explorar la posible existencia de discontinuidades en la distribución de divergencias genéticas, conocidas como *barcode gaps*, es decir, diferencias marcadas entre la variación intraespecífica y la interespecífica, se analizaron las distancias genéticas no corregidas entre todas las secuencias. La distribución de estos valores se representó mediante un histograma (Figura 1.7 A), el cual reveló un patrón claramente bimodal, con una acumulación de distancias bajas y otra de valores más altos, separadas por un *barcode gap* pronunciado. Esta discontinuidad sugiere la posible existencia de agrupamientos genéticos diferenciados. De manera consistente, la curva de rango acumulado (Figura 1.7 B) mostró un salto abrupto en los valores superiores, indicando una transición clara entre grupos de distancias genéticas bajas y elevadas.

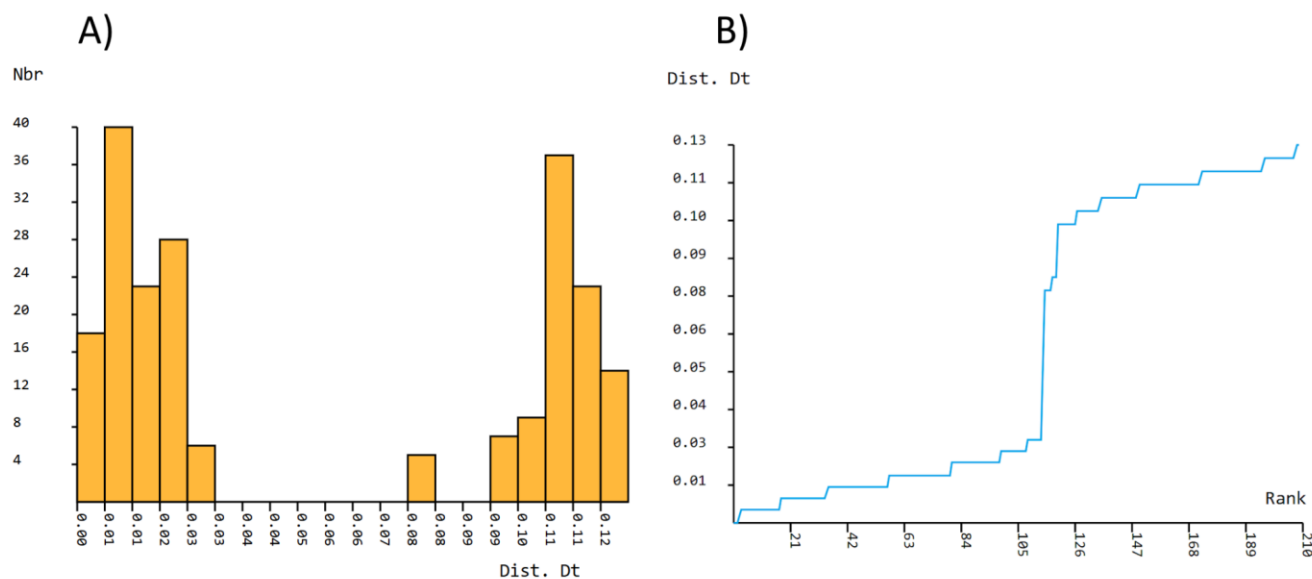


Figura 1.7. Distribución de distancias genéticas no corregidas (p-distancias) entre todas las secuencias analizadas. A) Histograma de frecuencias que muestra una distribución bimodal de las distancias, con una separación clara entre valores bajos y altos. B) Curva de rango acumulado. Se observa un salto abrupto en los valores de distancia, indicando una transición marcada entre dos agrupamientos genéticos diferenciados.

En cuanto a la delimitación de linajes, se aplicaron los algoritmos de partición molecular ASAP y ABGD para evaluar la estructuración primaria de los linajes mitocondriales (Figura 1.8). Ambos enfoques coincidieron en la detección de tres unidades taxonómicas operativas (MOTUs), consistentes con la procedencia geográfica de las secuencias analizadas:

- MOTU 1: secuencias sudamericanas, haplotipos 1 a 14 y Perú (MT246537.1).
- MOTU 2: secuencias provenientes de Irán (MH178300.1, MH181826.1, PP326859.1, MH178400.1 y MH178401.1).
- MOTU 3: secuencia de Canadá (EU394733.1)

En el caso de ASAP, la partición con menor puntaje (ASAP score) delimitó exactamente estos tres grupos (columna E). Por su parte, ABGD generó particiones consistentes bajo los distintos valores de divergencia intraespecífica (P), distinguiendo de forma estable los mismos tres MOTUs a lo largo de todo el rango de parámetros analizados.



Figura 1.8. Delimitación primaria de linajes moleculares mediante los algoritmos ABGD y ASAP aplicados a secuencias del gen mitocondrial COX1. El dendrograma representa la distancia genética entre haplotipos y secuencias de referencia obtenidas de GenBank. A la derecha, se muestran las particiones generadas por ABGD (colores a la izquierda) y ASAP (colores a la derecha). Ambos enfoques coincidieron en una delimitación consistente en tres MOTUs.

Por último, en el marco de los MOTUs definidos por los análisis de delimitación de linajes, se analizaron las distancias dentro y entre grupos (Figura 1.9). Las distancias inter-MOTU se ubican consistentemente por encima de las intra-MOTU, sin superposición entre los rangos intercuartílicos ni presencia de valores atípicos que comprometan esta separación. Esta clara diferenciación entre grupos respalda la validez de los límites establecidos por los algoritmos de partición, y sugiere una estructura genética robusta entre los linajes mitocondriales analizados. Además, la ausencia de solapamientos es coherente con la presencia de un *barcode gap* y proporciona evidencia adicional de divergencia evolutiva.

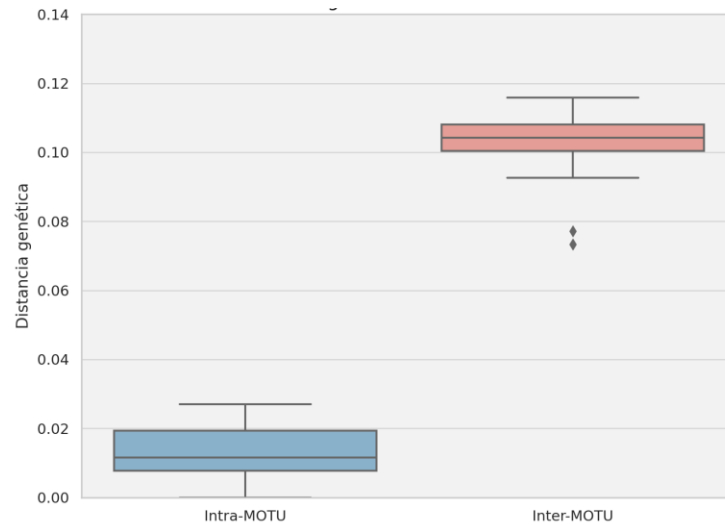


Figura 1.9. Boxplot de distancias genéticas intra- e inter-MOTU. Las distancias inter-MOTU (en rojo) se encuentran consistentemente por encima de las intra-MOTU (en azul), sin superposición entre los rangos, lo que apoya la existencia de diferenciación genética entre los linajes definidos.

Filogenia concatenada y asociaciones por hospedador y localidad

El análisis filogenético basado en la concatenación de los genes COX1 y ND4 reveló un total de 21 haplotipos (Figura 1.10). Cuatro de ellos (Hap8, Hap13, Hap14 y Hap18) se detectaron tanto en hospedadores silvestres como domésticos. Los haplotipos Hap13 y Hap8 presentaron la distribución geográfica más amplia, hallándose en cuatro localidades cada uno, seguidos de Hap12 y Hap14, presentes en dos localidades. Los clados con alto soporte estadístico (probabilidad posterior > 0,9) agrupan secuencias de distintas regiones y hospedadores, lo que refuerza la ausencia de estructuración geográfica o por especie.

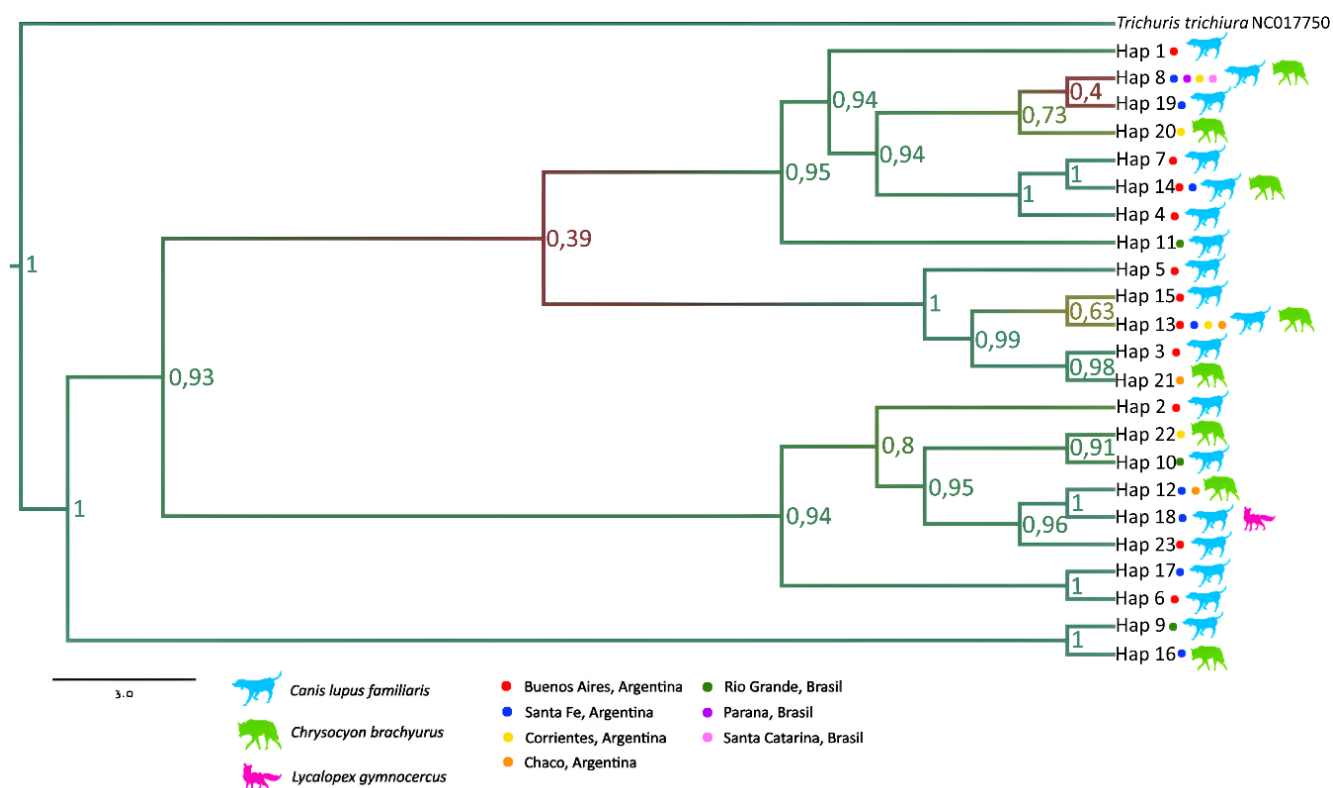
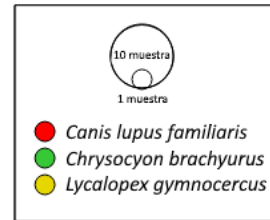
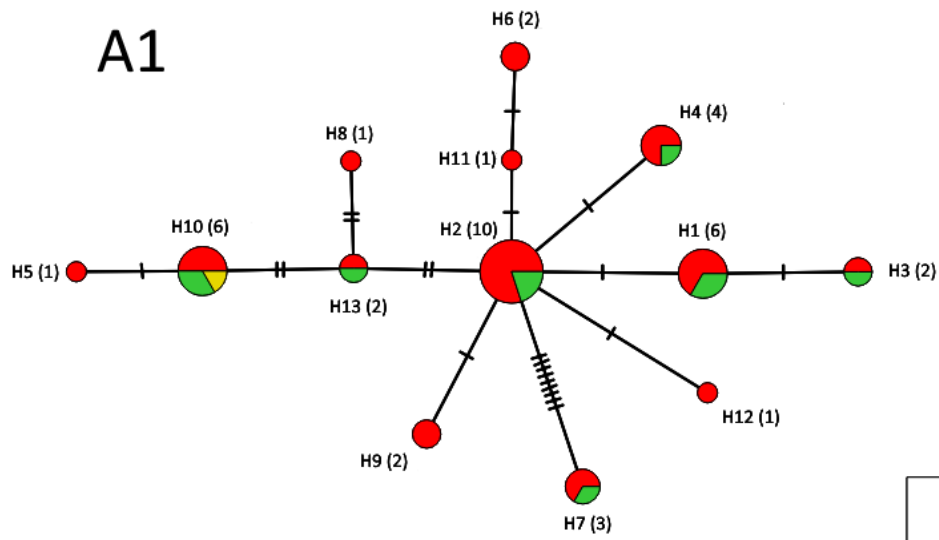


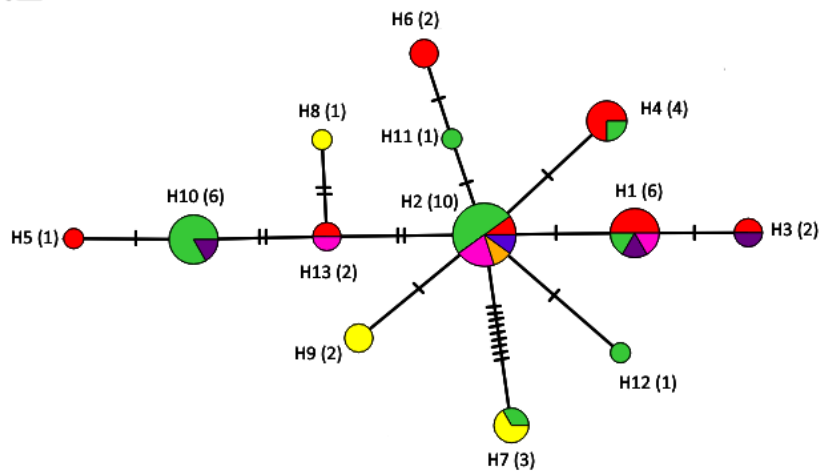
Figura 1.10. Cladograma obtenido por inferencia bayesiana utilizando software BEAST v2.6.7 y graficada con herramienta online iTOL utilizando los haplotipos encontrados en nuestro estudio. La secuencia de *Trichuris trichiura* fue utilizada como outgroup. Modificado de Arce et al. (2024).

El análisis de los marcadores mitocondriales mediante redes de haplotipos, tanto por separado o concatenados, no reveló estructuración de los haplotipos según la localidad geográfica ni la especie hospedadora, en concordancia con los árboles filogenéticos obtenidos (Figura 1.11). En términos demográficos, la red de haplotipos generada con COX1 no mostró una topología compatible con fenómenos destacados (Figura 1.11, B1 y B2). En cambio, la red construida exclusivamente con el gen ND4 exhibió un patrón consistente con una expansión poblacional: un haplotipo central (H2), de alta frecuencia (10 individuos), presente en cinco localidades distintas, del cual derivan múltiples haplotipos menos frecuentes, distribuidos en cada una de esas regiones (Figura 1.11, A1 y A2). Esta estructura sugiere un escenario en el que un haplotipo ancestral se dispersó geográficamente y, posteriormente, dio origen a variantes locales. En esa misma red, al examinar la composición de hospedadores por haplotipo, se observa que varios de ellos (incluido H2) están integrados por individuos tanto de *Chrysocyon brachyurus* como de *Canis lupus familiaris*, en proporciones similares (alrededor del 25–30 % correspondiente a la especie silvestre). Esta distribución mixta refuerza la hipótesis de un alto flujo génico entre hospedadores silvestres y domésticos, posiblemente facilitado por eventos de transmisión interespecífica en distintas regiones. La ausencia de este patrón en COX1 podría atribuirse a su menor tasa de mutación en comparación con ND4, lo que limitaría su sensibilidad para detectar procesos evolutivos recientes. Finalmente, la red de haplotipos generada a partir del marcador concatenado (COX1 + ND4) no evidenció una estructura compatible con expansión o contracción poblacional (Figura 1.11, C1 y C2). Esto indica que la señal filogenética observada en ND4 no se mantiene al incorporar información adicional, lo cual podría deberse a que la expansión poblacional inferida es un artefacto del análisis (y por lo tanto no refleja un proceso biológico real), o bien a que se trata de un fenómeno reciente cuya señal es tenue y se diluye al combinarse con la información menos variable del gen COX1. Estos resultados serán considerados en relación con las pruebas de expansión poblacional y neutralidad presentadas en el apartado siguiente.

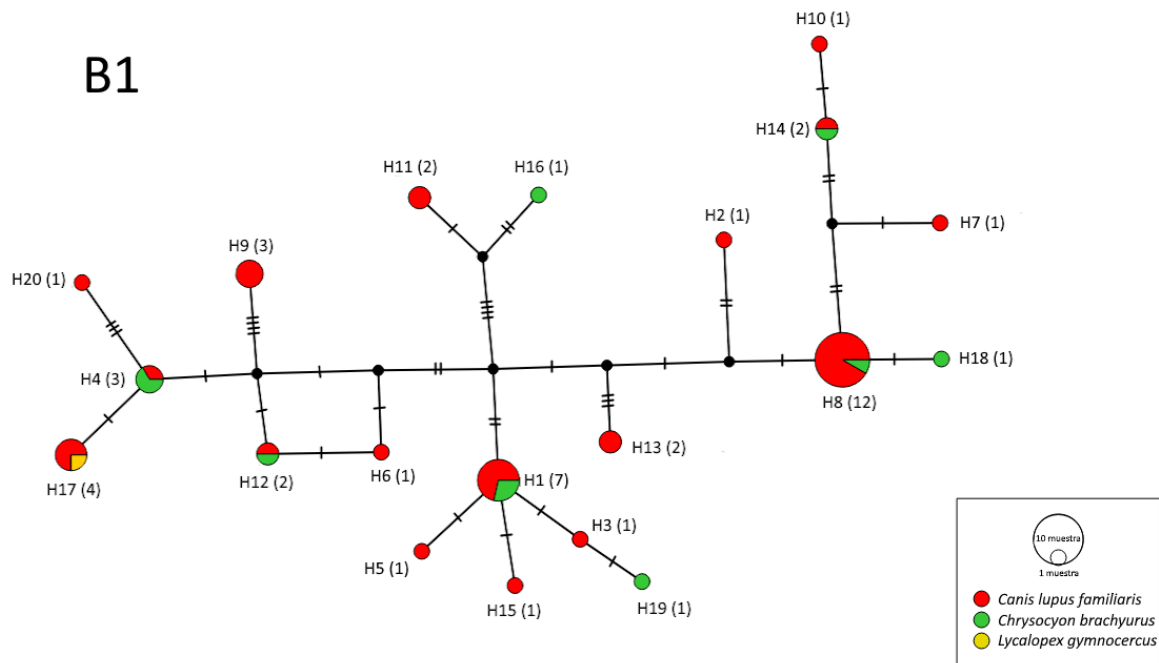
A1



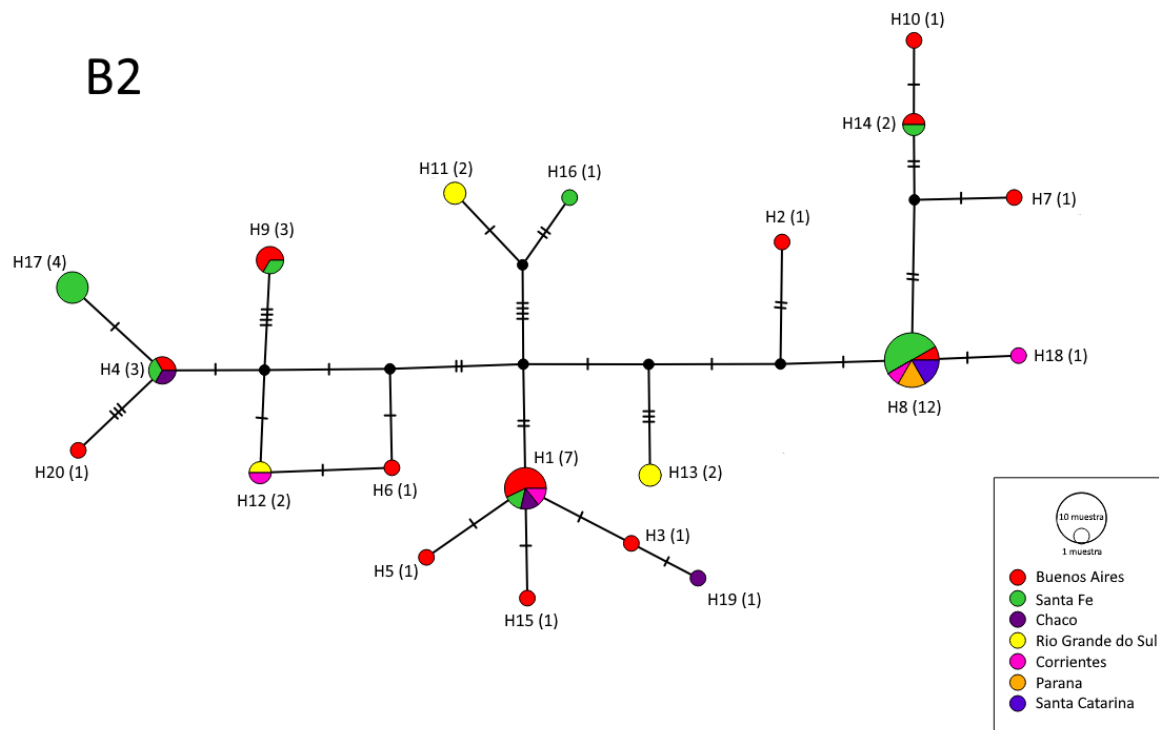
A2



B1



B2



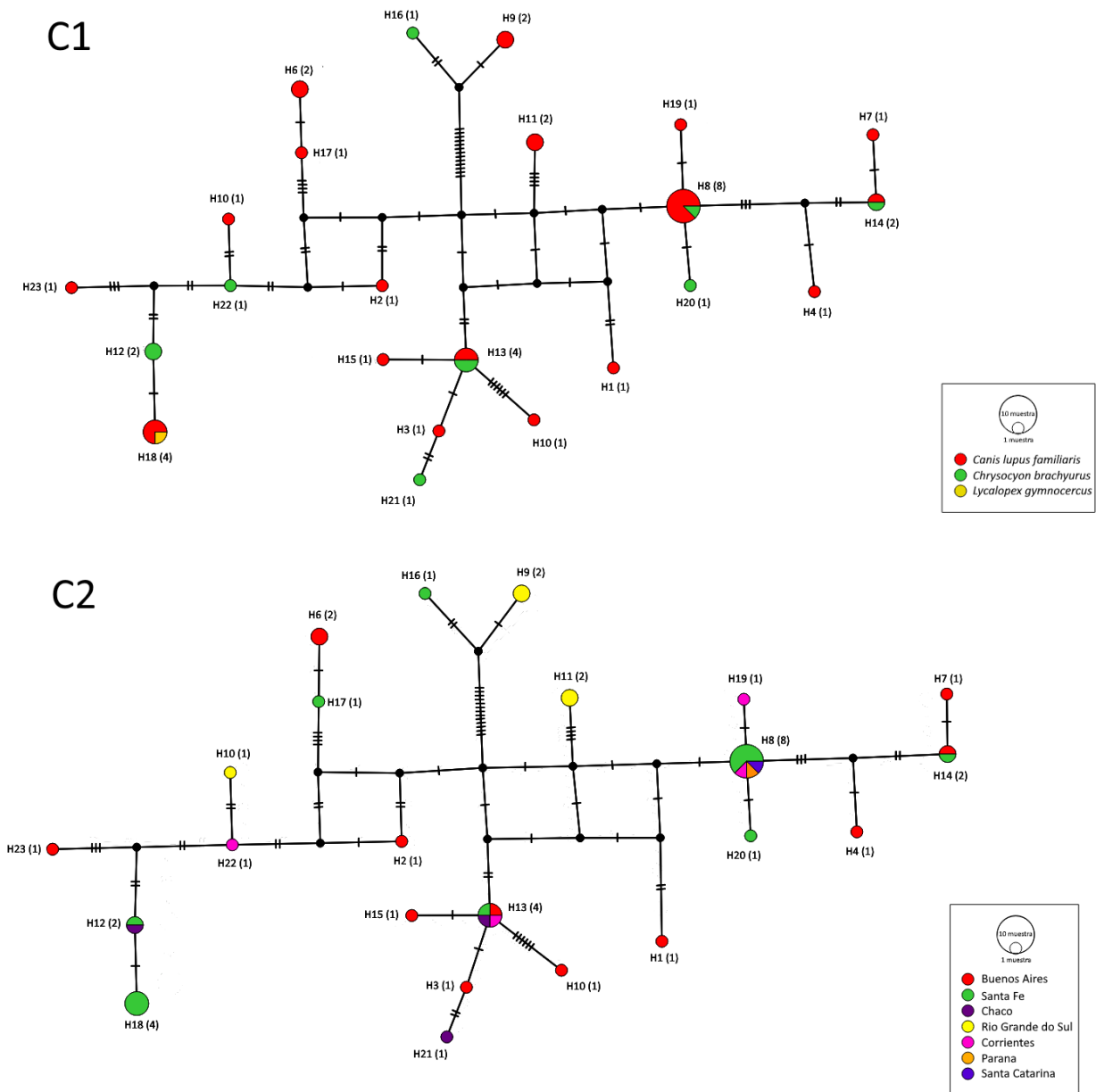


Figura 1.11. Redes de haplotipo para los marcadores construida mediante el método de Median Joining (epsilon = 0). Cada círculo muestra un haplotipo con su ID y su frecuencia entre paréntesis. Para cada marcador, se presentan dos visualizaciones: (1) coloreada según la especie hospedadora y (2) según la localidad de origen. (A) Marcador ND4, (B) marcador COX1, y (C) concatenado ND4+COX1. Modificado de Arce et al. (2024).

Relaciones genéticas y geográficas

Los resultados del AMOVA indicaron que la diversidad genética no se explicó por la diferenciación entre hospedadores silvestres y domésticos, lo que sugiere que los parásitos conformarían una unidad panmíctica, posiblemente como resultado de transmisión interespecífica. En cambio, al categorizar los individuos según su localidad (provincia o estado), se observó una diferenciación genética entre grupos, que explicó el 4,39 % de la variación total. Este valor se incrementó a 5,57 % al combinar las provincias de Corrientes y Chaco, donde los hospedadores comparten el sistema hídrico del río Paraná.

El test de Mantel, basado en 100.000 permutaciones, no mostró una correlación significativa entre las distancias genéticas y geográficas ($r = 0,007$; $p = 0,148$), lo que indica que no hay evidencia de aislamiento al flujo génico por distancia en la región estudiada. Además, se observó una amplia variación en las distancias genéticas observadas dentro de cada localidad (Figura 1.12).



Figura 1.12. Matriz de distancias genéticas de Tamura Nei (1993), agrupadas por localidad, resultado de análisis de aislamiento por distancia los datos fueron generados utilizando el software MEGA v11. Tomado de Arce et al. (2024).

En tres muestras se observó una distancia elevada en relación con las demás: Dren40 y Dren41, provenientes de perros localizados en Rio Grande do Sul, y Dren58, de un aguará guazú en Santa Fe. Estas muestras se agruparon separadas del resto en las redes de haplotipos (H9 para Dren40 y Dren41 y H16 para Dren58). A su vez, ocuparon posiciones basales en la filogenia concatenada, con alto soporte estadístico (probabilidad posterior = 1; véase Figura 1.10).

Con el objetivo de evaluar cambios recientes en el tamaño poblacional de *D. renale*, se aplicaron tres pruebas estadísticas: D de Tajima, F de Fu y R2 de Ramos-Onsins y Rozas. Consistentemente, ninguna de ellas mostró desviaciones significativas respecto de lo esperado bajo un equilibrio deriva–mutación, y por tanto no se evidencia crecimiento poblacional (estadísticos en Tabla 1.4).

Tabla 1. 4. Pruebas estadísticas basadas en datos de secuencia sobre aspectos demográficos de *D. renale*. La significancia se determinó mediante 1.000 simulaciones coalescentes. Valores de D, F y R2 obtenidos para los diferentes marcadores en contraste con lo esperado para $\alpha = 0,05$.

Marcador Molecular	D	$\alpha = 0.025$		F	$\alpha = 0.05$	R2	$\alpha = 0.05$
		2,50 %	97,50 %		5,00 %		5,00 %
COX1	-0,700896	-1,69456	1,92159	-3,42948	-4,63243	0,092026	0,062865
ND4	-1,21541	-1,71761	1,82527	-1,77377	-3,98389	0,074853	0,0660138
Concatenado COX1-ND4	-0,961274	-1,75164	1,88549	-3,38549	-4,79482	0,086563	0,0673349

Discusión

Marcadores Moleculares Genéticos para el estudio de *D. renale*

Los nematodos parásitos que afectan a la fauna silvestre en Sudamérica han sido poco abordados en estudios científicos, a pesar de su relevancia para la biodiversidad, la salud ambiental y su potencial zoonótico. Su identificación suele basarse en criterios morfológicos, los cuales pueden resultar limitados cuando las muestras están degradadas, como ocurre frecuentemente en necropsias de animales silvestres. Además, las similitudes morfológicas entre especies emparentadas dificultan su diferenciación y pueden ocultar la existencia de especies crípticas. En este contexto, el presente estudio propone un abordaje molecular y filogeográfico del nematodo *D. renale*, una especie ampliamente distribuida, pero con escasa información genética disponible. Para ello, se utilizaron marcadores moleculares basados en el ADNmt.

En este estudio se evaluaron las propiedades de distintos fragmentos cortos del gen mitocondrial COX1, con el objetivo de analizar su aplicabilidad en la identificación molecular de *D. renale*. En lo que respecta a **identificación de especies**, particularmente en metazoos, la primera región estandarizada para barcode genéticos, propuesta por Hebert et al., (2003), descrita por Folmer et al., (1994), son aproximadamente 648 pb y se ha convertido en la referencia para la identificación de especies mediante este gen. Estudios posteriores encontraron limitaciones en la capacidad informativa necesaria para diferenciar especies en algunos grupos basales de metazoos como los cnidarios y poríferos por lo que Erpenbeck et al. (2006) propusieron analizar una región más informativa, variable, del gen que comprende una región de 430 pb y se ha utilizado en estudios para diferenciar especies congéneres

en nematodos que no presentan diferencias morfológicas evidentes (Derycke et al., 2010), e incluso se logró amplificar la región que comprende ambas secuencias con un único par de primers (Ferri et al., 2009).

La región conocida como “región de Folmer”, se encuentra parcialmente comprendida (90 % según el alineamiento de aminoácidos) dentro del fragmento que en este trabajo denominamos COX1-L, pero se encuentra completo en COX1-XL y que es la primera vez que se documenta para *D. renale*. En línea con lo esperado para un marcador orientado a la identificación de especies, COX1-L presentó una menor proporción de sitios polimórficos y una diversidad nucleotídica más baja en comparación con COX1-M lo cual refuerza su idoneidad como herramienta de barcode molecular para esta especie, tanto en contextos de identificación, como diagnósticos. El marcador COX1-L representa una opción robusta al ofrecer un equilibrio adecuado entre especificidad y eficiencia de amplificación, especialmente en contextos donde la identificación morfológica se ve comprometida por el estado de conservación de las muestras, o en aquellos casos en los que se requiere una identificación molecular como complemento de la información morfológica (Eiras et al., 2021).

En cuanto a la identificación en condiciones de degradación extrema o escasa disponibilidad de tejido, el marcador COX1-L presenta limitaciones dado que su tamaño requiere una disponibilidad y estado de conservación del ADN que en estas ocasiones puede no ser posible. Este escenario es frecuente en estudios de fauna silvestre en donde los muestreos suelen realizarse a partir de ejemplares de fauna atropellada que han permanecido varios días en descomposición, lo cual afecta frecuentemente la integridad de los parásitos recuperados. En ese caso el fragmento más corto, COX1-S, si bien es menos informativo, ha demostrado una alta sensibilidad y una capacidad de discriminar la especie acertadamente en bases de datos, constituyendo una alternativa eficaz para la identificación molecular de *D. renale*. Es gracias al uso de este marcador que se cuenta con detección molecular de este parásito en el hospedador silvestre *Galictis cuja*, uno de los más prevalentes (36%) en la región de estudio (Eiras et al., 2021).

Para los estudios de **diversidad genética** intraespecífica, se requieren marcadores que presentan un nivel de variación suficientemente informativo entre individuos de una misma especie. En este sentido, los marcadores mitocondriales ofrecen ciertas ventajas frente a los nucleares, principalmente debido a su mayor tasa de mutación asociada al estrés oxidativo mitocondrial, que puede ser hasta diez veces superior a la del ADN nuclear. Esta elevada tasa de mutación incrementa su utilidad en estudios poblacionales, al tiempo que evita los sesgos derivados de eventos de recombinación. Dentro del gen COX1, la región de Folmer, que corresponde con la denominada COX1-L en este estudio, presenta una variabilidad limitada, lo que restringe su aplicabilidad en análisis intrapoblacionales. En contraste, la región I3-M11, incluida aquí en la región denominada COX1-M, mostró una variación intraespecífica considerable. Aunque esta región ha sido empleada en estudios de barcoding en metazoos justamente por su baja variabilidad intraespecífica, en este caso proporcionó información valiosa para identificar patrones locales de diversidad y comparar los linajes detectados con secuencias reportadas en otras regiones del mundo. Esta variabilidad complementa la observada en el marcador ND4, también caracterizado por su alta diversidad consistente las predicciones basadas en *Trichuris* spp. realizadas en esta tesis al momento de seleccionar el marcador, y con lo reportado previamente en nematodos (Blouin, 2002; Blouin et al., 1998; Gharamah et al., 2012). Este marcador probó tener la mayor diversidad nucleotídica de entre todos los analizados lo que lo convierte en un candidato ideal para estudios de variación genética intraespecífica para este parásito (Arce et al., 2024). En conjunto, ambos marcadores ofrecen un panorama más completo de la estructura genética y la filogeografía de *D. renale*.

Dada la diversidad de aplicaciones de las distintas regiones del marcador mitocondrial COX1, la amplificación de fragmentos extensos, denominada en este estudio como COX1-XL, representa un enfoque particularmente adecuado. Esta estrategia permite generar información útil no solo para la identificación específica, sino también para la evaluación de la diversidad genética dentro de los grupos de estudio. El comportamiento dual de las regiones COX1 en nematodos, y la consecuente necesidad de analizarlas de manera conjunta, ya había sido señalada por (Ferri et al., 2009) y (Derycke et al., 2010). La amplia diversidad específica que caracteriza a este phylum implica que el rendimiento de los distintos marcadores puede variar significativamente entre linajes, por lo que resulta esencial contar con estudios que comparen su comportamiento intra- e interpoblacional en representantes de los diferentes clados. Este aspecto adquiere especial relevancia en los Clados I y II, y en particular en el orden Dioctophymatida que, a pesar de su importancia en la salud animal y humana, sigue siendo escasamente representado en estudios moleculares. Recientemente, se han propuesto metodologías de metabarcoding, basadas en la secuenciación masiva de fragmentos cortos (en general) y altamente conservados para el análisis de comunidades biológicas, que sugieren el uso de la región I3-M11 como marcador COX1 universal para nematodos (Sikder et al., 2020). Sin embargo, esta propuesta se basa en estudios que no incluyen especies de los clados I y II. En contraste, los resultados obtenidos en este trabajo indican que, en *D. renale*, dicha región presenta una alta variabilidad intraespecífica, mientras que la región M1–M6 (conocida como región de Folmer) resulta menos variable y, por ende, más idónea. En este contexto, los datos aquí presentados no solo aportan el primer registro de estas regiones en *D. renale*, sino que también contribuyen a ampliar el paradigma sobre el comportamiento de los fragmentos del gen COX1 en nematodos en clados subrepresentados. En consecuencia, ofrecen nuevas consideraciones metodológicas para el diseño de aproximaciones moleculares, como el metabarcoding, aplicadas a la caracterización de comunidades con alta diversidad filogenética dentro del phylum.

Delimitación de linajes de *D. renale*

La correcta delimitación de especies en nematodos constituye un paso fundamental tanto para los estudios básicos en sistemática, ecología y evolución como para aplicaciones en salud humana, medicina veterinaria, agricultura y manejo ambiental (Hodda, 2022). Identificar con precisión qué linajes están evolucionando de forma independiente, entendiendo las especies como líneas evolutivas separadas según el concepto propuesto por De Queiroz (2007), permite no solo comprender la diversidad real presente en un sistema biológico, sino también establecer aproximaciones de estudio adecuadas y diseñar estrategias de control efectivas. Esta necesidad se vuelve especialmente crítica en organismos parásitos, ya que las decisiones médicas, veterinarias y epidemiológicas dependen directamente del reconocimiento certero del agente involucrado. La delimitación taxonómica precisa influye en la elección de tratamientos, en la evaluación de riesgos zoonóticos y en la implementación de medidas de prevención y monitoreo.

En el caso de *D. renale*, el estudio de Gomez-Puerta et al., (2021) combinó evidencia morfológica y molecular en ejemplares recolectados en Sudamérica, comparándolos con registros depositados en GenBank. Allí se reportaron discrepancias morfológicas respecto a la descripción clásica de la especie, en particular en las dimensiones de los huevos y la posición de la vagina, que son ambos caracteres morfológicos relevantes en la delimitación de las especies dentro del Orden Dioctophymatida. Además, se observaron divergencias genéticas del 0,35 % para el marcador nuclear 18S ARNr y entre 9,3 % y 12,5 % para el gen mitocondrial COX1. En función de estas diferencias, los autores propusieron referirse a los especímenes analizados como *Dioctophyme* sp., sugiriendo la posibilidad de que se trate de una especie distinta. La delimitación molecular de especies en nematodos ha sido abordada

mediante distintos enfoques, muchos de los cuales utilizan valores umbral de divergencia genética. Para el marcador COX1, Blouin (2002) propuso un umbral del 10 % para distinguir especies, mientras que otros estudios han empleado valores arbitrarios entre el 2 % y el 3 %, dependiendo del grupo taxonómico analizado (Abdo y Golding, 2007; Hebert, Ratnasingham, et al., 2003). Por su parte, el sistema Barcode of Life Data System utiliza un umbral inicial del 1 %, lo que tiende a generar un mayor número de unidades taxonómicas operativas (Ratnasingham y Hebert, 2007). En el presente estudio, se detectó una divergencia genética promedio de 1,4 % entre las secuencias sudamericanas, incluyendo la reportada por Gomez-Puerta et al. (2021) para Perú, y una divergencia del 10,4 % respecto de las secuencias provenientes de Canadá e Irán. Estos valores no permiten concluir una delimitación clara de especies entre los grupos geográficos analizados. Hebert et al. (2004) propusieron un criterio más general y menos dependiente del grupo taxonómico, conocido como la "regla del factor 10", que plantea que el umbral interespecífico debe ser diez veces superior al promedio de la variación intraespecífica del grupo en estudio. Este enfoque ha sido aplicado exitosamente en la identificación de especies crípticas de nematodos (Derycke et al., 2010; Ferri et al., 2009; Martínez-Arce et al., 2020). Aplicado a nuestros datos, la divergencia entre Sudamérica y los linajes de otras regiones representa aproximadamente siete veces la divergencia intra-Sudamérica, lo cual no alcanza el umbral esperado bajo este criterio. Por lo tanto, si bien se detecta una estructuración geográfica notable, los niveles de divergencia observados no resultan concluyentes para establecer límites específicos bajo estos criterios.

