Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

IDENTIFICACIÓN DE TRANSPORTADORES ABC EN MONOGÉNEOS

Por:

Víctor Hugo Caña Bozada

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN EN ACUACULTURA Y MANEJO AMBIENTAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

Mazatlán, Sinaloa Agosto 2019

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Víctor Hugo Caña Bozada, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.

Dr. Francisco Neptalí Morales Serna

Dr. Raúl Llera Herrera

Dra. Silvia Alejandra García Gasca

Dra. Emma Josefina Fajer Ávila

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Identificación de Transportadores ABC en Monogéneos" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Víctor Hugo Caña Bozada, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos

CIAD

Dr. Pablo Wong Gonzalez
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado una beca para la realización de mis estudios. Se les agradece profundamente el apoyo que brindan a ciudadanos de países hermanos.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), por haber abierto sus puertas y brindado la oportunidad de ser parte de su institución. Se les agradece por las facilidades prestadas para el uso de sus instalaciones y sobretodo a todo el personal que forma parte del CIAD, investigadores y técnicos, los cuales fueron parte fundamental en estos dos años de aprendizaje. Gracias por la calides brindada.

Al CONACYT por el financiamiento otorgado a través del proyecto FORDECYT 292474.

Al proyecto número 3285 del programa Cátedras de CONACYT.

Al Dr. Francisco Neptalí Morales Serna, por todo el apoyo académico brindado antes y durante el desarrollo de mi maestría. Quedo muy agradecido por haber sido un buen tutor y sobreto un buen amigo. Sus enseñanzas y la confianza en mí, hicieron que el camino recorrido haya sido una experiencia agradable y que volvería a repetir.

Al Dr. Raúl Llera por el aporte brindado desde su codirección de tesis, y por sus ideas que siempre fueron bienvenidas y provechosas.

A las Dras. Emma Fajer y Alejandra García por el valioso conocimiento impartido desde sus clases y como tutoras.

Se les agradece a la Biol. Rosa María Medina Guerrero, técnica de laboratorio, y a Citlalic Pimentel Acosta, estudiante de doctorado, por las enseñanzas brindadas y por el apoyo en el laboratorio mediante la colecta e identificación de los monogéneos parásitos.

Al Dr. Bruno Gómez por permitirme hacer uso del servidor del CIAD, BIOBACTER.

A mis compañer@s del laboratorio de Parasitología Acuática, Selena, Juan Manuel, David, Liseth, Carmen y Citlalic por haber estado siempre al pendiente de mi.

A mi buen amigo Pablo Almazán, por todo el apoyo brindado desde el inicio hasta el fin de la maestría, gracias por tu amistad incondicional.

A mis compañer@s y amig@s “8 del CIAD”, Karem, Tonatiuh, Dulce, Oscarin, Fernando, Lisbeth y Liov. Con cada uno aprendí y me divertí muchísimo (con alguién también me pelié muchísimo jejejeje). El aprecio a cada uno de ustedes es inmenso.

A Sonia y a Ana por haber sido mis primeras amigas en México y haberme hecho sentir bienvenido.

A mis buenas amigas Dania Gdp. y Martha por todos los buenos momentos compartidos, por haberme dado ánimos y apoyo moral cuando lo necesitaba.

A mis amigos de Ecuador que siempre estuvieron al pendiente.

Al grupo de los reverisimos Bozada, Sarita la pequeña, tía Sarita, tía Sara, Bellita, Tía Bella, Merlita, Paolita, Liz, tía Liz, tía Holanda, tío Marobio, tío Jonhy Arnaldo, Marita, Cesarin y los Michis.

A todos mis amig@s y compañer@s de México les agradezco, haberlos conocidos alimenta mi confianza en las personas. En todos lados siempre hay personas buenas e increíbles para conocer, y aquí conocí muchas que considero “únicas”.

Al gobierno de la Revolución Ciudadana por haber impulsado la educación y la investigación en Ecuador.

DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada a todas las personas que a lo largo de mi vida siempre me han ofrecido su cariño, enseñansas y su amistad.

Mi dedicatoria es especialmente a mis padres, Hugo Caña Blanch y Leticia Bozada. Mi fuerza y mis convicciones siempre se han mantenido intactas por el amor y confianza que me brindan incondicionalmente.

A mis Hermanos, Huguito, Efrencito y Javico, que son parte importante de mi vida.

A mi tía Bella. Me gusta pensar que nos dejaste para convertirte en un angelito.

Y al final pero igual de importante a toda mi familia, tías, primos y sobrinos, los quiero.

CONTENIDO

APROBACIÓN ..... **¡Error! Marcador no definido.**
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL 3
AGRADECIMIENTOS 4
DEDICATORIA 6
CONTENIDO 7
LISTA DE FIGURAS 9
LISTA DE TABLAS 10
RESUMEN 11
ABSTRACT 12
1. INTRODUCCIÓN 13
2. ANTECEDENTES 16
2.1. Monogéneos 16
2.2. Ancyrocephalidae 18
2.3. Género *Scutogyrus* 19
2.4. Mecanismo de Detoxificación 19
2.5. Resistencia Antiparasitaria 22
2.6. Transportadores ABC en Parásitos 24
2.6.1. ABC en Helmintos Parásitos 24
2.6.2. ABC en Artrópodos Parásitos 25
3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN 27
4. OBJETIVOS 28
4.1. Objetivo General 28
4.2. Objetivos Específicos 28
5. MATERIALES Y MÉTODOS 29
5.1. Aislamiento de *Scutogyrus longicornis* 29
5.2. Extracción de ADN 31
5.3. Construcción de Biblioteca Genómica de ADN y Secuenciación 31
5.4. Ensamble de novo de *Scutogyrus longicornis* 32
5.4.1. Control de Calidad, Limpieza de Lecturas y Ensamble 32
5.4.2. Predicción de Genes 33
5.5. Identificación de Proteínas ABC 35
5.6. Extracción de Dominios y Asignación de Subfamilias 36
5.7. Análisis Filogenético de Proteínas ABC 37
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 39
6.1. Análisis Morfométrico 39
6.2. Ensamble de Novo del Genoma de *Scutogyrus longocornis* 45

CONTENIDO (Continuación)

6.3. Identificación de Proteinas ABC 46
6.4. Análisis Filogenéticos por Subfamilia 62
6.4.1. Subfamilia ABCA 62
6.4.2. Subfamilia ABCB 64
6.4.3. Subfamila ABCC 68
6.4.4. Subfamila ABCD 711
6.4.5. Subfamila ABCE 722
6.4.6. Subfamila ABCF 744
6.4.7. Subfamila ABCG 777

7. CONCLUSIONES 79

8. RECOMENDACIONES 811

9. REFERENCIAS 82

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ciclo de vida generalizado de un monogéneo Monopisthocotylea	17
2	Microfotografía de luz de cuerpo entero de *Cichlidogyrus* philander	17
3	*Cichlidogyrus sclerosus*	18
4	Esquema del mecanismo de detoxificación de xenobióticos	20
5	Dominios de las proteínas ABC presentes en los transportadores ABC completos y parciales	21
6	Medidas utilizadas en este estudio	30
7	Esquema del funcionamiento del kit REPLI-g Single Cell MDA de Qiagen	32
8	Pipeline para el ensamble del genoma de *Scutogyrus longicornis*	33
9	Pipeline de predicción y anotación de genes	35
10	Pipeline para identificación de genes ABC putativos y obtención de los dominios (NBD y TMD)	36
11	Pipelines para el análisis filogenético por subfamilia ABC	38
12	Pipeline para obtención de dominios NBD y análisis filogenéticos por especie	38
13	Especies de monogéneos encontradas en la tilapia	42
14	Estructuras esclerotizadas y cuerpo de cuatro especies de monogéneos encontradas en la tilapia	43
15	Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) de la morfometría proporcional de las 4 especies de monogéneos que se encontraron infectando a la tilapia	44
16	Árbol filogenético no enraizado de dominios NBD de proteínas ABC de *Gyrodactylus salaris*	52
17	Árbol filogenético no enraizado de dominios NBD de proteínas ABC de *Eudiplozoon nipponicum*	53
18	Análisis filogenéticos de transportadores ABCA de 8 especies de metazoarios	63
19	Análisis filogenéticos de transportadores ABCB de nueve especies de metazoarios	67
20	Análisis filogenético de transportadores ABCC de 9 especies de metazoarios	70
21	Análisis filogenético de transportadores ABCD de 9 especies de metazoarios	72
22	Análisis filogenético de transportadores ABCE de 9 especies de metazoarios	74
23	Análisis filogenéticos de transportadores ABCF de 9 especies de metazoarios	76
24	Análisis filogenéticos de los transportadores parciales ABCG de 9 especies de metazoarios	78