Todos estos umbrales utilizados tradicionalmente para delimitar especies han sido cuestionados por su arbitrariedad (Gonçalves et al., 2021), dando lugar a métodos más robustos que emplean análisis probabilísticos centrados principalmente en el marcador COX1. Estos enfoques buscan identificar la denominada barcode gap, definida como la discontinuidad entre las mayores distancias intraespecíficas y las menores interespecíficas (DeSalle y Goldstein, 2019; Meyer y Paulay, 2005). En este estudio se exploró inicialmente la existencia de dicha discontinuidad mediante el análisis de las distancias genéticas no corregidas (p-distances) entre todas las secuencias obtenidas. La distribución gráfica de las distancias genéticas (Figura 1.5) mostró un claro patrón bimodal y un salto abrupto en la curva acumulada, indicando un potencial barcode gap. El algoritmo ABGD generó particiones consistentes y estables a lo largo de diversos valores del parámetro de divergencia intraespecífica, identificando claramente tres MOTUs correlacionados con la procedencia geográfica de las muestras analizadas: Sudamérica (Argentina, Brasil y Perú), Canadá e Irán. Esta agrupación no mostró subdivisiones internas adicionales y su estabilidad refuerza la hipótesis de una diferenciación geográfica sólida y potencialmente significativa desde una perspectiva taxonómica. Complementariamente, ASAP, entre múltiples particiones obtenidas (2, 3, 5, 8, 19 y 21 grupos), le otorgó el mejor puntaje estadístico (menor ASAP score) a la delimitación concordante con la brindada por ABGD, reafirmando los mismos tres grupos: Sudamérica, Canadá e Irán. Ambos análisis coinciden en apoyar firmemente la hipótesis de una diferenciación geográfica bien consolidada, evidenciando patrones claros de vicarianza genética en las poblaciones analizadas. Estos resultados sugieren que la variación observada podría reflejar procesos evolutivos independientes significativos, aunque la magnitud de divergencia aún no alcanza claramente los umbrales tradicionalmente utilizados para definir límites específicos concluyentes en nematodos.

Las filogenias COX1-M obtenidas en este estudio revelaron dos clados bien diferenciados con elevado soporte estadístico, separando claramente las muestras sudamericanas de aquellas provenientes de Canadá e Irán. Esta divergencia sugiere un fenómeno evolutivo antiguo asociado a procesos poblacionales naturales de dispersión mediante fauna silvestre, en lugar de una introducción reciente mediada por fauna doméstica como ocurre frecuentemente con otros parásitos a raíz de procesos globales contemporáneos. Adicionalmente, estudios previos sobre la tasa de sustitución del ADNmt en el género *Trichinella* sugieren una separación temporal entre linajes sudamericanos y del resto del mundo ocurrida hace aproximadamente 3 Ma. Este tiempo estimado

precede ampliamente la introducción de animales domésticos en la región y es congruente con el Gran Intercambio Biótico Americano, un masivo movimiento de especies entre América del Norte y América del Sur tras la formación del istmo de Panamá. En este contexto, *D. renale* habría colonizado gradualmente Sudamérica acompañando a sus hospedadores silvestres durante dicho evento geológico. Este tipo de codivergencia entre nematodos parásitos y la mastofauna que infectan en dicho evento ha sido previamente propuesto y desarrollado por (Jiménez et al., 2017).

El presente trabajo no pretende afirmar que los linajes sudamericanos de *Diectophyme* spp. hayan alcanzado un nivel inequívoco de especiación respecto a aquellos encontrados en otras regiones del mundo. Los análisis de divergencia genética aquí presentados se basan en la región COX1-M, un fragmento relativamente corto de 381 pb seleccionado por ser la única región mitocondrial disponible con homólogos conocidos en otras localidades geográficas, lo que limita la resolución para abordar la delimitación específica de manera definitiva. En cambio, se busca profundizar y expandir la propuesta inicial de Gomez-Puerta et al. (2021), aumentando el número y la extensión de las secuencias analizadas y aplicando métodos bioinformáticos más robustos para evaluar posibles hipótesis de especiación. Esta hipótesis queda planteada para futuras investigaciones que podrían expandir el análisis con secuenciación masiva y métodos genómicos, capaces de aportar mayor resolución y precisión en la delimitación específica y en la comprensión de los procesos evolutivos implicados. Además, estos abordajes requieren ser complementados con estudios morfológicos del linaje sudamericano que expongan diferenciaciones claras con el holotipo en cuanto a caracteres diagnósticos y que permitan describir el parásito de esta región. Pese a estas limitaciones, la marcada diferenciación genética observada entre los linajes sudamericanos y aquellos provenientes de otras regiones del mundo sugiere firmemente que la llegada del género *Diectophyme* spp. a Sudamérica fue el resultado de una dispersión antigua vinculada a fauna silvestre, más que una introducción antropogénica reciente mediada por animales domésticos.

Dinámica poblacional de *D. renale* en Sudamérica: efecto del hospedador y localidades

Los análisis realizados mediante filogenias bayesianas y redes de haplotipos indicaron ausencia de una estructuración genética clara según localidad o especie hospedadora en la región analizada. En cuanto a los hospedadores, las filogenias mostraron una distribución polifilética de los hospedadores infectados con un alto soporte estadístico, tanto para el marcador COX1, como usando toda la información genética con ND4 y COX1. Asimismo, en las redes de haplotipos se observa esa ausencia de haplogrupos consolidados por hospedador e incluso se observa similares proporciones de hospedadores domésticos y silvestres para cada haplotipo (Figura 1.11, A1). Este patrón, junto con los resultados del AMOVA donde no se ve estructuración alguna por especie hospedadora, acentúa la transmisión entre especies domésticas y silvestres, indicando que este fenómeno podría ser recurrente en el área. Esta información genera la base para, en estudios futuros, evaluar las zonas de interfaz donde interactúan los ecosistemas silvestres y urbanos y así conocer cómo ocurre el fenómeno de transmisión y desarrollar medidas de control necesarias.

En cuanto a las localidades, estos resultados sugieren que *D. renale* no enfrenta barreras geográficas evidentes que limiten significativamente su dispersión a escala regional. Sin embargo, el AMOVA indicó que la distribución geográfica explica una proporción ligeramente mayor de la variabilidad genética que la identidad del hospedador. Aunque esta contribución fue relativamente baja (4 %), aumentó ligeramente (6 %) cuando las localidades de Chaco y Corrientes fueron agrupadas, posiblemente debido a recursos hídricos comunes del río Paraná. Por ende,

la diversidad genética del parásito en la región tiene más relación con el lugar donde se encuentra que con las especies que infecta. Sin embargo, el test de Mantel no mostró evidencia significativa de aislamiento por distancia en esta escala geográfica, por lo que haplotipos distantes genéticamente han sido encontrados en sitios cercanos.

La identificación de posibles relaciones fuente-sumidero entre localidades resulta todavía prematura, aunque la comparación entre provincias argentinas sugiere ciertos patrones interesantes. En la provincia de Buenos Aires se observó una mayor diversidad haplotípica, pero una menor diversidad nucleotídica en comparación con la provincia de Santa Fe. Por su parte, Santa Fe presentó haplotipos compartidos con Brasil y careció de algunos haplotipos exclusivos de Buenos Aires. Este patrón sugiere que Santa Fe podría representar una zona de contacto entre dos regiones genéticamente diferenciadas: la templada (representada por Buenos Aires) y la tropical o subtropical (representada por Brasil y el norte argentino). Este escenario explicaría además la mayor diversidad nucleotídica observada al considerar estructuración geográfica. No se observaron diferencias significativas en la diversidad haplotípica entre Brasil y Argentina, dificultando determinar una dirección clara en el flujo génico entre ambos países. Probablemente esto sea resultado del extenso tiempo evolutivo transcurrido desde la dispersión inicial y la gran escala espacial asociada a las migraciones de los hospedadores. Adicionalmente, se detectaron múltiples haplotipos compartidos entre animales domésticos y silvestres, lo que apoya la hipótesis de múltiples eventos de transmisión en ambas direcciones en esta interfaz doméstico-silvestre. Este patrón no respalda una transmisión unidireccional del parásito, sino más bien una dinámica bidireccional con una alta tasa de intercambio entre hospedadores.

En relación con la dinámica demográfica de *D. renale*, algunos patrones observados en el marcador ND4 sugieren una posible señal débil de expansión poblacional. En particular, se registró un valor de θ_w aproximadamente un 50 % superior al de θ_π , lo cual podría reflejar un exceso de singletons en los haplotipos, un patrón compatible con escenarios de expansión reciente. Asimismo, la red haplotípica correspondiente mostró una organización centrada en un haplotipo con mayor frecuencia y ampliamente distribuido entre localidades del que se derivan otras variantes periféricas de menor frecuencia, lo que puede dar indicio de expansión poblacional. Sin embargo, los análisis estadísticos (tanto en prueba de neutralidad como de expansión poblacional) no mostraron diferencias significativas de los esperado para el equilibrio deriva/mutación. Por lo tanto, es probable que los patrones observados respondan a una estructura estable en la población sin implicar un cambio demográfico reciente, consistente con lo observado en COX1. Esto sugiere que *D. renale* ha estado presente en el área durante un tiempo evolutivamente prolongado, suficiente para que las señales de una posible colonización inicial hayan sido erosionadas o ya no sean detectables con los marcadores empleados.

La presencia de *D. renale* en hospedadores tanto domésticos como silvestres pone de manifiesto su capacidad para mantenerse en distintos ambientes y atravesar barreras ecológicas. Los resultados aquí presentados constituyen un aporte relevante para futuras investigaciones que busquen comprender con mayor profundidad la ecología del parásito en Sudamérica, su relación con la biodiversidad local y los posibles escenarios de transmisión interespecífica, con implicancias para la salud animal, la conservación de la fauna y la vigilancia zoonótica.

Parte II: Búsqueda e identificación de marcadores proteicos de *Dioctophyme renale*. Posible aplicación para estudios de diagnóstico.

Introducción

Diagnóstico de dioctofimosis en perros

En la actualidad existen variados métodos que conducen al diagnóstico de dioctofimosis (Tabla 2.1). El método de referencia para el diagnóstico de *Dioctophyme renale* en perros es el análisis de sedimento urinario (Pedrassani et al., 2015). Este procedimiento consiste en la homogenización y posterior centrifugación de 10 a 15 mL de orina, seguida de la observación directa de la morfología de los huevos del parásito (Figura 2.1) por microscopía óptica (Pedrassani, 2009).

Los huevos de *D. renale* presentan características morfológicas distintivas: son elípticos, de color claro, pardo o amarillo, con una cáscara gruesa y rugosa, y polos simétricos bien definidos. Su tamaño oscila entre 73 y 83 μm de largo por 45 a 47 μm de ancho, que los diferencian de otras especies de nematodos (Pedrassani et al., 2015; Perera et al., 2017). Al momento de ser eliminados con la orina, generalmente contienen una o dos células producto de la primera división del cigoto (Pedrassani, 2009).



Figura 2.1. Huevo no embrionado de *Dioctophyme renale*. Se observa su forma ovalada, el engrosamiento polar característico, la superficie rugosa y las dos células resultantes de la primera división del cigoto. Imagen provista por Florencia Facelli (INALI, UNL-CONICET).

La especificidad de esta técnica se basa en que solo tres formas parasitarias pueden encontrarse en la orina: microfilarias de *Dirofilaria immitis*, huevos de *Capillaria plica* y *D. renale*. De estas especies, únicamente *C. plica* y *D. renale* infectan el sistema urinario. A diferencia de *D. renale*, *C. plica* se localiza en la vejiga y sus huevos, más pequeños ($50\text{--}68 \times 22\text{--}32 \mu\text{m}$), son incoloros y de forma de barril (Carra Perera et al., 2021). La recolección de orina por micción espontánea es un método no invasivo, pero puede no proveer el volumen necesario para el análisis y presenta mayor riesgo de contaminación. En cambio, el cateterismo y la cistocentesis (punción vesical) suelen ofrecer mejores resultados, aunque son procedimientos más invasivos y requieren personal capacitado (Feldman y Sink, 2004; Rahal et al., 2014). Dado el riesgo de proliferación microbiana, las muestras deben refrigerarse y analizarse dentro de las 1–2 h posteriores a la recolección (Sink y Weinstein, 2012). Una limitación importante de este método es que sólo permite detectar la infección cuando hay hembras maduras en el riñón, ya que son las únicas capaces de liberar huevos en la orina de forma continua. Si el riñón contiene un macho, una hembra inmadura o muerta, la infección puede no ser detectada. Además, se han documentado múltiples casos de localización ectópica, especialmente en Sudamérica, lo que puede dar lugar a falsos negativos en el análisis urinario (Radman et al., 2017). Por ello, el examen por imágenes, en particular la ecografía, se utiliza de forma complementaria en la clínica veterinaria. Este método permite identificar parásitos adultos independientemente de su sexo o estado de madurez, tanto en el riñón como en ubicaciones ectópicas. No obstante, en infecciones incipientes el parásito puede no diferenciarse claramente o ser confundido con estructuras anatómicas, generando errores diagnósticos (Acha y Szyfres, 2003).

En numerosos casos, la infección se diagnostica por el hallazgo incidental de adultos durante procedimientos quirúrgicos o en necropsias, especialmente en animales asintomáticos o en fauna silvestre (Cansi et al., 2012; Silveira et al., 2015). Otra herramienta diagnóstica es el estudio histopatológico, útil en hospedadores paraténicos o en casos de enquistamiento. En cortes teñidos de enquistaciones que pueden encontrarse en tejido subcutáneo en distintas cavidades, pueden identificarse secciones transversales de larvas, adultos o huevos de *D. renale*, rodeados de una respuesta granulomatosa característica (Mascarenhas et al., 2019; Mascarenhas y Müller, 2015). Finalmente, el diagnóstico molecular puede emplearse como herramienta confirmatoria una vez extraídos el parásito adulto, huevos o larvas. Dado el conocimiento genético aún limitado sobre *Dioctophyme renale*, las aplicaciones moleculares se restringen a la amplificación por PCR y posterior secuenciación del gen nuclear de la subunidad menor del ribosoma (18S ARNr) y del gen mitocondrial de la subunidad 1 del citocromo c oxidasa (COX1) (Khullar et al., 2022). Este enfoque requiere disponer de material parasitario y resulta especialmente útil cuando la degradación del espécimen impide una identificación morfológica confiable, como sucede con frecuencia en necropsias. El desarrollo y aplicación de marcadores moleculares para la identificación del parásito ha sido abordado en profundidad en la Parte I del presente trabajo. La utilidad diagnóstica de marcadores genéticos ha sido respaldada por múltiples estudios realizados en distintas regiones geográficas y contextos epidemiológicos (Butti et al., 2019; Eslahi et al., 2021; Facelli Fernández et al., 2024; Gomez-Puerta et al., 2021; Tanaka et al., 2020; Tokiwa et al., 2014).

Tabla 2.1. Comparación de los principales métodos diagnósticos utilizados para la detección de *Diectophyme renale* en perros, incluyendo sus ventajas y limitaciones en función de la especificidad, sensibilidad, requerimientos técnicos y aplicabilidad en distintas condiciones clínicas y post mortem.

Método	Ventajas	Desventajas
Análisis de sedimento urinario	- No invasivo. - Específico. - Bajo costo. - No requiere personal altamente especializado.	- Baja sensibilidad. - No permite conservar la muestra por períodos prolongados. - Requiere la presencia de una hembra adulta viva en el riñón.
Ultrasonido	- No invasivo. - Permite detectar adultos, independientemente del sexo. - Bajo costo. - Útil para localizar infecciones en sitios ectópicos.	- No específico: puede confundirse con otros nemátodos adultos o con estructuras anatómicas. - Requiere personal capacitado. - Depende de la presencia de parásitos adultos.
Histopatología	- Alta especificidad. - Permite detectar larvas, adultos y formas enquistadas. - Útil para el estudio de múltiples organismos. - Aplicable a material de necropsia. - Las muestras pueden conservarse en formol.	- Procedimiento invasivo (requiere biopsia). - Necesita laboratorio y personal especializado. - Los resultados no se obtienen de forma inmediata.
Diagnóstico molecular	- Alta especificidad. - Permite identificar cualquier estadio del parásito (huevo, larva, adulto; macho o hembra). - Posibilita establecer relaciones filogenéticas entre muestras. - Las muestras pueden conservarse en etanol al 70% v/v.	- Requiere la obtención del parásito aislado del hospedador (generalmente mediante cirugía). - Necesita infraestructura molecular y personal calificado. - Resultados diferidos en el tiempo.

Potencial Serodiagnóstico

Aunque existen antecedentes experimentales, actualmente no se dispone de una prueba serológica estandarizada y ampliamente difundida para la detección de anticuerpos anti-*D. renale* en suero de hospedadores infectados. El desarrollo de una herramienta serológica específica permitiría diagnosticar esta parasitosis de manera rápida, sensible, precisa y a bajo costo, sin necesidad de equipamiento especializado ni procedimientos invasivos.

Al requerir únicamente una muestra de suero, este tipo de abordaje elimina la necesidad de la presencia de adultos del parásito, lo cual representa una ventaja sustancial frente a métodos convencionales. Además, podría facilitar el diagnóstico en estadios tempranos de la infección, antes del desarrollo completo del helminto y la

aparición de signos clínicos severos, contribuyendo a evitar procedimientos quirúrgicos mayores como laparotomías exploratorias o nefrectomías. Este aspecto adquiere particular relevancia en regiones con alta prevalencia e intensidad parasitaria, como se ha documentado en la fauna silvestre del litoral (Arce et al., 2024; Eiras et al., 2021; Facelli Fernández et al., 2024).

El primer estudio orientado al desarrollo de un diagnóstico serológico en caninos fue realizado por Pedrassani et al. (2015). El ensayo consistió en una prueba de inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA), en la que se empleó como antígeno un homogenato de proteínas solubles obtenidas del esófago de *D. renale*. Los sueros utilizados como anticuerpo primario provenían de perros previamente clasificados como positivos o negativos mediante análisis de sedimento urinario. Como anticuerpo secundario se utilizó IgG anti-perro conjugada con peroxidasa, y la detección se realizó mediante lectura de absorbancia a 490 nm utilizando o-fenilendiamina como sustrato cromogénico. Los resultados revelaron una clara diferenciación en la respuesta entre sueros infectados y no infectados (Figura 2.2), y el test mostró un desempeño diagnóstico prometedor: sensibilidad del 93,8 %, especificidad del 92,3 %, exactitud del 93,6 % y un índice kappa de Cohen de 0,76, lo que indica una concordancia sustancial con el diagnóstico basado en uroanálisis.

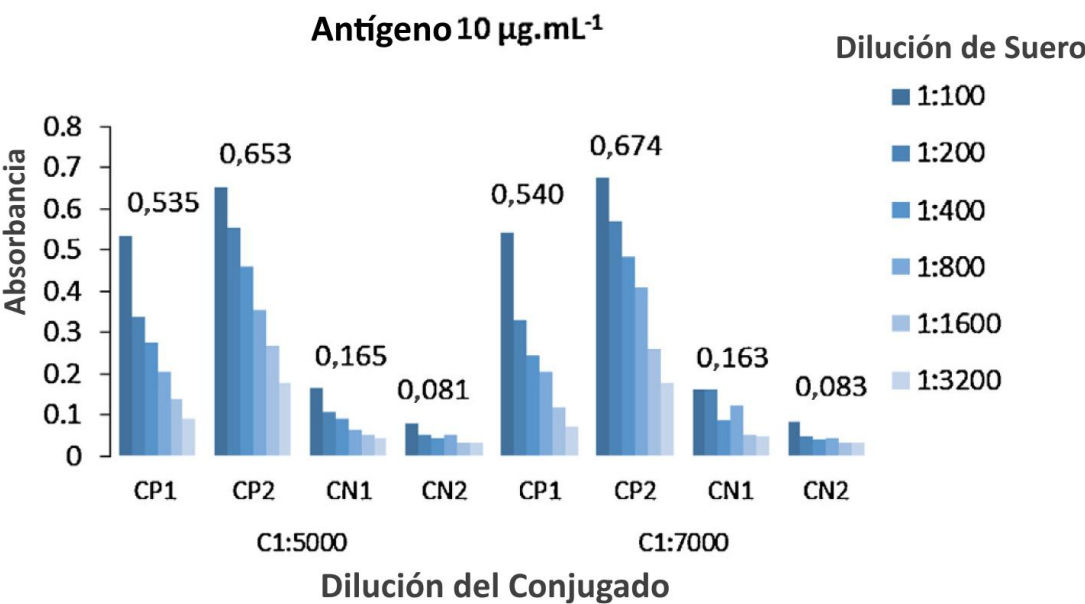


Figura 2.2. Modificado de Pedrassani et al. 2015. Absorbancia de las muestras de suero positivas y negativas para *Diocotophyme renale* en las diferentes diluciones, en función de la concentración del antígeno soluble y de la dilución del conjugado.

Posteriormente, De Almeida Capella et al. (2022) desarrollaron un segundo inmunoensayo utilizando como antígeno el líquido de excreción/secreción (LES) de *D. renale*. Este término hace referencia al conjunto de moléculas liberadas activamente por el parásito hacia su entorno inmediato, el cual, en el caso de los helmintos parásitos, corresponde al medio interno del hospedador. Al constituir la interfaz primaria entre el parásito y su hospedador, el LES representa una fuente relevante de antígenos capaces de inducir una respuesta inmune específica (Lightowlers y Rickard, 1988). El ensayo serológico desarrollado empleó sueros de perros infectados y no infectados, y demostró aún mayor desempeño diagnóstico que el homogenato de esófago, con una especificidad del 100 % y una sensibilidad del 97,4 %. Estos resultados indican que el LES constituye un candidato

altamente promisorio para el desarrollo de herramientas serológicas destinadas al diagnóstico de la dioctofimosis (Figura 2.3).

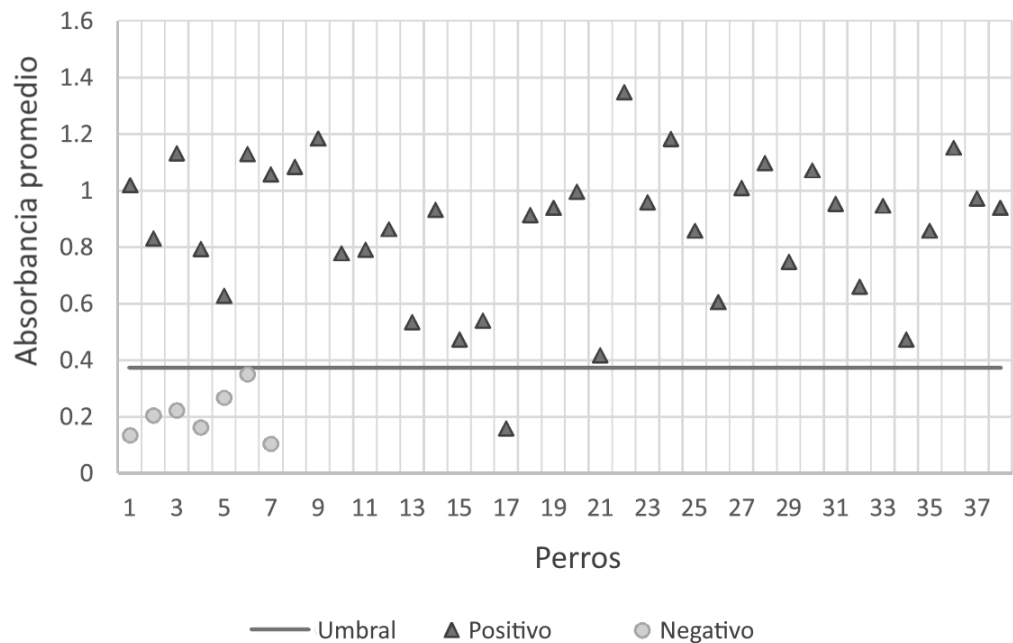


Figura 2.3. Modificado de Capella et al. (2022). Absorbancia ELISA indirecta media de los sueros de los perros positivos para *Dioctophyme renale* a una concentración de 1/400, antígeno LES a una concentración de 1 µg/100 µL, y el conjugado 1/25000.

Estudios posteriores, como el de De Almeida Capella et al. (2024), compararon distintos métodos diagnósticos, incluyendo ecografía, análisis de orina y la técnica de ELISA indirecto basada en el antígeno LES. Los resultados mostraron que el ELISA indirecto permitió diagnosticar infecciones por *D. renale* en perros, incluso en aquellos casos en los que los parásitos se encontraban exclusivamente en la cavidad abdominal, con una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 97,4 %. En comparación, el análisis de orina mostró una sensibilidad inferior (81,6 %). El diagnóstico conjunto mediante ecografía y orina también presentó casos de falsos negativos, especialmente en infecciones por parásitos inmaduros, localizaciones ectópicas como el testículo, o cuando los órganos aún no mostraban alteraciones visibles. Por lo tanto, se sugiere que el ELISA constituye una herramienta diagnóstica temprana más efectiva, con alto potencial para su aplicación clínica y para estudios epidemiológicos.

Estos avances sientan las bases para el desarrollo de una prueba serológica con aplicabilidad clínica. No obstante, las proteínas específicas responsables de las respuestas inmunes diferenciales aún no han sido identificadas. Además, la obtención de homogenatos esofágicos o de LES implica un procedimiento laborioso, dependiente de la recuperación de ejemplares adultos viables, lo que limita su implementación en la práctica veterinaria. Esta dificultad se ve acentuada por la imposibilidad de mantener *D. renale* en cultivo *in vitro* debido a la complejidad de su ciclo de vida, caracterizado por múltiples fases y distintos hospedadores, y por el desconocimiento del hospedador intermediario en muchas regiones. La identificación de secuencias peptídicas inmunorreactivas permitiría su producción mediante expresión recombinante, abriendo la posibilidad de generar antígenos estandarizados a gran escala para el desarrollo de pruebas serológicas robustas. En este sentido, disponer de herramientas diagnósticas serológicas más eficientes y fácilmente escalables permitiría mejorar la detección de

casos en contextos clínicos y contribuir al control de esta zoonosis, con beneficios concretos para la salud animal y pública.

Perfil Proteico de Esófago y Respuesta Antigénica

A partir de estos antecedentes, en el Laboratorio de Biofísica y Biología Celular de Proteínas que Unen Lípidos (INIBIOLP) se realizaron estudios preliminares orientados a identificar las proteínas específicas del esófago de *D. renale*, involucradas en la respuesta inmunológica diferencial observada en perros infectados.

Inicialmente, estos trabajos utilizaron muestras de esófago obtenidas de parásitos adultos disecados durante procedimientos quirúrgicos veterinarios. A partir de estos tejidos se elaboró un homogenato proteico, que fue analizado mediante la técnica de Western Blot. En este procedimiento, las proteínas del esófago fueron expuestas a sueros provenientes de perros infectados (S+) y no infectados (S-), actuando estos sueros como anticuerpos primarios, mientras que como anticuerpo secundario se utilizó IgG Anti-perro conjugado. El ensayo reveló un patrón específico de bandas con pesos moleculares entre 25 y 37 kDa exclusivamente en presencia del suero de perros infectados (S+), ausente en los sueros negativos (S-) (Figura 2.4). Estas bandas se postularon como candidatas a corresponder a las proteínas implicadas en la respuesta inmunológica diferencial previamente reportada por Pedrassani et al. (2015).

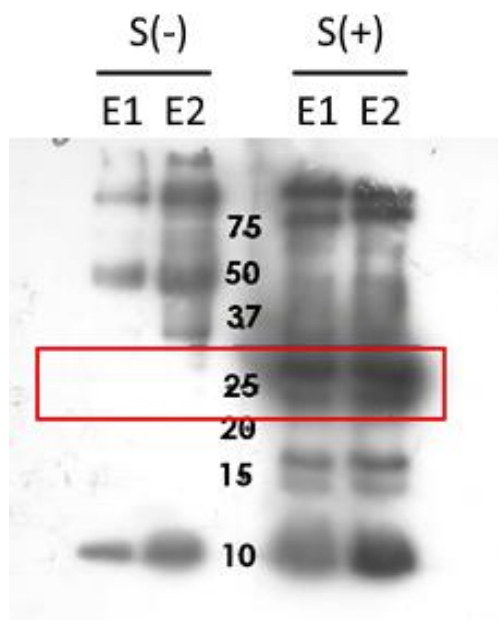


Figura 2.4. Imagen de Western Blot donde homogenatos de proteínas de dos esófagos (E1 y E2) fueron expuestos a sueros de perros con infección confirmada S(+) y no infectados S(-) y revelados por anticuerpo secundario Anti IgG canina.

Con el propósito de identificar las proteínas que podrían corresponder a las bandas observadas y ser responsables de la respuesta inmunológica diferencial, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) del homogenato proteico esofágico. El segmento del gel comprendido entre 25 y 37 kDa fue extraído y enviado al Servicio de Proteómica del Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa (CEQUIBIEM). Allí se realizó un análisis proteómico mediante espectrometría de masas, utilizando como base la información del genoma de *D. renale* v1 (Maldonado et al., en preparación), que fue provisto por el laboratorio donde se desarrolló la Parte I del presente plan de tesis. Como resultado, se obtuvieron datos detallados sobre los péptidos identificados, incluyendo sus características y parámetros estadísticos de coincidencia.

Al iniciar el presente plan de tesis se contaba con estos resultados previos del perfil proteico esofágico, que permiten sugerir posibles proteínas candidatas implicadas en la respuesta inmunológica diferencial. Hasta el momento no se ha explorado ni caracterizado el perfil proteico del LES, material que podría ser igualmente relevante para la identificación de marcadores antigénicos útiles en el diagnóstico serológico de la infección por *D. renale*. Esta tesis tiene como objetivo ampliar estos antecedentes y profundizar en el conocimiento de dicho material biológico para desarrollar marcadores proteicos específicos.

Objetivos

Objetivo general: Identificar y evaluar marcadores proteicos candidatos para el diagnóstico de la infección por *D. renale*.

Objetivos específicos:

- Caracterizar el perfil proteico de líquido de excreción/secreción (LES) de *D. renale*.
- Identificar proteínas candidatas a diagnóstico en los proteomas del LES y del esófago de *D. renale*.
- Clonar, expresar y evaluar la reactividad inmunológica de las proteínas seleccionadas frente a sueros de perros infectados (S+) y no infectados (S-).

Hipótesis: La gruesa cutícula de los nematodos limita considerablemente la exposición de sus proteínas al sistema inmune del hospedador. Por lo tanto, el líquido de excreción/secreción y el esófago, al estar en contacto directo con el medio interno del hospedador, constituyen los principales tejidos expuestos al reconocimiento inmunológico (Pedrassani et al., 2015; Capella et al., 2022). En particular, se propone que el LES de *D. renale* contiene proteínas específicas que desencadenan respuestas inmunes diferenciales en perros infectados, permitiendo discriminar claramente entre individuos infectados y no infectados, lo que posibilitaría aislar marcadores proteicos útiles para el diagnóstico serológico de la infección.

Metodología

Perfil proteico Líquido de Excreción/Secreción

Obtención de Líquido de Excreción/Secreción

El LES comprende el conjunto de fluidos liberados por el parásito al medio externo, utilizando diversas vías. Las proteínas contenidas en este líquido entran en contacto directo con el medio interno del hospedador, convirtiéndolas en potenciales inductores de respuesta inmune. Con el propósito de explorar este grupo de proteínas, ejemplares adultos vivos de *D. renale* fueron incubados individualmente en botellas de 500 mL conteniendo medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, cat. R6504) enriquecido con glucosa 25 mM, durante períodos de 48 o 96 h. Finalizada la incubación, los individuos fueron retirados y eutanasiados, mientras que el medio de cultivo conteniendo el LES fue conservado a -20 °C hasta su posterior análisis. El detalle del sexo de los ejemplares y del tiempo específico de incubación se resume en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Incubación de adultos de *D. renale* en medio RPMI para obtención de proteínas del LES.



ID	Sexo del individuo	Tiempo de Incubación (hs)	Fecha de Extracción
1	Macho	48	13/08/22
2	Hembra	48	13/08/22
3	Hembra	96	10/08/22
4	Hembra	96	05/09/22
5	Macho	96	05/09/22

Concentración de Proteínas de LES

Las cinco botellas de 500 mL con medio RPMI, en las que se habían incubado los ejemplares vivos de *D. renale*, fueron procesadas para concentrar las proteínas presentes en el LES. Para ello, se utilizaron unidades filtrantes Amicon® Ultra (Merck Millipore) de 15 mL con un umbral de corte molecular de 3.000 Da (MWCO). Cada solución fue centrifugada en tandas sucesivas a 3.000 xg durante 15 min. En cada ciclo, la fracción no retenida fue colectada en tubos Falcon de 50 mL, mientras que el volumen retenido en la unidad de filtración se mantuvo y se le añadió una nueva alícuota de LES hasta procesar completamente el contenido de cada botella. Finalizado el procedimiento, los concentrados retenidos fueron almacenados en tubos Eppendorf de 1,5 mL a -20 °C. Las fracciones no retenidas también fueron conservadas a -20 °C para su eventual reutilización o análisis posterior (Figura 2.5).

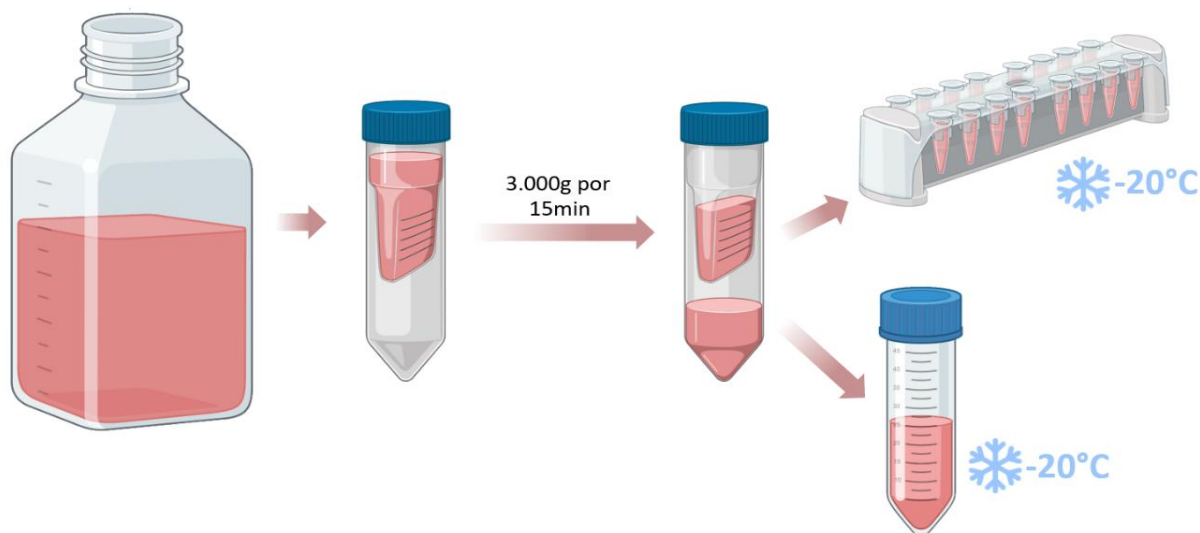


Figura 2.5. Esquema del procedimiento empleado para la obtención y concentración de proteínas del LES de *Diectophyme renale*, mediante centrifugación sucesiva.

La concentración de proteínas en los concentrados de LES obtenidos en cada experimento fue determinada mediante un ensayo colorimétrico con ácido bicinónico (BCA), utilizando el kit Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la construcción de la curva de calibración, se prepararon soluciones estándar de albúmina sérica bovina (BSA) con las concentraciones indicadas en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Estándares de BSA ara curva de calibración.

Curva de calibración	
Vial	[BSA] ug/mL
A	250
B	125
C	50
D	25
E	5
F	0 (Blanco)

Electroforesis de Proteínas de LES mediante SDS Page

Con el objetivo de visualizar el perfil proteico del material concentrado a partir de cada botella, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes, utilizando el método SDS-PAGE descrito por Laemmli (1970). Las soluciones necesarias para la preparación del gel fueron elaboradas conforme a las proporciones detalladas en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Soluciones utilizadas para la realización de las electroforesis de proteínas mediante SDS-PAGE. En todos los casos, se empleó agua purificada mediante sistema Milli-Q como solvente.

Soluciones	Componentes	Concentraciones Finales
Separador Buffer 4X (pH 8,8)	Tris base	1,4 M
	SDS	0,4 %
Concentrador Buffer 4X (pH 6,8)	Tris base	0,5 M
	SDS	0,4 %
Laemmli Buffer 10X (pH 8,3)	Tris base	3 % m/v
	Glicina	14,4 % m/v
Buffer de Corrida 1X	Laemmli buffer	1X
	SDS	0,1 %
Acrilamida-Bisacrilamida	Acrilamida	30 % m/v
	Bisacrilamida	0,8 % m/v
Persulfato de Amonio (APS)	Persulfato de Amonio	10 % m/v
TEMED BioBasic Canada	-	Ultrapuro
Buffer de Carga 5X	Tris	3,8 % m/v
	Glicerol	50 % v/v
	SDS	1 % m/v
	Beta-mercaptoetanol	25 % v/v
	Azul de Bromofenol	0,01 % m/v
Solución de Coomasie R250	Coomasie R250	0,1 % m/v
	Metanol	42 % v/v
	Ácido acético glacial	17 % v/v
Solución de Decolorante	Etanol	10 % v/v
	Ácido acético glacial	10 % v/v

Los geles utilizados para la resolución del perfil proteico fueron preparados con una concentración del 15 % de acrilamida/bisacrilamida (gel separador). Durante la corrida electroforética, este gel fue precedido por una capa de aproximadamente 1 cm de un gel al 4 % de Acril/Bis (gel apilador o concentrador), cuya función es concentrar las proteínas favoreciendo que ingresen a la vez en el gel separador. La preparación de ambos geles se realizó según las proporciones detalladas en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5. Composición en volumen de los geles utilizados para la electroforesis de proteínas mediante SDS-PAGE.

	Resolving Gel 15 %	Stacking Gel 4 %
Acril/Bis (mL)	2,5	0,325
Resolving o Stacking Buffer (mL)	1,25	0,625
H2O MiliQ (mL)	1,25	1,5
APS (uL)	50	25
TEMED (uL)	4	2,5

Se cargaron 4 µg de proteína por carril, según lo estimado a partir del ensayo de cuantificación BCA, en un volumen final de 15 µL. Como referencia de peso molecular se utilizó el marcador “Low Molecular Weight” de GE

Healthcare. La electroforesis se realizó a 80 V durante 30 min para permitir el recorrido por el gel concentrador, y luego a 120 V durante aproximadamente una hora, hasta que el frente de corrida alcanzó el extremo inferior del gel separador. Una vez finalizada la corrida, el gel fue transferido a un recipiente adecuado y teñido en agitación continua durante la noche (overnight) con 10 mL de solución de Coomassie R-250. Posteriormente, se procedió a la decoloración mediante agitación con 10 mL de solución de destinción durante 3 h o hasta que las bandas proteicas fueran claramente visibles.

Western Blot de LES con S(+) y S(-)

En el estudio de Capella et al. (2022) se evidenció una reactividad inmunológica diferencial al exponer proteínas del LES de *D. renale* a sueros de perros infectados (S+) y no infectados (S-). Con el objetivo de determinar con mayor precisión en qué rango de pesos moleculares se manifiesta dicha reactividad, se realizó un ensayo de Western Blot utilizando sueros S(+) y S(-) como anticuerpos primarios. Las soluciones junto con sus concentraciones finales empleadas en este procedimiento se detallan en la Tabla 2.6. Este enfoque metodológico replicó el procedimiento aplicado previamente para muestras de esófago del parásito, tal como se describe en la introducción de la Parte II de la presente tesis.

Tabla 2.6. Soluciones utilizadas en los experimentos de Western Blot. La solución de bloqueo y las soluciones correspondientes a los anticuerpos fueron preparadas utilizando PBS-Tween como solvente.

Soluciones	Componentes	Concentraciones Finales
Buffer de Transferencia	Laemmli Buffer	10 % v/v
	Metanol	20 % v/v
PBS 10X pH 7,4	NaCl	8 % m/v
	KCl	0,2 % m/v
	Na ₂ HPO ₄	1,44 % m/v
	KH ₂ PO ₄	2,4 % m/v
PBS-Tween	PBS	1X
	Tween-20	0,1 % v/v
Solución de Bloqueo	Leche en polvo “La Serenísima”	5 % m/v
Solución de Anticuerpo Primario	BSA	1 % m/v
	S(+) o S(-)	1:10.000
Solución de Anticuerpo Secundario	BSA	1 % m/v
	Antidog IgG (SIGMA)	1:10.000

Anticuerpo primario (Ant1): Se utilizaron sueros de perro obtenidos durante extracciones veterinarias en la ciudad de La Plata. Tanto de perros infectados con *D. renale* S(+) como de perros no infectados S(-). Almacenados a -20 °C.

Anticuerpo secundario (Ant2): Se utilizó una IgG anti-perro conjugada con peroxidasa de rábano picante (*Armoracia rusticana*) Rabbit Anti-Dog IgG-HRP A9042 Sigma-Aldrich.

Para realizar el experimento en paralelo con sueros S(+) y S(-), se prepararon dos geles de acrilamida/bisacrilamida (Acril/Bis) y se llevó a cabo la electroforesis SDS-PAGE conforme a las condiciones descritas anteriormente. Como marcador de peso molecular se utilizó el estándar Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope® (Bio-Rad, cat. 1610375). Como control positivo se sembró líquido pseudocelómico de *D. renale*, cuya reactividad previa con suero positivo había sido confirmada (Giorello, 2023).

Para la transferencia, se utilizó una membrana de PVDF de 8 × 6 cm (correspondiente al tamaño del gel separador), la cual fue activada previamente con metanol durante un minuto. Luego se colocó en contacto directo con el gel y se efectuó la transferencia electroforética utilizando el equipo Mini-Protean 2® (Bio-Rad) a 100 V durante una hora (Figura 2.6).

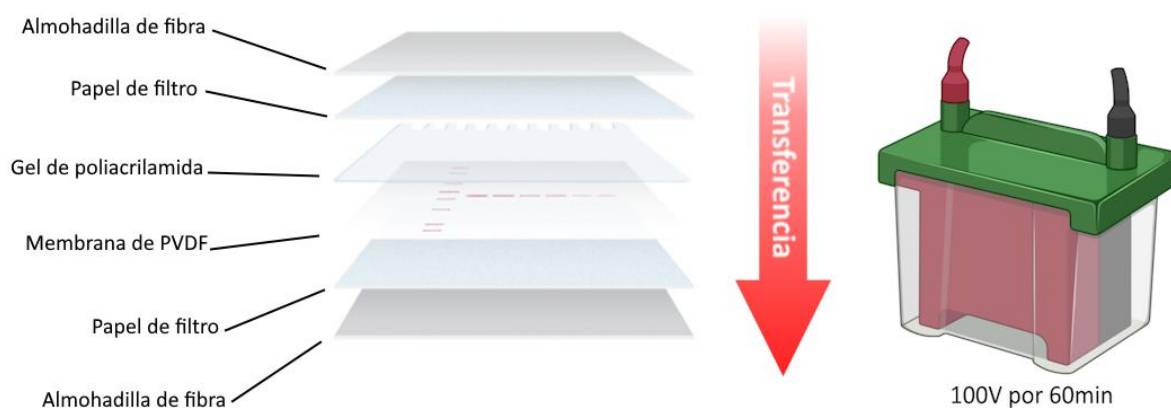


Figura 2.6. Esquemización del armado del casete de transferencia y ejecución del proceso de blotting, adaptado de Bio-Rad *The Ultimate Western Blotting Guide*.

La membrana fue incubada en solución de bloqueo a temperatura ambiente durante una hora. Luego, se realizaron tres lavados consecutivos con PBS-Tween, de 10 min cada uno. A continuación, se incubó con Ant1 a 4 °C durante la noche (overnight) bajo agitación constante. Finalizada esta etapa, se repitieron los lavados con PBS-Tween y se incubó con Ant2 a temperatura ambiente durante una hora. Finalmente, se realizaron tres lavados adicionales con PBS-Tween. Para verificar la eficiencia de la transferencia, el gel fue teñido en solución de Coomassie R-250 durante la noche.

El revelado de las membranas se realizó utilizando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal™ West Pico (Thermo Scientific, Cat. B2160636). Para cada membrana se preparó 1 mL de solución de trabajo mediante la mezcla en partes iguales de solución de peróxido estable y solución de luminol. Al entrar en contacto con la membrana, la peroxidasa conjugada al Ant2 cataliza la oxidación del luminol en presencia del peróxido, generando emisión de luz azul (425 nm). La detección se llevó a cabo mediante exposición de la membrana a una placa radiográfica durante 10 y 15 s, y luego a 1 y 5 min, en cuarto oscuro. Alternativamente, se empleó un sistema de adquisición de imágenes Chemidoc (Bio-Rad).

Proteómica del líquido de excreción/secreción (LES)

La aplicación de tecnologías de espectrometría de masas, junto con el avance de algoritmos bioinformáticos capaces de interpretar los espectros generados, permite realizar la identificación de proteínas en muestras complejas con un alto grado de sensibilidad y especificidad. En este contexto, conocer el proteoma del LES de *D. renale* resulta clave para identificar qué proteínas, de entre las predichas por el genoma, podrían estar involucradas en la respuesta inmunológica diferencial observada frente a sueros de perros infectados. Para ello, se enviaron muestras al Servicio de Proteómica de la Unidad de Espectrometría de Masas del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR, CONICET; <https://ibr-conicet.gov.ar/unidad-de-espectrometria-de-masa/>).

Preparación de la muestra

Según los requerimientos del servicio, las muestras fueron sembradas en un gel de poliacrilamida al 12 % con espesor de 0,75 mm. Se cargaron 30 µg de proteína total por muestra, dejando una calle vacía entre carriles contiguos, en la que solo se colocó buffer de carga 1X. Tanto el buffer de carga como el de corrida, y todas las soluciones utilizadas, fueron preparadas específicamente para este procedimiento, garantizando su integridad y evitando contaminaciones cruzadas.

La electroforesis se realizó a corriente constante (20 mA) hasta que el frente de corrida ingresó aproximadamente 1 cm en el gel separador, con el objetivo de recuperar el conjunto total de proteínas (pool). En paralelo, se realizaron corridas completas hasta que el frente de corrida alcanzó el extremo inferior del gel, lo que permitió visualizar bandas correspondientes a distintos pesos moleculares. De una muestra representativa se seleccionaron tres bandas, denominadas “a”, “b” y “c” de mayor a menor peso molecular (Figura 2.7), para su análisis por separado.

Luego de la corrida, el gel fue transferido a una caja acrílica nueva, enjuagado con agua destilada e incubado durante 45 min con solución de fijación (30 % v/v metanol y 10 % v/v ácido acético en agua) bajo agitación. Se realizaron cuatro lavados consecutivos con agua destilada (10 min cada uno), y posteriormente se incubó con solución de Coomassie coloidal bajo agitación, deteniendo el proceso al momento de visualizar las bandas evitando el sobreteñido.

Las bandas seleccionadas fueron recortadas con bisturíes nuevos, utilizándose uno diferente para cada corte. Los fragmentos fueron trozados en pequeños pedazos, dispuestos en el fondo de tubos Eppendorf sin apilamiento vertical y conservados a -20 °C hasta su envío al servicio de espectrometría de masas.

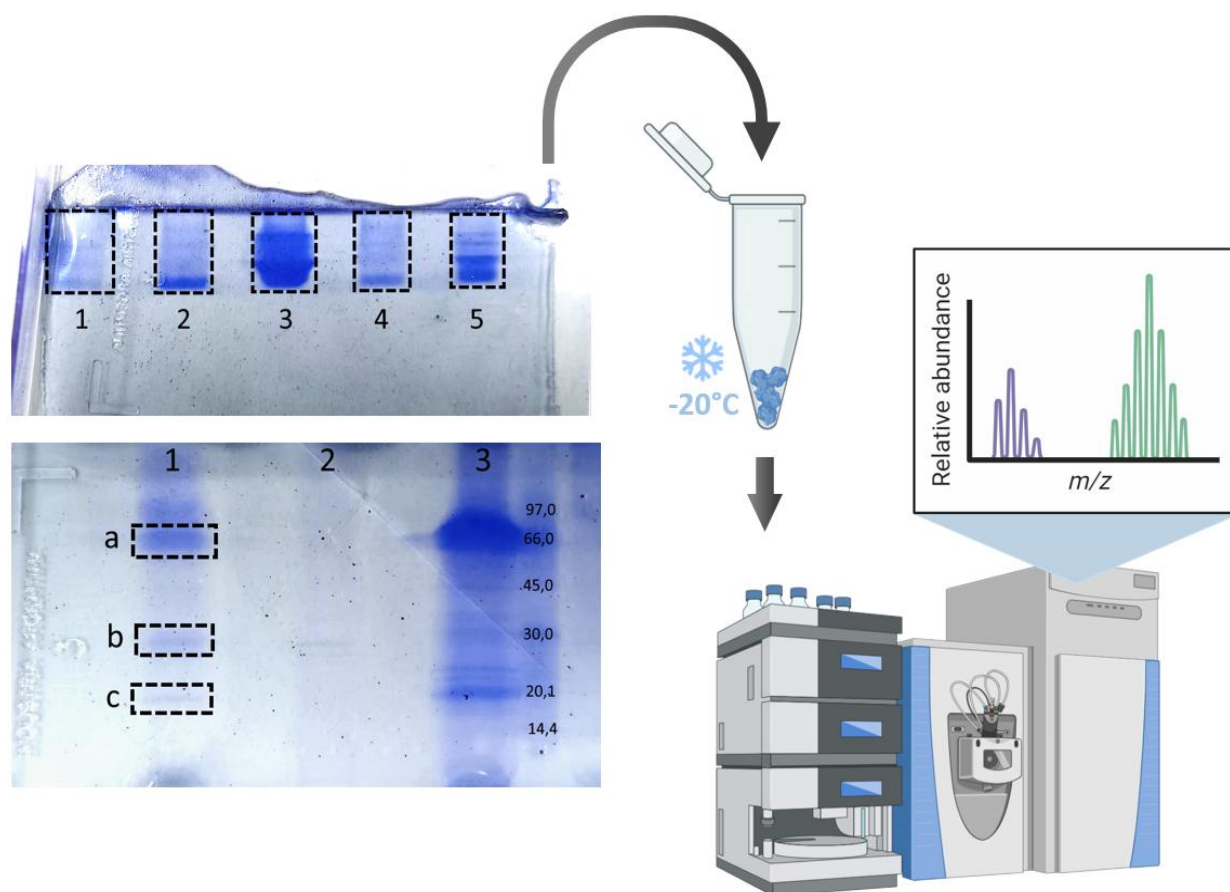


Figura 2.7. Esquema general del procedimiento de preparación de las muestras y su envío para análisis proteómico. Las muestras 1, 2, 3, 4 y 5 corresponden a concentrados de LES obtenidos de ejemplares adultos distintos de *Diectophyme renale*. Las bandas etiquetadas como “a”, “b” y “c” fueron seleccionadas a partir de la muestra 1, y representan fracciones de distinto peso molecular.

Ensayo de Proteómica y Obtención de Resultados

El análisis fue realizado mediante digestión enzimática con tripsina, seguida de espectrometría de masas utilizando tecnología Orbitrap. De manera complementaria, se proporcionó al servicio el proteoma predicho a partir de los marcos de lectura abiertos (ORFs) del ensamblado preliminar del genoma de *D. renale*, desarrollado en colaboración por ambos laboratorios implicados en este plan de tesis.

Dicho proteoma fue utilizado para simular *in silico* la digestión con tripsina y generar espectros teóricos de los péptidos esperados. A partir de esto, el servicio comparó los espectros experimentales obtenidos con los simulados, registrando coincidencias con base en parámetros estadísticos de confianza. Como resultado, se obtuvo un listado de proteínas identificadas, acompañado de los péptidos correspondientes y las métricas estadísticas que respaldan la validez de las coincidencias entre espectros teóricos y observados.

Búsqueda de Proteínas Candidatas en Proteoma de LES y Esófago

Los datos proteómicos obtenidos a partir de muestras de esófago y de LES de *D. renale* fueron analizados de manera independiente. Para asegurar la confiabilidad de los resultados, solo se consideraron aquellas proteínas cuyos péptidos presentaron un nivel de coincidencia clasificado como “High” por el servicio de espectrometría de masas, en relación con los espectros simulados. Además, se aplicó un umbral de cobertura mínima del 30 % sobre la secuencia proteica total para incluir únicamente las identificaciones más sólidas. En función de los resultados obtenidos en los ensayos de Western Blot, las proteínas fueron también filtradas por tamaño molecular, considerando únicamente aquellas comprendidas entre 25 y 40 kDa, rango en el que se había observado reactividad diferencial con sueros positivos.

A partir de las proteínas seleccionadas, se realizó un análisis mediante BLAST, con el objetivo de identificar y descartar aquellas con alta similitud a proteínas (Pearson et al., 2013) de otras especies (filtrado por homología). Cada proteína candidata fue alineada contra cinco bases de datos de secuencias proteicas con distintos niveles de curación y cobertura taxonómica: SwissProt, WormBase Parasite y tres bases del NCBI: las secuencias de referencia RefSeq, base de datos no redundante de proteínas y una versión no-redundante filtrada por taxones del phylum Nematoda. Para garantizar la relevancia de los alineamientos, se conservaron únicamente aquellos hits que cumplieran simultáneamente con los siguientes criterios: porcentaje de identidad ≥ 30 %, cobertura del alineamiento ≥ 70 %, E-value $< 1e-3$ y score de alineamiento > 50 . Con la intención de evaluar la especificidad se realizaron comparaciones basadas en el número total de hits, la diversidad taxonómica de las especies representadas, los valores de identidad y cobertura, así como el contexto filogenético de las similitudes. Estos análisis combinados proporcionaron información robusta para la selección de proteínas con alto potencial diagnóstico y reducida probabilidad de reacción cruzada con otras especies.

Con el fin de identificar proteínas con alto potencial antigénico, se analizó su inmunogenicidad mediante dos enfoques complementarios de predicción de epítomos de linfocitos B. En primer lugar, se utilizó BepiPred 3.0 (Clifford et al., 2022), una herramienta basada en modelos de lenguaje para proteínas (*Protein Language Models*), un tipo de aprendizaje automático (*Machine Learning*) que evalúa estructura secundaria y el péptido lineal para estimar, por sitio, la probabilidad de reconocimiento por células B en función del contexto local. Para cada proteína se consideraron tres parámetros: score estructural, score para péptidos lineales y probabilidad global de antigenicidad. Como segundo enfoque, se empleó VaxiJen v2.0 (Doytchinova y Flower, 2008), un predictor de antigenicidad independiente de homología que aplica una transformación de autocorrelación cruzada (ACC) sobre propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos.

Finalmente, se consideró la presencia de cada proteína en proteomas de otros tejidos de *D. renale* descritos en la tesis de doctorado de Giorello N. A. (2023). Este criterio se incorporó con base en estudios comparativos de expresión proteica entre tejidos, en los que se observó reactividad diferencial significativa ante sueros positivos y negativos únicamente en el esófago y en el LES, pero no en otros tejidos (Pedrassani et al., 2015; Capella et al., 2022). En consecuencia, se priorizaron proteínas presentes (o más abundantemente expresadas) en esófago y LES.

Clonación y Expresión de Proteínas Seleccionadas

Para evaluar individualmente la respuesta inmunogénica frente a sueros infectados y no infectados, se procedió a expresar de forma recombinante las proteínas candidatas seleccionadas. La metodología empleada siguió el protocolo descrito por (Bélgamo et al., 2020).

Vector de Clonación y Enzimas de Restricción

El vector seleccionado para la clonación y expresión recombinante fue el pET-28a(+) (Addgene Cat. 69864-3), que contiene un promotor específico para la ARN polimerasa T7, enzima altamente eficiente y selectiva. Esta característica permite alcanzar elevados niveles de expresión, representando hasta aproximadamente el 50 % de la producción total de proteínas en la célula transformada pocas horas después de la inducción. El vector incluye además sitios de restricción para las enzimas EcoRI, BamHI y NdeI (Tabla 2.7), seleccionadas debido a la ausencia de estos sitios en los genes de las proteínas estudiadas. Asimismo, cuenta con una secuencia que codifica un motivo de histidinas (His-tag) en tándem, facilitando la posterior purificación por cromatografía de afinidad con columnas que contienen iones Ni^{2+} . Como marcador de selección, el vector posee un gen de resistencia a kanamicina, permitiendo seleccionar fácilmente las bacterias transformadas cultivadas en medio LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L, en agua) suplementado con este antibiótico (Figura 2.8).

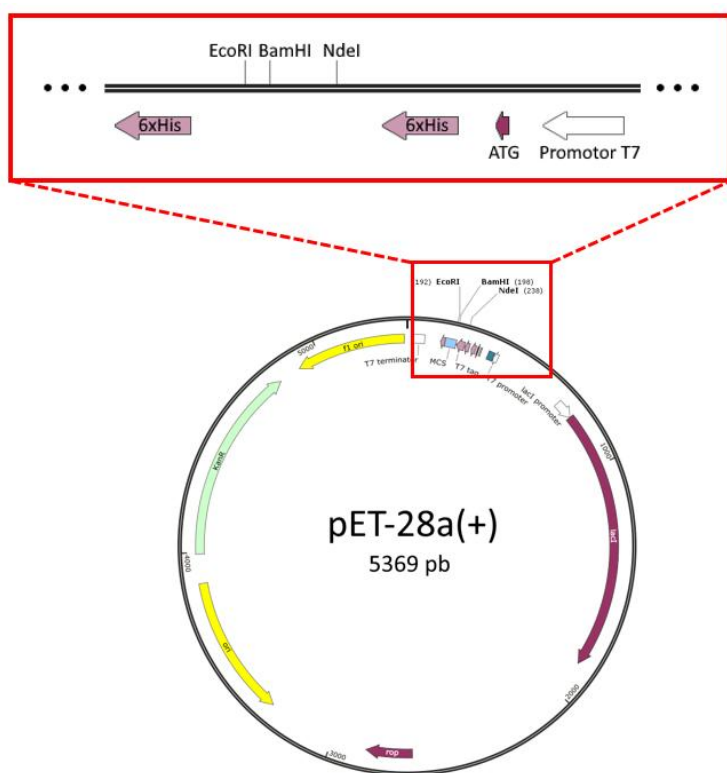


Figura 2.8. Plásmido utilizado para la clonación y expresión recombinante de las proteínas seleccionadas en el proteoma del LES y esófago. Se muestra ampliado el sitio de inserción con los sitios de corte de las enzimas, el promotor T7 de la expresión y la cola de histidina 6xHis agregada para la cromatografía de afinidad.

Tabla 2.7. Enzimas de restricción empleadas en la clonación y sus respectivos sitios de corte.

Enzima	Sitio de Corte	Extremo cohesivo
EcoRI	G↓AATT↑C	5' AATT 3'
BamHI	G↓GATC↑C	5' GATC 3'
NdeI	CA↓TA↑TG	5' TA 3'

Células Competentes para la Expresión de Proteína

La expresión de las proteínas se llevó a cabo en células competentes de la cepa recombinante *Escherichia coli* BL21 (DE3), según la descripción original de Studier y Moffatt (1986). Esta cepa expresa constitutivamente la ARN polimerasa T7, que reconoce específicamente el promotor presente en el vector pET-28a+ (Figura 2.9). La deficiencia en las proteasas Lon y OmpT característica de estas células permite altos niveles de acumulación intracelular de proteínas heterólogas, reduciendo significativamente su degradación incluso en condiciones de bajo número de copias plasmídicas. La expresión de las proteínas recombinantes se indujo mediante la adición del inductor isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

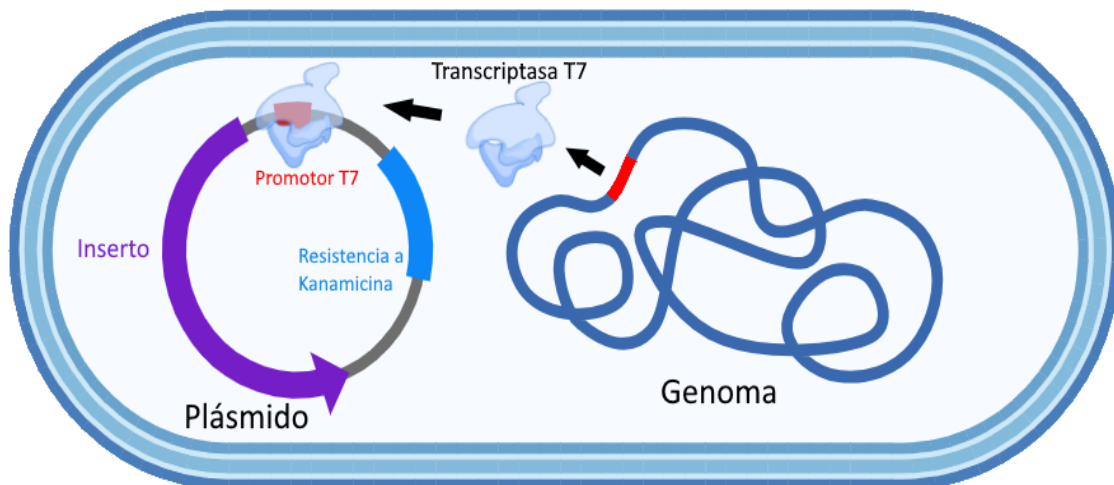


Figura 2.9. Esquema de cepa de *E. coli* BL21 transformada con pET28a+. Esta cepa presenta el gen de la Transcriptasa T7 en su genoma bajo control inducible por IPTG. La misma actúa sobre el promotor T7 del plásmido río arriba del sitio de corte de por las enzimas de restricción, por lo tanto, de la posición del inserto.

Dado que se trata de proteínas de un organismo eucariota expresadas en *E. coli*, un sistema que carece de las rutas metabólicas necesarias para realizar la mayoría de las modificaciones postraduccionales (PTMs), el mapeo de estas modificaciones puede resultar útil para identificar regiones funcionalmente relevantes en el contexto nativo y optimizar la selección de fragmentos antigénicos más estables o inmunológicamente activos. Para explorar la posible presencia de PTMs en las proteínas seleccionadas, se empleó PTMGPT2, un modelo de lenguaje entrenado sobre grandes conjuntos de secuencias proteicas y optimizado para la predicción de sitios modificables. Las secuencias de las proteínas recombinantes clonadas en este estudio fueron analizadas individualmente, identificándose regiones potencialmente susceptibles a modificaciones como fosforilación, glicosilación o ubiquitinación.

Diseño de primers para Clonación

La clonación y posterior expresión recombinante se inició con la amplificación por PCR del ADN complementario (ADNc) generado mediante retrotranscripción a partir del ARN mensajero correspondiente a cada proteína seleccionada. Los primers específicos se diseñaron basándose en los marcos abiertos de lectura (ORF) completos de cada proteína. Dado que en condiciones fisiológicas el péptido señal es escindido antes de adquirir la conformación final, y este proceso no ocurre en la expresión recombinante, se decidió excluir esta región en el diseño de los primers. La presencia y posición de péptidos señal fueron predichas utilizando el software SignalP, que emplea métodos de inferencia bayesiana y una base de datos específica para evaluar características biofísicas propias de estas secuencias.

Los primers debían amplificar específicamente el segmento de ADNc que contiene la secuencia codificante completa (sin péptido señal) y ser compatibles con los sitios de corte de enzimas de restricción del vector. Por ello, el diseño incorporó una región específica complementaria al ADNc tras el péptido señal, el sitio de restricción, y un segmento adicional que optimiza la eficiencia del corte enzimático.

Se estableció que las temperaturas de melting de los primers estuvieran entre 48 y 56 °C para garantizar una eficiente hibridación y amplificación, evitando temperaturas cercanas a la óptima para la ADN polimerasa (72 °C). Asimismo, se verificó la coincidencia de las temperaturas de melting entre los primers *forward* y *reverse*, y se descartó la formación de estructuras secundarias (horquillas) y dímeros mediante análisis con el software IDT OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Las modificaciones necesarias para optimizar estas condiciones se realizaron sobre las regiones adicionales incluidas en los extremos no codificantes de los primers (Tabla 2.8).

Tabla 2.8. Primers diseñados para la clonación de las proteínas candidatas a blanco de diagnóstico. En **rojo** se indica el sitio de corte de las enzimas, en **violeta** la secuencia que hibrida con el target y en **azul** en el segmento adicional de ADN.

Blanco	ID Primers	Secuencia
P52	Pr_52NdeI_F	5' ATACCATATG GACGATCCGAAT 3'
	Pr_52BamHI_R	5' ATTAGGATCCT CACTTGCTGGG 3'
P2454	Pr_2454NdeI_F	5' ATACCATATG TCCAAGCTGC 3'
	Pr_2454EcoRI_R	5' ATCGCAGAATTCTT ACACGATGTG 3'
P5212	Pr_5212NdeI_F	5' ATACCATATG GCTGAAAGTAAG 3'
	Pr_5212BamHI_R	5' ATTAGGATCCTC AGTTCGGTTTTG 3'
P9932	Pr_9932NdeI_F	5' ATACCATATG ACGGCGACTCC 3'
	Pr_9932BamHI_R	5' ATTAGGATCCTC AGCACTTGTCG 3'

Extracción de ARN

Las muestras de tejido esofágico de adultos de *D. renale*, obtenidas por disección, se preservaron a -20 °C en tubos Eppendorf de 2 mL con 500 µL de Trizol. La muestra fue homogeneizada y transferida a un tubo Eppendorf de 1,5 mL, centrifugada a 12.000 xg durante 10 min a 4 °C, recuperándose el sobrenadante. Posteriormente, se incubó 5 min a temperatura ambiente, se añadieron 100 µL de cloroformo y se agitó suavemente. Luego de otra incubación de 3 min a temperatura ambiente, se centrifugó nuevamente (12.000 xg, 15 min, 4 °C). El sobrenadante obtenido se mezcló con 250 µL de isopropanol y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Tras una nueva centrifugación (12.000 xg, 15 min, 4 °C), el sobrenadante fue eliminado, y el pellet resultante se lavó con 500 µL de etanol al 75 % v/v, mezclado con vortex y centrifugado (7.500 xg, 5 min, 4 °C). Finalmente, el pellet de ARN se secó completamente en un baño a 37 °C, resuspendido en 30 µL de agua libre de ARNasas e incubado a 60 °C durante 10 min. La concentración y pureza del ARN fueron determinadas con espectrofotometría en un equipo Nanodrop midiendo absorbancias a 230, 260 y 280 nm. Las muestras se conservaron a -80 °C hasta su uso.

Amplificación de transcriptos por RT-PCR

La retrotranscripción para sintetizar ADNc se realizó utilizando la retrotranscriptasa del virus de leucemia murina de Moloney (M-MLV, Promega, cat. M170A). En 20 µL de volumen final se mezclaron 1 µg de ARN, 12,3 µL de agua libre de ARNasas y 0,5 µL de primer poli-T (0,5 µg/µg de ARN). Esta mezcla se incubó a 70 °C (5 min) y luego a 4 °C (5 min). Posteriormente, se adicionaron 6,2 µL de mezcla de reacción, incluyendo inhibidor de ribonucleasas (RNase Out, Invitrogen, cat. 10777-019), incubándose a 42 °C por una hora (Tabla 2.9).

Tabla 2.9. Condiciones de reacción para la retrotranscripción con M-MLV retrotranscriptasa.

MIX Retrotranscripción	
Insumos	Concentración final de reacción
Buffer M-MLV 5X	1X
dNTPs	0,5 μ M
M-MLV Retrotranscriptasa	7 U/ μ L
RNAsa Out	1U/ μ L

La PCR para amplificar el ADNc se realizó utilizando la enzima Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, cat. M0491L), en 10 μ L de volumen final con ADNc (20-500 ng), dNTPs (0,25 mM), MgCl₂ (0,5 mM), primers específicos (1 μ M cada uno) y buffer correspondiente. Las condiciones fueron: 95 °C por 5 min, seguido por 34 ciclos (95 °C/30 s, 54 °C/30 s, 72 °C/40 s) y extensión final (72 °C/5 min). Los productos obtenidos se evaluaron en gel de agarosa al 1 %, teñidos con GelRed®, y visualizados en transiluminador UV.

MiniPreparación (MiniPrep) de Plásmido pET28a(+)

Se utilizó una cepa almacenada de bacterias *E. coli* BL21 previamente transformadas con el plásmido pET28a(+), conservadas a -80 °C en medio LB con 20 % de glicerol y kanamicina (50 μ g/mL). A partir de este stock se inoculó un cultivo en 5 mL de medio LB suplementado con kanamicina (1 μ g/mL), incubándose durante la noche a 37 °C con agitación a 180 rpm. Posteriormente, los 5 mL de cultivo se centrifugaron en tandas de 1 mL en tubos Eppendorf de 1,5 mL, descartando el sobrenadante tras cada centrifugación. La purificación del plásmido se llevó a cabo utilizando el kit comercial de Productos Biológicos (cat. SA0101), siguiendo estrictamente el protocolo proporcionado por el fabricante. La concentración y pureza del ADN plasmídico se determinaron mediante espectrofotometría a 260 y 280 nm utilizando un equipo Nanodrop.

Digestión con Enzimas de Restricción y Ligación

La digestión enzimática del vector y del inserto se realizó de forma independiente, empleando concentraciones finales de 0,25 U/ μ L para cada enzima de restricción, 35 ng/ μ L para el inserto y 5 ng/ μ L para el vector, en un volumen total de reacción de 20 μ L. Las mezclas se incubaron durante 2 h a 37 °C, seguido por un paso de inactivación térmica a 65 °C durante 20 min. Para evitar la recircularización del vector linealizado, se realizó una digestión adicional con fosfatasa alcalina FastAP® (Thermo, cat. EF0652) a una concentración final de 0,01 U/ μ L durante 10 min a 37 °C, y la enzima fue posteriormente inactivada a 75 °C por 5 min.

La reacción de ligación entre el vector tratado y el inserto se llevó a cabo utilizando ADN ligasa T4 (Promega, cat. M180A) a una concentración final de 0,03 U/ μ L, manteniendo una relación molar inserto/vector de 1:1 en un volumen total de 20 μ L. La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 3 h.

Transformación de bacterias BL21 (DE3)

Se prepararon células competentes químicamente de *E. coli* BL21 mediante un cultivo inicial nocturno de 5 mL en medio LB incubado a 37 °C con agitación a 180 rpm. Posteriormente, se inoculó un subcultivo transfiriendo 1 mL del cultivo inicial a 100 mL de medio LB, incubándose hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO600) de aproximadamente 0,3. El cultivo se centrifugó a 4000 $\times$ g durante 10 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 20 mL de CaCl₂ 100 mM, incubándose a 4 °C por 1 h. Tras repetir la centrifugación, las células se resuspendieron finalmente en 2 mL de CaCl₂ 85 mM suplementado con 15 % de glicerol, almacenándose a -80 °C hasta su uso.

Para la transformación bacteriana se mezclaron 10 μ L de cada reacción de ligación con 100 μ L de células competentes. Se incluyeron controles negativos (agua miliQ estéril) y positivos (plásmido pET28a+ vacío). Las mezclas se incubaron sobre hielo por 30 min, sometidas a choque térmico a 42 °C durante 50 s, y enfriadas nuevamente sobre hielo por 2 min para la restauración de las membranas. Luego, se añadieron 400 μ L de medio SOC (triptona 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 0,5 g/L, glucosa 20 mM), incubándose a 37 °C por 1 h para permitir la recuperación celular y optimizar la eficiencia de la transformación. Tras la incubación, se centrifugaron brevemente las muestras (12.000 $\times$ g durante 2 min), descartando 300 μ L del sobrenadante y resuspendiendo el pellet en los 100 μ L restantes. Esta suspensión se sembró sobre placas LB-agar (15 g/L de agar) suplementadas con kanamicina utilizando una espátula Drigalsky, y se incubó durante la noche a 37 °C.

De cada placa se seleccionaron 10 colonias para verificar la presencia del inserto mediante PCR. Cada colonia se transfirió con un palillo estéril a tubos con 10 μ L de agua miliQ ultrapura, se hirvió a 100 °C por 5 min, y posteriormente se utilizó como molde en la PCR. Con el mismo palillo se tocó una placa con LB agar con kanamicina y se creció la colonia ON. Los productos amplificados fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con GelRed bajo transiluminador UV.

Colonias que mostraron amplificación específica se sometieron a un screening preliminar de expresión. Se cultivaron en medio LB-kanamicina durante la noche a 37 °C con agitación. Posteriormente, se tomó una alícuota del cultivo para inducir la expresión mediante IPTG durante 2 h, evaluándose luego mediante SDS-PAGE. Las colonias con expresión diferencial fueron conservadas a -80 °C en medio LB con kanamicina y glicerol al 20 %.

Para cada colonia seleccionada, se realizó un cultivo en 5 mL de medio líquido LB-kanamicina durante la noche. Posteriormente, se llevó a cabo la purificación del plásmido utilizando el kit y la metodología detallada anteriormente en esta sección. Los plásmidos purificados fueron enviados al servicio de secuenciación Sanger de Macrogen (Corea), empleando un primer específico para el promotor T7 del vector.

Expresión de Proteínas a Gran Escala

Utilizando el software BioEdit se analizaron las secuencias recibidas por el servicio de MacroGen. Se seleccionaron las colonias que mostraron buena calidad de secuenciación y que, usando el código de traducción de invertebrados, mostraron secuencias aminoacídicas consistentes con las proteínas candidatas seleccionadas de la predicción genómica.

Desde los stocks de LB-glicerol conservados a -80 °C se inocularon cultivos preliminares (starter) en 20 mL de medio LB-kanamicina, incubándose toda la noche a 37 °C con agitación a 180 rpm. Posteriormente, 2 mL del starter fueron transferidos a cada uno de cinco frascos Erlenmeyer de 2 L, cada uno conteniendo 200 mL de medio LB-kanamicina, cultivándose a 37 °C con agitación hasta alcanzar una DO600 entre 0,6 y 0,8. La expresión proteica se indujo mediante la adición de IPTG (1M, 200 µL por matraz), manteniendo las condiciones de cultivo durante 3 h adicionales. El cultivo se centrifugó a 4000 xg durante 20 min, se descartó el sobrenadante y los pellets se resuspendieron en Buffer de Unión (Tabla 2.10), almacenándose a -80 °C.

Purificación de Proteínas por Cromatografía de Afinidad

Los pellets celulares previamente resuspendidos en Buffer de Unión fueron sometidos a lisis mediante sonicación durante 7 min, utilizando una potencia de nivel 3 en modo pulsátil, manteniéndose la muestra a 4 °C. El homogenato resultante fue centrifugado a 10.000 xg durante 40 min, separándose el sobrenadante (fracción soluble), que se transfirió a un tubo Falcon de 50 mL. El pellet, correspondiente a la fracción insoluble, fue resuspendido en Buffer PBS (ver Tabla 2.6).

Con el objetivo de purificar la proteína recombinante expresada, se realizó una cromatografía de afinidad basada en la interacción entre el motivo 6xHis del extremo de la proteína y los iones de Ni²⁺ inmovilizados en columnas de sefarosa, siguiendo el protocolo de Rey-Burusco et al. (2015). Se emplearon columnas de 1 mL de volumen, previamente almacenadas a 4 °C en etanol al 30 %. Para su activación, se lavaron con 10 volúmenes de columna (VC) de agua miliQ, seguidos por 10 VC de Buffer de Unión.

El sobrenadante fue aplicado sobre la columna, recolectando la fracción no retenida en un tubo Falcon de 50 mL. Posteriormente, se realizaron dos lavados sucesivos con 6 VC de Buffer de Lavado, cada uno colectado en tubos Falcon individuales. La elución de la proteína unida se llevó a cabo con fracciones de 2 VC de Buffer de Elución, que se recolectaron en tubos Eppendorf de 2 mL.

Para monitorear la eficiencia de cada etapa de la purificación, se tomaron 50 µL de todas las fracciones colectadas y se analizaron mediante electroforesis en gel SDS-PAGE. Se emplearon geles de 1 mm de espesor con una concentración de 15 % de acrilamida/bisacrilamida. Las fracciones restantes fueron almacenadas a -80 °C. Finalmente, la columna fue lavada con 10 VC de agua miliQ y conservada en etanol al 30 % para su reutilización. Los pasos de purificación fueron monitoreados mediante SDS-PAGE en gel de poliacrilamida.

Tabla 2.10. Soluciones utilizadas para la cromatografía de afinidad.

Soluciones	Componentes	Concentraciones Finales (mM)
Buffer de Unión	TRIS	20
	NaCl	500
	NaN ₃	1
	Imidazol	5
Buffer de Lavado	TRIS	20
	NaCl	500
	NaN ₃	1
	Imidazol	25
Buffer de Elución	TRIS	20
	NaCl	500
	NaN ₃	1
	Imidazol	250

Western Blot de las Proteínas Purificadas

Se realizaron ensayos de Western Blot (WB) con las proteínas recombinantes purificadas, utilizando sueros de perros infectados (S+) y no infectados (S-) provenientes del biobanco del laboratorio como anticuerpos primarios, y Anti-Perro-IgG como anticuerpo secundario. La metodología empleada fue la misma utilizada previamente para el análisis del líquido de excreción/secreción (LES).

En cada gel se sembraron las siguientes muestras:

- La fracción de elución en la que se detectó la presencia de la proteína recombinante, según el perfil observado en la cromatografía de afinidad.
- Muestras de LES (identificado como "5", Tabla 2.2) y de esófago (identificado como "E1") en carriles separados. Estas matrices, con respuestas inmunológicas previamente caracterizadas frente a S(+) y S(-), sirvieron como referencia para comparar la reactividad de las proteínas recombinantes.
- Suero de perro no infectado con *D. renale* (Neg2, según el código utilizado para el banco de sueros del laboratorio), utilizado como control del anticuerpo secundario Anti-IgG canino.
- Homogenato de *E. coli* BL21 transformado con el vector pET28a(+) vacío, con el fin de descartar posibles reacciones inespecíficas frente a proteínas bacterianas no recombinantes, considerando la posible exposición previa de los animales a *E. coli* ambientales.

Cada muestra fue sembrada utilizando 10 µL mezclados en una proporción 5:1 con Sample Buffer. La detección de las proteínas se realizó mediante revelado utilizando el equipo ChemiDoc Imaging System Bio Rad, Laboratories Inc.

Caracterización estructural *in silico*

Con el objetivo de generar información de base que complemente futuras caracterizaciones bioquímicas en laboratorio, se realizó un análisis estructural *in silico* de las proteínas que mostraron una respuesta diferencial frente a sueros positivos y negativos. Para ello, se utilizó el servidor AlphaFold3 (Abramson et al., 2024) para predecir la estructura tridimensional de cada proteína a partir de su secuencia de aminoácidos.