LISTA DE CUADROS

Cuadros **Página**

1 Ejemplos de posibles moléculas de señalización que son sustratos de transportadores ABC…….. ….22

2 Longitud promedio de diferentes estructuras corporales de cuatro especies de monogéneos…….. ….41

3 Análisis de similitud (ANOSIM) entre cada especie de monogéneo……...…..44

4 Análisis de porcentajes de similitud (SIMPER) para las especies de monogéneos…..…..45

5 Número de miembros de cada subfamilia ABC en 11 metazoarios……. ….48

6 Resumen de los 34 transportadores ABC identificados *G. salaris*……..…..49

7 Resumen de los 46 transportadores ABC identificados en *E. nipponicum*……..…..54

8 Resumen de los 40 transportadores ABC identificados en *P. xenopodis*……..…..57

9 Resumen de los 9 transportadores ABC identificados en *N. melleni*……...…..60

10 Resumen de los 10 transportadores ABC identificados en *S. longicornis*……...…..61

RESUMEN

Los transportadores ABC son una familia de proteínas involucrada en el mecanismo celular de detoxificación de xenobióticos prácticamente en cualquier organismo. En parasitología, los ABC han llamado la atención por su papel en el desarrollo de resistencia antiparasitaria. La creciente disponibilidad de genomas ha permitido reconocer diversos transportadores ABC en platelmintos parásitos de las clases Trematoda y Cestoda; sin embargo, en la clase Monogenea permanecen desconocidos. Los monogéneos son parásitos de organismos acuáticos, principalmente peces, e incluyen especies altamente patógenas que representan un riesgo para la industria acuícola. El objetivo de este trabajo fue identificar los transportadores ABC en cuatro especies de monogéneos (*Gyrodactylus salaris, Protopolystoma xenopodis, Eudiplozoon nipponicum* y *Neobenedenia melleni*) que actualmente cuentan con datos genómicos disponibles publicamente. Además, se secuenció el ADN de *Scutogyrus longicornis*, monogéneo que infecta a la tilapia, y se obtuvo un primer borrador del ensamble de su genoma. La integridad del genoma fue evaluada con el programa BUSCO, el cual determinó que sólo se obtuvo el 14.9% del cluster de genes ortólogos del grupo metazoa de los genes esperados. Los archivos de proteínas predichas de las cinco especies de monogéneos fueron utilizadas para identificar los transportadores ABC mediante análisis bioinformáticos. Se encontraron 34 transportadores ABC putativos en el genoma de *G. salaris*, 40 en el genoma de *P. xenopodis*, 46 en el transcriptoma de *E. nipponicum*, 9 en las secuencias EST disponibles para *N. melleni* y 10 en el genoma de *S. longicornis*. Se identificaron miembros de siete subfamilias, siendo ABCC la subfamilia más grande. Los análisis filogenéticos mostraron que algunos integrantes de las subfamilias B, C y G se relacionan con proteínas del humano, las cuales desempeñan función de transporte de fármacos. Transportadores ABC de *N. melleni* y *G. salaris*, especies conocidas por ocasionar problemas en peces de cultivo, estuvieron incluidos dentro de esta relación. Esta información puede ser útil para futuros estudios funcionales sobre transportadores ABC en monogéneos y para para el entendimiento de la acción de antihelmínticos.

Palabras claves: Platyhelminthes, detoxificación, transportadores de fármacos

ABSTRACT

ABC transporters are a family of proteins involved in the cellular mechanism of detoxification of xenobiotics in practically any organism. In parasitology, ABCs have attracted attention for their role in the development of antiparasitic resistance. The increasing availability of genomes has made it possible to recognize several ABC transporters in parasitic flatworms of the Trematoda and Cestoda classes; however, in the Monogenea class they remain unknown. Monogeneans are parasites of aquatic organisms, mainly fish, and include highly pathogenic species that pose a risk to the aquaculture industry. The objective of this work was to identify ABC transporters in four monogeneans species (*Gyrodactylus salaris*, *Protopolystoma xenopodis*, *Eudiplozoon nipponicum* and *Neobenedenia melleni*) that currently have publicly available genomic data. In addition, it was sequenced the DNA of *Scutogyrus longicornis*, a monogenean that infects the tilapia, and a first draft of the assembly of its genome was obtained. The integrity of the genome was evaluated with the BUSCO program, which determined that only 14.9% of the metazoan orthologous gene cluster of the expected genes was obtained. The predicted protein files of the five monogeneans species were used to identify the ABC transporters by bioinformatic analysis. We found 34 putative ABC transporters in the genome of *G. salaris*, 40 in the genome of *P. xenopodis*, 46 in the transcriptome of *E. nipponicum*, 9 in the EST sequences available for *N. melleni* and 10 in the genome of *S. longicornis*. Members of seven subfamilies were identified, with the subfamaly C being the largest. Phylogenetic analyzes showed that some members of subfamilies B, C and G are related to human proteins, which play the role of drug transport. ABC transporters of *N. melleni* and *G. salaris*, species known to cause problems in farmed fish, were included in this relationship. This information may be useful for future functional studies on ABC transporters in monogeneans and for the understanding of the action of anthelmintics.

Keywords: Platyhelminthes, detoxification, drug transporters

1. INTRODUCCIÓN

A nivel celular, prácticamente todos los organismos tienen mecanismos de detoxificación para enfrentar ambientes adversos. Estos mecanismos se pueden dar en tres fases: I, biotransformación del xenobiótico con procesos metabólicos como oxidación, reducción e hidrólisis; II, conjugación de los metabolitos con compuestos endógenos; y III, expulsión de metabolitos fuera de la célula por medio de proteínas transportadoras de membrana (Szakács et al., 2006; Matoušková et al., 2016). La fase III involucra varias familias de proteínas, destacando los transportadores de casette de unión a ATP (ABC), tanto por ser de las familias más grandes de proteínas en muchos genomas como por su habilidad para translocar una gran variedad de sustratos, incluyendo fármacos (Sheps et al., 2004; Higgins, 2007; Matoušková et al., 2016). Los transportadores ABC también participan en el inicio, elongación y terminación de la traducción y reparación del ADN (Goosen y Moolenaar, 2001; Chen et al., 2006; Davidson et al., 2008; Jeong et al., 2015). No obstante, el interés en estas proteínas es principalmente por su actividad transportadora.

Los transportadores ABC se encuentran en organismos en toda la escala filogenética (Dassa y Bouige, 2001), en bacterias participan en el influjo y eflujo de moléculas, mientras que en eucariotas sólo en el eflujo. Esta familia se divide en ocho subfamilias conocidas como ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF, ABCG y ABCH, clasificación basada en la homología de secuencias del dominio de unión a nucleótidos (NBD) (Leprohon et al., 2011). No todas las subfamilias están presentes en todos los organismos. En plantas se ha identificado la subfamilia I pero no la H (Ofori et al., 2018).

La funcionalidad de las proteínas ABC depende del número de dominios y su organización estructural. La estructura típica consiste en segmentos transmembranales que componen el dominio de transmembrana (TMD) y los motivos Walker A y Walker B los cuales conforman el NBD (Leprohon et al., 2011). Dentro de las proteínas ABC con funcionalidad de transporte encontramos los transportadores completos, que poseen dos TMD y dos NBD de forma intercalada (TMD-NBD-TMD-NBD), y los transportadores parciales, que poseen un TMD y un NBD (Leprohon et al.,

2011; Sarkadi et al., 2006). En ambos transportadores, los NBD se unen a moléculas ATP para, mediante un proceso de hidrólisis, generar la energía requerida por los TMD para crear un poro en la membrana por donde translocar a los sustratos (Aller et al., 2009; Greenberg, 2013). Por lo general, el sustrato es transportado contra un gradiente químico (Wilkens, 2015). Además del transporte a través de la membrana celular, éste también se puede dar a través de las membranas intracelulares del retículo endoplásmico (ER) (Dean et al., 2001), peroxisoma (ABCD3) (Wanders et al., 2007) y mitocondria (Young et al., 2001), dependiendo del tipo de proteína ABC. Otra característica que varía entre diferentes tipos de proteínas ABC es la selectividad de sustrato.

En parasitología, los transportadores ABC han llamado la atención como blancos de fármacos antiparasitarios. En los platelmintos parásitos, los cuales pertenecen a tres clases (Cestoda, Trematoda y Monogenea), el estudio de los transportadores ABC se ha centrado sólo en algunas especies de tremátodos y céstodos, dando énfasis a la identificación y caracterización de las subfamilias B y C por su participación en el desarrollo de resistencia antihelmíntica (Greenberg, 2013; Nicolao et al., 2014; Matoušková et al., 2016). El reconocimiento de la función de estas proteínas ha permitido explorar el diseño de fármacos más eficientes. Por ejemplo, al aplicar un antihelmíntico junto con inhibidores de transportadores ABC se puede suprimir la actividad de la glicoproteína-P (gp-P, miembro de la subfamilia B) y aumentar la susceptibilidad del parásito al fármaco (Kasinathan et al., 2014; Mordvinov et al., 2017).

Hasta donde se sabe, los transportadores ABC no han sido estudiados en platelmintos parásitos de la clase Monogenea. La diversidad de monogéneos incluye aproximadamente 5000 especies (Whittington y Chisholm, 2008), las cuales parasitan principalmente peces, pero también se pueden encontrar en otros organismos acuáticos. Estos parásitos tienen un ciclo de vida directo e infectan la piel, branquias, cavidad bucal y aletas de los peces, llegando a ocasionar lesiones que generan hemorragias, pérdida de apetito, problemas osmoregulatorios, retardo de crecimiento e incluso la muerte (Hayward, 2005; Ogawa, 2015; Hirazawa et al., 2016). Algunas especies de monogéneos, especialmente de las familias Capsalidae, Diplectanidae, Ancyrocephalidae, Gyrodactylidae, Microcotylidae y Diclidophoridae han sido registradas ocasionando problemas en cultivos de peces (Ogawa, 2015). De hecho, *Gyrodactylus salaris* ha sido enlistada por la Oficina Internacional de

Epizootias (OIE) como una especie altamente patógena y de declaración obligatoria para los salmónidos en cultivo.