Las estructuras obtenidas fueron posteriormente analizadas mediante búsqueda Foldseek (van Kempen et al., 2024), una herramienta que convierte las coordenadas atómicas en una representación lineal compacta para realizar búsquedas en bases de datos estructurales. Esta estrategia permitió identificar posibles homólogos estructurales, incluso en casos donde no se habían detectado homologías significativas mediante búsquedas de similitud de secuencia con BLAST, dado que la estructura proteica se encuentra más conservada que la secuencia de aminoácidos.

Posteriormente, se evaluó la presencia de dominios conservados y se exploraron anotaciones funcionales asociadas (términos GO, funciones moleculares y procesos biológicos), ya sea directamente en la proteína de interés o en sus homólogos estructurales más cercanos obtenidos a partir de los resultados de Foldseek.

Resultados

Perfil Proteico Líquido de Excreción/Secreción

Se realizó la cuantificación de proteínas totales presentes en las diferentes muestras de LES. La curva de regresión obtenida, construida a partir de dos réplicas por punto de medición, presentó un coeficiente de determinación $R^2 = 0,987$ y se ajustó a la función lineal $y = 0,0013x + 0,085$ (Figura 2.10). A partir de esta ecuación se calcularon las concentraciones correspondientes a las cinco muestras concentradas de LES, cuyos valores se detallan en la Tabla 2.11.

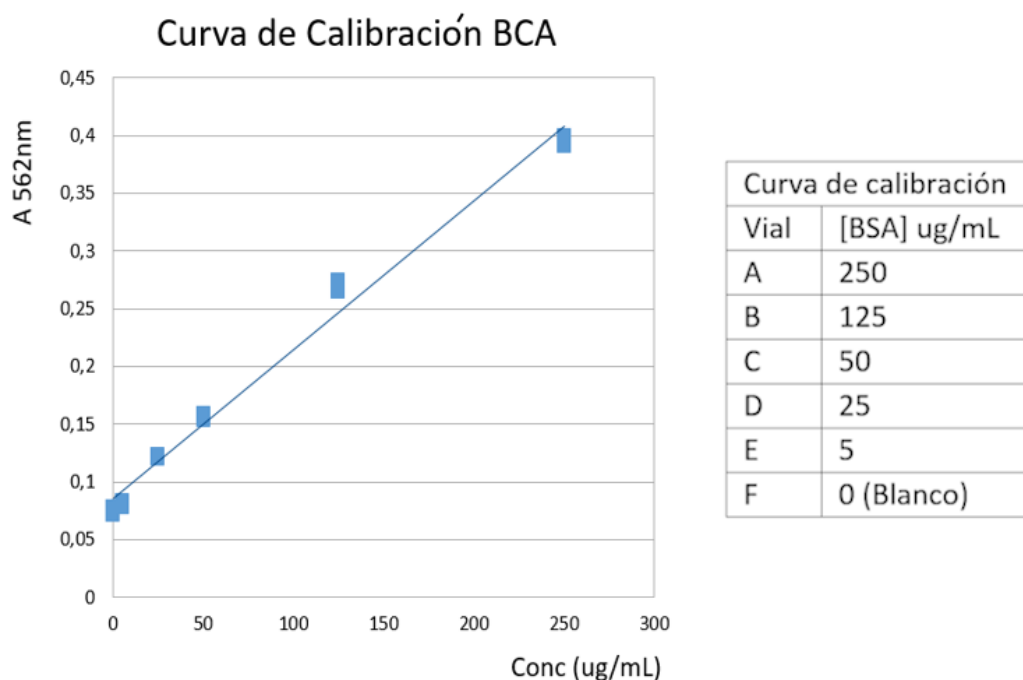


Figura 2.10. Curva de calibración obtenida para el ensayo de cuantificación de proteínas totales por método BCA.

La concentración de proteínas determinada mediante el ensayo BCA varió entre 0,8 y 1,7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ entre las distintas muestras. Para los ensayos de electroforesis se buscó sembrar 10 μg de proteína por muestra. Si bien el tamaño muestral fue limitado, no se observaron diferencias consistentes en la concentración proteica en función del sexo del parásito ni del tiempo de incubación (48 vs. 96 h).

Tabla 2.11. Concentraciones de proteínas determinadas por ensayo de BCA para cada una de las muestras de LES de *D. renale* estudiada.

ID	[Proteínas] ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Sexo del individuo	Tiempo de Incubación (hs)
1	1,72	Macho	48
2	1,24	Hembra	48
3	1,31	Hembra	96
4	0,88	Hembra	96
5	1,09	Macho	96

En el gel de SDS-PAGE, a pesar de haberse sembrado 10 μg de proteína por carril, se observó en general un bajo nivel de proteínas en todas las muestras. En todas las fracciones de LES analizadas se detectó una banda a aproximadamente 45 kDa, con mayor intensidad en las muestras 1 y 4. Estas diferencias no se correlacionan con el tiempo de incubación ni con el sexo del individuo. Además, se identificó una banda adicional de alrededor de

30 kDa, más intensa en la muestra 1 y de menor intensidad en las restantes, que coincide con la observada previamente por Capella et al. (2022) en ensayos con LES de *D. renale* (Figura 2.11).

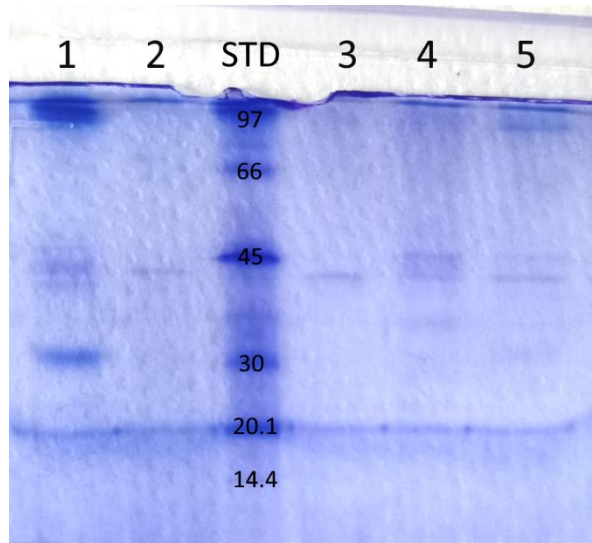


Figura 2.11. Electroforesis de proteínas por SDS-Page del LES concentrado de *Diocotophyme renale*.

Se realizó un Western blot a partir de muestras de LES, utilizando suero de perro infectado (S+) y no infectado (S-) con *D. renale* como anticuerpo primario, y un anticuerpo anti-IgG canina como secundario. Al exponer la membrana durante 10 s, se observaron bandas inmunorreactivas en las muestras 1, 4 y 5 únicamente con el suero positivo, mientras que dichas bandas estuvieron ausentes al utilizar el suero negativo (Figura 2.12). Las señales detectadas se ubicaron en el rango de 25 a 37 kDa, coincidiendo con el patrón previamente observado en los Western blots de esófago (ver Introducción del capítulo). Esto sugiere que las proteínas inmunorreactivas podrían estar presentes tanto en el tejido esofágico como en el LES, posiblemente como productos de secreción o excreción. Considerando que el LES no constituye un tejido estructurado y contiene menor carga proteica, podría representar un medio más accesible para la identificación de biomarcadores específicos de la infección.

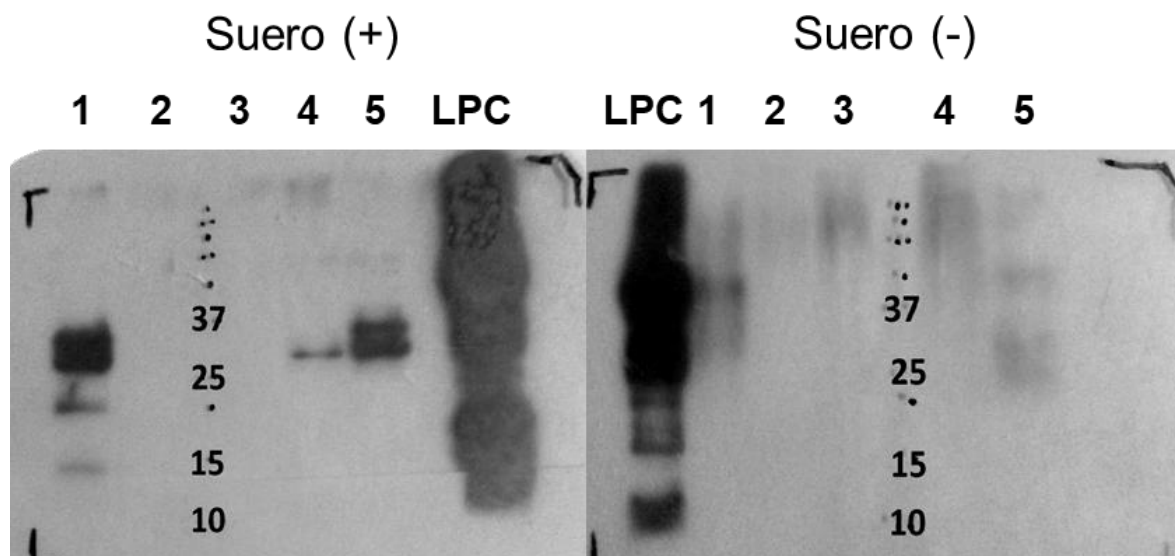


Figura 2.12. Western blot de muestras de LES de *Diocotophyme renale*, utilizando como anticuerpo primario suero de perro infectado o no infectado, y como anticuerpo secundario anti-IgG canina. El líquido pseudocelómico (LPC) del parásito se incluyó como control positivo, ya que en ensayos previos realizados en el mismo laboratorio mostró reactividad frente a sueros de perros tanto infectados como no infectados. Como marcador de peso molecular se utilizó Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ (Bio-Rad, cat. 1610375).

Resultado de Proteómica Esófago y LES

Los análisis de proteómica permitieron identificar un total de 125 proteínas en el homogenato de esófago, correspondientes a la banda de entre 25 y 40 kDa seleccionada para su procesamiento. Estas proteínas presentan péptidos con un alto nivel de coincidencia respecto del espectro de masas simulado. La predicción de proteínas presentes a partir de los péptidos identificados mostró una amplia diversidad de tamaños, por lo que se procedió a filtrar aquellas comprendidas específicamente en el rango de 25 a 40 kDa, resultando en 62 proteínas candidatas. Posteriormente, se aplicó un segundo filtro basado en la cobertura de los péptidos predichos, excluyéndose aquellas con una cobertura inferior al 30 %, lo que redujo el conjunto a 18 proteínas con alta confianza.

En cuanto a las muestras del líquido de LES, se analizaron tanto el pool total de proteínas como la fracción correspondiente a la banda de entre 25 y 40 kDa. En total, se identificaron 584 proteínas con péptidos de alta coincidencia espectral. Luego del filtrado por tamaño, se obtuvo un subconjunto de 143 proteínas. Al aplicar el criterio de cobertura mínima del 30 %, se conservaron 20 proteínas que mostraron una alta confianza en su identificación. Cabe destacar que éstas, seis también se encuentran dentro del conjunto previamente seleccionado en esófago, lo que refuerza su potencial relevancia como posibles determinantes antigénicos.

Con el objetivo de acotar el conjunto de proteínas candidatas con potencial diagnóstico, se analizó la distribución tisular de las 18 proteínas seleccionadas previamente en el esófago, entre las cuales seis también se encontraron en el LES. Debido a que estudios previos demostraron que esta reactividad diferencial frente a sueros positivos y negativos se restringe al esófago y al LES, sin evidencias similares en otros tejidos (Pedrassani et al., 2015; Capella et al., 2022), se consideró relevante identificar proteínas con expresión específica o predominante en dichos

tejidos. Para ello, se investigó la presencia de estas proteínas en datos de proteoma generados para otros tejidos de *D. renale* (digestivo, gónada, pared corporal y líquido pseudocelómico) en la tesis doctoral de Giorrello (2023).

Tabla 2.12. Presencia de las 18 proteínas seleccionadas del esófago en proteomas de distintos tejidos de *D. renale*. Se indica el número de proteomas obtenidos a partir de muestras independientes para cada tejido. Para cada proteína, se señala en cuántos proteomas fue detectada; “—” indica ausencia en todos los proteomas analizados. LPC: líquido pseudocelómico. (*) Los proteomas del LES generados en este estudio incluyen cuatro obtenidos a partir del total de proteínas y uno correspondiente al rango de 25–40 kDa.

	Proteomas					
	Esófago	LES	LPC	Pared Corporal	Digestivo	Gónada
N° Proteomas	6	5*	5	6	6	6
P10346	6	-	-	5	2	2
P9932	6	-	-	5	-	2
P2454	6	-	-	6	6	6
P8001	6	-	-	5	5	5
P8285	6	-	-	5	5	4
P293	2	-	-	1	-	2
P7227	6	2	-	1	2	-
P3578	6	-	2	5	6	5
P51	6	2	-	-	1	-
P670	6	-	-	5	6	6
P7230	6	-	-	1	2	-
P1603	6	1	-	6	4	5
P5212	6	2	4	6	6	4
P7900	2	-	-	-	-	2
P52	6	2	-	-	-	-
P2362	6	2	3	6	6	6
P5598	6	-	-	6	4	3
P7047	6	-	-	6	-	5

De las 18 proteínas analizadas, la mitad fueron detectadas, además del esófago, en tejidos del sistema digestivo, la pared corporal y la gónada. La pared corporal fue el tejido con mayor número de coincidencias, con 15 presentes. En cambio, solo tres se hallaron en el líquido pseudocelómico (LPC), lo que sugiere cierta singularidad de este tejido en cuanto a su perfil de expresión, al menos respecto del subconjunto evaluado. Las proteínas P5212 y P2362 se expresaron de manera amplia en todos los tejidos analizados. Ninguna proteína se detectó exclusivamente en el esófago; sin embargo, P52 fue la única presente únicamente en esófago y LES, lo que la posiciona como una candidata de interés. P7227 y P51 también se detectaron de forma consistente en esófago y LES, pero con escasa representación en otros tejidos. En contraste, proteínas como P2454, P8001 y P8285, ausentes en el LES, mostraron una distribución amplia y frecuente en múltiples tejidos, lo que disminuye la probabilidad de que estén asociadas a la respuesta inmunológica diferencial observada (Tabla 2.12).

Estas observaciones permiten priorizar aquellas proteínas cuya detección se restringe a los tejidos en los que se ha comprobado una respuesta inmune diferencial. No obstante, es importante considerar que la comparación entre tejidos está condicionada por el número desigual de proteomas disponibles, lo cual puede influir en la frecuencia de detección. Mientras que para esófago, gónada y otros tejidos se cuenta con seis muestras independientes, en el caso del LES se analizaron cuatro proteomas correspondientes al total de proteínas y uno adicional obtenido a partir de la fracción comprendida entre 25 y 40 kDa. Esta diferencia metodológica podría subestimar la presencia de algunas proteínas en el LES, especialmente aquellas cuya detección no alcanza el umbral de cobertura requerido para ser consideradas.

Evaluación de Proteínas Candidatas por Especificidad y Antigenicidad

Los resultados de las búsquedas BLAST de las 18 proteínas candidatas en las distintas bases de datos, SwissProt, WormBase, GenBank no redundante, su versión filtrada por nematodos y la base de secuencias de referencia RefSeq evidenciaron un amplio rango de similitud entre las proteínas candidatas y las secuencias allí registradas (Figura 2.13). El filtrado de las coincidencias (hits) mediante umbrales de identidad $\geq 30\%$, cobertura $\geq 70\%$, E-value $< 1e-3$ y score > 50 permitió establecer un criterio de confianza para la comparación, revelando diferencias notables entre proteínas. Las proteínas filtradas de las distintas bases de datos se reunieron en un único set de datos con el que se realizaron los análisis posteriores. Mientras que P8285 presentó 622 hits, P52 registró solo uno, lo que podría sugerir una mayor especificidad para *D. renale*. El resto de las proteínas se ubican en un rango intermedio, entre 350 y 480 hits, a excepción de P2454 (106) y P10346 (63), que también mostraron una representación más limitada. Estas últimas presentaron hits en cuatro y dos bases de datos respectivamente.

En relación con las bases de datos utilizadas, se observó una distribución homogénea en la mayoría de ellas, con excepción de WormBase Parasite, donde se registraron las mayores variaciones. Esta base contiene secuencias de genomas aún no completamente anotados, lo que puede incrementar el número de hits con lecturas de los mismos. Al estar enfocada exclusivamente en nematodos y reunir un alto volumen de secuencias con distintos niveles de curaduría, WormBase fue la base que reportó la mayor cantidad de hits (1737). En contraste, SwissProt mostró el menor número de hits (703), lo que es esperable dado que solo incluye proteínas con validación experimental. Y a su vez, podría presentar un sesgo hacia especies modelo, explicando la variabilidad observada entre proteínas con distintos niveles de representación. Las bases de datos del NCBI mostraron una mayor consistencia en el número de hits entre proteínas, probablemente debido a la amplia diversidad de secuencias que contienen. En particular, el conjunto no redundante reportó 1470 hits, seguido por RefSeq con 1387 y por la versión filtrada por nematodos con 1335. Ninguna base de datos presentó hits con todas las proteínas seleccionadas.

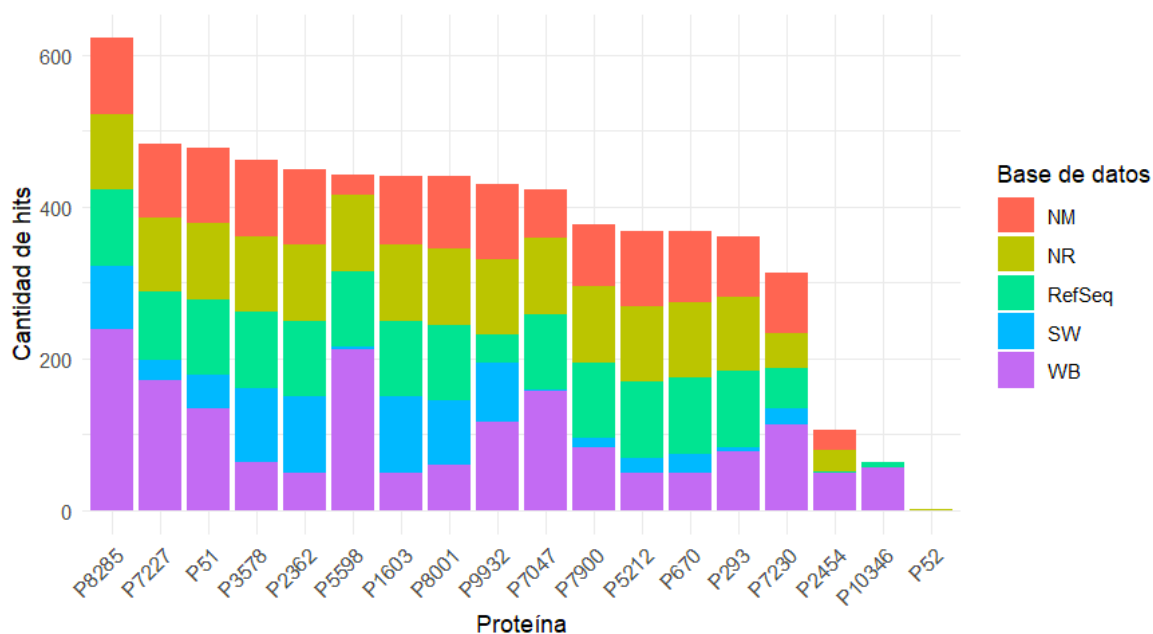


Figura 2.13. Número de hits obtenidos para cada proteína seleccionada, discriminados según la base de datos consultada. (NR) Nucleótidos no redundantes del NCBI; (NM) secuencias filtradas por el clado Nematoda del NCBI; (RefSeq) secuencias de referencia del NCBI; (SW) SwissProt; (WB) WormBase.

Si bien el número total de hits proporciona una primera aproximación al grado de singularidad de cada proteína, este parámetro debe interpretarse con discernimiento, especialmente considerando la escasa representación de *D. renale* en las bases de datos moleculares. Un indicador más robusto de especificidad potencial es el número de especies distintas representadas. En el análisis de diversidad taxonómica asociada a los hits de cada proteína, se observaron diferencias marcadas entre las proteínas seleccionadas en concordancia con los resultados anteriores (Figura 2.14). La proteína P1603 presentó la mayor amplitud taxonómica, con coincidencias en 289 especies distintas, seguida por P7900, con 210 especies. Este amplio rango sugiere una alta conservación evolutiva, lo que podría limitar su utilidad diagnóstica debido al riesgo de reactividad cruzada con proteínas homólogas de otros organismos. El resto de las proteínas mostró hits provenientes de entre 100 y 200 especies, a excepción de P10346 (46 especies), P2454 (20 especies) y P52 (1 especie). Estas últimas, en particular P52, destacan por su escasa representación taxonómica en las bases de datos, lo que refuerza su potencial como marcador antigénico específico para *D. renale*.

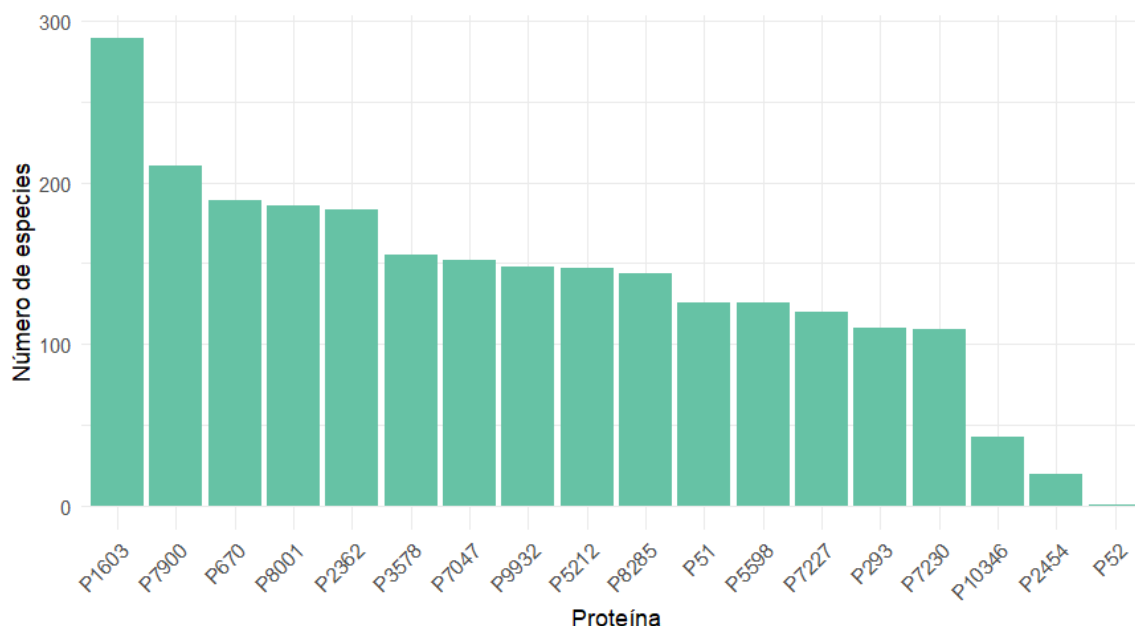


Figura 2.14. Número de especies en las que se detectaron hits para cada una de las proteínas seleccionadas.

El análisis de las identidades promedio por proteína en cada base de datos reveló un amplio rango de valores, tanto entre proteínas como entre bases de datos consultadas (Figura 2.15). Las proteínas P2362, P10346 (a pesar de haber presentado hits en solo dos bases), P8001 y P1603 exhibieron los mayores niveles de identidad promedio, superando el 70 % en la mayoría de las bases, lo que sugiere un alto grado de conservación evolutiva. En contraste, otras proteínas mostraron valores de identidad sustancialmente más bajos o incluso ausencia total de hits, aun en bases especializadas en nematodos como WormBase o la versión filtrada por nematodos del NCBI. Entre estas, P5212, P3578, P9932 y P2454 registraron identidades promedio inferiores al 50 %. Particularmente, el único alineamiento obtenido para P52, correspondiente a la base no redundante del NCBI, alcanzó apenas un 30,2 % de identidad. Estos resultados permiten refinar la selección de candidatos antigénicos, priorizando aquellos con baja probabilidad de similitud de secuencia y representación restringida en las bases de datos, lo que contribuiría a reducir la probabilidad de reacciones cruzadas en aplicaciones serológicas.



Figura 2.15. Heatmap que representa el porcentaje de identidad obtenido para cada proteína analizada en distintas bases. (NR) Nucleótidos no redundantes del NCBI; (NM) secuencias filtradas por el clado Nematoda del NCBI; (RefSeq) secuencias de referencia del NCBI; (SW) SwissProt; (WB) WormBase. El símbolo ‘–’ indica ausencia de hits para la proteína en la base correspondiente. Este gráfico fue realizado utilizando el paquete ggplot2 en código R.

La evaluación del potencial antigénico global para linfocitos B de las proteínas seleccionadas, basada en sus propiedades fisicoquímicas mediante el software Vaxijen 2.0, reveló que ocho de ellas superaron el umbral de probabilidad de 0,5, valor generalmente aceptado como indicador de antigenicidad. Este enfoque, independiente de alineamientos, identificó a la proteína P1603 como la que presentó el valor más alto (0,6639), lo que la posiciona como una de las candidatas con mayor potencial inmunógeno. Sin embargo, su utilidad como marcador específico podría estar limitada, ya que fue también la proteína que presentó coincidencias con el mayor número de organismos en los análisis de homología (Tabla 2.13).

Tabla 2.13. Potencial antigénico global predicho para cada proteína. Se consideró un umbral de 0,5 para identificar candidatas con propiedades fisicoquímicas compatibles con antigenicidad.

Proteína	Estimación del potencial antigénico global	Resultado
P7230	0,2367	No Antígeno
P7900	0,3168	No Antígeno
P670	0,3241	No Antígeno
P51	0,3384	No Antígeno
P5212	0,3598	No Antígeno
P293	0,3960	No Antígeno
P8001	0,4669	No Antígeno
P3578	0,4770	No Antígeno
P5598	0,4801	No Antígeno
P2454	0,4870	No Antígeno
P2362	0,5083	Antígeno
P9932	0,5129	Antígeno
P52	0,5184	Antígeno
P10346	0,5226	Antígeno
P7227	0,5227	Antígeno
P7047	0,6110	Antígeno
P8285	0,6605	Antígeno
P1603	0,6639	Antígeno

Con el objetivo de complementar esta evaluación mediante métodos basados en alineamientos, se empleó el software BepiPred 3.0, que permitió estimar el potencial antigénico de cada proteína a partir del promedio de los valores predichos para cada residuo aminoacídico (Tabla 2.14). Los puntajes más elevados (superiores a 0,120) se observaron en las proteínas P52, P7230, P2362, P5212 y P2454, lo que sugiere un mayor número de sitios con propensión al reconocimiento por linfocitos B.

Tabla 2.14. Score promedio de predicción antigénica para cada proteína, calculado a partir del valor medio asignado a sus residuos considerando tanto el modelo estructural como el lineal. Los valores se representan mediante un gradiente de color, donde las tonalidades más intensas indican mayor potencial antigénico promedio.

Proteína	Score promedio de antigencidad	
	Estructural	Lineal
P7047	0,040	0,040
P5598	0,049	0,049
P293	0,075	0,074
P3578	0,078	0,077
P1603	0,081	0,079
P8285	0,082	0,081
P10346	0,085	0,085
P9932	0,087	0,086
P7227	0,102	0,101
P8001	0,107	0,106
P670	0,114	0,113
P51	0,115	0,113
P7900	0,118	0,116
P2454	0,121	0,120
P5212	0,123	0,121
P2362	0,134	0,132
P7230	0,144	0,143
P52	0,144	0,143

No obstante, los sitios con altos valores de score no deben considerarse únicamente de forma aislada, sino también en el contexto estructural de la proteína en la que se encuentran. En este sentido, lo que define a un epítipo como candidato potencial no es únicamente la magnitud del score por residuo, sino la presencia de regiones contiguas compuestas por al menos seis aminoácidos consecutivos con puntuaciones elevadas (EL-Manzalawy et al., 2008; Ras-Carmona et al., 2022). A su vez, una proteína se considera una mejor candidata antigénica cuando presenta múltiples regiones de este tipo distribuidas a lo largo de su secuencia. En consecuencia, se estimó el porcentaje de cobertura de epítipos lineales definidos como segmentos continuos de al menos seis residuos con alta puntuación, tanto a partir de los valores predichos considerando estructura secundaria como de los correspondientes al péptido lineal (Figura 2.16).

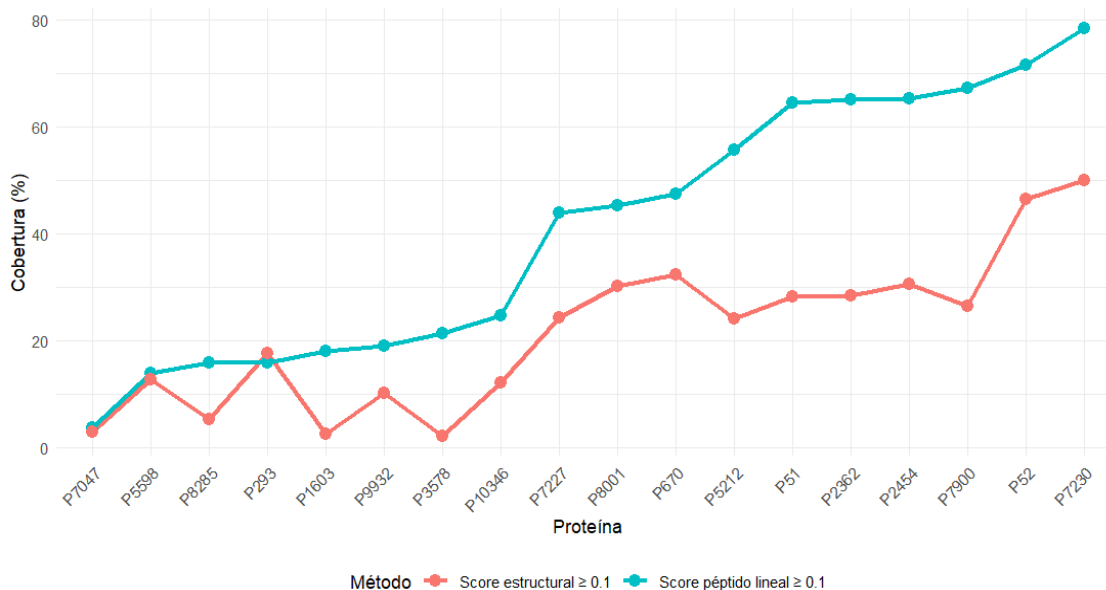


Figura 2.16. Cobertura porcentual de epítomos contiguos de más de seis residuos con alto score de predicción antigénica, calculada para cada proteína analizada. Se muestran dos líneas: una correspondiente a los valores obtenidos considerando la estructura y otra basada en la secuencia lineal del péptido, ambas estimadas mediante BepiPred-3.0.

Las predicciones obtenidas evidencian una amplia cobertura de regiones con alto potencial antigénico, particularmente en las proteínas P7230 y P52, sobre todo al considerar los valores estructurales predichos teniendo en cuenta la estructura. Asimismo, las proteínas P7900 y P2454 mostraron una cobertura elevada cuando se evaluó específicamente el puntaje asociado al péptido lineal. Este hallazgo resulta especialmente relevante si se tiene en cuenta que, en técnicas como el Western Blot, el reconocimiento del anticuerpo ocurre frente a proteínas desnaturalizadas. Estos resultados reflejan la diversidad de regiones con alta probabilidad de actuar como epítomos dentro de cada proteína, en línea con el reconocimiento policlonal por parte del sistema inmune. A su vez, destacan la importancia de considerar múltiples regiones inmunogénicas, dado que la selección de un único epítomo promisorio, conlleva el riesgo de que este se encuentre inaccesible en la conformación nativa de la proteína o sea enmascarado por modificaciones postraduccionales. Cabe señalar que este algoritmo utiliza exclusivamente en información derivada de la secuencia proteica, por lo que no permitiría una predicción robusta de epítomos discontinuos. Estos epítomos, también denominados conformacionales, están compuestos por residuos que pueden encontrarse alejados entre sí en la cadena polipeptídica, pero que se disponen en proximidad espacial cuando la proteína alcanza su conformación nativa.

A partir del análisis integrado de los datos, se identificaron proteínas con alto potencial antigénico y baja identidad de secuencia frente a los registros disponibles en las bases de datos. Sobre este subconjunto, se llevó a cabo un escrutinio individual exhaustivo, en el que se evaluaron en detalle los alineamientos obtenidos para cada proteína candidata en las distintas bases de datos. El objetivo fue priorizar aquellas que ofrecieran un equilibrio óptimo entre especificidad y sensibilidad, según los criterios definidos en los análisis previos. Se excluyeron aquellas proteínas cuyos alineamientos más probables correspondían a secuencias de mamíferos, por su potencial de generar reactividad con el hospedador, así como aquellas con alta homología con otros nematodos parásitos,

debido al riesgo de pérdida de especificidad diagnóstica. Como resultado de este proceso de filtrado, se seleccionaron cuatro candidatos finales para su validación experimental: P52, P9932, P5212 y P2454 (Tabla 2.15).

Tabla 2.15. Proteínas seleccionadas para clonación, expresión y candidatas a marcador diagnóstico de infección.

Proteínas Seleccionadas	Secuencia Aminoacídica
P9932	MTATPCTPNYLPAQKSSSDSVDFDPVADADALKQAIGCLGCDNATILRTICQRSNAQRQ EIRRTYQTAFGHDLIKRLKSALFMHFKDVIVALTYSPEYDAKQLRRALKIPGLTDP AIVEIL TTRTKEEIENVKQVYARMYSEQLEDTIRASTAGSLRHLLISLSKVEKLVHTNTEALAKDA MALHEAGEKRLGTDES FNEVFGSRTHDQLQLVFQEYELAGHGIETAVEKEFKGPMQ NALLTMTKIVRNPTVYFAKQLHSAMKGP GTDDPLLIRIIVSRSERDLVQIKEEFFNLYGKPL RSVVKGDTTGLYEDALLTIIDKC
P2454	MSKLRRQCPPDSAYDPDMGTCCQKCEPGLGVALPCTKHNDTVCSPTDGV TYSPVSSH EQVCRPCSHCPAKSFPVHKCNSTHNTKCECTKDFFYQADKNMCMPCRRCRPGETMVR PCSSAMDTVCEPCPPYTYTKVYNHRGPCLNCSRCKANQLLKHPTK FQDVHCLDLELYE NGNKDSEESGKNLIYVCCTLLGTLLLVLIYAIVKNNHMKLCFRSCYSSGKSSSRRQSSSN ANNARVQKKPKIAKCSVTQNDLLLPLASQDSSLYNLPQSTLNDLKSFNNGSEESNWE MFAKALGYSQQKIDHVKM VAPTHGRTPCEQLHQLSKTSGVTTQAF LKALHTTG HDDV VQVIQKSLEAPRAIHIV
P5212	MAESKQHYKLTYFDIKGLGEPIRLLFAYVDQPFEDVRLKLDDWPKVKPTTFGQVPV LDF DGKRLTQSAAILRYLGEHFDLMPKTSWDKAKADEMATSYFDL PKLQQMMVAESEEEK KEIINQAINDFLIPRFKVDYLSHCRSGFFGNDQICWADFFMYNMLDLCKSSLTADLSPY SHIMHFMTKFAALPQIQQWHAKHPDVKGTYHDFPKPN
P52	MLVTLTLILFATVSTLVLADDPNSYPLHVLEVQNDPSLFQGD MIMGKSSREDFINSIQPW TDGKIYYTL DSSFSDEIERIENKFGELEDQFSCIEFIKRTKEPTWVHIKNGGRNCD FVVG PSTKGEHVAHLPQKCHHQLVILHGLHLLGLTHAHSYPNRKLWLDKVEPKK TMRGHEKD LDITFPHHLYKDMKKDLENGLFSP LQYGPYAFSNGEISMHFWHHWSV VPSLKQIVAVY LSDVQQINHLKCP SK

Revisión de Modificaciones Postraduccionales y Péptido Señal

La evaluación de posibles modificaciones postraduccionales (PTMs) en las proteínas seleccionadas, realizada con el software PTMGPT2, indicó la presencia potencial de estos eventos en las cuatro candidatas analizadas (Tabla 2.16). Al examinar los sitios afectados y los tipos de modificaciones predichas, se observó que P52 presentó la menor cantidad de PTMs, mientras que P9932 fue la que registró el mayor número. Si bien es esperable que estas modificaciones no se reproduzcan en las versiones recombinantes expresadas en sistemas heterólogos, los sitios potencialmente modificados no se superponen sustancialmente con las regiones antigénicas de alta probabilidad, por lo que se espera que no comprometan su reconocimiento inmunológico.

Tabla 2.16. Tipos de modificaciones postraduccionales (PTM) predichas y residuos aminoacídicos correspondientes en cada una de las proteínas analizadas.

Tipo de PTM	Residuo Modificado			
	P52	P5212	P9932	P2454
Amidación (V)	-	-	-	371
Metilación (K)	-	-	235 238	-
Ubiquitinación (K)	-	-	193 261 268	360
Fosforilación (S, T)	-	-	-	234 235 236 253 285
Glucosilación tipo N (N)	-	-	43	79 145
S-nitrosilación (C)	-	144	6 38 41	8 159
Fosforilación (Y)	6	12 209	258	-
Acetilación (K)	-	47 63 91	193 261 309	313
Metilación (R)	-	-	-	-
Hidroxilación (K)	-	-	193	-
Hidroxilación (P)	-	-	-	27 69 74 109 142
Glucosilación tipo O (S, T)	-	49 50 173	124 152	318 332
Malonilación (K)	-	47 89 91	309	-
Glutarilación (K)	149 153 154	89 91	102 302	156
Glutathionilación (C)	-	-	327	324
S-palmitoilación (C)	-	-	-	-
Succinilación (K)	-	63 84 119	78 235 238 309	-
Sumoilación (K)	177	206	293	-
Formilación (K)	-	-	102	-

La predicción de péptido señal mediante el análisis bayesiano realizado por el software SignalP indicó su presencia exclusivamente en la proteína P52, con una probabilidad posterior de 1 (Figura 2.17). En contraste, las proteínas P5212, P9932 y P2454 no presentaron señal, también con una probabilidad posterior de 1. Para P52, se estimó un sitio de clivaje entre los residuos 19 y 20, luego del PTM predicho para el sitio 6, con una probabilidad posterior de 0,98. La secuencia identificada corresponde a una señal de secreción estándar, transportada por el sistema Sec y escindida por la enzima Signal Peptidase I (Lep). Este hallazgo es consistente, aunque no excluyente, con la detección de dicha proteína en la fracción de productos de LES. Esta información fue considerada en el diseño de los primers de clonación, con el fin de excluir la región codificante de la señal de secreción durante la expresión recombinante de la proteína (Tabla 2.8).

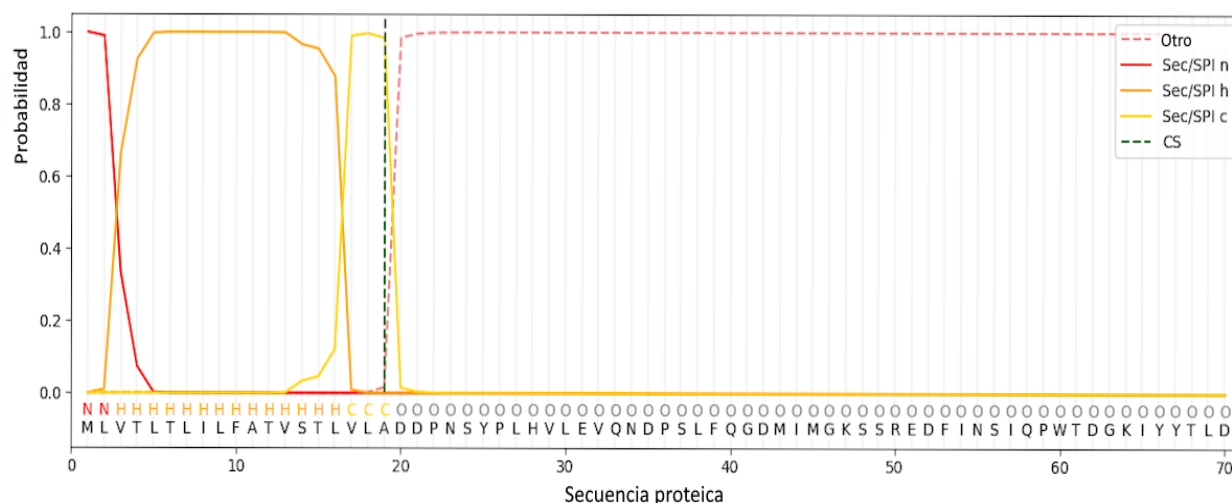


Figura 2.17. Curva de probabilidad por residuo aminoacídico correspondiente a la predicción de señal de secreción observada en P52. Se visualizan las probabilidades asignadas a las regiones características de un péptido señal: (N) región N-terminal, (H) región intermedia hidrofóbica, (C) región C-terminal asociada al sitio de clivaje, y (O) probabilidad de pertenecer a una región que no corresponde a un péptido señal.

Clonación y Expresión de las Proteínas Candidatas

Las cuatro proteínas seleccionadas mostraron productos de amplificación compatibles con los tamaños esperados según las predicciones del genoma: 711 pb para P52, 648 pb para P5212, 1113 pb para P2454 y 981 pb para P9932. En este último caso, en una misma calle del gel se observaron, además de la banda correspondiente al tamaño esperado, otras bandas adicionales de diferente tamaño, lo que podría deberse a amplificaciones inespecíficas o a la presencia de variantes de splicing. La amplificación de P2454 presentó una banda tenue; para esta PCR se ajustó el tiempo de extensión de acuerdo al tamaño del inserto, considerando 500 nucleótidos por cada 30 s, conforme a las recomendaciones del fabricante de la enzima. Con el objetivo de aumentar la masa total de inserto recuperado, se realizaron cuatro reacciones de PCR independientes por cada proteína blanco (Figura 2.18). Para P2454, sólo se logró una amplificación positiva, con una banda de baja intensidad que no pudo reproducirse en ensayos posteriores, por lo que no se obtuvo la masa de inserto necesaria para avanzar con la clonación. A esto se suma que P2454 fue la única de las cuatro proteínas seleccionadas que no se detectó en el proteoma del LES, incluso bajo los umbrales más permisivos de cobertura. A diferencia de P9932, que sí fue identificada, aunque con 25 % de cobertura y baja representación en las muestras. En función de estos resultados, y con el objetivo de optimizar recursos, se decidió continuar únicamente con las proteínas P52, P5212 y P9932.

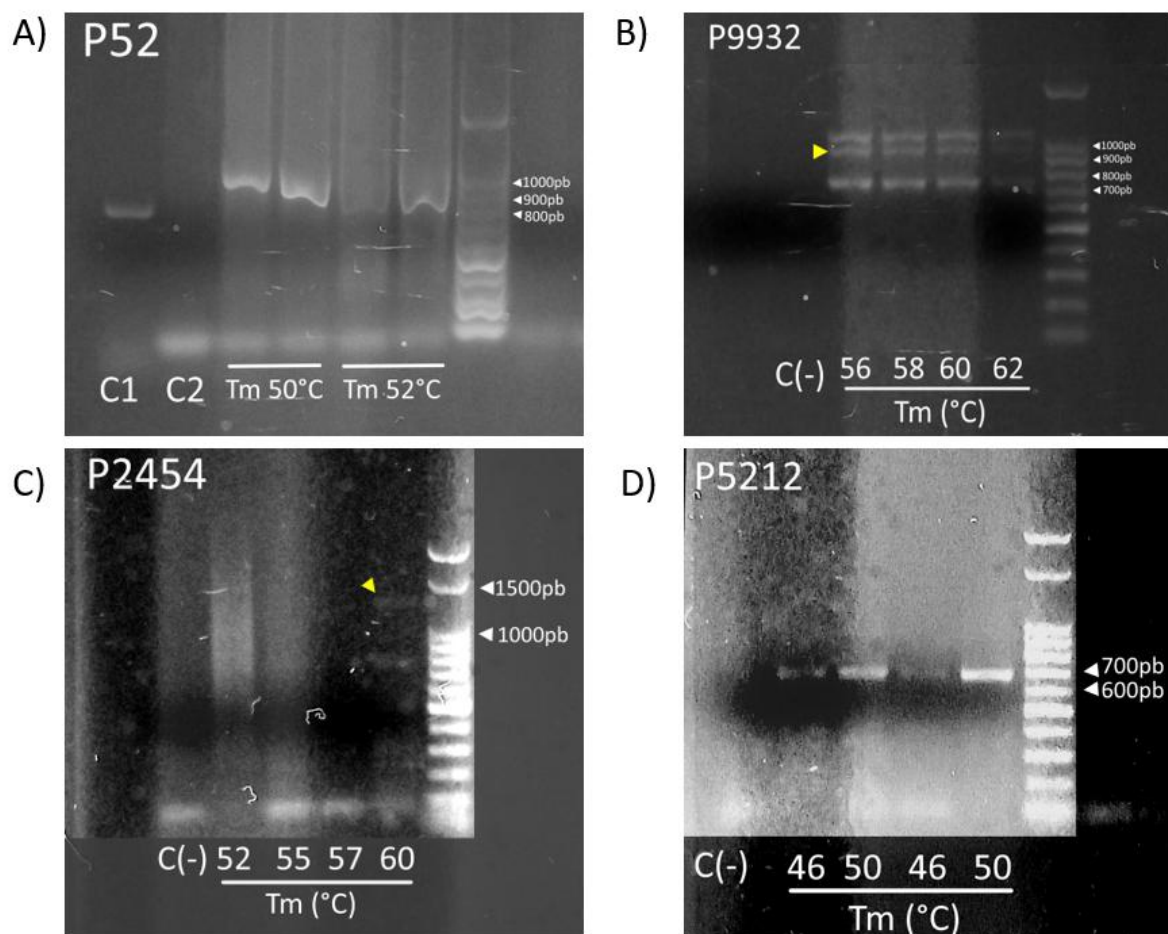


Figura 2.18. Productos de amplificación por RT-PCR obtenidos a partir de ARN de esófago de *Diocotophyme renale*, utilizando primers específicos para las proteínas P52 (A), P9932 (B), P2454 (C) y P5212 (D). Las reacciones correspondientes a una misma proteína diana fueron combinadas durante la purificación del inserto. Se probaron distintas temperaturas de melting en búsqueda de optimizar la amplificación. En la imagen de P52 (A), C1 corresponde a un control negativo que consistió en los primers de amplificación de P52 pero con ADN molde no blanco. C2 corresponde a un control que consiste en ese mismo ADN no blanco con primers específicos del mismo. Las flechas amarillas indican la banda tenue en P2454 (C) y la del tamaño esperado en P9932 (B).

Los amplicones correspondientes a cada proteína fueron agrupados y digeridos con enzimas de restricción. En paralelo, el vector fue sometido a la misma digestión enzimática y posteriormente desfosforilado. Se realizó la ligación y el producto fue transformado en células competentes. Las colonias obtenidas mostraron un alto crecimiento en placas de LB-agar suplementadas con kanamicina. Se seleccionaron diez colonias por constructo para realizar PCR de colonia (Colony PCR) con el objetivo de verificar la presencia del inserto (Figura A2, Apéndice). Para el constructo correspondiente a P52 se detectaron cinco colonias positivas; en el caso de P5212, siete; y para P9932, las diez colonias resultaron positivas. Nuevamente, en P9932 se observaron productos de amplificación de distinto tamaño, lo que podría corresponder a variantes de inserción o eventos inespecíficos.

A partir de las colonias positivas, se seleccionaron aquellas que presentaron bandas de mayor intensidad en gel de agarosa para realizar un ensayo de screening de expresión. En el caso de P52, se observó una banda en las cepas inducidas, ausente en las no inducidas, correspondiente a una proteína de menor peso molecular respecto

al esperado (aproximadamente 20 kDa), presente en todas las colonias seleccionadas (Colonias 1, 4, 6 y 10). Para P9932, la Colonia 1 no mostró expresión detectable, mientras que las Colonias 2 y 3 presentaron una inducción leve, y la Colonia 6 una expresión elevada, todas con una banda cercana a los 30 kDa. Por su parte, P5212 mostró la mayor expresión tras la inducción, con un patrón de chorreado que dificultó la resolución individual de bandas; no obstante, en las Colonias 2 y 3 la expresión fue más marcada, también alrededor de los 30 kDa (Figura A3, Apéndice).

Las Colonias 4 y 10 de P52, 2 y 6 de P9932, y 2 y 3 de P5212 fueron seleccionadas para secuenciación mediante la técnica de Sanger, utilizando un primer específico en el promotor T7 de acuerdo al mapa del vector de expresión (Tabla 2.17). Las secuencias obtenidas para P52 Col. 4, P5212 Col. 2 y P9932 Col. 6 presentaron alta calidad y coincidieron, tras traducción con el código genético nuclear de invertebrados, con las secuencias de aminoácidos predichas a partir del genoma preliminar, observándose solo algunas variaciones sinónimas a nivel nucleotídico. Estas tres colonias fueron seleccionadas para continuar con la expresión recombinante a gran escala.

Tabla 2.17. Resultados de la secuenciación por la técnica de Sanger de los plásmidos enviados a MacroGen, utilizando un primer dirigido al promotor T7.

Proteína	Secuencia Nucleotídica
P52 (sin péptido señal)	ATGGACGATCCGAATTCATATCCGCTACACGTGCTTGAGGTTCAAAATGATCCTTCCCTCTTCAAGGCGACATGATCATGGGG AAGTCCTCACGAGAGGACTTCATCAACAGCATACAGCCATGGACTGATGGAAAAATTTACTACACACTGGACTCGTCATTAGT GATGAGATAGAGAGAATAATTGAAAAATAAGTTCCGTGAATTAGAAGATCAGTTCTCGTGCAATTGAATTCATCAAACGCACAAA GGAACCAACCTGGGTGCATATTAACCAACGGCGGGAGAACTGCGATTTTCGTATCGGAATGCCGTCAACTAAAGGGGAACAT GTGGCGCATCTGCCACAAAAGTGCCACCACCACTGGTGATTCTTCACGGCATCTGCATCTACTTGGCTTGACCCATGCACAT TCTTACCCAAACCGAAAACTGTGGCTCGACAAAAGTAGAACCAAGAAAACCATGAGAGGTCACGAAAAAGACTTAGACATCAC TTTTCCGCATCATCTTTACAAGGACATGAAAAAGGATCTGGAACCGGGCTCTTTCTCCTCTGCAATACGGTCCGTACGCATTT TCGAACAATGGAGAAATCTCGATGCACTTTTGGCACCCTGGCAATGTAAGTTCCTCGCTGAAGCAGATAATAGCAATGGA ACCTCAATCGACTAACAGTGAATCAACCCACCACTATAA
P5212	ATGGCTGAAAGTAAGCAACTACAACTGACTTATTTGACATCAAGGGGCTGGGTGAGCCGATTCGGCTGCTGTTTCGCTTA CGTCGACCAACCGTTTGAAGACGTGCTGTGAAGTTGGACGACTGGCCGAAAGTGAAGCCAACAACACCTTTTCGGGCAGGTT CCAGTGTGGATTTTACGGCAAGCGGCTCACGCAGTCGGCAGCTATTTTGCCTATCTCGGCGAGCATTTTCGACCTGATGCCG AAGACATCATGGGACAAGGCCAAAGCTGACGAAATGCCACATCGTATTTGACTTCTGCCAAAACCTCAACAGATGATGGT TGCAGAAAGCGAGGAAAAGAAGAAAGAAATCATTAAACCAAGCAATAAACGATTTTCTCATACCCCGTTTCAAGGTGTACGATG AATACTTGTCTCACTGCAGATCCGGTTTCTCGGAAATGATCAGATATGCTGGGCTGACTTTTTATGTACAACATGTTAGACCT GTGCAATCCAGTCTTACGGCCGACTTGAGTCCGTATTGCGATATAATGCACTTCATGACGAAGTTCGCTGCACTGCCGCAAT CCAACAATGGCATGCAAAGCATCCGGACGTTAAAGGCACTTACCACGATTTTCCAAAACCGAACTG
P9932	ATGACGGCGACTCCTTGACACCGAACTACCTGCCGGCGCAGAAAAGCAGCAGTGATTCGGTGGATTTGATCCTGTGCGCGA TGCTGACGCGCTGAAGCAGGCGATCGGATGTCTGGGCTGTGACAACGCGACGATTCTCGGACCATCTGCCAGCGATCGAAC GCCCAGCGACAAGAGATTGCGCCGACTTATCAACCGCTTTTGGACAGATTGATAAAGCGCTTGAAATCAGCTCTCTTCATG CATTTCAAAGACGTTATCGTCGCTCTGACCTACTCGCCGGCAGAATATGATGCAAAGCAGCTTCGACAGGGCCTTGAAAATACCC GGACTGACAGACCCAGCGATTGTAGAAATCCTCACGACAAGAACAAAAGAAGAAATCGAAAACGTTAAGCAGGTTTATGCAC GAATGTACAGCGAACAGCTAGAAGACACAATCCGGGCTTACCGCTGGTAGTTTGAGGCATTTGCTGATTTCACTGTGCGAAG GTTGAAAAGCTGAACGGGGTACATACGAACACGGAGCTGGCGTTGAAAGATGCCATGGCCCTTCATGAAGCGGGCGGAAAAG CGACTCGGCACCGACGAGTCGGTGTTCAACGAGGTGTTCCGGCTCTCGGACGCACGACCAGCTGCAGCTGGTGTTTCAGGAGT ACGAAAAGCTGGCCGGCCACGGCATCGAAACGGCCGTGAGAAGGAGTTCAAGGGACCGATGCAAAACGCGCTCTGACGA TGACCAAAATTGTCGCAACCCGACCGTCTACTTTGCAAAGCAGCTGCACAGCGCGATGAAGGGTCCGGGCACCGACGATCCC CTGCTGATCCGCATCATCGTCAGCCGTTTCGGAACGGGACTTGTTTCAGATCAAAGAGGAATTTTCAACCTGTACGGCAAACC GCTCAGAAGCGTCGTCAAGGGTGACACCACCGGCTGTATGAAGACGCTTTGCTTACGATAATCGACAAGTGCTGA

Purificación de las proteínas candidatas

Durante la cromatografía de afinidad realizada para P5212, se obtuvo una alta concentración de proteína en la primera elución, una cantidad moderada en la segunda y una menor en la tercera. Estas bandas no estuvieron presentes en las fracciones restantes del proceso de purificación. La segunda elución fue seleccionada para los ensayos de Western blot (WB), dado que presentaba una concentración adecuada de proteína y menor interferencia por bandas inespecíficas, con predominancia de la proteína esperada y escaso contenido de otras proteínas visibles en el gel (Figura 2.19). Las marchas de purificación de las demás proteínas se encuentran en el apéndice (Figura A4 y A5, Apéndice).

P5212

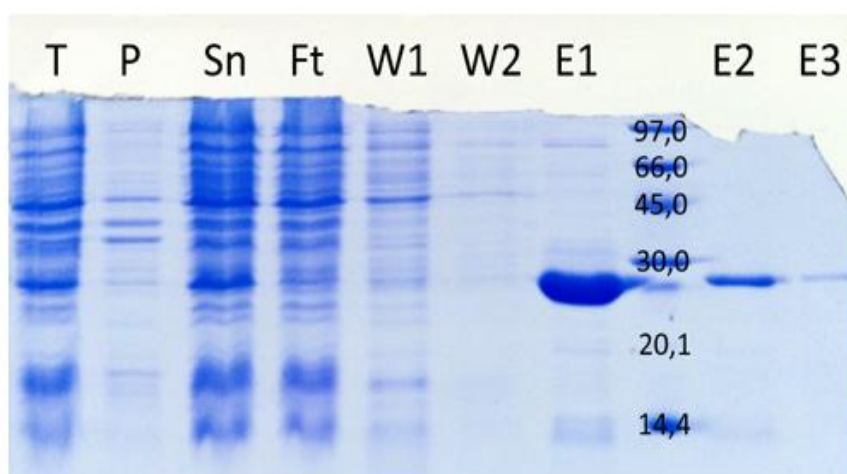


Figura 2.19. Proceso de purificación de la proteína P5212 mediante cromatografía de afinidad. Se muestran las fracciones correspondientes al homogenato total (T), pellet (P) y sobrenadante (S) post lisis celular, la fracción no retenida (Ft), los primeros lavados (W1 y W2) y las tres eluciones obtenidas (E1, E2 y E3).

En la primera cromatografía de afinidad realizada para P9932 y P52, la banda correspondiente al tamaño esperado no se detectó en ninguna de las fracciones de elución, sino en el pellet post lisis. Este resultado sugiere que ambas proteínas, al ser expresadas, podrían haber formado agregados o cuerpos de inclusión, quedando retenidas en la fracción insoluble tras la centrifugación celular. Para intentar recuperar las proteínas, los pellets fueron resuspendidos en buffer de unión con urea 8 M, centrifugados a 12.000 rpm durante 30 min y sometidos nuevamente a cromatografía de afinidad bajo condiciones desnaturalizantes.

En el caso de P9932, la banda esperada apareció en la primera elución, acompañada por una banda secundaria de mayor peso molecular que también fue visible en el primer lavado. En la segunda elución, la banda esperada se observó con menor intensidad y la banda secundaria prácticamente desapareció, motivo por el cual esta fracción fue seleccionada para los ensayos de Western blot (Figura A4, Apéndice). En la tercera y cuarta elución, la banda objetivo fue apenas visible.

Para P52, se detectó la banda esperada en la primera elución de forma tenue, acompañada por tres bandas adicionales, de las cuales dos desaparecieron en la segunda elución (Figura A5, Apéndice). En las eluciones

posteriores, la banda objetivo fue muy débil. Para concentrar el material proteico, se tomaron 2 mL de la primera y 2 mL de la segunda elución, y se sometieron a concentración por centrifugación a 3.000 g durante 15 min, utilizando unidades filtrantes Merck Amicon Millipore (15 mL, 3.000 MWCO), hasta reducir el volumen total a 1 mL. Este concentrado fue utilizado para los ensayos de Western blot.

Western blot de proteínas recombinantes

Se realizaron un total de 16 ensayos de Western blot (WB) para evaluar la reactividad inmunológica de las proteínas recombinantes P52, P5212 y P9932 (Tabla 2.18). Como anticuerpo primario se emplearon sueros de perro infectado (S+) y no infectado (S-) con *D. renale*, y como anticuerpo secundario, IgG anti-perro. De los 16 ensayos, 8 se realizaron con S(+) y 8 con S(-). Dos de ellos (uno con cada tipo de suero) arrojaron resultados no concluyentes y fueron excluidos del análisis.

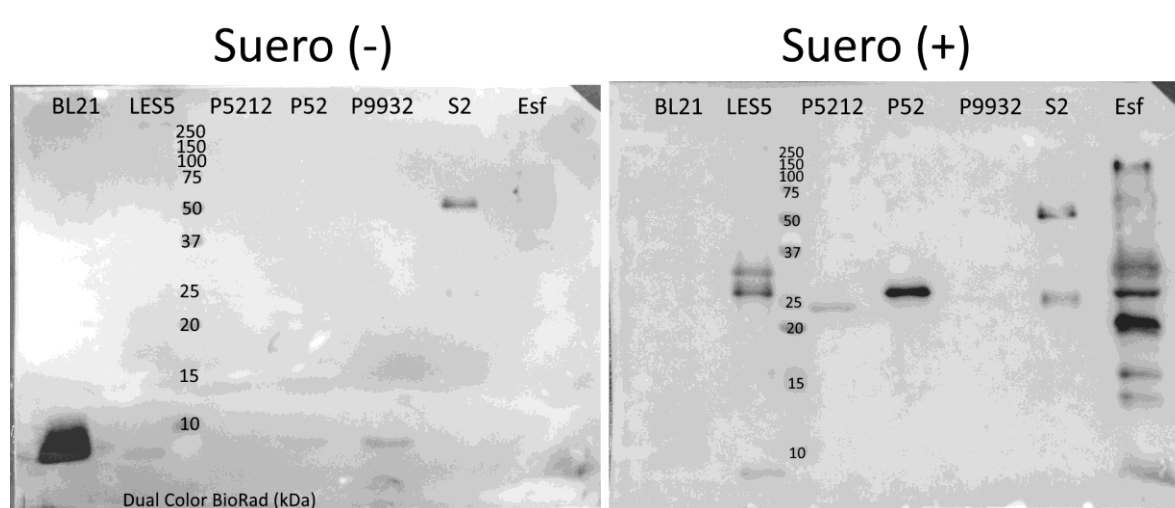


Figura 2.20. Western Blot con sueros caninos negativo (izquierda) y positivo (derecha) para *Dioctophyme renale* como anticuerpos primarios. En ambas membranas se sembraron, en calles individuales: homogenato de esófago del parásito (Esf) y líquido de excreción/secreción (LES5) como controles positivos; suero de perro no infectado (S2) como control del anticuerpo secundario (anti-IgG de perro); homogenato de *E. coli* BL21 como control de fondo inespecífico asociado a la bacteria de expresión; y las proteínas recombinantes seleccionadas P52, P5212 y P9932. La comparación entre ambas membranas permite evaluar la especificidad de la respuesta inmunológica frente a cada antígeno. Se seleccionaron a modo ilustrativo los ensayos realizados con S(-) Neg13 y S(+) Pos3. Los demás ensayos se encuentran en el Apéndice (Figura A6)

En el caso de **P52**, la banda correspondiente al tamaño esperado se observó con claridad en 4 de los 7 WB realizados con S(+) (Figura 2.20), y en los 3 restantes se detectó de forma tenue al saturar la señal. No se registraron resultados completamente negativos frente al suero positivo. En los ensayos con S(-), 6 muestras no mostraron reactividad, mientras que una presentó una banda tenue coincidente con una banda intensa en las muestras de LES y *E. coli* BL21, lo que sugiere posible contaminación o reactividad cruzada (Figura A6, Apéndice).

Para **P5212**, se detectó una respuesta positiva en 3 de los ensayos con S(+), y una respuesta negativa en los otros 4. Frente a S(-), se observó una respuesta positiva en 2 casos, negativa en 4, y una banda tenue en el mismo suero S(-) que también reaccionó débilmente con P52.

En cuanto a **P9932**, no se observó reactividad específica frente a ninguno de los sueros. Solo se detectaron dos bandas tenues, posiblemente asociadas a proteínas bacterianas residuales, ya que coincidieron con las observadas también en P52 y P5212 frente a S(-), y en la fracción correspondiente a *E. coli* BL21.

Cabe destacar que cuando se evidenció una señal intensa en la calle correspondiente a ***E. coli* BL21**, también se registró señal en diferentes regiones de las calles de las proteínas recombinantes. Esto indica la presencia de proteínas bacterianas remanentes en las fracciones purificadas, lo que en algunos casos enmascaró o interfirió con la detección de la banda de interés.

El patrón de bandas observado en las fracciones de **LES** no resultó consistente con el perfil detectado en esófago, lo que probablemente refleje las diferencias en la composición proteica de ambos compartimentos. En algunos casos se observó alta señal en LES sin corresponder a alta señal en esófago, y viceversa. También se registraron situaciones en las que ambos tejidos mostraron alta reactividad, sin que esto se correspondiera con la detección de las proteínas candidatas.

En todos los Western blots realizados, el **suero** de perro no infectado reveló la presencia de la banda correspondiente a la IgG canina, confirmando el correcto funcionamiento del anticuerpo secundario.

Tabla 2.18. Resultados de Western Blot para las proteínas recombinantes seleccionadas. Se utilizaron como anticuerpo primario sueros caninos positivos y negativos para dirofilimosis, y como anticuerpo secundario un anti-IgG de perro. En cada membrana se sembraron las proteínas recombinantes junto con controles adecuados. Se indica la presencia de bandas inmunorreactivas con los siguientes símbolos: ‘-’ = sin señal; ‘+’, ‘++’, ‘+++’ = intensidad creciente de la señal; ‘+/-’ = resultado dudoso por alto background; ‘-’ = señal negativa, pero con fuerte reactividad inespecífica atribuida al background generado por proteínas de *E. coli* (la banda observada en la calle de la proteína coincide con la observada en la calle control de *E. coli*).

		Resultados					
		P52		P5212		P9932	
Suero (+)	Suero (-)	S(+)	S(-)	S(+)	S(-)	S(+)	S(-)
Pos11	Neg11	+++	-	-	-	-	-
Pos11	Neg11	+++	-	-	-	-	-
Pos1	Neg12	++	-*	-	-*	-	-*
Pos3	Neg13	+++	-	+++	-	-	-
Pos8	Neg14	+++	-*	++	+++	-	-
Pos9	Neg15	+	-	-	-	-	-
Pos4	Neg16	+/-	-	++	+	+/-	-

Caracterización *in silico* de P52

Dado el patrón de reconocimiento diferencial observado para la proteína P52 frente a sueros de perros infectados y no infectados, se procedió a un análisis estructural *in silico* a partir de su secuencia aminoacídica, empleando herramientas bioinformáticas y búsquedas en bases de datos de estructuras. La predicción tridimensional obtenida mediante AlphaFold 3 reveló una estructura globular con considerable contenido de alfa hélices. Los residuos mostraron alta confiabilidad en la conformación propuesta, con valores de pLDDT (una métrica que estima la confianza local por residuo en la predicción estructural) superiores a 70 en la mayor parte de la proteína y mayores a 90 en extensas regiones, lo que indica una predicción de alta calidad. De manera complementaria, el error de posición esperado (EPE), que estima la incertidumbre en la ubicación espacial de cada residuo respecto a otros, mostró valores cercanos a 0 para la mayoría de la secuencia, lo que refuerza la idea de una proteína bien estructurada. Una excepción se observó en los primeros 20 residuos N-terminales, donde se registraron valores elevados de EPE y pLDDT reducidos, en concordancia con la presencia de un péptido señal, tal como se había predicho previamente mediante el software SignalP (Figura 2.21).

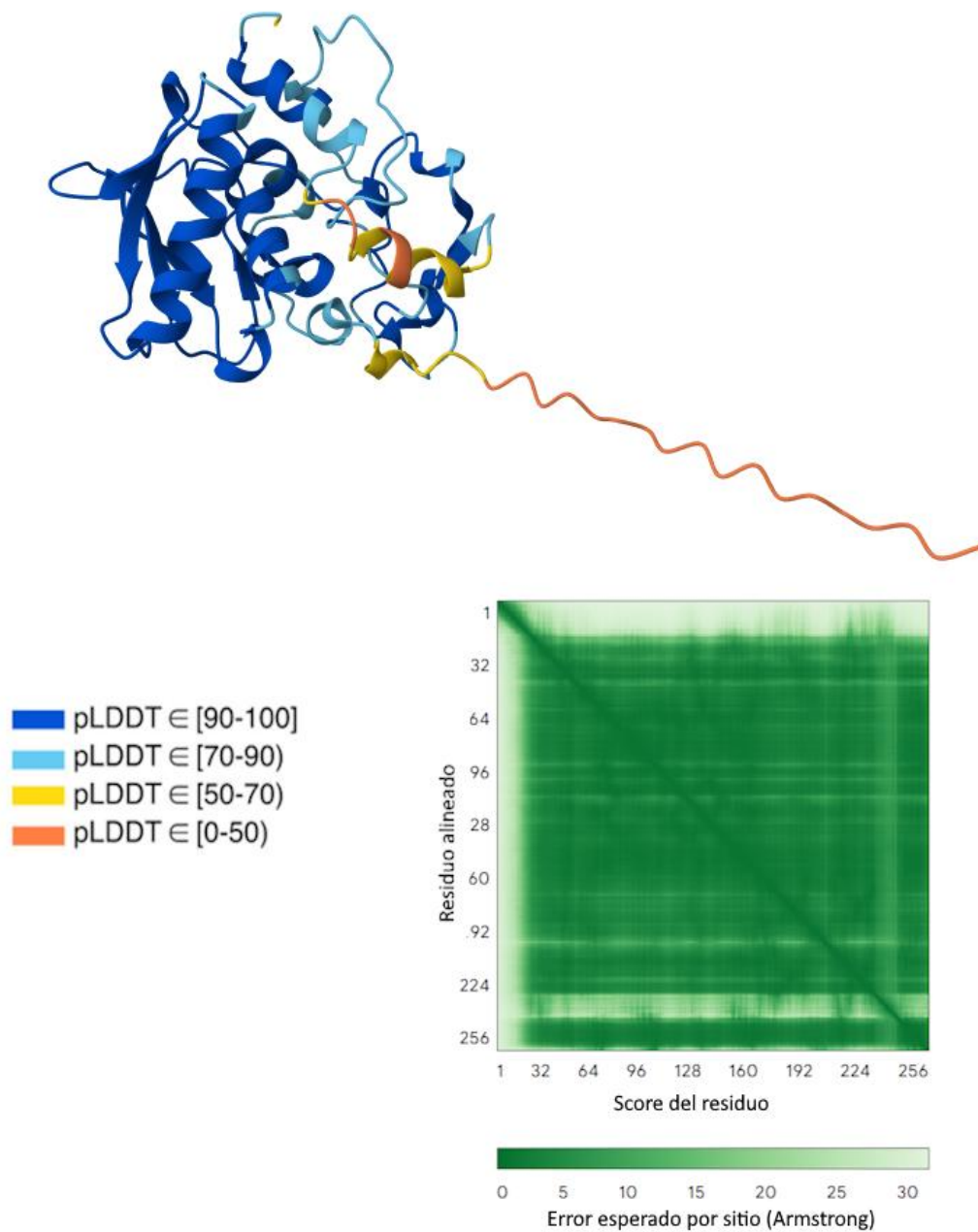


Figura 2.21. Modelo estructural de la proteína P52 predicho mediante AlphaFold3. La estructura se muestra en estilo cartoon, con un código de colores que indica el nivel de confianza por residuo según los valores de pLDDT. Se incluye el gráfico correspondiente al error de posición esperado (Expected Position Error, EPE) por residuo, el cual refleja la incertidumbre relativa entre pares de posiciones dentro de la estructura.

Dado que el péptido señal es escindido durante el procesamiento postraducciona y, además, no se encuentra presente en la proteína recombinante expresada, se procedió al análisis estructural del modelo sin dicho

segmento. La estructura resultante presentó niveles de confianza comparables a los observados en el modelo completo (Figura 2.22). En particular, el 84 % de los residuos mostraron valores de pLDDT superiores a 70 y el

42 % superiores a 90, lo que indica una predicción estructural de alta calidad. La comparación entre ambas versiones reveló cambios conformacionales leves, sin evidencias de mejora en la calidad de la predicción. El alineamiento estructural, basado en la superposición de las secuencias y sus modelos tridimensionales, arrojó una distancia media entre átomos equivalentes (RMSD) de 0,211 Å, calculada sobre 1447 átomos (Figura 2.23), lo que indica una alta similitud estructural. Se adoptó la estructura sin el péptido señal para los análisis estructurales posteriores.

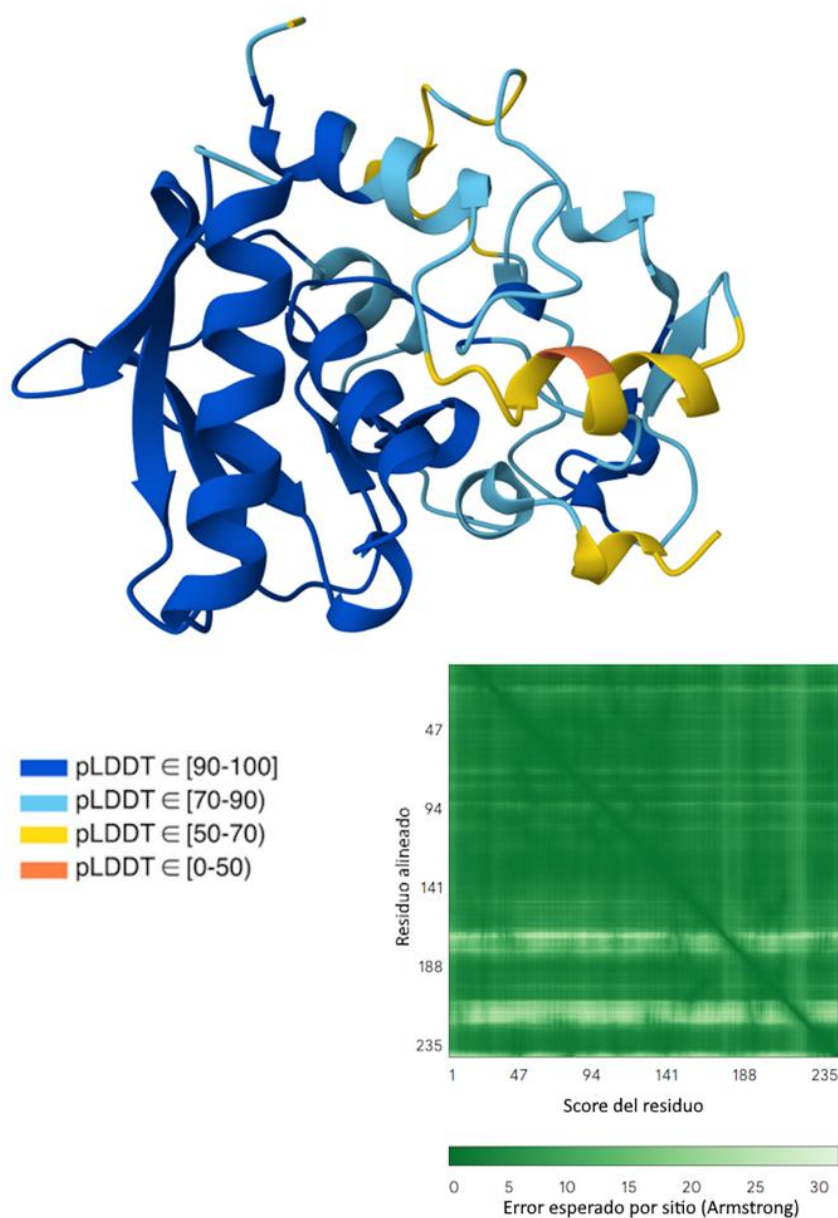


Figura 2.22. Estructura predicha de la proteína P52 sin péptido señal mediante AlphaFold3. Se muestra en estilo cartoon con codificación de colores según los valores de pLDDT, junto al gráfico de error de posición esperado (EPE) por residuo.

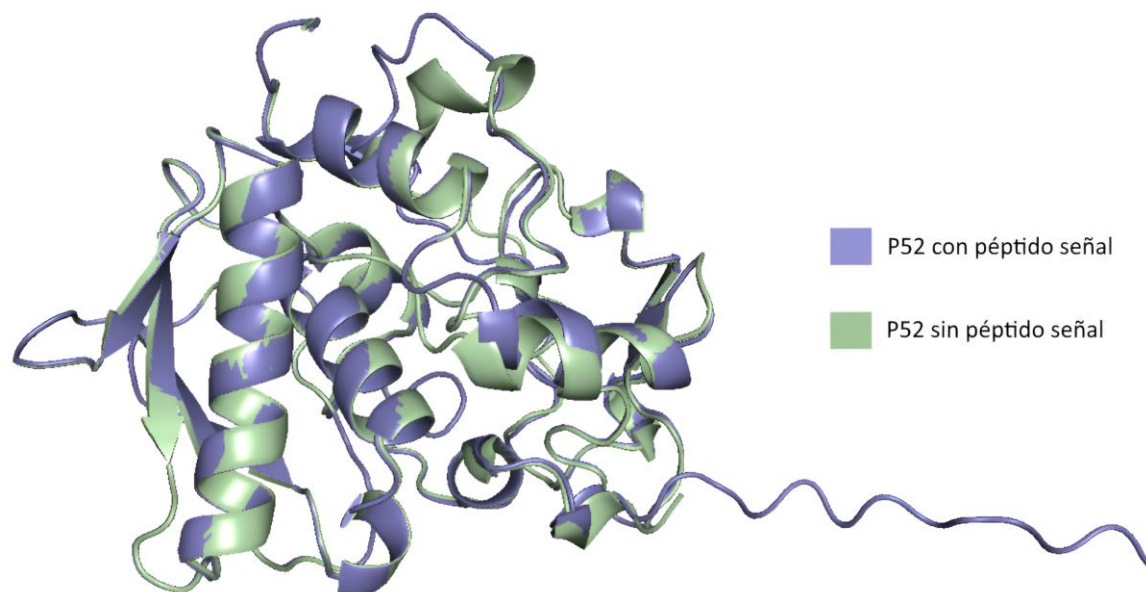


Figura 2.23. Alineamiento estructural de la proteína P52 con y sin péptido señal, realizado en PyMOL a partir del alineamiento de sus secuencias peptídicas. Se observa la superposición de ambas conformaciones con leves diferencias estructurales.

A diferencia de los resultados obtenidos mediante la búsqueda de similitud a nivel de secuencia con BLAST, el análisis estructural realizado con FoldSeek permitió identificar múltiples coincidencias de alta similitud tridimensional. Este resultado es esperable, dado que las estructuras proteicas tienden a estar más estrechamente asociadas a la función que las secuencias primarias, y por lo tanto suelen conservarse evolutivamente incluso en presencia de divergencia a nivel de aminoácidos. La búsqueda realizada en la base de datos AlphaFold Proteome, que reúne modelos estructurales predichos por AlphaFold, mostró un total de 579 hits, de los cuales 369 correspondieron a proteínas de nematodos. Al filtrar aquellos alineamientos con probabilidad posterior igual a 1, se obtuvieron 353 estructuras de alta confianza. De estas, 344 fueron anotadas como peptidasas y, entre los mejores hits ($n = 112$), se identificaron metaloendopeptidasas con coordinación de iones Zn^{2+} , todas ellas también provenientes de nematodos, incluidos representantes del Clado I.

Búsquedas complementarias en la base de datos de Swiss Prot, que presenta validación experimental, mostraron resultados concordantes, mostrando similitud con metaloendopeptidasas que coordinan Zn^{2+} , con probabilidades posteriores de 1 y valores de e-value entre $6,84 \times 10^{-16}$ y $6,34 \times 10^{-15}$, aunque estas coincidencias no provienen mayormente de organismos cercanos evolutivamente con excepción de *C. elegans*. Esto es consistente con la limitada disponibilidad de proteínas caracterizadas experimentalmente en organismos no modelo.

A partir de estas observaciones, se analizó la secuencia de P52 con el software PSIPRED, utilizando el modelo de predicción de coordinación de iones DMPmetal, el cual indicó interacción con iones Zn^{2+} en los residuos 126, 130 y 136. Al repetir la predicción estructural con AlphaFold3 incorporando explícitamente un catión Zn^{2+} , se observó una mejora notable en la calidad del modelo, particularmente en las regiones comprendidas entre los residuos 26 y 38, y entre 139 y 205. Como resultado, el 91 % de la proteína presentó valores de pLDDT superiores a 70, y un 75 %, incluyendo el sitio de coordinación del ion, superó el valor de 90 (Figura 2.24). En el modelo se observa una

coordinación con los residuos predichos por DMPmetal y adicionalmente un aspartato en la posición 23 (Figura 2.25).