Si bien existe una variedad de tratamientos contra monogéneos, como la formalina, peróxido de hidrogeno, sulfato de cobre, cloruro de sodio, praziquantel y mebendazol, estos no son siempre totalmente efectivos y pueden ser tóxicos no solamente para el pez, sino también para el humano y el ecosistema (Schelkle et al., 2009; Ogawa, 2015; Morales-Serna et al., 2018a). Además, se tiene la preocupación del posible desarrollo de resistencia antihelmíntica. Por ejemplo, Buchmann et al. (1992) observaron que las poblaciones de monogéneos tratadas subterapéuticamente con mebendazol desarrollaron resistencia a este fármaco.

La eficacia de los compuestos antiparasitarios se podría mejorar con base en análisis genómicos que ayuden a identificar genes o proteínas relevantes para la detoxificación (e.g., Zheng et al., 2013). En el caso de los monogéneos, actualmente existe información genómica disponible de sólo cuatro especies. Por lo tanto, el presente estudio pretende contribuir al campo de la genómica de los monogéneos e identificar los transportadores ABC mediante análisis bioinformáticos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Monogéneos

Los monogéneos son un grupo muy diverso de helmintos que se encuentran parasitando principalmente peces. Existen aproximadamente 5000 especies de monogéneos descritas (Whittington y Chisholm, 2008) y se estima que el número podría llegar a 25000 (Whittington, 1998). Estos parásitos poseen un ciclo de vida directo (Figura 1), generalmente corto, y aunque son hermafroditas también realizan la fertilización cruzada. La mayoría de las especies son ovíparas; con excepción de las especies de la familia Gyrodactylidae que son vivíparas con la capacidad de autofertilización. Como se ilustra en la Figura 1, de cada huevo emerge una larva de vida libre llamada oncomiracidio que se encarga de encontrar e infectar a un pez hospedero para continuar con su desarrollo y llegar a la etapa adulta. El desarrollo desde huevo hasta adulto puede ser de aproximadamente 16 días a 25°C (Dinh y Hutson, 2014). Estas características permiten a los monogéneos multiplicarse rápidamente y provocar una epizootia. Por ejemplo, un individuo de *Neobenedenia* sp. totalmente aislado es capaz de producir aproximadamente 3,300 huevos en 17 días (Dinh y Hutson, 2014). Asimismo, un solo individuo de *Gyrodactylus salaris* es capaz de producir seis millones de individuos en cuatro semanas (Whittington y Chisholm, 2008).

Los monogéneos son organismos con alta especificidad de hospedero. Principalmente infectan la superficie externa como la piel, aletas, cabeza, branquias y cavidad oral, adhiriéndose mediante una estructura llamada háptor (Figura 2) (Whittington, 2005). Los monogéneos se encuentran divididos en dos subclases, Monopisthocotylea y Polyopisthocotylea, dentro de los cuales se encuentran 12 órdenes (Hayward, 2005; Whittington, 2005) y 53 familias (Boeger y Kritsky, 2001). La disposición, la morfología y el origen de los elementos de las estructuras esclerotizadas del háptor y órgano copulador (Figuras 2 y 3) son importantes para la clasificación, la sistemática y la identificación de especies (Fannes et al., 2017; Igeh et al., 2017).

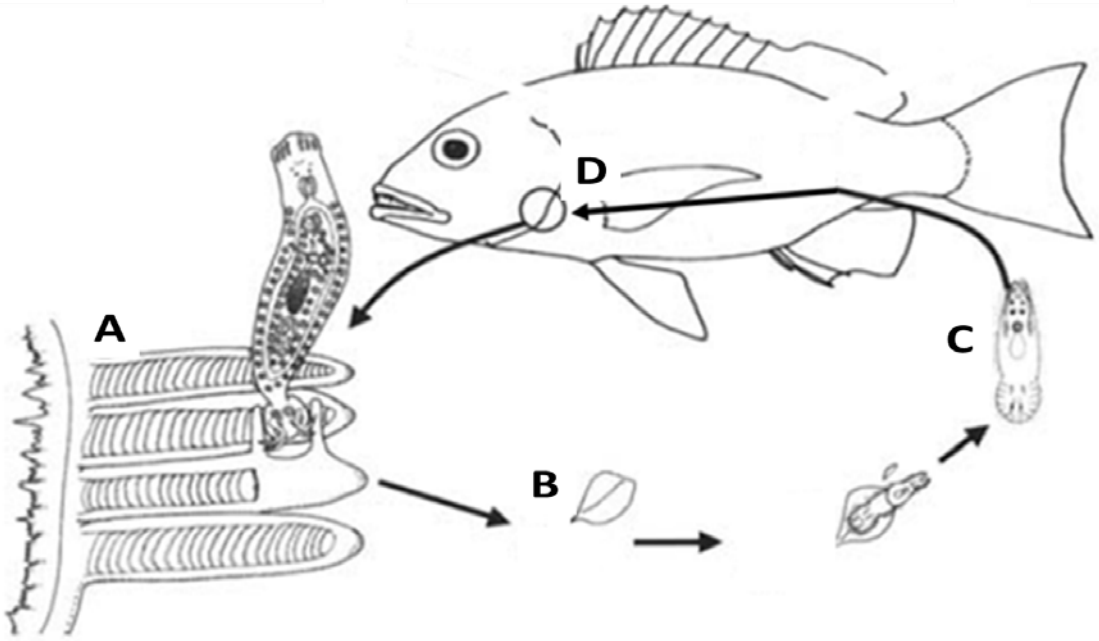

Figura 1. Ciclo de vida generalizado de un monogéneo Monopisthocotylea. A. Parásito adulto en las branquias, entre las lamelas secundarias. B. Los parásitos liberan huevos en el agua. C. La larva (= oncomiracidio) que eclosiona es la etapa infectiva. D. La larva debe ubicarse y unirse a un pez hospedero (modificado de Whittington, 2005).

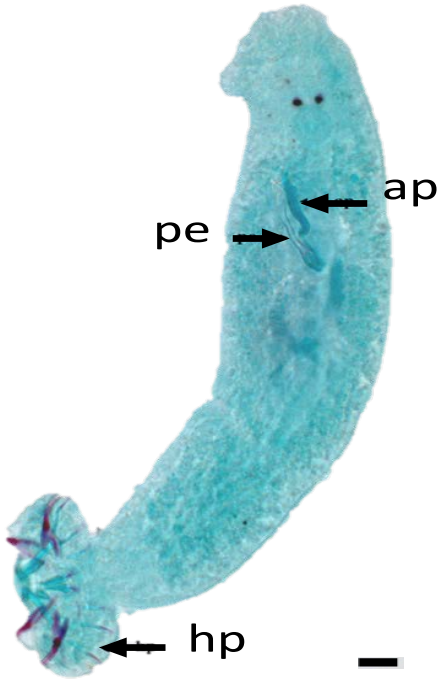

Figura 2. Microfotografía de luz de cuerpo entero de *Cichlidogyrus philander*; Abreviaturas: ap, pieza accesoria; hp haptors; pe pene. Barras de escala: A, 20 µm. Modificado de Igeh et al. (2017).

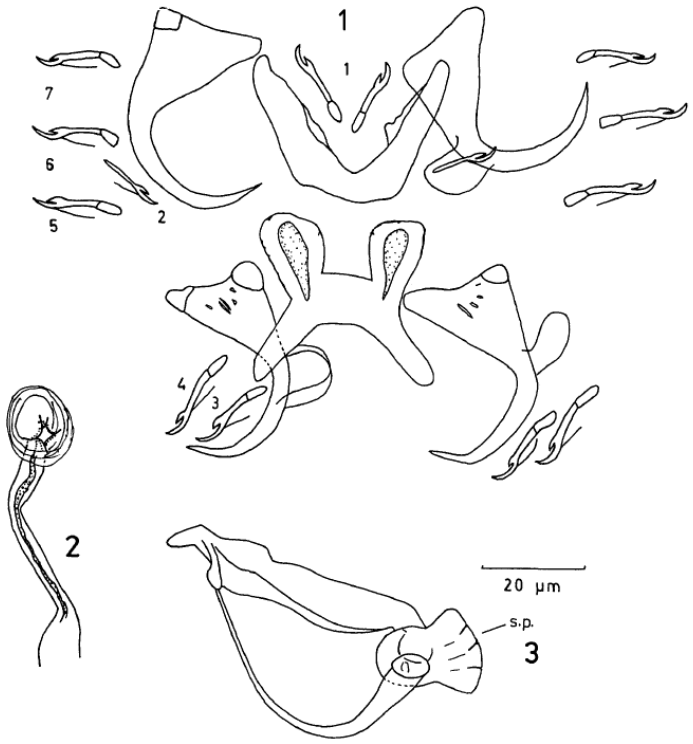

Figura 3. *Cichlidogyrus sclerosus*. 1. Armadura haptoral. 2. Vagina. 3. órgano copulatorio. Abreviatura: s.p., placa dentada. Tomada de Douëllou (1993).