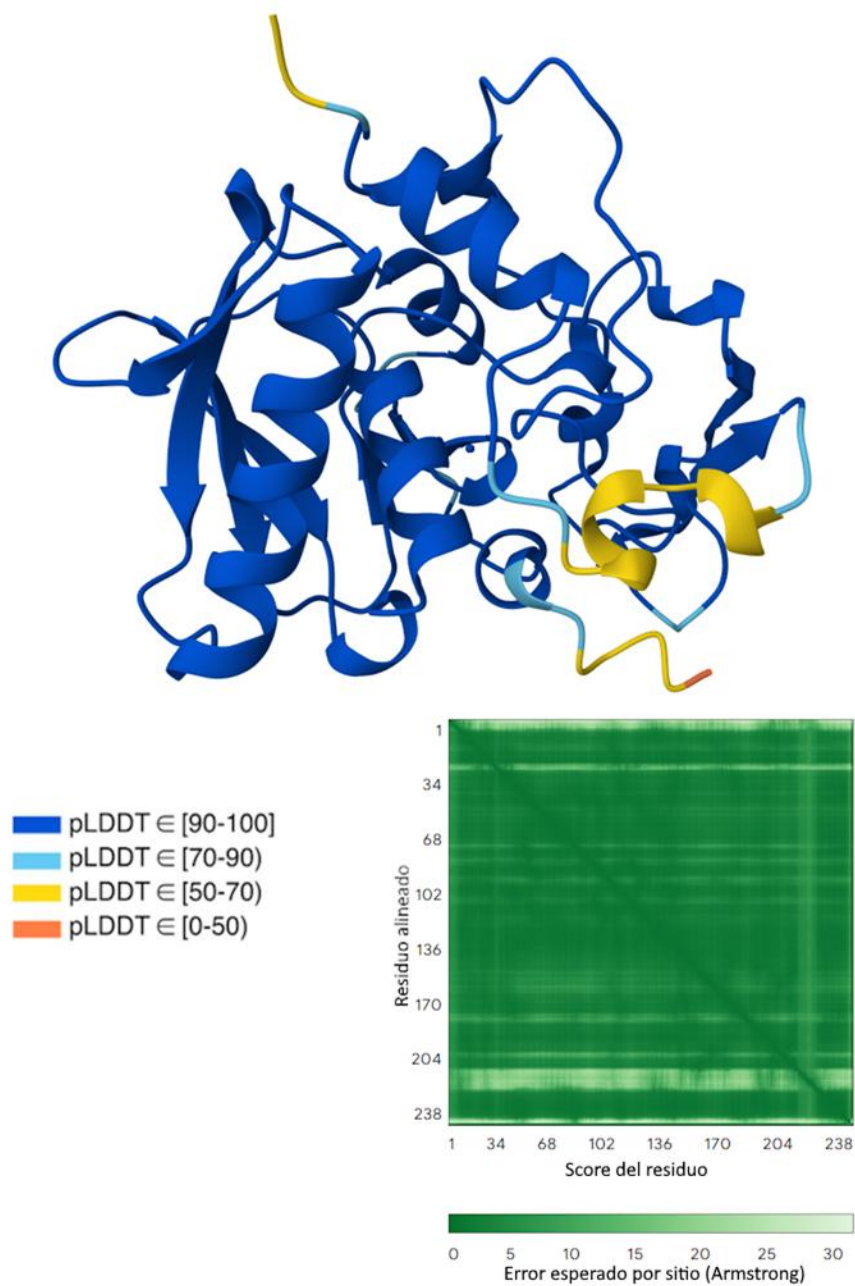


Figura 2.24. Estructura predicha de la proteína P52 coordinando un catión Zn^{2+} , obtenida mediante AlphaFold3. Se muestra en estilo cartoon con codificación por pLDDT y gráfico de error de posición esperado (EPE) por residuo.

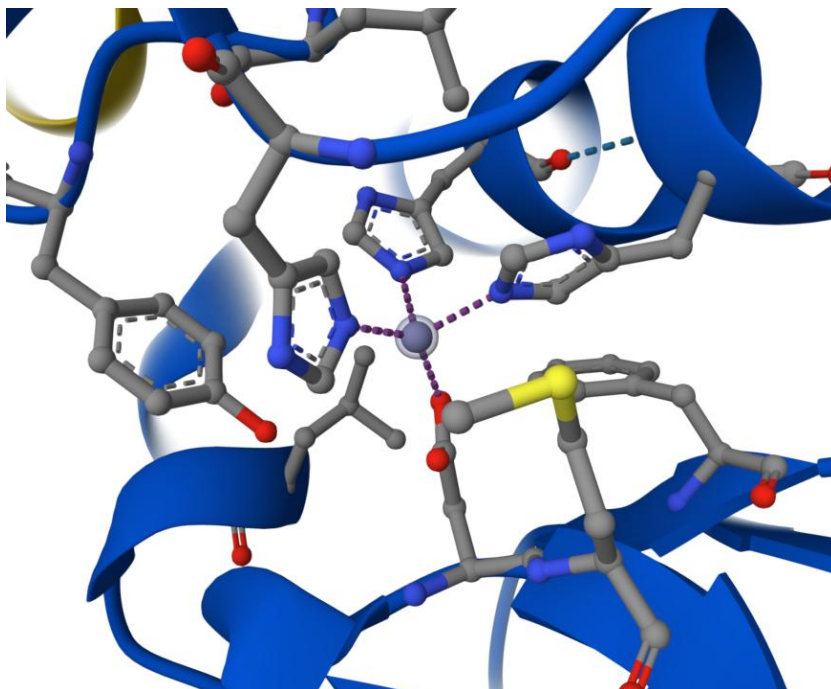


Figura 2.25. Detalle del sitio de coordinación del catión Zn^{2+} en el centro de la proteína P52. El ion se encuentra coordinado por cuatro residuos: Asp23, His126, His130 y His136.

La comparación entre las estructuras de la proteína P52 en ausencia y en presencia del ion Zn^{2+} , alineadas a partir de sus respectivas secuencias aminoácidas, mostró que las mejoras observadas en los niveles de confianza de la predicción estructural son consistentes con un cambio conformacional marcado. Este se refleja en un valor de RMSD de 0,392 Å, calculado sobre 1399 átomos. En conjunto, los resultados sugieren que la proteína adquiere una conformación más definida en presencia de Zn^{2+} (Figura 2.26).

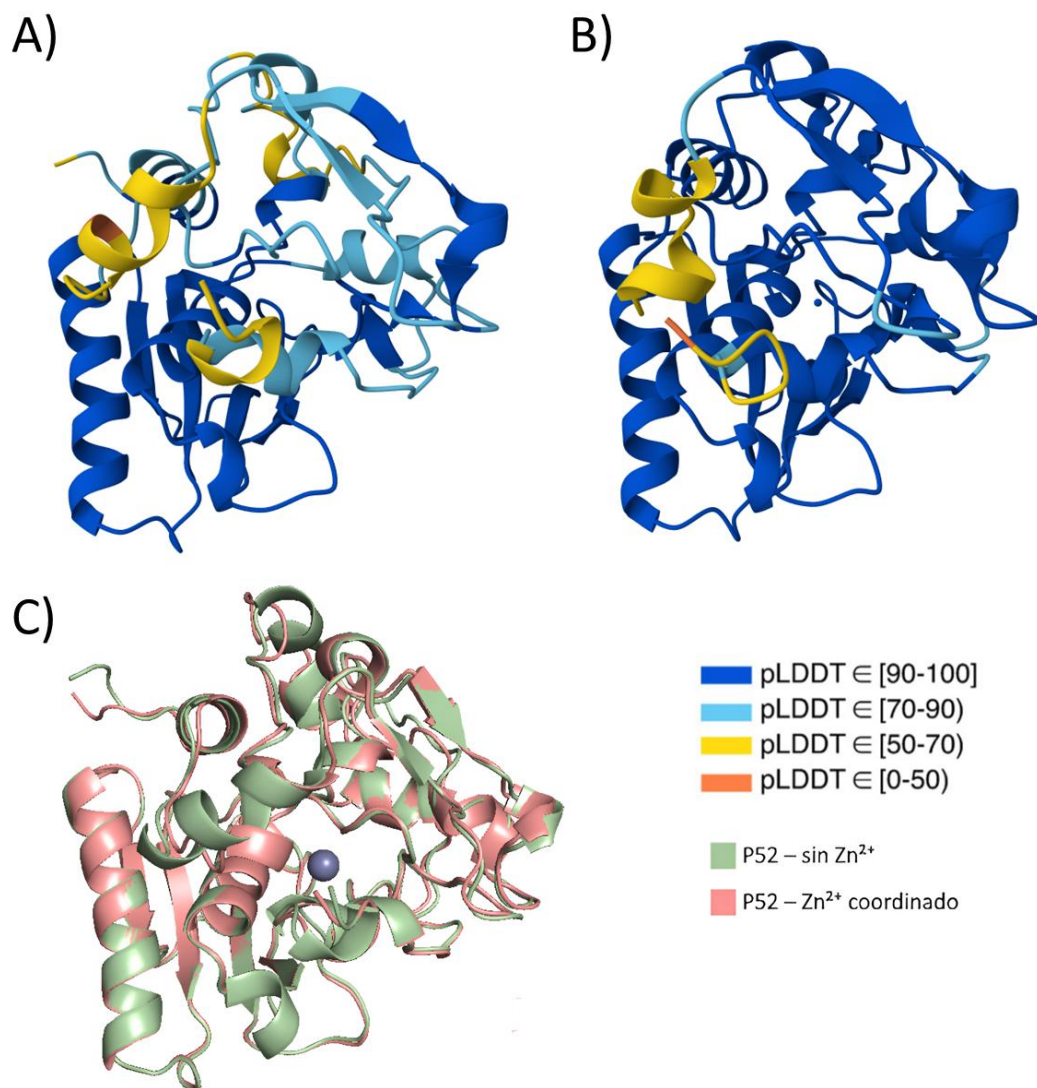


Figura 2.26. (A)

Estructura predicha de la proteína P52 sin coordinación de Zn²⁺. (B) Estructura de P52 coordinando un catión Zn²⁺, donde se observa una mejora en la calidad de la predicción estructural. (C) Alineamiento estructural entre ambos modelos, evidenciando los cambios conformacionales inducidos por la presencia del ion metálico.

Dado que la secuencia peptídica de esta proteína no mostró coincidencias en las búsquedas de dominios conservados ni se encuentra anotada en bases de datos funcionales, se repitió la búsqueda estructural mediante FoldSeek utilizando el modelo que incluye la coordinación con Zn²⁺. A partir de los mejores hits obtenidos, se analizó la información estructural y funcional de las proteínas con mayor similitud. Entre ellas se destaca una estructura predicha de *Trichuris trichiura* (clado compartido con *D. renale*, UniProt: A0A077YYG0), una validada a nivel transcripto de *Caenorhabditis elegans* (Q9U3S9) y una proteína caracterizada experimentalmente en la araña *Loxosceles intermedia* (A0FKN6). Todas ellas presentan de forma consistente dominios conservados de unión a Zn²⁺ (PROSITE: PS0014) y el dominio característico de la familia astacina (PROSITE: PS51864), una clase de metaloendopeptidasas ampliamente distribuida en animales, con funciones que varían desde factores de desarrollo en *C. elegans* hasta proteasas gástricas en el cangrejo de río *Astacus astacus*. Además, comparten un

dominio estructural correspondiente a la superfamilia de colagenasas (CATH: 3.40.390.10), cuyas proteínas integrantes son mayoritariamente metaloproteasas y productos de excreción. Las comparaciones estructurales mostraron una similitud considerable con la proteína P52, con valores de TM-score de 0,7149 y RMSD de 3,91 Å para *T. trichiura*, TM-score de 0,7682 y RMSD de 3,63 Å para *C. elegans*, y TM-score de 0,7957 con un RMSD de 3,52 Å para *L. intermedia*.

Discusión

La diotofimosis es una enfermedad parasitaria de relevancia médica y veterinaria, causada por *D. renale*, que en la actualidad no presenta métodos diagnósticos que permitan preveer el desarrollo del adulto del parásito, evitando la presentación clínica más severa. Ante esta situación, y considerando el riesgo que representa para la salud animal y humana, resulta prioritario avanzar en el desarrollo de herramientas diagnósticas sensibles y específicas que permitan su detección temprana. En este contexto, LES producido por *D. renale* constituye una fuente valiosa de biomoléculas con potencial diagnóstico. Las proteínas presentes en estos productos cumplen un rol clave en la interfaz hospedador-parásito, al modular directamente la respuesta inmunitaria del hospedador. En esta especie, los ensayos ELISA realizados con homogenatos de distintos tejidos han demostrado que tanto el esófago como, más recientemente, el LES son las únicas fracciones capaces de discriminar entre sueros de perros infectados y no infectados (De Almeida Capella et al., 2022, 2024; Pedrassani et al., 2015). Este enfoque ha sido exitoso en otras especies de nematodos, como *Ancylostoma* spp., *Anisakis* spp., *Trichuris* spp. y *Strongyloides* spp., donde el análisis proteómico del LES mediante espectrometría de masas permitió identificar blancos terapéuticos y candidatos diagnósticos (Soleymani et al., 2024). Desde una perspectiva diagnóstica, los marcadores proteicos derivados del LES podrían superar las limitaciones de las pruebas parasitológicas convencionales, al constituir una alternativa más sensible, específica y no invasiva, capaz de detectar distintos estadios del parásito y facilitar diagnósticos tempranos, incluso en ausencia de signos clínicos (Tiberti et al., 2024).

Si bien existen estudios previos que caracterizan proteínas del LES en otros nematodos parásitos, en el presente trabajo se obtuvo por primera vez el perfil proteómico del LES de *D. renale*, identificándose un total de 584 proteínas con péptidos de alta coincidencia espectral. Este resultado se basa en la comparación entre los espectros de masas de los péptidos obtenidos experimentalmente y los espectros predichos *in silico* a partir del ensamblado genómico preliminar de *D. renale*. En consecuencia, muchas de las proteínas identificadas presentan homología con otras proteínas de nematodos y de organismos del clado Ecdysozoa, lo que no solo permite una caracterización detallada de los tejidos analizados, sino que también respalda la calidad del ensamblado genómico de esta especie utilizado como referencia (Maldonado et al., en preparación).

La obtención del proteoma del LES, a partir de adultos machos y hembras, y de la banda donde se observó reactividad diferencial frente a los sueros (+) y (-) constituye una fuente de información valiosa tanto para este estudio como para futuras investigaciones orientadas al desarrollo de diagnósticos, búsqueda de blancos terapéuticos o antígenos vacunales potenciales. Esta línea de trabajo adquiere particular relevancia en un contexto donde la diotofimosis en perros puede alcanzar prevalencias superiores al 30 % (Burgos et al., 2015; Radman et al., 2017), donde la infección cursa frecuentemente de manera asintomática (Khullar et al., 2022), y donde aún se desconoce la identidad del hospedador intermediario en la región, dificultando el control ambiental del ciclo biológico. Así, el diagnóstico temprano y el tratamiento oportuno en los hospedadores definitivos se

presentan como las principales estrategias para interrumpir el ciclo de vida parasitario, y en consecuencia, la transmisión y así lograr el control de la enfermedad.

En este trabajo se realizó el primer análisis del perfil proteómico no sólo del LES sino también del esófago, cuyo poder diagnóstico ya fue ampliamente demostrado por Pedrassani et al. (2015) y Capella et al. (2024), en búsqueda de proteínas posibles blanco serodiagnóstico. Como primer criterio de filtrado, se excluyeron las proteínas con baja cobertura de péptidos hallados en el proteoma y aquellas fuera del rango de tamaño de interés. Este paso fue el que más redujo el número de candidatos. Cabe destacar que en este análisis se priorizaron 18 proteínas detectadas en el esófago, de las cuales 6 también estaban presentes en el LES. No se trabajó directamente con proteínas exclusivas del LES, ya que los homogenatos de esófago han sido ampliamente utilizados en ensayos serológicos tipo ELISA, y cuentan con mayor respaldo experimental en cuanto a su antigenicidad. De hecho, su sensibilidad diagnóstica ha demostrado ser superior a la de métodos convencionales como el análisis de orina o la ecografía, incluso cuando estos se aplican de manera combinada (De Almeida Capella et al., 2024). La selección final de candidatos consideró, además de los criterios de expresión y cobertura, su localización anatómica, su potencial antigénico y su especificidad.

Finalmente se seleccionaron cuatro proteínas candidatas para su expresión recombinante y posterior evaluación mediante western blot. Al momento del análisis, ninguna de ellas mostró similitud evidente con proteínas previamente caracterizadas, por lo que no fue posible inferir una función hipotética. Su detección tanto en el esófago como en el LES sugiere una posible interacción con el sistema inmune del hospedador y, junto con su ausencia de homología con proteínas conocidas y su alto potencial antigénico evaluado *in silico* mediante métodos independientes, las posiciona como prometedores marcadores serodiagnósticos. Las cuatro proteínas fueron exitosamente amplificadas a partir de ARN mensajero mediante RT-PCR, y tres de ellas fueron secuenciadas desde el vector con resultados Sanger de alta calidad. Esto no solo confirma el éxito en la clonación, sino que también permite validar experimentalmente la predicción genómica original. Las proteínas propuestas para validación experimental fueron:

P5212: Esta proteína se detectó con gran abundancia en los perfiles proteómicos de todos los tejidos evaluados, incluyendo tanto el esófago como el LES. Aunque presentó hits de homología en múltiples especies, los porcentajes de identidad fueron bajos (<40 %) y correspondieron mayormente a proteínas hipotéticas o escasamente caracterizadas. Este patrón, consistente con una expresión amplia en tejidos del parásito y escasa similitud con proteínas conocidas, sugiere un buen equilibrio entre sensibilidad y especificidad diagnóstica. Además, P5212 mostró una alta cobertura de epítomos lineales con elevado potencial inmunogénico, una característica especialmente favorable para técnicas como el western blot, en las que los epítomos se encuentran en conformaciones desnaturalizadas. Cabe destacar que fue la proteína con mayor rendimiento en la purificación.

P9932. Esta proteína se detectó con alta abundancia en el esófago y también estuvo presente en la pared corporal y en la gónada. Aunque se identificó en algunas fracciones del LES, presentó una cobertura peptídica del 25 %, por lo que fue descartada en los primeros pasos del filtrado. Sin embargo, es importante destacar que las proteínas con baja cobertura en el LES podrían estar subrepresentadas debido al ambiente proteolítico en el que se encuentran, lo cual podría afectar su detección. Por su localización anatómica, es accesible al sistema inmune del hospedador. En cuanto al análisis de homología, mostró un número intermedio de hits respecto de las otras candidatas, pero con porcentajes de identidad superiores al 40 % y E-values menores a 1E-80 frente a proteínas aún no caracterizadas en *Soboliphyme baturini* (Clado I, Orden Dioctophymatida) y en otros nematodos pertenecientes a distintos clados del phylum, lo que sugiere la existencia de homólogos funcionales y un riesgo

potencial de reactividad cruzada. A nivel fisicoquímico global, fue predicha como un antígeno potencial. No obstante, la predicción de epítomos lineales por alineamiento resultó limitada, y su secuencia incluye 26 modificaciones postraduccionales previstas que podrían interferir aún más en la detección *in vivo*. Durante el proceso de purificación, se encontró en la fracción insoluble, aunque fue posible su resuspensión y separación en solución de urea 8M.

P2454. Esta proteína se detectó en alta abundancia en los proteomas del esófago, la pared corporal, el tracto digestivo y la gónada, aunque no se identificó en los resultados proteómicos del LES. Al igual que las demás candidatas seleccionadas, P2454 se encuentra representada de forma consistente en tejidos expuestos al sistema inmunitario del hospedador. Después de P52, fue la proteína que presentó coincidencias en el menor número de especies, restringidas a nematodos del Clado I, incluyendo *Soboliphyme baturini*, y asociadas a proteínas hipotéticas aún no caracterizadas. Al igual que P5212, mostró una alta cobertura de epítomos lineales con elevado potencial inmunogénico. Las predicciones de modificaciones postraduccionales revelaron cinco sitios de fosforilación y cinco de hidroxilación, siendo la única proteína del conjunto en presentar este tipo específico de modificaciones, las cuales podrían influir en su inmunogenicidad o estabilidad estructural. Si bien fue posible obtener amplicones correspondientes a su secuencia (Figura 2.18), la calidad y cantidad del producto no resultaron suficientes para avanzar con la clonación, y considerando su ausencia en el LES, se decidió prescindir de continuar su análisis dentro del presente trabajo de tesis.

P52. Esta proteína se destacó como la candidata más prometedora del conjunto analizado. Se detectó exclusivamente en el esófago y en el LES, sin presencia en otros tejidos con datos proteómicos disponibles, lo que la señala como posible responsable de la respuesta diferencial observada entre sueros positivos (S+) y negativos (S-) en dichos tejidos. Los análisis de homología revelaron un único hit en las bases de datos, correspondiente a una peptidasa de *Triplophysa rosa*, un pez de agua dulce de China, con una identidad del 30 %, una cobertura del 87 % y un E-value de $2E-10$. Este hallazgo, sin coincidencias con nematodos, parásitos ni hospedadores mamíferos, resalta su especificidad diagnóstica. En cuanto a su potencial antigénico, fue la proteína que presentó los valores más altos según ambos algoritmos utilizados, tanto en la evaluación global como en la extensión de regiones con alta probabilidad de contener epítomos. Además, mostró una elevada densidad de epítomos contiguos, tanto lineales como estructurales, lo que refuerza su idoneidad. Presentó la menor cantidad de modificaciones postraduccionales predichas (cuatro). También se identificó un péptido señal de secreción tipo I con sitio de escisión entre los residuos 19 y 20, consistente con su liberación activa al LES. Durante el proceso de purificación, al igual que P9932, se encontró en la fracción insoluble y fue inicialmente resuspendida en urea 8 M; sin embargo, este procedimiento no permitió una purificación eficiente. Fue necesario repetir el proceso desde la resuspensión del pellet bacteriano en urea 8 M y con inhibidores de proteasas, lo que permitió una recuperación más efectiva. No obstante, se observó una disminución progresiva en la intensidad de la banda tras sucesivos SDS-PAGE, lo que sugiere una vida útil reducida de la proteína purificada.

En el análisis del potencial antigénico mediante ensayos de Western Blot no se observó una respuesta diferencial frente a sueros positivos S(+) y negativos S(-) en las proteínas recombinantes P5212 ni P9932, mientras que en el caso de P52 sí, se evidenció una discriminación clara entre ambos tipos de suero. En el caso de P9932, no se detectó inmunorreactividad con ninguno de los sueros evaluados, con excepción de una muestra en la que se sospecha una reacción inespecífica atribuible a proteínas de *E. coli*. En P5212, se observaron respuestas positivas en algunos ensayos, lo que indica que esta proteína es reconocida por el sistema inmune del hospedador. Este resultado concuerda con su elevada abundancia en todos los tejidos del parásito adulto analizados y con el alto

potencial inmunogénico predicho *in silico*. No obstante, la detección de reacciones positivas y negativas tanto con S(+) como con S(−) indica que no permitiría diferenciar de forma efectiva entre perros infectados y no infectados.

Como se mencionó anteriormente, P52 mostró una respuesta diferencial consistente ante la exposición a ambos tipos de suero, sin falsos positivos ni falsos negativos evidentes, a pesar de la baja cantidad de proteína purificada disponible para su siembra en gel. Resulta especialmente relevante que, según lo observado en los geles réplica, P52 fue la proteína menos abundante durante los ensayos, en contraste con P5212 y P9932, que fueron las más abundantes. Esta observación sugiere que P52 no solo posee capacidad para discriminar sueros, sino también una alta sensibilidad para hacerlo.

En algunos ensayos, frente a S(−), se detectó una intensa reactividad en las muestras de LES y esófago, pero no en las proteínas candidatas. Este patrón podría explicarse por la presencia de proteínas homólogas a otros nematodos parásitos, evidenciada en los análisis de proteoma, o bien por un reconocimiento policlonal frente al amplio conjunto de proteínas presentes en esos tejidos o fluidos. En otros casos, la reactividad fue baja en LES y esófago, pero elevada frente al homogenato de *E. coli*, lo cual se replicó también en las calles correspondientes a las proteínas recombinantes. Esta reactividad es esperable, dado que *E. coli* forma parte de la microbiota intestinal de mamíferos y puede desencadenar respuestas inmunes en condiciones de sobrecrecimiento o inmunosupresión del hospedador. En tales situaciones, las bandas observadas podrían corresponder a proteínas bacterianas y no a la proteína recombinante expresada. Estos resultados resaltan la necesidad de procedimientos de purificación más específicos para futuras aplicaciones diagnósticas. Si bien la cromatografía por afinidad resulta adecuada para ensayos exploratorios, el desarrollo de técnicas como ELISA, que no permiten discriminar por tamaño molecular, o su implementación en entornos clínicos exige estrategias complementarias de purificación, como la cromatografía por exclusión molecular o la diálisis, para eliminar proteínas contaminantes derivadas de la cepa de expresión.

En cuanto al análisis estructural de P52, se observó una estructura tridimensional de alta confiabilidad, con valores de pLDDT superiores a 90 en la mayor parte de su secuencia y se reconfirmó la presencia de un péptido señal. La remoción del péptido señal produjo cambios leves en la estructura, mientras que la incorporación de un catión Zn^{2+} no sólo mejoró notablemente la predicción estructural (RMSD = 0,392 Å), sino que también fue respaldada con varios análisis complementarios: la detección de homólogos estructurales con sitios de unión a Zn^{2+} en bases de datos especializadas, el aumento en la confianza del modelo estructural al incluir dicho catión, y por la predicción de sitios de coordinación por DMPmetal en las histidinas 126, 130 y 136, así como una posible interacción adicional predicha por AlphaFold 3 con el residuo Asp23 (Figura 2.25).

Las búsquedas por similitud estructural ofrecieron un mayor número de coincidencias y de mejor calidad que aquellas basadas en secuencia, lo cual resulta esperable dado que la estructura tridimensional suele conservarse más estrechamente con la función biológica a lo largo de la evolución. Estas búsquedas, realizadas sobre la proteína sin péptido señal y coordinando Zn^{2+} , revelaron una alta similitud con metaloproteasas dependientes de Zn^{2+} pertenecientes a la superfamilia de colagenasas, en particular con la familia de las astacinas. Esta familia de metalopeptidasas está asociada en metazoos y especialmente en nematodos a funciones fisiológicas diversas como la digestión, la morfogénesis y la eclosión de huevos (Bond y Beynon, 1995; Möhrle et al., 2003). Dado que estas funciones no se esperan en el estadio adulto, al menos en lo referido a la eclosión o al remodelado tisular, y considerando su localización específica en el esófago y en el LES, se plantea la hipótesis de que P52 participa en la digestión externa del parénquima renal del hospedador, facilitando así la alimentación del parásito. La actividad proteasa hipotética es consistente con observaciones experimentales durante su purificación: las bandas

obtenidas en SDS-PAGE fueron tenues y disminuyeron progresivamente al reutilizar la misma alícuota purificada, lo que sugiere una posible autodegradación. En el cangrejo de río (*Astacus astacus*), donde esta proteína fue caracterizada por primera vez como una enzima digestiva, se observó que al ser expresada y plegada de forma heteróloga puede presentar comportamiento autoproteolítico *in vitro* (Stöcker y Yiallourous, 2004). En nuestro caso, la purificación eficiente de P52 sólo fue posible bajo condiciones desnaturalizantes y en presencia de inhibidores de proteasas. En ensayos de expresión realizados sin inhibidores, como el screening de expresión de las colonias, se observaron patrones compatibles con degradación proteolítica, incluyendo bandas de bajo peso molecular posiblemente atribuibles a productos generados por la actividad proteasa.

En conjunto, estos hallazgos identifican a P52 como una candidata altamente prometedora para el desarrollo de herramientas diagnósticas. A futuro, y a partir de los resultados obtenidos en este estudio, será posible avanzar hacia la implementación de ensayos ELISA utilizando un mayor número de sueros de perros infectados y no infectados, o incluso evaluar su utilidad como marcador de infección activa mediante ensayos de Western blot con anticuerpos anti-IgM. También podrían desarrollarse análisis de actividad proteasa en presencia y ausencia de agentes quelantes y evaluar la dependencia al Zn^{2+} . Finalmente, cabe destacar que, además de P52, se propuso un conjunto de proteínas candidatas seleccionadas a partir del esófago y del LES, cuyas características fueron evaluadas *in silico* y que podrán ser expresadas y analizadas experimentalmente siguiendo la misma estrategia aplicada en esta tesis. Estos desarrollos podrían ser el precursor de un test serológico capaz de reemplazar el uso de homogenatos de esófago por una proteína recombinante de alta sensibilidad. Esta estrategia no solo facilitaría la estandarización y producción a gran escala, sino que también evitaría la necesidad de obtener ejemplares adultos del parásito, lo que representa una ventaja logística significativa, caminando hacia métodos más eficaces para la detección y control de la dioctofimosis.

Conclusiones Generales

En esta tesis, se integraron enfoques basados tanto en marcadores genéticos como en marcadores proteicos, lo que permitió abordar de manera complementaria la caracterización del parásito *D. renale*. Mientras los primeros aportaron información sobre la diversidad genética, estructura poblacional y dinámica evolutiva del parásito, los segundos permitieron identificar candidatos con potencial diagnóstico directo, centrados en proteínas expresadas o secretadas durante la infección. Esta estrategia integrada no sólo enriqueció la comprensión de la biología del agente, sino que también sentó las bases para el desarrollo de herramientas diagnósticas más específicas, sensibles y adaptables a distintas condiciones clínicas y epidemiológicas.

En este estudio se desarrollaron herramientas moleculares orientadas al estudio de este parásito en fauna silvestre. Se establecieron marcadores genéticos que permiten investigar su diversidad genética e identificar ejemplares en casos crípticos. En particular, se diseñaron y validaron nuevos marcadores mitocondriales basados en el gen COX1, explorando distintas regiones del mismo, y en el gen ND4, evaluando su aplicabilidad tanto para la identificación molecular como para estudios de diversidad intraespecífica. Este trabajo constituye el primer registro molecular de la secuencia *barcode* de Folmer para esta especie. Además, los fragmentos obtenidos demostraron ser alternativas sensibles y específicas que complementan las limitaciones del análisis morfológico tradicional, especialmente ante muestras degradadas o de escasa disponibilidad. Además, mediante un enfoque filogeográfico, este estudio identificó patrones de diferenciación genética en *D. renale* en nuestra región. Hasta el momento, la información disponible sobre la diversidad genética de este nematodo zoonótico, ampliamente distribuido en el mundo y con elevadas prevalencias en regiones ribereñas de Argentina y Brasil, era extremadamente escasa. Nuestro trabajo constituye el primer aporte sistemático sobre su variabilidad genética en Sudamérica. Si bien los niveles de divergencia observados no permiten confirmar un fenómeno de especiación, y se precisa un número mayor de datos para poder elaborar una conclusión definitiva, los análisis realizados evidencian una estructura genética consistente con procesos de vicarianza entre el norte y el sur del continente, en concordancia con el Gran Intercambio Biótico Americano, y remarcan la necesidad de ampliar los estudios genómicos en este grupo poco representado en las bases de datos moleculares disponibles a nivel global. Los resultados sugieren que *D. renale* ha estado presente en Sudamérica el tiempo suficiente como para haber generado linajes genéticos locales, refutando la hipótesis de una introducción reciente desde otras regiones. A pesar de su amplia distribución, los datos moleculares no evidencian señales claras de expansión poblacional. Las filogenias, por su parte, revelaron patrones de transmisión bidireccional entre localidades y entre hospedadores silvestres y domésticos.

Además del abordaje ecoepidemiológico de *D. renale*, este estudio se centró en la identificación de biomarcadores proteicos con potencial diagnóstico, orientados a facilitar la detección temprana de la infección y, en consecuencia, contribuir al control y mitigación de esta parasitosis. Se caracterizó por primera vez el proteoma del líquido de excreción/secreción (LES) y del esófago del parásito, generando perfiles detallados que aportan información valiosa tanto para el desarrollo de aplicaciones diagnósticas y terapéuticas como para una comprensión más profunda de su biología e interacción con el hospedador. A partir de este análisis, se identificaron cientos de proteínas, de las cuales cuatro fueron seleccionadas mediante criterios relacionados con su localización tisular, especificidad y antigenicidad, para ser expresadas de forma recombinante y validadas experimentalmente. Entre ellas, la proteína P52 se destacó por su reactividad diferencial frente a sueros de perros infectados y no infectados. Esta proteína, exclusiva del LES y del esófago, presenta un alto potencial antigénico,

carece de homología con proteínas previamente descritas en hospedadores o parásitos conocidos, y exhibe similitud estructural con metaloproteasas tipo astacina, lo que sugiere un rol funcional en la digestión del parénquima renal. Su perfil inmunogénico, junto con estas características bioquímicas y estructurales, la posiciona como una candidata promisorio para el desarrollo de herramientas serológicas específicas para el diagnóstico de la dioctofimosis.

Los hallazgos de esta tesis contribuyen significativamente al conocimiento sobre *D. renale*, al proporcionar herramientas moleculares y proteicas que fortalecen la capacidad para diagnosticar, monitorear y comprender la ecología, evolución y funcionalidad de este nematodo zoonótico. Los resultados obtenidos amplían el panorama molecular y evolutivo de la especie y sientan las bases para futuros desarrollos tecnológicos orientados al diagnóstico y control de la dioctofimosis. Además, el enfoque integrativo aplicado en este trabajo ofrece un modelo replicable para el estudio de otros helmintos zoonóticos poco caracterizados, contribuyendo así al fortalecimiento de estrategias interdisciplinarias en el abordaje de enfermedades parasitarias emergentes.

Apéndice

Filogenia COX1-S

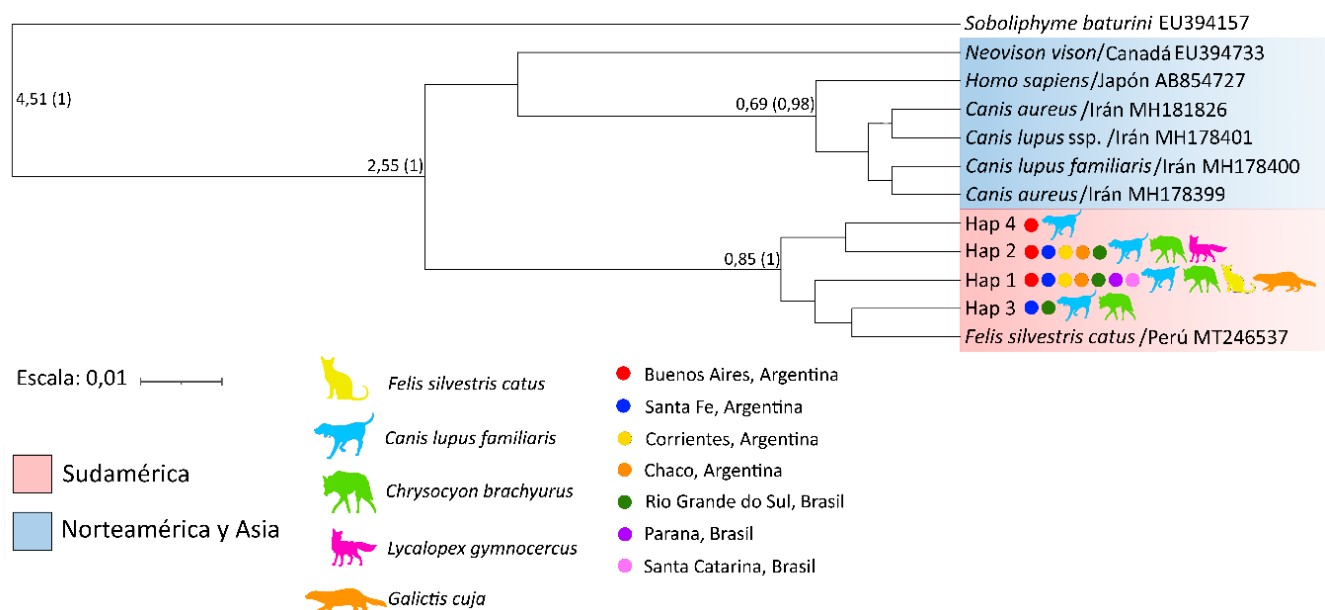


Figura A1. Filogenia para la región COX1-S por inferencia bayesiana obtenida con software BEAST v2.6.7 y graficada con herramienta online iTOL utilizando los haplotipos encontrados en este estudio y disponibles en la base de datos del GenBank para *Dioctophyme renale*. La secuencia de *Soboliphyme baturini* fue incluida como outgroup. Los nodos muestran el tiempo en Ma y entre paréntesis la probabilidad posterior. Al tratarse de una región acotada, la amplificación es más sensible y permite incorporar muestras en estado de conservación deficiente, adicionando aquellas provenientes de *Galictis cuja* al análisis. Además, permite la comparación con la secuencia obtenida en el primer estudio molecular del parásito aislado de un caso humano en Japón (Tokiwa et al., 2014).