2.2. Ancyrocephalidae

Los monogéneos de la familia Ancyrocephalidae son parásitos de branquias de peces de agua dulce, marinos y salobres principalmente (Reed et al., 2009). Las especies de esta familia son ovíparas y tienen un ciclo de vida directo típico de los monogéneos (Figura 1) (Reed et al., 2009). Las características distintivas de Ancyrocephalidae incluyen dos pares de manchas oculares y dos pares de ganchos de anclajes con su respectiva barra transversal (Reed et al., 2009). Además, presentan de 12 a 14 uncinulus marginales que pueden estar ausentes en algunas especies. Esta familia cuenta con 77 géneros (WoRMS, 2018). Debido a la diversidad que posee la familia Ancyrocephalidae, es importante la observación de patrones morfológicos para su identificación. Para la discriminación de especies se ha utilizado mayormente la morfología del órgano copulatorio y las partes haptorales (Igeh et al., 2017); sin embargo, puede existir similitud en estas estructuras. Por ejemplo, Fannes et al. (2017) encontraron similitud en dos especies de la familia Ancyrocephalidae,

pertenecientes al género *Cichlidogyrus*, que co-existían en tilapias, lo cual podría dirigir a errores de identificación. En estos casos, estudios más profundos como el uso de técnicas moleculares pueden ser utilizadas.

Algunas especies de Ancyrocephalidae, como *Cichlidogyrus sclerosus, C. tilapiae C. dossoui* y *Scutogyrus longicornis* son comunes en tilapias cultivadas tanto en México como en otras regiones del mundo (Akoll et al., 2012; Paredes-Trujillo et al., 2016; Morales-Serna et al., 2018b). Entre los daños que esta familia puede ocasionar al hospedero se encuentran: branquias hiperémicas, lesiones en la piel y letargo (Omrani, 2014). Estos parásitos no son conocidos por causar problemas serios a los peces, pero sí por causar alteraciones histológicas e inmunológicas (Sandoval-Gío et al., 2008; Pahor-Filho et al., 2017).

2.3. Género *Scutogyrus*

Dentro de la familia Ancyrocephalidae, el género *Scutogyrus* incluye 7 especies cuya característica distintiva es una barra dorsal alada con aurículas muy largas y barra ventral asociada a una placa (Pariselle y Euzet, 2009; Pariselle et al., 2013). Estas características permiten separar al género *Scutogyrus* del género *Cichlidogyrus*, cuyas especies posee una barra dorsal con aurículas cortas y barra ventral no asociada con una placa. Para la discriminación entre especies se utilizan características morfológicas como tamaño de pene y vagina, longitud del pene, forma de la base y terminación de la pieza accesoria del pene (Pariselle y Euzet, 1995; Pariselle y Euzet, 2009).

2.4.Mecanismo de Detoxificación

Los organismos tienen genes que codifican a enzimas y proteínas transportadoras que ayudan en la protección contra toxinas ambientales y fármacos (Laing et al., 2013). El mecanismo de detoxificación se divide en tres fases que son: fase de biotransformación y fase de conjugación, en

las cuales intervienen enzimas que biotransforman los xenobióticos con la capacidad de abolir la eficacia de fármacos; y la fase de transporte en el que intervienen proteínas transmembranales (Figura 4) (Matoušková et al., 2016). En la primera fase intervienen enzimas como citocromo P450 (CYPs), capaces de metabolizar una amplia gama de sustratos endógenos y exógenos. Esta enzima tiene la capacidad de oxidar, reducir e hidrolizar toxinas para introducir o exponer grupos funcionales reactivos que posteriormente puedan conjugarse con moléculas como glutatión, ácido glucurónico o glucosa. En el proceso de conjugación intervienen enzimas como glutatión S-transferasa (GST) que sirve de mediadora (James et al., 2009). Finalmente, las toxinas metabolizadas son eliminadas de la célula por proteínas transmembranales como lo son los transportadores ABC (James et al., 2009).

Los ABC son una de las familias de genes más estudiadas desde la perspectiva de detoxificación de xenobióticos (Matouskova et al., 2016). Estos genes se pueden encontrar en organismos de todos los reinos de vida (Dassa y Bouige, 2001). En eucariotas se reconocen ocho subfamilias de transportadores ABC (ABCA – ABCH) con base en la similitud en la secuencia NBD (Leprohon et al., 2011).

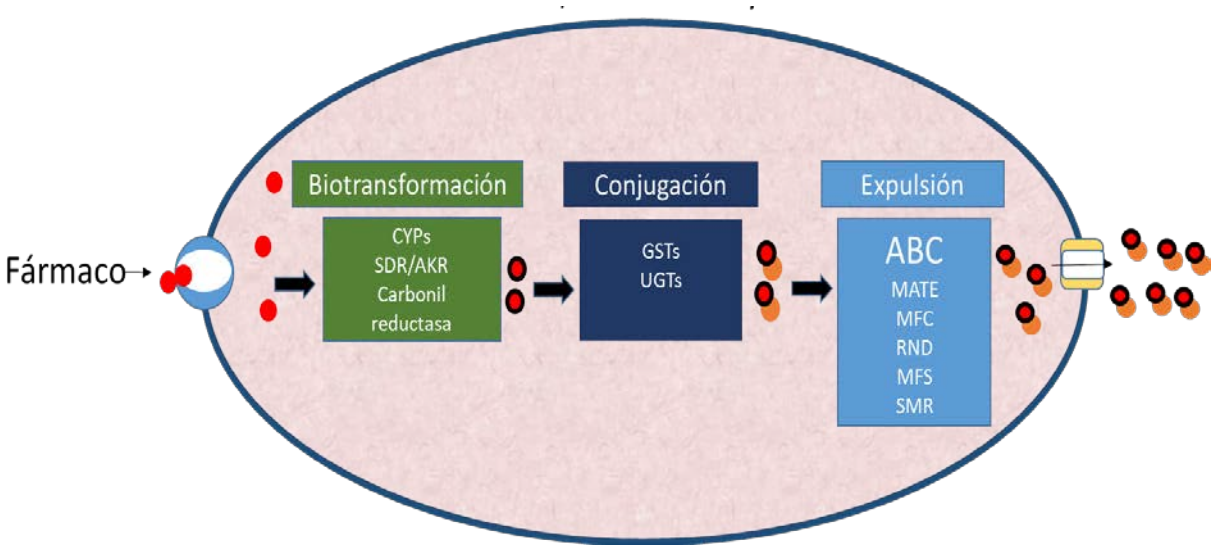

Figura 4. Esquema del mecanismo de detoxificación de xenobióticos. Mientras que en la fase de biotransformación y conjugación intervienen enzimas, en la fase de expulsión interviene proteínas transmembranales. Modificado de Matoušková et al. (2016).

Los transportadores ABC están codificados como transportadores completos (TMD-NBD-TMD-NBD) o como transportadores parciales (TMD-NBD) (Figura 5) que se combinan como homo- o hetero-dímeros para crear una unidad funcional (Leprohon et al., 2011). La selectividad del sustrato puede variar entre cada subfamilia (Tabla 1) (Greenberg, 2013), en donde además las diferentes fases del sistema detoxificador pueden estar asociadas. Por ejemplo, la proteína ABCC1 transporta preferentemente aniones orgánicos y productos metabólicos de la fase II como conjugados de glutatión al igual que otros miembros de la subfamilia C (Szakács et al., 2006). Las proteínas ABCB1, ABCC1 y ABCG2 se encuentran entre las más estudiadas (Wong et al., 2014) ya que han sido relacionadas con el fenómeno de resistencia a multidrogas (MDR) en humanos y roedores (Sharom, 2008). En particular, la ABCB1 de mamíferos es ampliamente conocida en cuanto a su estructura y mecanismo de acción. ABCB1 está involucrada en el fenómeno MDR en tumores y puede transportar una amplia gama de compuestos estructuralmente diferentes, muchos de los cuales son clínicamente importantes, incluidos los medicamentos contra el cáncer, inhibidores de la proteasa del VIH, analgésicos, antihistamínicos, antagonistas de los receptores H2, agentes inmunosupresores, glucósidos cardíacos, bloqueadores de los canales de calcio, antagonistas de la calmodulina, antieméticos, antihelmínticos, antibióticos y esteroides (Sharom, 2008).

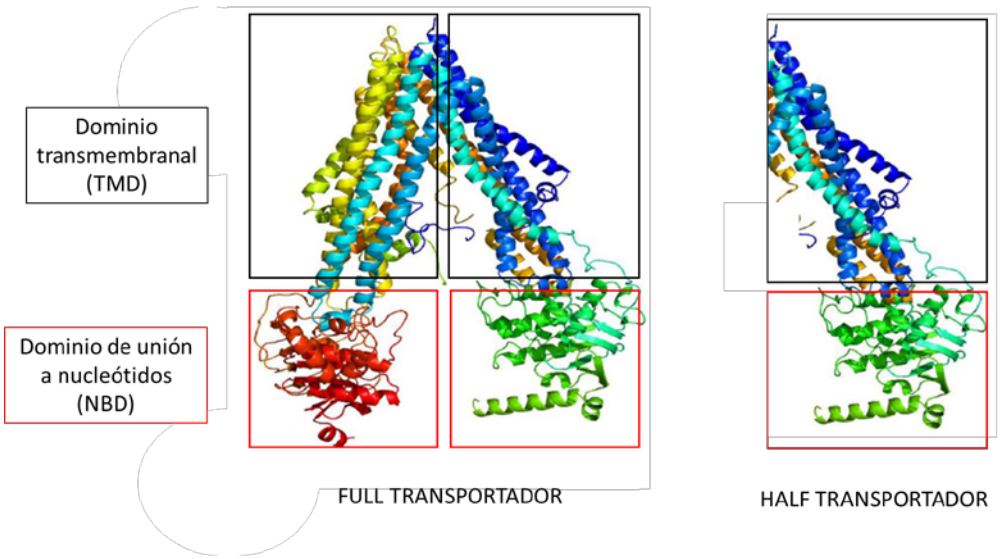

Figura 5. Dominios de las proteínas ABC presentes en los transportadores ABC completos y parciales. Modificado de Mordinov et al. (2017)

Cuadro 1. Ejemplos de posibles moléculas de señalización que son sustratos de transportadores ABC en metazoarios. Tomado de Greenberg (2014).

Compuesto	Función	Transportador(es)
Factor activador de plaquetas (PAF)	Mediador de inflamación	ABCB1 (Pgp)
Fosfolípidos [e.g., fosfatidilcolina, fosfatidilserina (PS), Fosfatidiletanolamina]	Integridad de la membrana, regulación del ciclo celular; señalización celular; esquistosoma PS y liso-PS polarizan DC	ABCB1, ABCB3, ABCA1, ABCA2, ABCG2 (BCRP)
Nucleótido cíclico	Regulador de la respuesta inflamatoria, polarización de monocitos, maduración	ABCC4, ABCC5, ABCC11
Esfingosina-1-fosfato (S1P)	Localización de células T; inmunosupresión	ABCB1
Leucotrieno LTC4	Mediador de inflamación; migración de DC	ABCC1, other ABCCs (MRPs)
LTB4, LTD4, LTE4	Mediador de inflamación; migración de DC	ABCC1, ABCC4
Prostaglandinas PGE1, PGE2, PGE2α	Migración/maduración de DC; inmune supresión	ABCC4
Esfingomielina, glicolípidos, colesterol	Múltiple	ABCB1, ABCAs
Péptidos	Presentador de antígeno	ABCB2/3 (TAP1/2)
dsRNA	Activador de TLR3 en DCs por huevos de schistosoma	*C. elegans*ABCA, ABCB□, ABCD, ABCGs

2.5. Resistencia Antiparasitaria

En parasitología veterinaria, se dice que una población de parásitos ha desarrollado resistencia antiparasitaria cuando la frecuencia de individuos capaces de tolerar un fármaco ha aumentado

respecto al pasado, siendo heredable y más grande que en una población normal (susceptible) de la misma especie (Coles, 2006). Hay una resistencia completa cuando la dosis máxima de fármaco tolerada por el hospedero no tiene ningún efecto sobre la población de parásitos (Coles, 2006). Cabe aclarar que los parásitos tolerantes se definen como aquellos que de forma innata, sin exposición previa, no son susceptibles a un fármaco (Fallon et al., 1996). Por lo tanto 'tolerancia' no se usa para describir niveles intermedios de resistencia, sino que se limita a la inactividad innata de un fármaco hacia una etapa o una especie particular de parásito, en la cual podría esperarse actividad como resultado de eficacia farmacológica frente a una especie estrechamente relacionada (Coles, 2006).

La resistencia antiparasitaria puede ser causada por diferentes procesos, incluyendo una mutación genética, cambios en la expresión de genes, mejorías en el mecanismo de detoxificación, conjunto de parásitos que podría incluir un solo gen u otros alelos como primer paso en el desarrollo de la resistencia a determinados medicamentos. Además, la selección de alelos o genes adicionales que contribuyen a la resistencia podría aumentar el nivel de resistencia (Wolstenholme et al., 2004).

La resistencia antihelmíntica en parásitos de animales es un problema importante en todo el mundo (Wolstenholme et al., 2004). Los principales antihelmínticos usados en medicina veterinaria incluyen ivermectina, bencimidazoles, imidazotiazoles y praziquantel (McKellar y Jackson, 2004). El problema más grave de resistencia antihelmíntica ha sido observado en nemátodos parásitos de las ovejas y las cabras, los cuales han adquirido resistencia a todas las clases principales de fármacos (James et al., 2009). Además, la eficacia de los antihelmínticos puede variar debido a la heterogeneidad genética de las poblaciones de parásitos (James et al., 2009). En tremátodos, particularmente del género *Schistosoma*, también se han observado diversos eventos de resistencia a fármacos (Cioli et al., 1995).

La capacidad de los monogéneos para desarrollar resistencia antihelmíntica fue demostrada experimentalmente por Buchmann et al. (1992). Estos autores primero determinaron la concentración letal del mebendazol en dos especies de monogéneos (*Pseudodactylogyrus bini* y *P. anguillae*), después los monogéneos fueron expuestos a concentraciones sub-letales de mebendazol por 7 meses, una vez transcurrido ese tiempo realizaron una prueba de toxicidad y observaron que

la concentración letal ya no fue efectiva. Los mecanismos moleculares utilizados por los monogéneos para desarrollar resistencia son desconocidos. Sin embargo, estos podrían ser como en los tremátodos y céstodos, dado su parentesco filogenético.

2.6.Transportadores ABC en Parásitos

El estudio de los ABC en metazoarios parásitos ha abarcado principalmente la identificación y caracterización de la glicoproteína-P (gp-P) (Jeong et al., 2014). Sin embargo, actualmente, los estudios genómicos y bioinformáticos están permitiendo predecir una variedad amplia de transportadores ABC y su función tanto en helmintos como en artrópodos parásitos que han afectado a la salud humana o a la producción de alimentos (Sturm et al., 2009; Carmona-Antoñanzas et al., 2015; Mordvinov et al., 2017).

2.6.1. ABC en Helmintos Parásitos

En los platelmintos parásitos, particularmente en tremátodos y céstodos como *Schistosoma mansoni, Opisthorchis felineus, Hymenolepis microstoma*, se han identificado siete de las ocho subfamilias ABC conocidas en metazoarios, dentro de las cuales existen miembros asociados a la resistencia a tratamientos antihelmínticos (Greenberg, 2013; Kasinathan et al., 2014). En *S. mansoni* se han identificado un total de 29 transportadores (Kasinathan y Greenberg 2012), de los cuales la gp-P cumple un rol importante en el eflujo de xenobióticos. Esto se ha demostrado en experimentos como el de Kasinathan et al. (2014), quienes observaron que los parásitos expuestos a concentraciones sub-letales de praziquantel permanecieron activos; sin embargo, cuando el praziquantel se co-administró con un inhibidor de gp-P o con inhibidores múltiples de ABC los parásitos perdieron por completo la motilidad y presentaron daño en el tegumento.

En *O. felineus* se han realizado estudios de identificación, filogenética y de caracterización funcional de los ABC. En el transcriptoma de esta especie, Mordvinov et al. (2017) identificaron 23 transportadores ABC, de los cuales cuatro fueron clasificados como gp-P. Estos autores observaron que el parásito es capaz de expulsar la resofurina, un xenobiótico que es sustrato de gp-P; sin embargo, cuando aplicaron la resofurina junto con tariquidar y verapamil (que son inhibidores de ABC) observaron que la resofurina penetró en el tejido del parásito, con lo cual Mordvinov et al. (2017) demostraron que las gp-P de *O. felineus* funcionan como bombas eflujo de xenobióticos y, por lo tanto, podrían ser utilizadas como dianas moleculares para mejorar la eficacia de los compuestos antihelmínticos.

En céstodos, la información sobre los transportadores ABC es muy limitada. Mediante un análisis bioinformático poco riguroso, Matoušková et al. (2016) identificaron 27, 18 y 32 transportadores ABC en *Echinococcus multilocularis*, *Hymenolepis microstoma* y *Taenia solium*, respectivamente. En *Echinococcus granulosus*, Nicolao et al. (2014) identificaron cinco genes que codifican a gp-P (Eg-Pgp) y demostraron que los genes *eg-pgp1* y *eg-pgp2* se sobre-expresan en respuesta a los fármacos amiodarona y loperamida. Además, estos autores observaron que el parásito es capaz de expulsar la calceína-AM, el cual es un sustrato de gp-P y MRP1, pero lograron inhibir dicha expulsión tras la aplicación de compuestos conocidos por ser inhibidores potenciales de gp-P como loperamide y trifluoperazine.