Colony PCR de proteínas clonadas

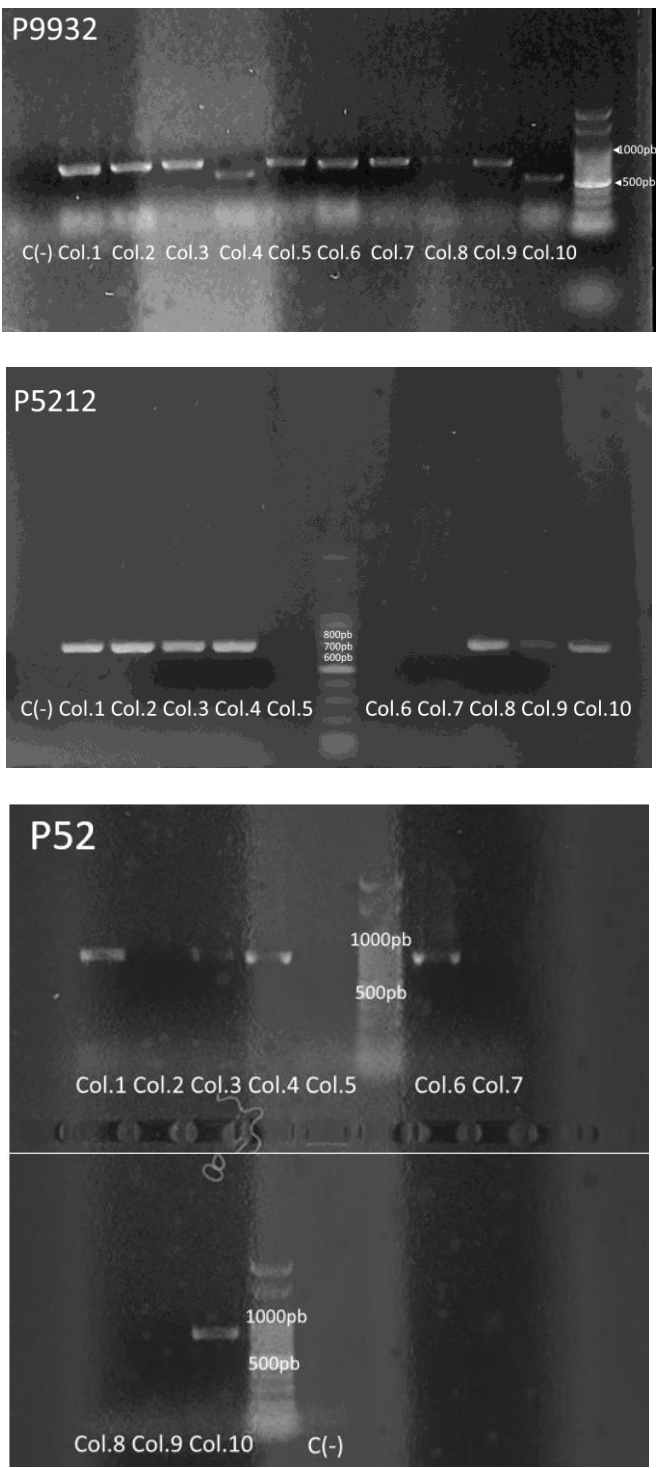
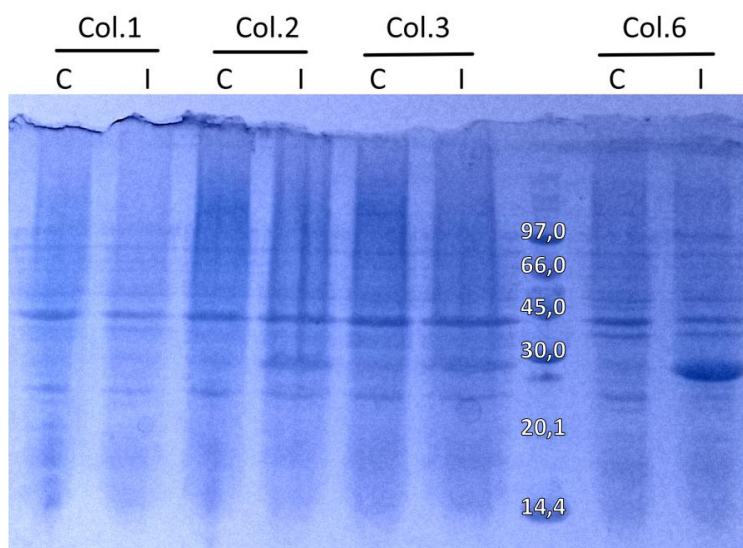


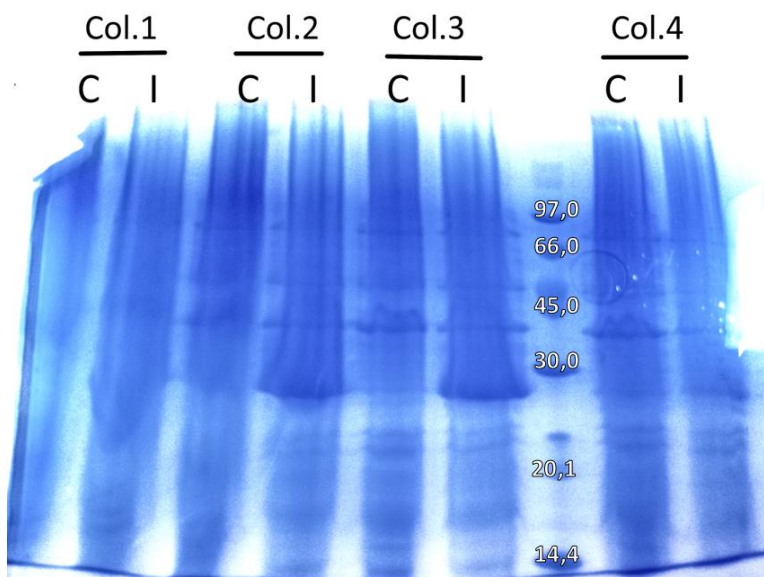
Figura A2. Se muestran los productos de colony PCR en gel de agarosa de las colonias de *Escherichia coli* BL21 aisladas en medio LB-Agar suplementado con kanamicina luego de la transformación.

Screening de expresión de proteínas candidatas

P9932



P5212



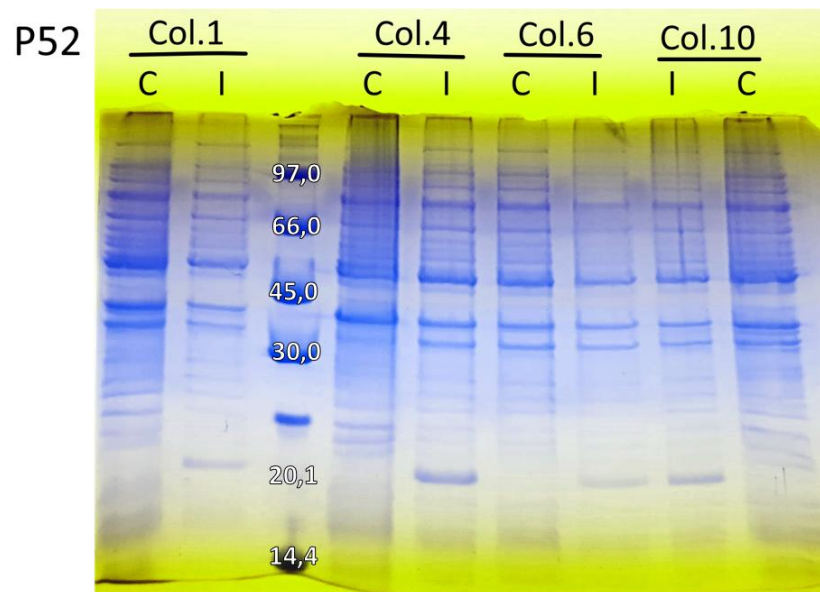


Figura A3. Se muestran los Screening de Expresión de las proteínas candidatas en colonias (Col.) de *Escherichia coli* BL21 crecidas en medio LB suplementado con kanamicina para cada proteína diana. Colonias control (C) e inducidas (I) con IPTG.

Marcha de purificación de proteínas candidatas

P9932

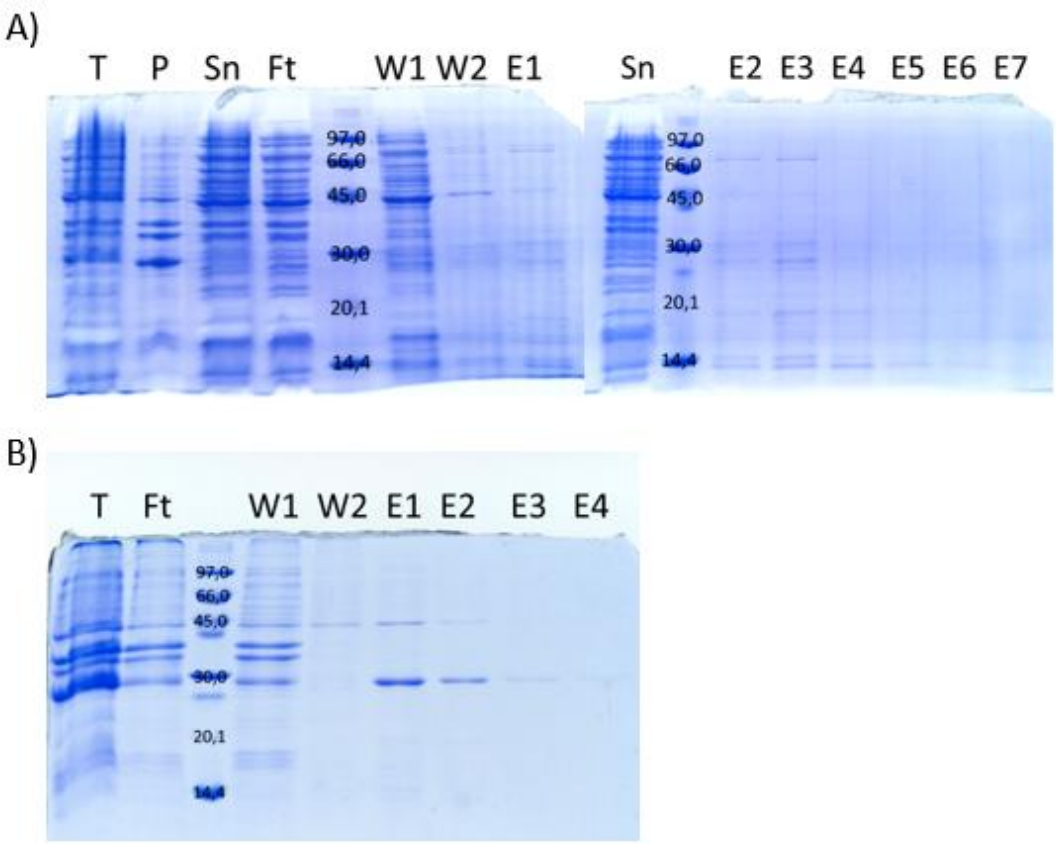


Figura A4. Marcha de purificación por cromatografía de afinidad de P9932. A) Primera purificación desde el sobrenadante. B) Segundo intento de purificación resuspendiendo el pelet en Urea 8M. Homogenato total (T). Pelet (P) y sobrenadante (S) luego del lisado de células. No retenido (Ft). Primer (W1) y Segundo lavado (W2). Primera (E1), segunda (E2) y tercera (E3) elución.

P52

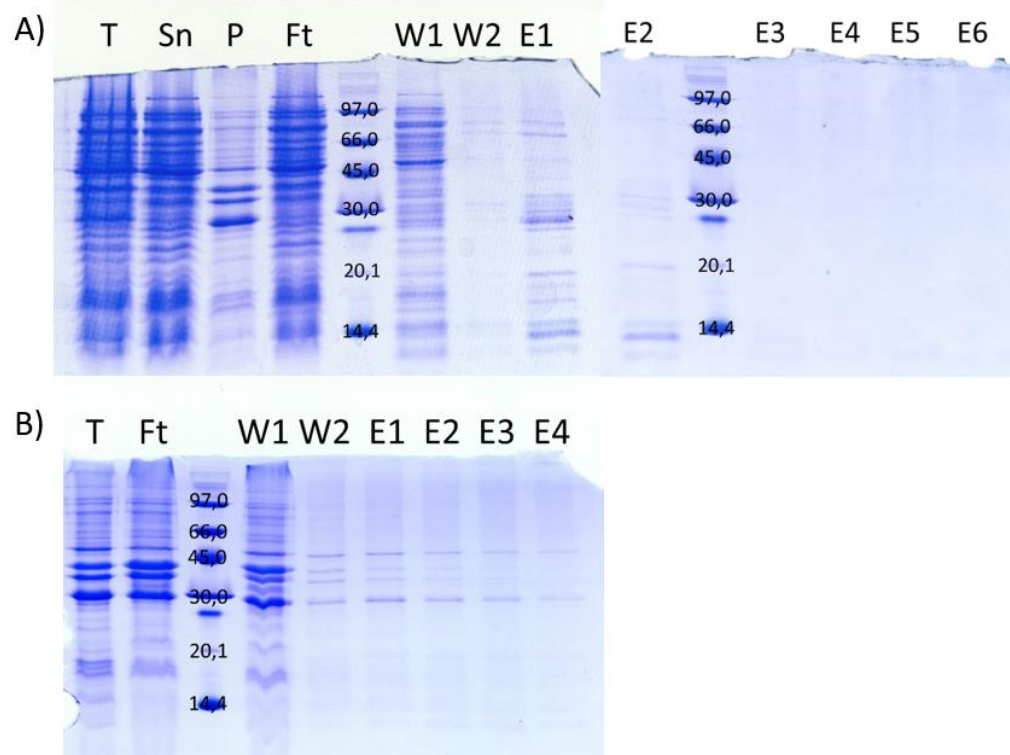


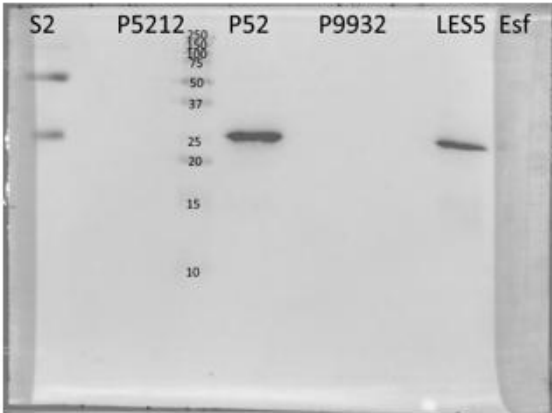
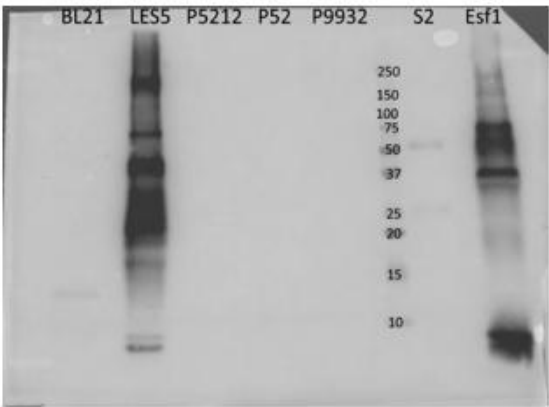
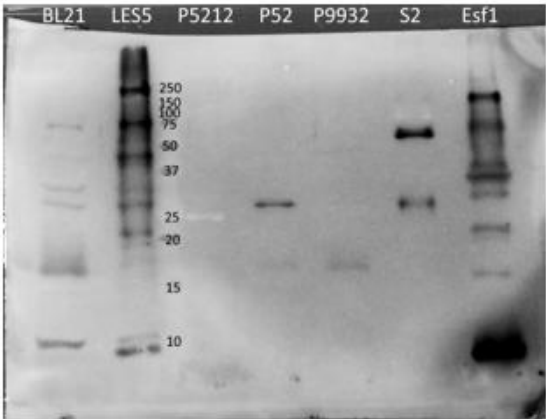
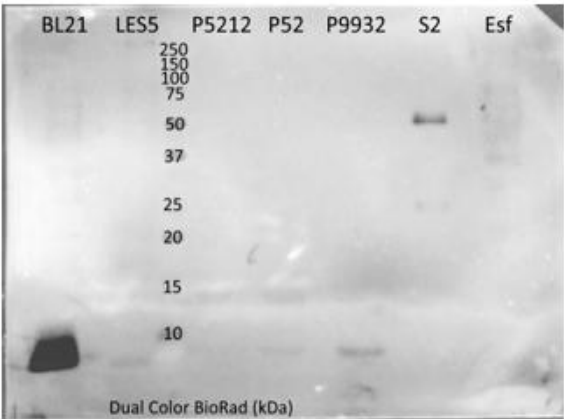
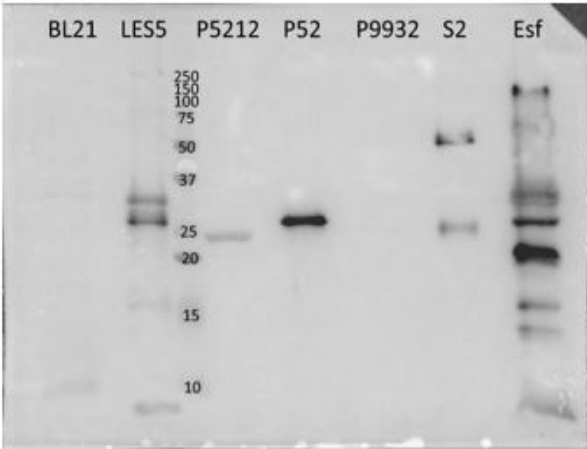
Figura A5. Marcha de purificación por cromatografía de afinidad de P9932. A) Primera purificación desde el sobrenadante. B) Segundo intento de purificación resuspendiendo el pelet en Urea 8M. Homogenato total (T). Pelet (P) y sobrenadante (S) luego del lisado de células. No retenido (Ft). Primer (W1) y Segundo lavado (W2). Primera (E1), segunda (E2) y tercera (E3) elución.

Western blot de proteínas seleccionadas frente a sueros (+) y (-)

S(-)



S(+)



S(-)

S(+)

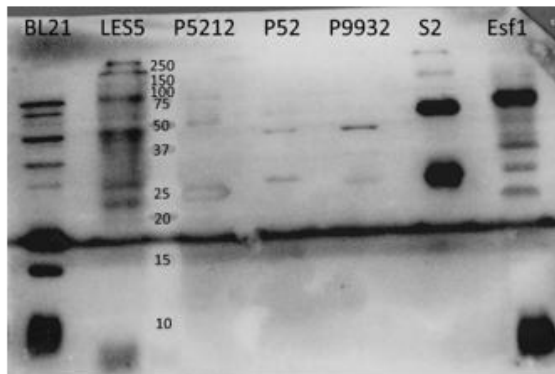
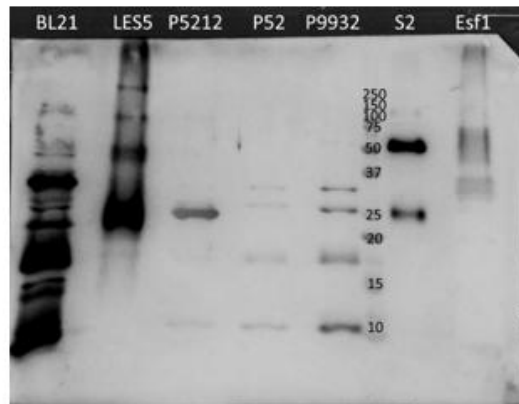
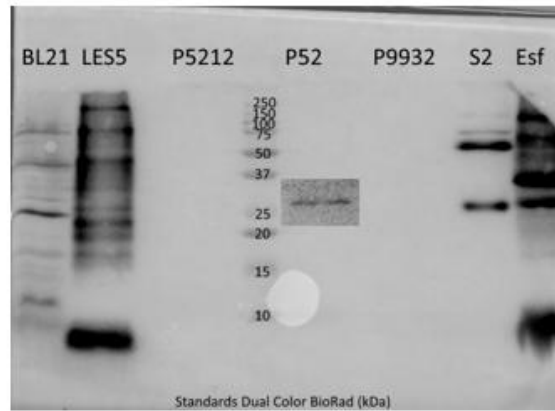
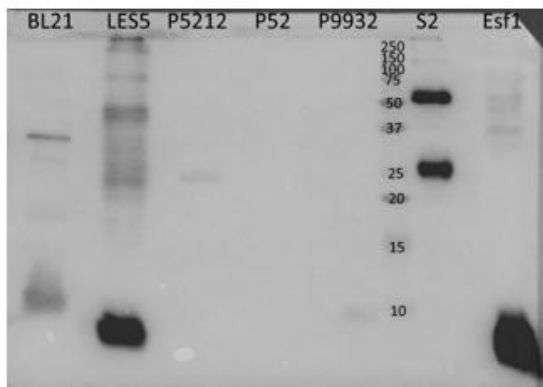
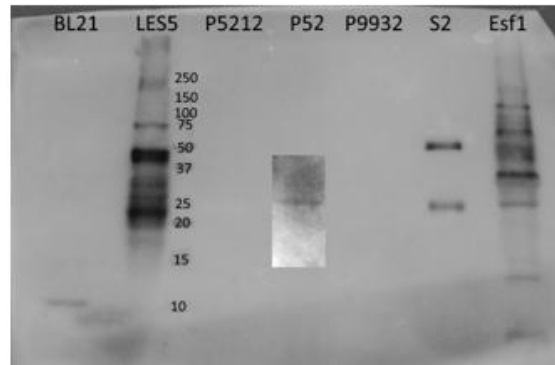
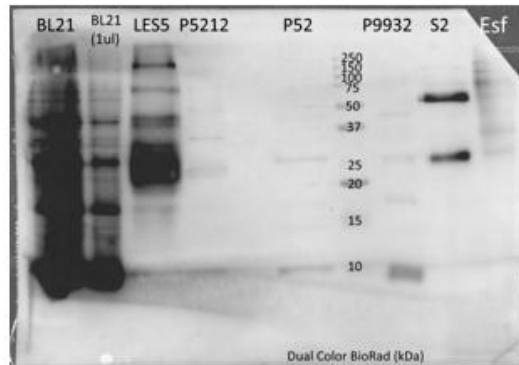


Figura A6. Western Blot exponiendo las proteínas a suero de perro infectado "S(+)" y suero de perro no infectado "S(-)". Se sembraron: las purificaciones de P52, P5212 y P9932, un homogenato de *E. coli* BL21 transformadas con el vector pET28a+ vacío (BL21), suero de perro no infectado con *Diocotophyme renale* (S2), homogenato de esófago (Esf) y concentrado de LES (LES) de *Diocotophyme renale*.

Referencias

- Abdo, Z., & Golding, G. B. (2007). A step toward barcoding life: A model-based, decision-theoretic method to assign genes to preexisting species groups. *Systematic Biology*, 56(1), 44–56. <https://doi.org/10.1080/10635150601167005>
- Abolafia, J., & Peña-Santiago, R. (2016). *Protorhabditis hortulana* sp. n. (Rhabditida, Protorhabditidae) from southern Iberian Peninsula, one of the smallest free-living soil nematodes known, with a compendium of the genus. *Zootaxa*, 4144(3). <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4144.3.7>
- Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A., Ronneberger, O., Willmore, L., Ballard, A. J., Bambrick, J., Bodenstein, S. W., Evans, D. A., Hung, C. C., O'Neill, M., Reiman, D., Tunyasuvunakool, K., Wu, Z., Žemgulytė, A., Arvaniti, E., ... Jumper, J. M. (2024). Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, 630(8016), 493–500. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>
- Acha, P. N., & Szyfres, B. (2003). *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. Organización Panamericana de la Salud.
- Aguinaldo, A. M. A., Turbeville, J. M., Linford, L. S., Rivera, M. C., Garey, J. R., Raff, R. A., & Lake, J. A. (1997). Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature*, 387(6632), 489–493. <https://doi.org/10.1038/387489a0>
- Ahmed, M., & Holovachov, O. (2021). Twenty Years after De Ley and Blaxter—How Far Did We Progress in Understanding the Phylogeny of the Phylum Nematoda? *Animals*, 11(12), 3479. <https://doi.org/10.3390/ani11123479>
- Ahmed, M., Roberts, N. G., Adediran, F., Smythe, A. B., Kocot, K. M., & Holovachov, O. (2022). Phylogenomic Analysis of the Phylum Nematoda: Conflicts and Congruences With Morphology, 18S rRNA, and Mitogenomes. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.769565>
- Aleshin, V. V., Kedrova, O. S., Milyutina, I. A., Vlad'yehenskaya, N. S., & Petrov, N. B. (1998). Relationships among nematodes based on the analysis of 18S rRNA gene sequences: molecular evidence for monophyly of chromadorian and secernentian nematodes. *Russian Journal of Nematology*, 6, 175–184.
- Ambe, L. A., Limunga, E., Mbah, C. E., Adela, N., Eric, N., Ngog, M., Sone, B., Lochnit, G., Tachu, J. B., Wanji, S., Taubert, A., Hermosilla, C., & Kamena, F. (2024). Identification and Characterization of *Onchocerca volvulus* Heat Shock Protein 70 (OvHSP70) as Novel Diagnostic Marker of Onchocerciasis in Human Urine. *Pathogens*, 13(4). <https://doi.org/10.3390/pathogens13040293>
- Anderson, G. R. (1998). Inference of phylogeny and taxonomy within the Didymozoidae (Digenea) from the second internal transcribed spacer (ITS2) of ribosomal DNA. *Systematic Parasitology*, 41(2), 87–94. <https://doi.org/10.1023/A:1006024128098>

- Andrews, K. R., Good, J. M., Miller, M. R., Luikart, G., & Hohenlohe, P. A. (2016). Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*, 17(2), 81–92. <https://doi.org/10.1038/nrg.2015.28>
- Arana, M. D., Natale, E. S., Ferretti, N. E., Romano, G. M., Oggero, A. J., Martínez, G., Posadas, P. E., & Morrone, J. J. (2021). Esquema biogeográfico de la República Argentina. *Opera Lilloana* ISSN: 0078-5245. <http://www.lillo.org.ar/editorial/index.php/publicaciones/catalog/book/253>
- Arce, L. F., Facelli Fernández, F., Giorello, N., Butti, M., Maldonado, L. L., Arrabal, J. P., Natalini, M. B., Kowalewski, M., Pedrassani, D., Silveira Mascarenhas, C., da Silva Rappeti, J. C., Zilli, F., Beldomenico, P. M., Lia, V., Franchini, G. R., & Kamenetzky, L. (2024). Genetic diversity of *Diectophyme renale* in Southern South America. *Parasitology*, 1–11. <https://doi.org/10.1017/S0031182024001379>
- Aronson, J. K., & Ferner, R. E. (2017). Biomarkers—a general review. En *Current Protocols in Pharmacology* (Vol. 2017, pp. 9.23.1–9.23.17). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1002/cpph.19>
- Babayan, S. A., Read, A. F., Lawrence, R. A., Bain, O., & Allen, J. E. (2010). Filarial Parasites Develop Faster and Reproduce Earlier in Response to Host Immune Effectors That Determine Filarial Life Expectancy. *PLoS Biology*, 8(10), e1000525. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000525>
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Banta, J. A., Dole, J., Cruzan, M. B., & Pigliucci, M. (2007). Evidence of local adaptation to coarse-grained environmental variation in *Arabidopsis thaliana*. *Evolution*, 61(10), 2419–2432. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00189.x>
- Bélgamo, J. A., Alberca, L. N., Pórfido, J. L., Romero, F. N. C., Rodriguez, S., Talevi, A., Córscico, B., & Franchini, G. R. (2020). Application of target repositioning and *in silico* screening to exploit fatty acid binding proteins (FABPs) from *Echinococcus multilocularis* as possible drug targets. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 34(12), 1275–1288. <https://doi.org/10.1007/s10822-020-00352-8>
- Bennuru, S., Meng, Z., Ribeiro, J. M. C., Semnani, R. T., Ghedin, E., Chan, K., Lucas, D. A., Veenstra, T. D., & Nutman, T. B. (2011). Stage-specific proteomic expression patterns of the human filarial parasite *Brugia malayi* and its endosymbiont *Wolbachia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(23), 9649–9654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011481108>
- Bernal, D., Trelis, M., Montaner, S., Cantalapiedra, F., Galiano, A., Hackenberg, M., & Marcilla, A. (2014). Surface analysis of *Dicrocoelium dendriticum*. The molecular characterization of exosomes reveals the presence of miRNAs. *Journal of Proteomics*, 105, 232–241. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.02.012>
- Bitencourt Vidal, M. L., Silveira, D. S., Martins, I. V. F., Boeloni, J. N., & de Carvalho Nunes, L. (2021). Rare case of *Diectophyme renale* (Nematoda: Enoplida) and *Diriofilaria* sp. (Nematoda: Spirurida) in the subcutaneous tissue of a cat in Espírito Santo, Brazil. *Heliyon*, 7(2), e06092. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06092>
- Blaxter, M. (2009). Nematodes (Nematoda). En *The Timetree of Life* (pp. 247–250). Oxford University PressOxford. <https://doi.org/10.1093/oso/9780199535033.003.0028>

- Blaxter, M. (2011). Nematodes: The worm and its relatives. *PLoS Biology*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001050>
- Blaxter, M., & Koutsovoulos, G. (2015). The evolution of parasitism in Nematoda. *Parasitology*, 142, S26–S39. <https://doi.org/10.1017/S0031182014000791>
- Blaxter, M., Koutsovoulos, G., Jones, M., Kumar, S., & Elsworth, B. (2016). Phylogenomics of Nematoda. En P. D. Olson, J. Hughes, & J. A. Cotton (Eds.), *The Systematics Association Special* (pp. 62–83). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139236355.004>
- Blaxter, M. L. (2003). Nematoda: Genes, Genomes and the Evolution of Parasitism. En *Advances in Parasitology Volume 54* (pp. 101–195). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(03\)54003-9](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(03)54003-9)
- 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>
- Blouin, M. S. (2002). Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. *International Journal for Parasitology*, 32(5), 527–531. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00357-5](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00357-5)
- Blouin, M. S., Yowell, C. A., Courtney, C. H., & Dame, J. B. (1998). Substitution Bias, Rapid Saturation, and the Use of mtDNA for Nematode Systematics. *Molecular Biology and Evolution*, 15(12), 1719–1727. <https://academic.oup.com/mbe/article/15/12/1719/963107>
- Bond, J. S., & Beynon, R. J. (1995). The astacin family of metalloendopeptidases. *Protein Science*, 4(7), 1247–1261. <https://doi.org/10.1002/pro.5560040701>
- Bouckaert, R., Vaughan, T. G., Barido-Sottani, J., Duchêne, S., Fourment, M., Gavryushkina, A., Heled, J., Jones, G., Kühnert, D., De Maio, N., Matschiner, M., Mendes, F. K., Müller, N. F., Ogilvie, H. A., Du Plessis, L., Poppinga, A., Rambaut, A., Rasmussen, D., Siveroni, I., ... Drummond, A. J. (2019). BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology*, 15(4), 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006650>
- Bredtmann, C. M., Krücken, J., Murugaiyan, J., Kuzmina, T., & von Samson-Himmelstjerna, G. (2017). Nematode species identification—current status, challenges and future perspectives for cyathostomins. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(283). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00283>
- Bucholz, J. R., Sard, N. M., VanTassel, N. M., Lozier, J. D., Morris, T. J., Paquet, A., & Zanatta, D. T. (2022). RAD-tag and mitochondrial DNA sequencing reveal the genetic structure of a widespread and regionally imperiled freshwater mussel, *Obovaria olivaria* (Bivalvia: Unionidae). *Ecology and Evolution*, 12(1). <https://doi.org/10.1002/ece3.8560>
- Buck, A. H., Coakley, G., Simbari, F., McSorley, H. J., Quintana, J. F., Le Bihan, T., Kumar, S., Abreu-Goodger, C., Lear, M., Harcus, Y., Ceroni, A., Babayan, S. A., Blaxter, M., Ivens, A., & Maizels, R. M. (2014). Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nature Communications*, 5(1), 5488. <https://doi.org/10.1038/ncomms6488>
- Burgos, L., Acosta, R. M., Fonrouge, R. D., Archelli, S. M., Gamboa, M. I., Linzitto, O. R., Linzitto, J. P., Osen, B.

- A., & Radman, N. E. (2015). Prevalencia de un parásito zoonótico, *Dioctophyma renale* (Goeze, 1782), en caninos machos de una zona riverense al Río de la Plata, Provincia de Buenos Aires, República Argentina. *Revista de Patología Tropical*, 43(4). <https://doi.org/10.5216/rpt.v43i4.33603>
- Butti, M. J., Gamboa, M. I., Terminiello, J. D., Franchini, G. R., Giorello, A. N., Maldonado, L. L., Kamenetzky, L., Luna, M. F., Lopez Merlo, M., & Radman, N. E. (2019). *Dioctophyme renale* in a domestic cat (*Felis catus*): Renal location and nephrectomy. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 18(100339). <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100339>
- Campbell, L. I., Rota-Stabelli, O., Edgecombe, G. D., Marchioro, T., Longhorn, S. J., Telford, M. J., Philippe, H., Rebecchi, L., Peterson, K. J., & Pisani, D. (2011). MicroRNAs and phylogenomics resolve the relationships of Tardigrada and suggest that velvet worms are the sister group of Arthropoda. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(38), 15920–15924. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105499108>
- Cansi, E. R., Bonorino, R., Mustafa, V. S., & Guedes, K. M. R. (2012). Multiple parasitism in wild maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*, Mammalia: Canidae) in Central Brazil. *Comparative Clinical Pathology*, 21(4), 489–493. <https://doi.org/10.1007/s00580-012-1513-7>
- Cardoso, J. M. S., Anjo, S. I., Manadas, B., Silva, H., Abrantes, I., Nakamura, K., & Fonseca, L. (2022). Virulence Biomarkers of *Bursaphelenchus xylophilus*: A Proteomic Approach. *Frontiers in Plant Science*, 12(822289). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.822289>
- Carra Perera, S., Silveira Mascarenhas, C., Brum Cleff, M., Müller, G., & da Silva Rappeti, J. C. (2021). *Dioctophimosis: A Parasitic Zoonosis of Public Health Importance* (pp. 129–142). https://doi.org/10.1007/978-3-030-63908-2_10
- Chan, A. H. E., Chaisiri, K., Saralamba, S., Morand, S., & Thaenkham, U. (2021). Assessing the suitability of mitochondrial and nuclear DNA genetic markers for molecular systematics and species identification of helminths. *Parasites & Vectors*, 14(1), 233. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04737-y>
- Chilton, N. B. (2004). The use of nuclear ribosomal DNA markers for the identification of bursate nematodes (order Strongylida) and for the diagnosis of infections. *Animal Health Research Reviews*, 5(2), 173–187. <https://doi.org/10.1079/AHR200497>
- Chitwood, B. G., & Chitwood, M. B. H. (1937). *An introduction to nematology*. Monumental printing co.,. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.7355>
- Clifford, J. N., Høie, M. H., Deleuran, S., Peters, B., Nielsen, M., & Marcatili, P. (2022). BepiPred-3.0: Improved B-cell epitope prediction using protein language models. *Protein Science*, 31(12). <https://doi.org/10.1002/pro.4497>
- Coghlan, A., & Wolfe, K. H. (2002). Fourfold Faster Rate of Genome Rearrangement in Nematodes Than in *Drosophila*. *Genome Research*, 12(6), 857–867. <https://doi.org/10.1101/gr.172702>
- Cooper, D., & Eleftherianos, I. (2016). Parasitic Nematode Immunomodulatory Strategies: Recent Advances and Perspectives. *Pathogens*, 5(3), 58. <https://doi.org/10.3390/pathogens5030058>
- Cutter, A. D., Wasmuth, J. D., & Washington, N. L. (2008). Patterns of molecular evolution in *Caenorhabditis* preclude ancient origins of selfing. *Genetics*, 178(4), 2093–2104.

<https://doi.org/10.1534/genetics.107.085787>

- De Almeida Capella, G., Berne Pinheiro, N., Quintana de Moura, M., Carra Perera, S., Borges Weege, G., Pereira Leivas Leite, F., James Scaini, C., Cristina da Silva Rappeti, J., & Aires Berne, M. E. (2022). *Diectophyme renale*: in vitro culture, production of excretory and secretory antigens, and their use in immunodiagnosis. *Veterinary Parasitology*, 303. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2022.109674>
- De Almeida Capella, G., da Silva Rappeti, J. C., Pinheiro, N. B., Perera, S. C., de Moura, M. Q., Cleff, M. B., da Costa, C. M., Strothmann, A. L., Weege, G. B., Mascarenhas, C. S., & Berne, M. E. A. (2024). An evaluation of techniques to diagnose *Diectophyme renale* in dogs. *Revista Brasileira de Medicina Veterinaria*, 46. <https://doi.org/10.29374/2527-2179.bjvm006423>
- De la Torre Escudero, E., Manzano-Román, R., Valero, L., Oleaga, A., Pérez-Sánchez, R., Hernández-González, A., & Siles-Lucas, M. (2011). Comparative proteomic analysis of *Fasciola hepatica* juveniles and *Schistosoma bovis schistosomula*. *Journal of Proteomics*, 74(9), 1534–1544. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.024>
- De Ley, P., & Blaxter, M. (2002). Systematic Position and Phylogeny. En *The Biology of Nematodes* (pp. 1–30). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b12614-2>
- De Ley, P., & Blaxter, M. L. (2004). A new system for Nematoda: combining morphological characters with molecular trees, and translating clades into ranks and taxa. En *Proceedings of the Fourth International Congress of Nematology, 8-13 June 2002, Tenerife, Spain* (pp. 633–653). BRILL. https://doi.org/10.1163/9789004475236_061
- De Ley, P., De Ley, I. T., Morris, K., Abebe, E., Mundo-Ocampo, M., Yoder, M., Heras, J., Waumann, D., Rocha-Olivares, A., Jay Burr, A. H., Baldwin, J. G., & Thomas, W. K. (2005). An integrated approach to fast and informative morphological vouchering of nematodes for applications in molecular barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1945–1958. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1726>
- De Ley, P., Van De Velde, M. C., Mounport, D., Baujard, P., & Coomans, A. (1995). Ultrastructure of the Stoma in Cephalobidae, Panagrolaimidae and Rhabditidae, With a Proposal for a Revised Stoma Terminology in Rhabditida (Nematoda). *Nematologica*, 41(1–4), 153–182. <https://doi.org/10.1163/003925995X00143>
- De Queiroz, K. (2007). Species Concepts and Species Delimitation. *Systematic Biology*, 56(6), 879–886. <https://doi.org/10.1080/10635150701701083>
- Denver, D. R., Morris, K., Lynch, M., Vassilieva, L. L., & Thomas, W. K. (2000). High Direct Estimate of the Mutation Rate in the Mitochondrial Genome of *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 289(5488), 2342–2344. <https://doi.org/10.1126/science.289.5488.2342>
- Derycke, S., Remerie, T., Vierstraete, A., Backeljau, T., Vanfleteren, J., Vincx, M., & Moens, T. (2005). Mitochondrial DNA variation and cryptic speciation within the free-living marine nematode *Pellioditis marina*. *Marine Ecology Progress Series*, 300, 91–103. <https://doi.org/10.3354/meps300091>
- Derycke, S., Vanaverbeke, J., Rigaux, A., Backeljau, T., & Moens, T. (2010). Exploring the use of cytochrome oxidase c subunit 1 (COI) for DNA barcoding of free-living marine nematodes. *PLoS ONE*, 5(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013716>

- DeSalle, R., & Goldstein, P. (2019). Review and Interpretation of Trends in DNA Barcoding. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00302>
- DeWalick, S., Bexkens, M. L., van Balkom, B. W. M., Wu, Y.-P., Smit, C. H., Hokke, C. H., de Groot, P. G., Heck, A. J. R., Tielens, A. G. M., & van Hellemond, J. J. (2011). The proteome of the insoluble *Schistosoma mansoni* eggshell skeleton. *International Journal for Parasitology*, 41(5), 523–532. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.12.005>
- Di Nucci, D. L., Guerisoli, M. de las M., Sciabarrasi Bagilet, A., Tittarelli, M., Natalini, M. B., Castillo Giraudo, M., & Orozco, M. M. (2020). Nuevos hallazgos y localidades de *Diectophyme renale* (Nematoda, Enoplida, Diectophymatidae) en *Chrysocyon brachyurus* (Carnivora: Canidae) para la República Argentina. *Notas Sobre Mamíferos Sudamericanos*, 01(1), 001–011. <https://doi.org/10.31687/saremnms.2020.0.11>
- Dorris, M., De Ley, P., & Blaxter, M. L. (1999). Molecular Analysis of Nematode Diversity and the Evolution of Parasitism. En *Focus 188 Parasitology Today* (Vol. 15, Número 5).
- Doytchinova, I. A., & Flower, D. R. (2008). Bioinformatic Approach for Identifying Parasite and Fungal Candidate Subunit Vaccines. In *The Open Vaccine Journal* (Vol. 1). <http://www.jenner.ac.uk/Vaxijen>.
- Echenique, J. V. Z., Soares, M. P., Mascarenhas, C. S., Bandarra, P. M., Quadros, P., Driemeier, D., & Schild, A. L. (2018). *Lontra longicaudis* infected with canine parvovirus and parasitized by *Diectophyma renale*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38(9), 1844–1848. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5744>
- Eiras, J., Zhu, X. Q., Yurlova, N., Pedrassani, D., Yoshikawa, M., & Nawa, Y. (2021). *Diectophyme renale* (Goeze, 1782) (Nematoda, Diectophymidae) parasitic in mammals other than humans: A comprehensive review. In *Parasitology International* (Vol. 81). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102269>
- Eisen, J. A., & Fraser, C. M. (2003). Phylogenomics: Intersection of Evolution and Genomics. *Science*, 300(5626), 1706–1707. <https://doi.org/10.1126/science.1086292>
- EL-Manzalawy, Y., Dobbs, D., & Honavar, V. (2008). Predicting Flexible Length Linear B-Cell Epitopes. *Computational Systems Bioinformatics*, 7, 121–132. https://doi.org/10.1142/9781848162648_0011
- Elsasser, S. C., Floyd, R., Hebert, P. D. N., & Schulte-Hostedde, A. I. (2009). Species identification of North American guinea worms (Nematoda: *Dracunculus*) with DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 9(3), 707–712. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02393.x>
- Eme, L., Tamarit, D., Caceres, E. F., Stairs, C. W., De Anda, V., Schön, M. E., Seitz, K. W., Dombrowski, N., Lewis, W. H., Homa, F., Saw, J. H., Lombard, J., Nunoura, T., Li, W.-J., Hua, Z.-S., Chen, L.-X., Banfield, J. F., John, E. S., Reysenbach, A.-L. Ettema, T. J. G. (2023). Inference and reconstruction of the heimdallarchaeal ancestry of eukaryotes. *Nature*, 618(7967), 992–999. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06186-2>
- Erpenbeck, D., Hooper, J. N. A., & Wörheide, G. (2006). CO1 phylogenies in diploblasts and the ‘Barcoding of Life’ — are we sequencing a suboptimal partition? *Molecular Ecology Notes*, 6(2), 550–553. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01259.x>
- Eslahi, A. V., Mowlavi, G., Houshmand, E., Pirestani, M., Majidiani, H., Nahavandi, K. H., Johkool, M. G., &

- Badri, M. (2021). Occurrence of *Diectophyme renale* (Goeze, 1782) in road-killed canids of Iran and its public health implication. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 24, 100568. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100568>
- Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2005). Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, 1. <https://doi.org/10.1177/117693430500100003>
- Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), 479–491. <https://doi.org/10.1093/genetics/131.2.479>
- Facelli Fernández, F., Facelli Fernández, C., Arce, L. F., Marini, R., Franchini, G. R., Kamenetzky, L., & Beldomenico, P. M. (2024). First record of *Diectophyme renale* (Goeze, 1782) in the pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*, Fischer, 1814) (Carnivora: Canidae). *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 49, 101001. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2024.101001>
- Faugere, J., Gouveia, D., Ayciriex, S., Chaumot, A., François, A., Armengaud, J., Lemoine, J., Geffard, O., & Salvador, A. (2020). *High-multiplexed monitoring of protein biomarkers in the*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391920302694>
- Feldman, B., & Sink, C. (2004). *Laboratory Urinalysis and Hematology for the Small Animal Practitioner*. Teton NewMedia. <https://doi.org/10.1201/9780367805999>
- Ferri, E., Barbuto, M., Bain, O., Galimberti, A., Uni, S., Guerrero, R., Ferté, H., Bandi, C., Martin, C., & Casiraghi, M. (2009). Integrated taxonomy: Traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). *Frontiers in Zoology*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1742-9994-6-1>
- Floyd, R., Abebe, E., Papert, A., & Blaxter, M. (2002). Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular Ecology*, 11(4), 839–850. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01485.x>
- Folmer, R. H. A., Nilges, M., Folkers, P. J. M., Konings, R. N. H., & Hilbers, C. W. (1994). A Model of the Complex between Single-stranded DNA and the Single-stranded DNA Binding Protein Encoded by Gene V of Filamentous Bacteriophage M13. *Journal of Molecular Biology*, 240(4), 341–357. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1449>
- Fu, Y.-X. (1997). *Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection*. <https://academic.oup.com/genetics/article/147/2/915/6054139>
- Gasser, R. B., & Newton, S. E. (2000). Genomic and genetic research on bursate nematodes: significance, implications and prospects. *International Journal for Parasitology*, 30(4), 509–534. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00021-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00021-7)
- Gharamah, A. A., Azizah, M. N. S., & Rahman, W. A. (2012). Genetic variation of *Haemonchus contortus* (Trichostrongylidae) in sheep and goats from Malaysia and Yemen. *Veterinary Parasitology*, 188(3–4), 268–276. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.04.003>
- Giorello, A. N. (2023). *Identificación y caracterización de proteínas específicas del nematode parásito*

Dioctophyme renale (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
<https://doi.org/10.35537/10915/162083>

- Giribet, G., Distel, D. L., Polz, M., Sterrer, W., & Wheeler, W. C. (2000). Triploblastic Relationships with Emphasis on the Acoelomates and the Position of Gnathostomulida, Cycliophora, Plathelminthes, and Chaetognatha: A Combined Approach of 18S rDNA Sequences and Morphology. *Systematic Biology*, 49(3), 539–562. <https://doi.org/10.1080/10635159950127385>
- Glasziou, P. P., Irwig, L., & Aronson, J. K. (2008). *Evidence-based Medical Monitoring: From Principles to Practice*. Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1002/9780470696323>
- Gomez-Fuentes, S., Morales-Ruiz, V., López-Recinos, D., Guevara-Salinas, A., Arce-Sillas, A., Rodríguez, J. F., Parada-Colin, C., & Adalid-Peralta, L. (2020). Biological role of excretory–secretory proteins in endemic parasites of Latin America and the Caribbean. *Journal of Helminthology*, 94, e53. <https://doi.org/10.1017/S0022149X19000312>
- Gomez-Puerta, L. A., Cieza, R., Lopez-Urbina, M. T., & Gonzalez, A. E. (2021). Abdominal dioctophymosis in a domestic cat from the Peruvian rainforest confirmed morphologically and molecularly. *Parasitology International*, 83. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102359>
- Gonçalves, L. T., Bianchi, F. M., Deprá, M., & Calegaro-Marques, C. (2021). Barcoding a can of worms: Testing cox1 performance as a dna barcode of nematoda. *Genome*, 64(7), 705–717. <https://doi.org/10.1139/gen-2020-0140>
- Grover, A., & Sharma, P. C. (2016). Development and use of molecular markers: Past and present. En *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 36, Número 2, pp. 290–302). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.959891>
- Gubanov N. M. (1951). A giant nematode from the placenta of cetaceans *Placenttnema gigantissima* n.g. n.sp. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, 77(6), 1123–1125.
- Guillou, F., Mitta, G., Galinier, R., & Coustau, C. (2007). Identification and expression of gene transcripts generated during an anti-parasitic response in *Biomphalaria glabrata*. *Developmental & Comparative Immunology*, 31(7), 657–671. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.10.001>
- Haag, E. S., Fitch, D. H. A., & Delattre, M. (2018). From “the worm” to “the worms” and back again: The evolutionary developmental biology of nematodes. *Genetics*, 210(2), 397–433. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300243>
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., & DeWaard, J. R. (2003). Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>

- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S., & Francis, C. M. (2004). Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biology*, 2(10), e312. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020312>
- Hewitson, J. P., Harcus, Y. M., Curwen, R. S., Dowle, A. A., Atmadja, A. K., Ashton, P. D., Wilson, A., & Maizels, R. M. (2008). The secretome of the filarial parasite, *Brugia malayi*: Proteomic profile of adult excretory–secretory products. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 160(1), 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.02.007>
- Hodda, M. (2022). Phylum Nematoda: feeding habits for all valid genera using a new, universal scheme encompassing the entire phylum, with descriptions of morphological characteristics of the stoma, a key, and discussion of the evidence for trophic relationships. *Zootaxa*, 5114(1), 318–451. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5114.1.3>
- Hodda, M. (2022). Phylum Nematoda: trends in species descriptions, the documentation of diversity, systematics, and the species concept. *Zootaxa*, 5114(1), 290–317. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5114.1.2>
- Hodel, R. G. J., Segovia-Salcedo, M. C., Landis, J. B., Crowl, A. A., Sun, M., Liu, X., Gitzendanner, M. A., Douglas, N. A., Germain-Aubrey, C. C., Chen, S., Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (2016). The report of my death was an exaggeration: A review for researchers using microsatellites in the 21st century. *Applications in Plant Sciences*, 4(6). <https://doi.org/10.3732/apps.1600025>
- Holterman, M., Schratzberger, M., & Helder, J. (2019). Nematodes as evolutionary commuters between marine, freshwater and terrestrial habitats. *Biological Journal of the Linnean Society*, 128(3), 756–767. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blz107>
- Holterman, M., van der Wurff, A., van den Elsen, S., van Megen, H., Bongers, T., Holovachov, O., Bakker, J., & Helder, J. (2006). Phylum-Wide Analysis of SSU rDNA Reveals Deep Phylogenetic Relationships among Nematodes and Accelerated Evolution toward Crown Clades. *Molecular Biology and Evolution*, 23(9), 1792–1800. <https://doi.org/10.1093/molbev/msl044>
- Hong, Y., Sun, A., Zhang, M., Gao, F., Han, Y., Fu, Z., Shi, Y., & Lin, J. (2013). Proteomics analysis of differentially expressed proteins in schistosomula and adult worms of *Schistosoma japonicum*. *Acta Tropica*, 126(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.12.009>
- Hotez, P. J., Alvarado, M., Basáñez, M.-G., Bolliger, I., Bourne, R., Boussinesq, M., Brooker, S. J., Brown, A. S., Buckle, G., Budke, C. M., Carabin, H., Coffeng, L. E., Fèvre, E. M., Fürst, T., Halasa, Y. A., Jasrasaria, R., Johns, N. E., Keiser, J., King, C. H., ... Naghavi, M. (2014). The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and Implications for the Neglected Tropical Diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(7), e2865. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002865>
- Hu, M., Chilton, N. B., Zhu, X., & Gasser, R. B. (2002). Single-strand conformation polymorphism-based analysis of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 reveals significant substructuring in hookworm populations. *Electrophoresis*, 23(1), 27. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200201\)23:1<27::AID-ELPS27>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200201)23:1<27::AID-ELPS27>3.0.CO;2-7)
- Huang, X. (1992). A contig assembly program based on sensitive detection of fragment overlaps. *Genomics*, 14(1), 18–25. [https://doi.org/10.1016/S0888-7543\(05\)80277-0](https://doi.org/10.1016/S0888-7543(05)80277-0)

- Hudson, R. R. (1990). Gene genealogies and the coalescent process. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, 7, 1–44.
- Hung, G.-C., Chilton, N. B., Beveridge, I., Zhu, X. Q., Lichtenfels, J. R., & Gasser, R. B. (1999). Molecular evidence for cryptic species within *Cylicostephanus minutus* (Nematoda: Strongylidae). *International Journal for Parasitology*, 29(2), 285–291. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00203-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00203-3)
- Hyman, L. H. (1951). *The Invertebrates: Acanthocephala, A schelminthes, and Entoprocta The pseudocoelomate Bilateria* (Inc. McGraw-Hill Book Company, Ed.; 1^a ed.).
- Ingram, J., Knudsen, G., Lim, K. C., Hansell, E., Sakanari, J., & McKerrow, J. (2011). Proteomic Analysis of Human Skin Treated with Larval Schistosome Peptidases Reveals Distinct Invasion Strategies among Species of Blood Flukes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(9), e1337. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001337>
- Jiang, Y., Chen, J., Wu, Y., Wang, Q., & Li, H. (2016). Sublethal toxicity endpoints of heavy metals to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE*, 11(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148014>
- Jiménez, F. A., Notarnicola, J., & Gardner, S. L. (2017). Nematodes Associated With Mammals In The Great American Biotic Interchange (GABI). *Oecologia Australis*, 21(01), 01–16. <https://doi.org/10.4257/oeco.2017.2101.01>
- Kapur-Ghai, J., Kaur, M., & Goel, P. (2014). Development of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Journal of Parasitic Diseases*, 38(3), 302–306. <https://doi.org/10.1007/s12639-013-0246-0>
- Kern, E. M. A., Kim, T., & Park, J. K. (2020). The Mitochondrial Genome in Nematode Phylogenetics. En *Frontiers in Ecology and Evolution* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00250>
- Khullar, S., Verma, N., & Mirdha, B. R. (2022). Diectophymiasis. In *Textbook of Parasitic Zoonoses* (pp. 978–981). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-7204-0_46
- Kim, J., Kern, E., Kim, T., Sim, M., Kim, J., Kim, Y., Park, C., Nadler, S. A., & Park, J.-K. (2017). Phylogenetic analysis of two Plectus mitochondrial genomes (Nematoda: Plectida) supports a sister group relationship between Plectida and Rhabditida within Chromadorea. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 107, 90–102. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.10.010>
- Kiontke, K., Blaxter, M., & Fitch, D. H. (2021). Phylum Nematoda. En CRC Press (Ed.), *Invertebrate Zoology* (pp. 477–498).
- Kiontke, K., & Fitch, D. H. A. (2013). Nematodes. En *Current Biology* (Vol. 23, Número 19). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.08.009>
- Koehler, A. V. A., Hoberg, E. P., Dokuchaev, N. E., Tranbenkova, N. A., Whitman, J. S., Nagorsen, D. W., & Cook, J. A. (2009). *Phylogeography of a Holarctic nematode, Soboliphyme baturini, among mustelids: climate change, episodic colonization, and diversification in a complex host-parasite system*. <https://academic.oup.com/biolinnean/article/96/3/651/2452751>

- Koehler, A. V. A., Hoberg, E. P., Torres-Pérez, F., & Cook, J. A. (2009). A molecular view of the superfamily dioctophymatoidea (Nematoda). *Comparative Parasitology*, 76(1), 100–104. <https://doi.org/10.1654/4366.1>
- L'Ollivier, C., & Piarroux, R. (2013). Diagnosis of human nematode infections. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 11(12), 1363–1376. <https://doi.org/10.1586/14787210.2013.851001>
- Laemmli, U. K. (1970). Glycine-SDS-PAGE for separation of proteins. *Nature*, 227(5), 541.
- Lanfear, R., Frandsen, P. B., Wright, A. M., Senfeld, T., & Calcott, B. (2017). Partitionfinder 2: New methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 34(3), 772–773. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw260>
- Latrofa, M. S., Palmisano, G., Annoscia, G., Pierri, C. L., Chandrashekar, R., & Otranto, D. (2021). Major antigen and paramyosin proteins as candidate biomarkers for serodiagnosis of canine infection by zoonotic *Onchocerca lupi*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(2), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009027>
- Lavrov, D. V., & Brown, W. M. (2001). *Trichinella spiralis* mtDNA: A Nematode Mitochondrial Genome That Encodes a Putative ATP8 and Normally Structured tRNAs and Has a Gene Arrangement Relatable to Those of Coelomate Metazoans. *Genetics*, 157(2), 621–637. <https://doi.org/10.1093/genetics/157.2.621>
- Lightowlers, M. W., & Rickard, M. D. (1988). Excretory-secretory products of helminth parasites: effects on host immune responses. In *Parasitology* (Vol. 96).
- Liu, Z., Goddard, M. E., Reinhardt, F., & Reents, R. (2014). A single-step genomic model with direct estimation of marker effects. *Journal of Dairy Science*, 97(9), 5833–5850. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7924>
- Ma, H., Glenn, T. C., Jagoe, C. H., Jones, K. L., & Williams, P. L. (2009). A Transgenic Strain Of The Nematode *Caenorhabditis Elegans* As A Biomonitor For Heavy Metal Contamination. In *Environmental Toxicology and Chemistry* (Vol. 28, Issue 6).
- Mace, T. F., & Anderson, R. C. (1975). Development of the giant kidney worm, *Dioctophyma renale* (Goeze, 1782) (Nematoda: Dioctophymatoidea). *Canadian Journal of Zoology*, 53(11), 1552–1568. <https://doi.org/10.1139/z75-190>
- Mahmood, K., Jadoon, S., Mahmood, Q., Irshad, M., & Hussain, J. (2014). Synergistic effects of toxic elements on heat shock proteins. In *BioMed Research International* (Vol. 2014). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2014/564136>
- Mallatt, J., & Giribet, G. (2006). Further use of nearly complete 28S and 18S rRNA genes to classify Ecdysozoa: 37 more arthropods and a kinorhynch. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40(3), 772–794. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.04.021>
- Mantel, N., & Valand, R. S. (1970). A Technique of Nonparametric Multivariate Analysis. *Biometrics*, 26(3), 547. <https://doi.org/10.2307/2529108>
- Marchese, M. R., dos Santos, M. R., Dos Santos Lima, J. C., & Pamplin, P. A. Z. (2015). First record of introduced species *Lumbriculus variegatus* Müller, 1774 (Lumbriculidae, Clitellata) in Brazil. *BioInvasions Records*,

4(2), 81–85. <https://doi.org/10.3391/bir.2015.4.2.02>

- Marcilla, A., Trelis, M., Cortés, A., Sotillo, J., Cantalapiedra, F., Minguez, M. T., Valero, M. L., Sánchez del Pino, M. M., Muñoz-Antoli, C., Toledo, R., & Bernal, D. (2012). Extracellular Vesicles from Parasitic Helminths Contain Specific Excretory/Secretory Proteins and Are Internalized in Intestinal Host Cells. *PLoS ONE*, 7(9), e45974. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045974>
- Martínez-Arce, A., De Jesús-Navarrete, A., & Leasi, F. (2020). DNA Barcoding for Delimitation of Putative Mexican Marine Nematodes Species. *Diversity*, 12(3), 107. <https://doi.org/10.3390/d12030107>
- Martínez-Ibeas, A. M., Perteguer, M. J., González-Lanza, C., Gárate, T., & Manga-González, M. Y. (2013). Analysis of an expressed sequence tag library from *Dicrocoelium dentriticum*. *Experimental Parasitology*, 135(2), 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.07.005>
- Martín-Ventura, J. L., Blanco-Colio, L. M., Tuñón, J., Muñoz-García, B., Madrigal-Matute, J., Moreno, J. A., de Céniga, M. V., & Egidio, J. (2009). Biomarkers in Cardiovascular Medicine. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 62(6), 677–688. [https://doi.org/10.1016/S1885-5857\(09\)72232-7](https://doi.org/10.1016/S1885-5857(09)72232-7)
- Mascarenhas, C. S., & Müller, G. (2015). Third-stage larvae of the enoplid nematode *Diectophyma renale* (Goeze, 1782) in the freshwater turtle *Trachemys dorbigni* from southern Brazil. *Journal of Helminthology*, 89(5), 630–635. <https://doi.org/10.1017/S0022149X14000364>
- Mascarenhas, C. S., Müller, G., de Macedo, M. R. P., Henzel, A. B. D., Robaldo, R. B., & Corrêa, F. (2019). The role of freshwater fish in the life cycle of *Diectophyma renale* in Southern Brazil. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 16. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100274>
- Mathieson, W., & Wilson, R. A. (2010). A comparative proteomic study of the undeveloped and developed *Schistosoma mansoni* egg and its contents: The miracidium, hatch fluid and secretions. *International Journal for Parasitology*, 40(5), 617–628. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.10.014>
- Mattos Varzone, J. R., Cury Thomaz de Aquino, L. P., & Rodovalho, M. V. de T. (2008). Macroscopic findings of lesions resulting from parasitism by *Diectophyma renale* in Lobo-Guará (*Chrysocyon brachyurus*) - case report. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e Da Saúde*, XII(2), 171–178. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=26012841015>
- Mayeux, R. (2004). Biomarkers: Potential Uses and Limitations. *NeuroRx*, 1(2), 182–188. <https://doi.org/10.1602/neurorx.1.2.182>
- Meldal, B. H. M., Debenham, N. J., De Ley, P., De Ley, I. T., Vanfleteren, J. R., Vierstraete, A. R., Bert, W., Borgonie, G., Moens, T., Tyler, P. A., Austen, M. C., Blaxter, M. L., Rogers, A. D., & Lamshead, P. J. D. (2007). An improved molecular phylogeny of the Nematoda with special emphasis on marine taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42(3), 622–636. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.08.025>
- Meyer, C. P., & Paulay, G. (2005). DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. *PLoS Biology*, 3(12), e422. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030422>
- Milanelo, L., Moreira, M. B., Fitorra, L. S., Petri, B. S. S., Alves, M., & de Cássia dos Santos, A. (2009). Ocorrência de parasitismo por *Diectophyma renale* em quati (*Nasua nasua*) do Parque Ecológico Tietê, São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29(12), 959–962. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2009001200001>

- Miserendino, M. L. (2007). Macroinvertebrate functional organization and water quality in a large arid river from Patagonia (Argentina). *Annales de Limnologie*, 43(3), 133–145. <https://doi.org/10.1051/limn:2007008>
- Möhrlen, F., Hutter, H., & Zwilling, R. (2003). The astacin protein family in *Caenorhabditis elegans*. *European Journal of Biochemistry*, 270(24), 4909–4920. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03891.x>
- Montaldo, H. H., & Meza-Herrera, C. A. (1998). Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(2), 83–89. <https://doi.org/10.2225/vol1-issue2-fulltext-4>
- Morphew, R. M., MacKintosh, N., Hart, E. H., Prescott, M., LaCourse, E. J., & Brophy, P. M. (2014). In vitro biomarker discovery in the parasitic flatworm *Fasciola hepatica* for monitoring chemotherapeutic treatment. *EuPA Open Proteomics*, 3, 85–99. <https://doi.org/10.1016/j.euprot.2014.02.013>
- Mutapi, F. (2012). Helminth parasite proteomics: from experimental models to human infections. *Parasitology*, 139(9), 1195–1204. <https://doi.org/10.1017/S0031182011002423>
- Navone, G. T., Achinelly, M. F., Notarnicola, J., & Zonta, M. L. (2020). Phylum Nematoda. *Macroparásitos: Diversidad y Biología*. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/126913>
- Nei, M., & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(10), 5269–5273. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269>
- Nei, M., & Tajima, F. (1981). DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*, 97(1), 145–163. <https://doi.org/10.1093/genetics/97.1.145>
- Nguyen, V. C., Villate, L., Gutierrez-Gutierrez, C., Castillo, P., Van Ghelder, C., Plantard, O., & Esmenjaud, D. (2019). Phylogeography of the soil-borne vector nematode *Xiphinema index* highly suggests Eastern origin and dissemination with domesticated grapevine. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43812-4>
- Niemiller, M. L., Davis, M. A., Tan, M., Apodaca, J. J., Dooley, K. E., Cucalón, R. V., Benito, J. B., Niemiller, K. D., Hardman, R. H., Istvanko, D., & Thames, D. (2022). Mitochondrial DNA and Population Genomics Reveal Additional Cryptic Diversity in the Green Salamander (Subgenus *Castaneides*) Species Complex. *Frontiers in Conservation Science*, 3. <https://doi.org/10.3389/fcsc.2022.890859>
- Norouzi, R., Manochehri, A., & Hanifi, M. (2017). A case report of human infection with *Diectophyma renale* from Iran. *Urology Journal*, 14(2), 3043–3045.
- Okakpu, O. K., & Dillman, A. R. (2022). Review of the Role of Parasitic Nematode Excretory/Secretory Proteins in Host Immunomodulation. *Journal of Parasitology*, 108(2), 199–208. <https://doi.org/10.1645/21-33>
- Pan, W., Shen, Y., Han, X., Wang, Y., Liu, H., Jiang, Y., Zhang, Y., Wang, Y., Xu, Y., & Cao, J. (2014). Transcriptome Profiles of the Protoscoleces of *Echinococcus granulosus* Reveal that Excretory-Secretory Products Are Essential to Metabolic Adaptation. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(12), e3392. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003392>

- Parkinson, J., Mitreva, M., Whitton, C., Thomson, M., Daub, J., Martin, J., Schmid, R., Hall, N., Barrell, B., Waterston, R. H., McCarter, J. P., & Blaxter, M. L. (2004). A transcriptomic analysis of the phylum Nematoda. *Nature Genetics*, 36(12), 1259–1267. <https://doi.org/10.1038/ng1472>
- Pedrassani, D. (2009). *Aspectos Morfológicos, Imunológicos E Epidemiológicos Do Dioctophyme renale Em Cães No Distrito De São Cristóvão, Três Barras, San. Universidade Estadual Paulista “Julio De Mesquita Filho” Faculdade De Ciências Agrárias E Veterinárias Câmpus De Jaboticabal*
- .Pedrassani, D., Nascimento, A. A. do, André, M. R., & Machado, R. Z. (2015). Improvement of an enzyme immunosorbent assay for detecting antibodies against *Dioctophyma renale*. *Veterinary Parasitology*, 212(3–4), 435–438. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.08.007>
- Perera, S. C., Rappeti, J. C. S., Milech, V., Braga, F. A., Cavalcanti, G. A. O., Nakasu, C. C., Durante, L., Vives, P., & Cleff, M. B. (2017). Eliminação de *Dioctophyme renale* pela urina em canino com dioctofimatoze em rim esquerdo e cavidade abdominal - Primeiro relato no Rio Grande do Sul. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 69(3), 618–622. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9036>
- Peterson, K. J., & Eernisse, D. J. (2001). Animal phylogeny and the ancestry of bilaterians: inferences from morphology and 18S rDNA gene sequences. *Evolution & Development*, 3(3), 170–205. <https://doi.org/10.1046/j.1525-142x.2001.003003170.x>
- Pinto, R. M., Knoff, M., Gomes, D. C., & Noronha, D. (2011). Nematodes From Mammals in Brazil: an Updating. *Neotropical Helminthology*, 5(2), 139–183.
- Poinar, G. O. (1984). First Fossil Record of Parasitism by Insect Parasitic Tylenchida (Allantonematidae: Nematoda). *The Journal of Parasitology*, 70(2), 306. <https://doi.org/10.2307/3281883>
- Poinar, G. O. (2015). The Geological Record of Parasitic Nematode Evolution. *Advances in Parasitology*, 90, 53–92. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2015.03.002>
- Powers, T. O., Todd, T. C., Burnell, A. M., Murray, P. C. B., Fleming, C. C., Szalanski, A. L., Adams, B. A., & Harris, T. S. (1997). The rDNA Internal Transcribed Spacer Region as a Taxonomic Marker for Nematodes 1. En *Journal of Nematology* (Vol. 29, Número 4).
- Prosser, S. W. J., Velarde-Aguilar, M. G., León-Règagnon, V., & Hebert, P. D. N. (2013). Advancing nematode barcoding: A primer cocktail for the cytochrome c oxidase subunit I gene from vertebrate parasitic nematodes. *Molecular Ecology Resources*, 13(6), 1108–1115. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12082>
- Puillandre, N., Brouillet, S., & Achaz, G. (2021). ASAP: assemble species by automatic partitioning. *Molecular Ecology Resources*, 21(2), 609–620. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13281>
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., & Achaz, G. (2012). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21(8), 1864–1877. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x>
- Pullan, R. L., Smith, J. L., Jasrasaria, R., & Brooker, S. J. (2014). Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. *Parasites & Vectors*, 7(1), 37. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-37>

- Qing, X., Zhang, Y. M., Sun, S., Ahmed, M., Lo, W.-S., Bert, W., Holovachov, O., & Li, H. (2024). Phylogenomic Insights into the Evolution and Origin of Nematoda. *Systematic Biology*. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syae073>
- Radman, N. E., Gamboa, M. I., Butti, M. J., Blanco, M., Rube, A., Terminiello, J., Osen, B. A., Burgos, L., Corbalán, V., Paladini, A., Acosta, R. M., Eugui, J. I. R., Borrelli, S., Brusa, M., & Martino, P. (2017). Occurrence of diotrophymosis in canines within a riparian zone of the Río de La Plata watercourse, in Ensenada, Buenos Aires Province, Argentina. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 10, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.07.007>
- Rahal, S. C., Mamprim, M. J., Oliveira, H. S., Mesquita, L. R., Faria, L. G., Takahira, R. K., Matsubara, L. M., & Agostinho, F. S. (2014). Ultrasonographic, computed tomographic, and operative findings in dogs infested with giant kidney worms (*Diotrophyme renale*). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 244(5), 555–558. <https://doi.org/10.2460/javma.244.5.555>
- Rambaut, A., & Drummond, A. J. (2003). *Tracer, version 1.2. 1. Program distributed by the author*.
- Ramos-Onsins, S. E., & Rozas, J. (2002). Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, 19(12), 2092–2100. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004034>
- Ras-Carmona, A., Lehmann, A. A., Lehmann, P. V., & Reche, P. A. (2022). Prediction of B cell epitopes in proteins using a novel sequence similarity-based method. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18021-1>
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System: Barcoding. *Molecular Ecology Notes*, 7(3), 355–364. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>
- 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*. *Biochemical Journal*, 471(3), 403–414. <https://doi.org/10.1042/BJ20150068>
- Riemann, F., Malakhov, V. V., Bentz, G. V., & Hope, W. D. (1994). Nematodes: Structure, Development, Classification, and Phylogeny. *Transactions of the American Microscopical Society*, 113(2), 199. <https://doi.org/10.2307/3226648>
- Riveau, G., Deplanque, D., Remoué, F., Schacht, A.-M., Vodougnon, H., Capron, M., Thiry, M., Martial, J., Libersa, C., & Capron, A. (2012). Safety and Immunogenicity of rSh28GST Antigen in Humans: Phase 1 Randomized Clinical Study of a Vaccine Candidate against Urinary Schistosomiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(7), e1704. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001704>
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sanchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sanchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12), 3299–3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
- Salas-Leiva, D. E., Mayor-Durán, V. M., & Toro-Perea, N. (2009). Genetic diversity of black mangrove (*Avicennia germinans*) in natural and reforested areas of Salamanca Island Parkway, Colombian Caribbean. *Hydrobiologia*, 620(1), 17–24. <https://doi.org/10.1007/s10750-008-9611-x>

- Schmidt-Rhaesa, A. (2012). 1. Gastrotricha, Cycloneuralia and Gnathifera: General History and Phylogeny. En *Nematomorpha, Priapulida, Kinorhyncha, Loricifera* (pp. 1–10). DE GRUYTER. <https://doi.org/10.1515/9783110272536.1>
- Schmidt-Rhaesa, A. (2013). Order Dioctophymatida. In *Nematoda* (pp. 317–334). DE GRUYTER. <https://doi.org/10.1515/9783110274257.317>
- Sikder, M. M., Vestergård, M., Sapkota, R., Kyndt, T., & Nicolaisen, M. (2020). *A novel metabarcoding strategy for studying nematode communities*. <https://doi.org/10.1101/2020.01.27.921304>
- Silveira, C. S., Diefenbach, A., Mistieri, M. L., Machado, I. R. L., & Anjos, B. L. (2015). *Dioctophyma renale* em 28 cães: aspectos clinicopatológicos e ultrassonográficos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 35(11), 899–905. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015001100005>
- Sink, C. A., & Weinstein, N. M. (2012). *Practical veterinary urinalysis* (John Wiley & Sons (ed.)).
- Smythe, A. B., Holovachov, O., & Kocot, K. M. (2019). Improved phylogenomic sampling of free-living nematodes enhances resolution of higher-level nematode phylogeny. *BMC Evolutionary Biology*, 19(1), 121. <https://doi.org/10.1186/s12862-019-1444-x>
- Soblik, H., Younis, A. E., Mitreva, M., Renard, B. Y., Kirchner, M., Geisinger, F., Steen, H., & Brattig, N. W. (2011). Life Cycle Stage-resolved Proteomic Analysis of the Excretome/Secretome from *Strongyloides ratti*—Identification of Stage-specific Proteases. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(12), M111.010157. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.010157>
- Soleymani, N., Sadr, S., Santucciu, C., Dianaty, S., Lotfalizadeh, N., Hajjafari, A., Heshmati, F., & Borji, H. (2024). Unveiling Novel Insights in Helminth Proteomics: Advancements, Applications, and Implications for Parasitology and Beyond. In *Biologics* (Vol. 4, Issue 3, pp. 314–344). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/biologics4030020>
- Sonah, H., Bastien, M., Iquira, E., Tardivel, A., Légaré, G., Boyle, B., Normandeau, É., Laroche, J., Larose, S., Jean, M., & Belzile, F. (2013). An Improved Genotyping by Sequencing (GBS) Approach Offering Increased Versatility and Efficiency of SNP Discovery and Genotyping. *PLoS ONE*, 8(1), e54603. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054603>
- Sotillo, J., Ferreira, I., Potriquet, J., Laha, T., Navarro, S., Loukas, A., & Mulvenna, J. (2017). Changes in protein expression after treatment with *Ancylostoma caninum* excretory/secretory products in a mouse model of colitis. *Scientific Reports*, 7(1), 41883. <https://doi.org/10.1038/srep41883>
- Sternberg, P. W., Van Auken, K., Wang, Q., Wright, A., Yook, K., Zarowiecki, M., Arnaboldi, V., Becerra, A., Brown, S., Cain, S., Chan, J., Chen, W. J., Cho, J., Davis, P., Diamantakis, S., Dyer, S., Grigoriadis, D., Grove, C. A., Harris, T., Stein, L. (2024). WormBase 2024: status and transitioning to Alliance infrastructure. *Genetics*, 227(1). <https://doi.org/10.1093/genetics/iyae050>
- Stöcker, W., & Yiallourous, I. (2004). Astacin. In *Handbook of Proteolytic Enzymes* (pp. 595–598). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-079611-3.50166-X>
- Stoeckle, M. (2003). Taxonomy, DNA, and the Bar Code of Life. *BioScience*, 53(9), 796–797. [https://doi.org/doi.org/10.1641/0006-3568\(2003\)053\[0796:tdatbc\]2.0.co;2](https://doi.org/doi.org/10.1641/0006-3568(2003)053[0796:tdatbc]2.0.co;2)

- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 113–130. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2)
- Tajima, F. (1989). *The Effect of Change in Population Size on DNA Polymorphism*. <https://academic.oup.com/genetics/article/123/3/597/5998727>
- Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10(3), 512–526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tanaka, T., Tokiwa, T., Hasegawa, H., Kadosaka, T., Itoh, M., Nagaoka, F., Maruyama, H., Mizuno, Y., Kanoh, H., & Shirai, N. (2020). Morphologically and Genetically Diagnosed Dermal Dioctophyme Larva in a Chinese Man: Case Report. *SN Comprehensive Clinical Medicine*, 2(4), 468–471. <https://doi.org/10.1007/s42399-020-00256-6>
- Tang, H., Ming, Z., Liu, R., Xiong, T., Grevelding, C. G., Dong, H., & Jiang, M. (2013). Development of Adult Worms and Granulomatous Pathology Are Collectively Regulated by T- and B-Cells in Mice Infected with *Schistosoma japonicum*. *PLoS ONE*, 8(1), e54432. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054432>
- Tavare, S. (1984). Line-of-Descent and Genealogical Processes, and Their Applications in Population Genetics Models. *Theoretical Population Biology*, 26, 119–164. [https://doi.org/10.1016/0040-5809\(84\)90027-3](https://doi.org/10.1016/0040-5809(84)90027-3)
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 22). <http://nar.oxfordjournals.org/>
- Tiberti, N., Manfredi, M., Piubelli, C., & Buonfrate, D. (2024). Progresses and challenges in *Strongyloides spp.* proteomics. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 379, Issue 1894). Royal Society Publishing. <https://doi.org/10.1098/rstb.2022.0447>
- Tokiwa, T., Ueda, W., Takatsuka, S., Okawa, K., Onodera, M., Ohta, N., & Akao, N. (2014). The first genetically confirmed case of *Dioctophyme renale* (Nematoda: Dioctophymatida) in a patient with a subcutaneous nodule. *Parasitology International*, 63(1), 143–147. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.09.015>
- Torres Courchoud, I., & Pérez Calvo, J. I. (2016). Biomarcadores y práctica clínica. En *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* (Vol. 39, Número 1, pp. 5–8). Gobierno de Navarra. <https://doi.org/10.4321/S1137-6627/2016000100001>
- Traversa, D., Avolio, S., Modrý, D., Otranto, D., Iorio, R., Aroch, I., Cringoli, G., Milillo, P., Albrechtová, K., Mihalca, A. D., & Lavy, E. (2008). Copromicroscopic and molecular assays for the detection of cancer-causing parasitic nematode *Spirocerca lupi*. *Veterinary Parasitology*, 157(1–2), 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.06.022>
- Trindade, M. A. C., Macedo, M. R. P. de, & Muller, G. (2018). *Dioctophyme renale* (Nematoda: Dioctophymatidae) in *Leopardus geoffroyi* (Carnivora: Felidae) in the Neotropical region. *Revista*

Brasileira de Parasitologia Veterinária, 27(2), 223–225. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612017079>

- Van der Ree, A. M., & Mutapi, F. (2015). The helminth parasite proteome at the host-parasite interface- Informing diagnosis and control. In *Experimental Parasitology* (Vol. 157, pp. 48–58). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.06.007>
- Van Kempen, M., Kim, S. S., Tumescheit, C., Mirdita, M., Lee, J., Gilchrist, C. L. M., Söding, J., & Steinegger, M. (2024). Fast and accurate protein structure search with Foldseek. *Nature Biotechnology*, 42(2), 243–246. <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01773-0>
- Van Megen, H., van den Elsen, S., Holterman, M., Karssen, G., Mooyman, P., Bongers, T., Holovachov, O., Bakker, J., & Helder, J. (2009). A phylogenetic tree of nematodes based on about 1200 full-length small subunit ribosomal DNA sequences. *Nematology*, 11(6), 927–950. <https://doi.org/10.1163/156854109X456862>
- Vanfleteren, J. R., Van De Peer, Y., Blaxter, M. L., Tweedie, S. A. R., Trotman, C., Lu, L., Van Hauwaert, M.-L., & Moens, L. (1994). Molecular Genealogy of Some Nematode Taxa as Based on Cytochrome c and Globin Amino Acid Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 3(2), 92–101. <https://doi.org/10.1006/mpev.1994.1012>
- Vanhamme, L., Souopgui, J., Ghogomu, S., & Ngale Njume, F. (2020). The Functional Parasitic Worm Secretome: Mapping the Place of *Onchocerca volvulus* Excretory Secretory Products. *Pathogens*, 9(11), 975. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110975>
- Wangchuk, P., Kouremenos, K., Eichenberger, R. M., Pearson, M., Susianto, A., Wishart, D. S., McConville, M. J., & Loukas, A. (2019). Metabolomic profiling of the excretory–secretory products of hookworm and whipworm. *Metabolomics*, 15(7), 101. <https://doi.org/10.1007/s11306-019-1561-y>
- Wasmuth, J., Schmid, R., Hedley, A., & Blaxter, M. (2008). On the extent and origins of genic novelty in the phylum nematoda. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000258>
- Watterson, G. A. (1975). On the Number of Segregating Sites in Genetical Models without Recombination. In *Population Biology* (Vol. 7).
- Yang, J., Pan, W., Sun, X., Zhao, X., Yuan, G., Sun, Q., Huang, J., & Zhu, X. (2015). Immunoproteomic profile of *Trichinella spiralis* adult worm proteins recognized by early infection sera. *Parasites and Vectors*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0641-8>
- Zanchett, C. T., & Pedrassani, D. (2020). Parasitismo por *Diectophyme renale* encontrado em cães de abrigos do município de São Mateus Do Sul, Estado Do Paraná. *Archives of Veterinary Science*, 25(3). <https://doi.org/10.5380/avs.v25i3.67935>
- Zarlenga, D. S., Rosenthal, B. M., La Rosa, G., Pozio, E., & Hoberg, E. P. (2006). *Post-Miocene expansion, colonization, and host switching drove speciation among extant nematodes of the archaic genus Trichinella* (Vol. 103, Issue 19). www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0602466103
- Zhong, Z., Zhou, H., Li, X., Luo, Q., Song, X., Wang, W., Wen, H., Yu, L., Wei, W., & Shen, J. (2010). Serological proteome-oriented screening and application of antigens for the diagnosis of Schistosomiasis japonica.

Acta Tropica, 116(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.04.014>