2.6.2. ABC en Artrópodos Parásitos

Los transportadores ABC han sido estudiados en dos especies de copépodos parásitos, *Caligus rogercresseyi* y *Lepeophtheirus salmonis*, las cuales han sido reconocidas por impactar el cultivo de salmónidos. En estos copépodos se han encontrado las 8 subfamilias ABC. En *L. salmonis*, Carmona-Antoñanzas et al. (2015) identificaron 33 genes ABC de los cuales 18 fueron asignados a subfamilias que contienen función transportadora de fármacos. En *C. rogercresseyi*, Valenzuela-Muñoz et al. (2015) identificaron 57 genes ABC, de los cuales, aquellos pertenecientes a las

subfamilias B y C fueron mayormente expresados cuando los copépodos se expusieron a compuestos antiparasitarios (deltametrina o azametifos).

Tetranychus urticae, comúnmente conocida como araña roja, es un parásito de plantas y se considera como una de las plagas más polífagas del mundo. Este parásito ha recibido mucha atención debido a su impacto negativo en la agricultura y a su tolerancia a diversos plaguicidas (van Leeuwen et al., 2010). Para comprender el mecanismo de detoxificación de *T. urticae*, Dermauw et al. (2013) realizaron un estudio que comprendió el inventario, relaciones filogenéticas y avaluación de la expresión de los genes ABC. Estos autores identificaron un total de 103 genes distribuidos en las ocho subfamilias (ABCA-H), siendo el mayor número de genes ABC encontrados en cualquier especie de metazoo, con la expansión de las subfamilias C, G y H. Su análisis reveló una expresión diferencial de los miembros las subfamilias C, G y H tras la exposición del hospedero a xenobióticos, sugiriendo su papel fundamental en la detoxificación, un hecho que también puede explicar su retención después de la duplicación del genoma. De acuerdo con Dermauw et al. (2013), la diversidad amplia de plantas hospederas y los niveles altos de resistencia a los plaguicidas están asociadas con expansiones específicas del linaje de los genes ABC en *T. urticae*, muchos de los cuales respondieron transcripcionalmente a la exposición a xenobióticos.

3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- ¿Cuántas proteínas transportadoras ABC están presentes en monogéneos?

- ¿Cuál es la relación filogenética entre los transportadores ABC de los monogéneos y otros grupos metazoarios?

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

- Identificar los miembros de la familia de transportadores ABC en monogéneos a partir de información genómica disponible

4.2. Objetivos Específicos

- Generar el ensamble *de novo* del genoma de *Scutogyrus longicornis*.

- Analizar la posición filogenética de los integrantes de cada subfamilia ABC de monogéneos con otras especies de metazoarios.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Aislamiento de *Scutogyrus longicornis*

Se decidió obtener el genoma de *S. longicornis* debido a que es una especie encontrada comúnmente en cultivos de tilapia y también porque es una especie que se puede identificar sin la necesidad de desintegrar a los especímenes, lo cual es importante para la extracción de ADN. Esto fue determinado mediante el análisis morfométrico que se describe a continuación.

Las tilapias (*Oreochromis niloticus*) infectadas con monogéneos fueron capturadas en una granja comercial de peces localizada en el sur de Sinaloa. Los peces vivos fueron trasladados al Laboratorio de Parasitología Acuática del CIAD-Mazatlán, donde se mantuvieron en tanques de 400 L con aireación, temperatura ambiente y fotoperiodo natural hasta el momento de su disección para la recolección de parásitos.

Los monogéneos encontrados fueron identificados a nivel de especie según Douëllou (1993). El tejido de cada individuo parásito fue digerido utilizando la enzima proteinasa K. La digestión permitió la observación de las estructuras esclerotizadas, las cuales son utilizadas para la identificación de especies. A un grupo de individuos de cada especie se les tomaron las siguientes medidas (Figura 6): A) barra transversal ventral, en el cual se midió la longitud de una de las ramas ventrales y el ancho máximo de la barra ventral; B) barra transversal dorsal, se midió la longitud total de la barra dorsal, el ancho máximo de la barra dorsal, longitud de la aurícula de la barra dorsal y la distancia entre las aurículas; C) gancho, se midió la longitud total del gancho, longitud del eje del anclaje, longitud de la protección del anclaje y longitud del punto de anclaje; y D) órgano copulatorio masculino, se midió la longitud de la pieza accesoria, longitud del penis y longitud del talón. Las medidas son expresadas en micrómetros dando el promedio e intervalo.
Con el fin de detectar si las longitudes se agrupan por especie, se realizó un análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) y un análisis de similitud (ANOSIM), y para determinar cuales medidas contribuían a la formación de las agrupaciones se realizó un análisis de porcentaje

de similitud (SIMPER). Estos análisis se realizaron en el programa PRIMER 7. Las mediciones fueron estandarizadas (i.e., la longitud de cada estructura fue dividida entre la longitud del cuerpo) para evitar que la etapa de desarrollo influyera en las diferencias morfométricas entre las especies. Luego los datos fueron transformados a raíz cuarta y se realizó una matriz de similitud basada en el índice de Bray Curtis. Además, estos mismos análisis fueron realizados siguiendo el tratamiento de datos empleados por Cantatore y Timi (2010) para corroborar la formación de grupos. Estos autores transformaron los datos a raíz cuadrada y utilizaron la matriz de similitud basada en distancias euclidiana para los análisis multivariados.

Posteriormente, las longitudes de aquellas estructuras que presentaron mayor contribución a la disimilitud fueron comparadas entre especies con las pruebas no paramétrica Kruskal-Wallis para determinar posibles diferencias significativas. Luego se realizó una prueba de Nemenyi para saber cuál es la especie que difiere. Este análisis morfométrico permitió el reconocimiento confiable de individuos vivos de *S. longicornis* y *C. sclerosus* con base en la forma y longitud de su cuerpo y barra dorsal.

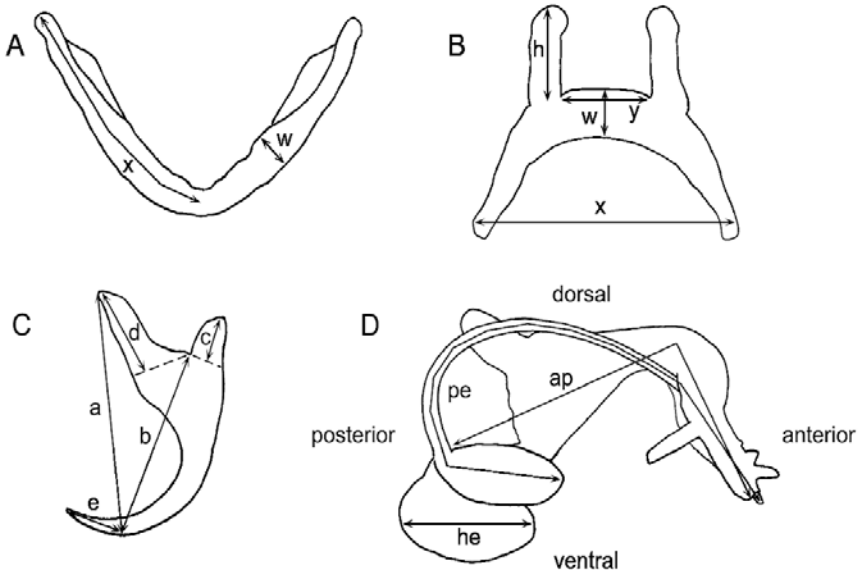

Figura 6. Medidas utilizadas en este estudio. A, barra transversal ventral (x, longitud de una rama ventral de la barra; w, ancho máximo de la barra ventral); B, barra transversal dorsal (x, longitud total de la barra dorsal; w, ancho máximo de la barra dorsal; h, longitud de la aurícula de la barra dorsal; y, distancia entre las aurículas); C, gancho (a, longitud total de la garra, b, longitud de la hoja de la garra, c, longitud del eje de la garra, d, longitud de la protección de la garra, e, longitud del punto de la garra); D, órgano copulatorio masculino (ap, longitud de la pieza accesoria; pe, longitud del penis; he, longitud del talón). Tomado de Fannes et al. (2017).

5.2. Extracción de ADN

Se recolectaron 40 individuos de *S. longicornis* los cuales fueron bañados con agua destilada para tratar de reducir carga bacteriana y mucus del hospedero. Las muestras se fijaron en RNA-later y fueron almacenadas a -4 °C para la extracción de ADN. La extracción de ADN se realizó con el Quick-DNA/RNA™ Miniprep Kit (Zymo Research) siguiendo el protocolo del fabricante. Este kit utiliza la tecnología de columnas Zymo-Spin ™ y proporciona un método rápido para el aislamiento de ADN genómico de alta calidad a partir de pequeñas cantidades de células y tejidos.

5.3. Construcción de Biblioteca Genómica de ADN y Secuenciación

La cantidad total de ADN se midió con Qubit fluorometer dsDNA HS Kit (Invitrogen). El kit REPLI-g Single Cell MDA de Qiagen fue utilizado para la amplificación completa del genoma siguiendo el protocolo preestablecido por el fabricante, debido a la baja cantidad de ADN extraído. Este kit utiliza la tecnología de Amplificación por Desplazamiento Múltiple (MDA) combinado con un paso suave de desnaturalización alcalina para evitar la fragmentación del ADN, la cual permite obtener lecturas de longitudes largas con amplificación a una misma temperatura (Detalles de MDA en la figura 7). La polimerasa Phi 29 que utiliza este kit puede producir réplicas de hasta 70 kb sin disociarse de la plantilla de ADN genómico y permite la amplificación uniforme de los loci genómicos.

El ADN amplificado fue usado para la construcción de la librería genómica paired-end short-insert (170 y 500 bp) usando la tecnología TruSeq de Illumina, siguiendo las pautas del fabricante para fragmentar el ADN. Finalmente, la integridad del ADN fue verificada por la plataforma Bioanalizador (RIN>8).

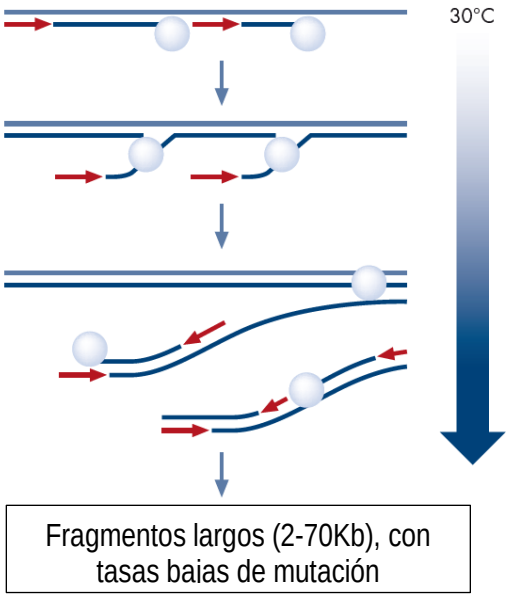

Figura 7. Los cebadores (flechas) se acoplan al ADN de la plantilla y se extienden a 30 ° C mediante la polimerasa Phi 29, que se mueve a lo largo de la hebra de la plantilla de ADN, desplazando la hebra complementaria y convirtiéndose en una plantilla en sí misma para la replicación (QIAGEN 2013–2019).

5.4. Ensamble de novo de *Scutogyrus longicornis*

5.4.1. Control de Calidad, Limpieza de Lecturas y Ensamble

El ensamble del genoma de *S. longicornis* se realizó siguiendo el pipeline que se muestra en la Figura 8. Primero se realizó el control de calidad de las secuencias usando el programa FastQC v0.11.8 (Andrews, 2010), el cual permite visualizar mediante gráficos la calidad de lecturas y la presencia de adaptadores, además nos da información acerca del número de lecturas obtenidas. Para esto, el programa utiliza el score de calidad Phred el cual mide la probabilidad de que una determinada base haya sido nombrada incorrectamente. Los gráficos muestran valores promedios e intervalos de la calidad de secuencias a lo largo de las lecturas, secuencias sobrexpresadas y *k*-meros (subsecuencias de largo *k*). Luego del diagnóstico, se realizó la limpieza de lecturas. En este paso se removieron adaptadores, lecturas de baja calidad y lecturas cortas usando el programa Trimmomatic v0.36 (Bolger et al., 2014). Para corroborar que la limpieza haya dado lecturas de

calidad, el programa FastQC se ejecutó nuevamente obteniendo valores de calidad Phred óptimos. Finalmente, las secuencias genómicas limpias fueron ensambladas utilizando el programa Megahit v1.2.1 (Li et al., 2016) y la integridad del genoma fue evaluado utilizando el programa BUSCO (Simão et al., 2015).

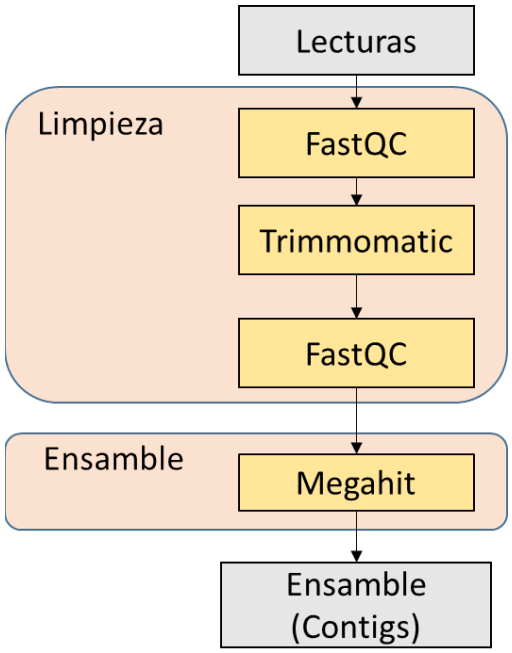

Figura 8. Pipeline para el ensamble del genoma de *Scutogyrus longicornis.*

5.4.2. Predicción de Genes

Para la predicción de genes se siguió el pipeline que se muestra en la Figura 9. Primero se ejecutó el programa Repeat Modeler v1.0.11 (Smit y Hubley 2015) utilizando el genoma ensamblado como archivo de entrada para construir una bibliotecas de familias repetidas. Luego se utilizó el programa GeneMark HMMs v3.54 (Lomsadze et al., 2005) con el genoma ensamblado de *S. longiconis* para obtener un archivo de modelos genéticos de regiones *ab initio*. El programa SNAP v2006-07-28 (Korf, 2004) fue entrenado con un archivo de modelos de genes obtenido mediante el programa CEGMA (Parra et al., 2007). SNAP es un predictor de sitios de genes, mientras que CEGMA es

un evaluador de ensambles. Estos archivos generados fueron utilizados por MAKER v2.31.10 (Holt y Yandell, 2011) para hacer una anotación estructural automática. MAKER aprovecha herramientas de software existentes para determinar el mejor modelo de genes. Parte del trabajo de MAKER es identificar y enmascarar elementos repetidos mediante RepeatMasker open-4.0.7 (Smit et al., 2015), producir predicciones de genes con sitios de *inicio AB* con los programas GeneMark (Lomsadze et al., 2005), SNAP v2006-07-28 (Korf, 2004) y Augustus (Stanke y Waack, 2003), alinear las proteínas del genoma y sintetizar estos datos en anotaciones finales. Además, MAKER puede ejecutarse de forma iterativa, al utilizar los modelos genéticos de la primera ronda para entrenar el software *ab initio* para mejorar la inferencia de los modelos genéticos en la siguiente ronda.

Se realizaron dos rondas de MAKER. En la primera se utilizaron archivos de proteínas de la base de datos de UniProt/Swiss-Prot, la cual posee secuencias de proteínas anotadas y no redundantes de alta calidad, archivos de proteínas de la especie *G. salaris*, archivos de proteínas de la base de datos de OrthoDB v9 (Kriventseva et al., 2018), la cual posee genes ortólogos de copia única casi universales, y datos genómicos de las proteínas seleccionadas por CEGMA a partir de la base de datos KOG (Tatusov et al., 2003), la cual posee grupos de proteínas ortólogas de organismos eucariotas, para, mediante el proceso de alineamiento por BLAST (Altschul et al., 1997), producir modelos de genes como evidencia física de proteínas. Además, se utilizó el archivo generado por RepeatModeler para enmascarar las regiones repetidas y evitar que las proteínas se alineen con ellas. En la segunda ronda se utilizaron los programas SNAP, GeneMark y Augustus para la predicción de *ab initio*. En el caso de SNAP, utilizó el archivo generado por la primera ronda de MAKER para su predicción, mientras que GeneMark utilizó el archivo generado al inicio y Augustus utilizó archivos del organismo modelo *Schistosoma*. En este paso, el archivo de proteínas introducido en la primera ronda para el proceso de BLAST fue reemplazado por el mismo archivo en formato GFF para reducir la demanda computacional.

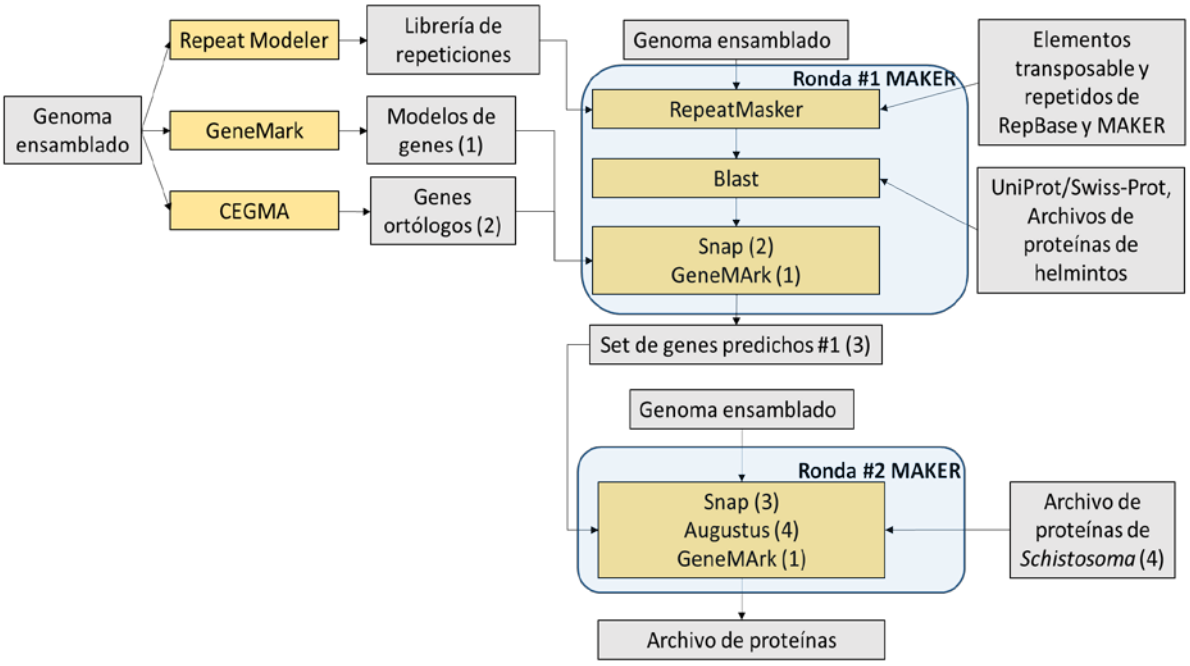

Figura 9. Pipeline de predicción y anotación de genes.

5.5. Identificación de Proteínas ABC

Para la identificación de las proteínas ABC en monogéneos se siguió el pipeline presentado en la Figura 10. Primero, con BLASTp, se realizaron búsquedas de proteínas ABC potenciales en los archivos de proteínas predichas de los genomas de *Gyrodactilus salaris* (Hahn et al., 2014) y *Protopolystoma xenopodis* descargados de https://parasite.wormbase.org/species.html (Howe et al., 2017), del transcriptoma de *Eudiplozoon nipponicum* descargado de https://github.com/jirivorel/Eudiplozoon-nipponicum-transcriptome-secretome y de ESTs de *Neobenedenia melleni* disponibles en NCBI. Como archivos de consulta se utilizaron dominios altamente conservados de proteínas ABC (descargados de InterPro, dominios con el código IPR003439) de *Caenorhabditis elegans* (hit con E-value < 10^{-5}).

5.6. Extracción de Dominios y Asignación de Subfamilias

La topología de las potenciales proteinas ABC (dominios NBD y TMD) se determinó con el servidor web HMMER (Potter et al., 2018) usando la colección de perfiles de la base de datos de pfam (Finn et al., 2016). Aquellos genes que no presentaron ningún dominio fueron descartados. Posteriormente, para la asignación de subfamilias putativas, cada gen identificado fue anotado manualmente usando BLASTp con la base de datos de proteínas no redundantes disponibles en NCBI como archivo de consulta. Aquellas lecturas cuyos hits más altos pertenecían a proteínas relacionadas a bacterias fueron descartadas.

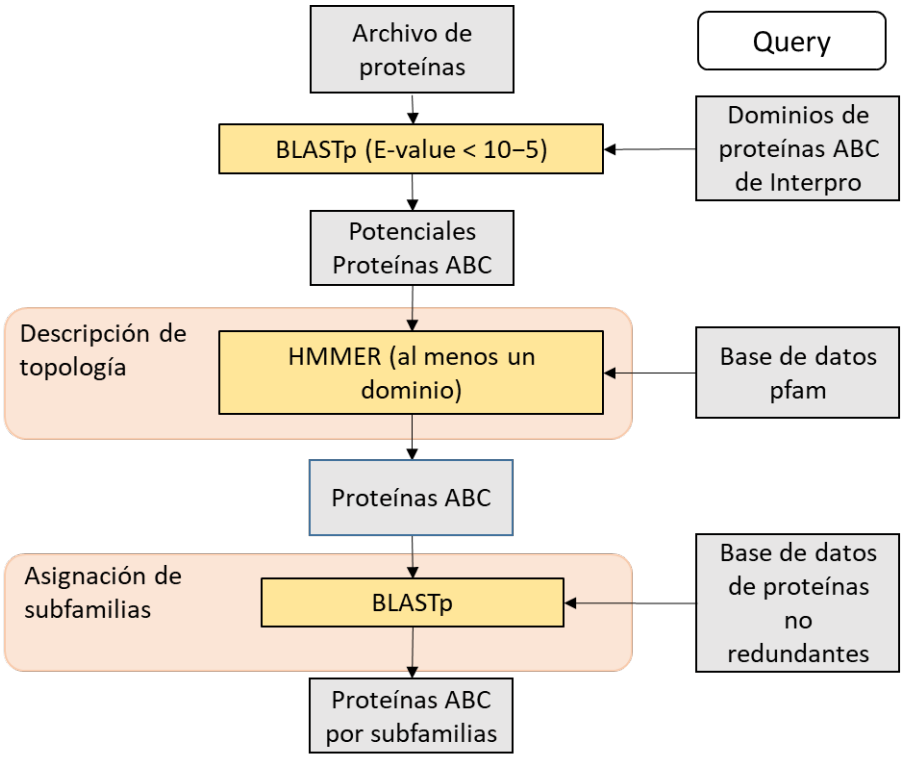

Figura 10. Pipeline para identificación de genes ABC putativos y obtención de los dominios (NBD y TMD).

5.7. Análisis Filogenético de Proteínas ABC

Para inferir la funcionalidad y evaluar las relaciones evolutivas de las proteinas ABC predichas se realizó un análisis filogenético para cada subfamilia ABC (Figura 11). En este análisis se incluyeron secuencias completas de las cinco especies monogéneos y de otros metazoarios en los que estas proteinas se encuentren bien caracterizadas. Las especies de metazoarios incluidas fueron: araña roja *Tetranychus urticae* (Dermauw et al., 2013), humano *Homo sapiens* (Dean et al., 2001b), nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Sheps et al., 2004; González-Cabo et al., 2011), crustáceo *Daphnia pulex* (Sturm et al., 2009) y mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Dean et al., 2001b). Los códigos de los genes utilizados fueron obtenidos de Carmona-Antoñanzas et al. (2015). La construcción de cada árbol filogenético se realizó siguiendo el pipeline mostrado en la Figura 11. Primero, las secuencias fueron alineadas usando el programa MUSCLE v3.8.31 (Edgar, 2004) y recortadas con Trimal v1.4 (Capella-Gutiérrez et al., 2009), con el parámetro optimizado para la construcción de árboles con el método de Máxima verosimilitud (ML) (-automated1). El mejor modelo de sustitución de aminoácidos para el alineamiento fue seleccionado mediante el programa ProtTest v 3.4.2 (Abascal et al., 2005), con el Criterio de Información Akaike corregido (AICc) (Sugiura, 1978) y el Criterio de Información Bayesiano (BIC) (Schwarz, 1978), en los cuales el modelo que mejor se ajusta a los datos observados posee el valor más bajo. Finalmente, cada árbol filogenético fue construido usando el método de máxima verosimilitud con 1000 interacciones bootstrap en el programa RAxML v8.0.26 (Stamatakis, 2014).

La asignación de las proteinas a cada subfamilia ABC fue reevaluada mediante un análisis filogenético para cada especie de monogéneo utilizando los dominio NBD extraído de ScanProsite (De Castro et al., 2006) (http://prosite.expasy.org/scanprosite/) con el perfil de prosite PS50893 como archivo de consulta (Figura 12). Este análisis se realizó sólo para *G. salaris* y *E. nipponicum*, ya que para *N. melleni* y *P. xenopodis* el número de dominios NBD encontrados fue muy bajo. El análisis y la construcción de cada árbol fueron realizados siguiendo el procedimiento anteriormente descrito.

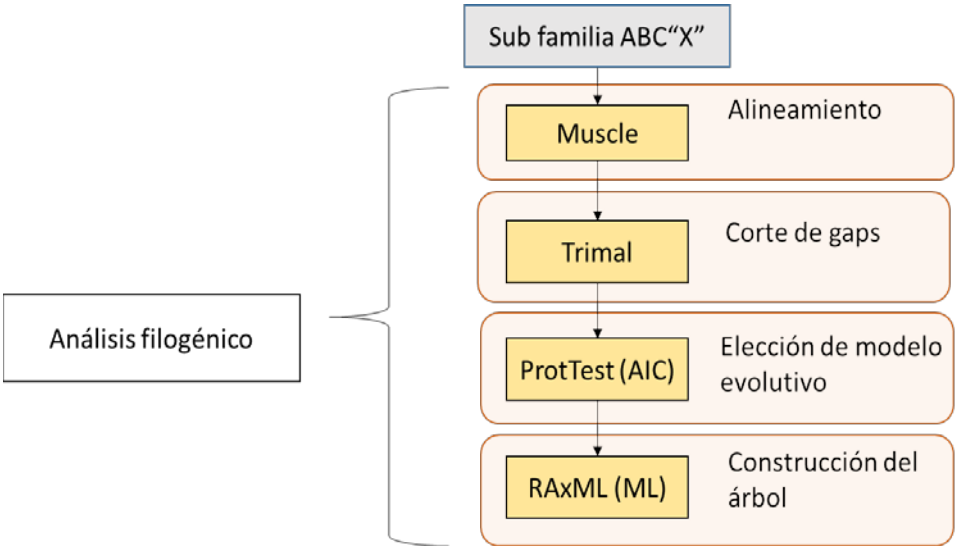

Figura 11. Pipelines para el análisis filogenético por subfamilia ABC.

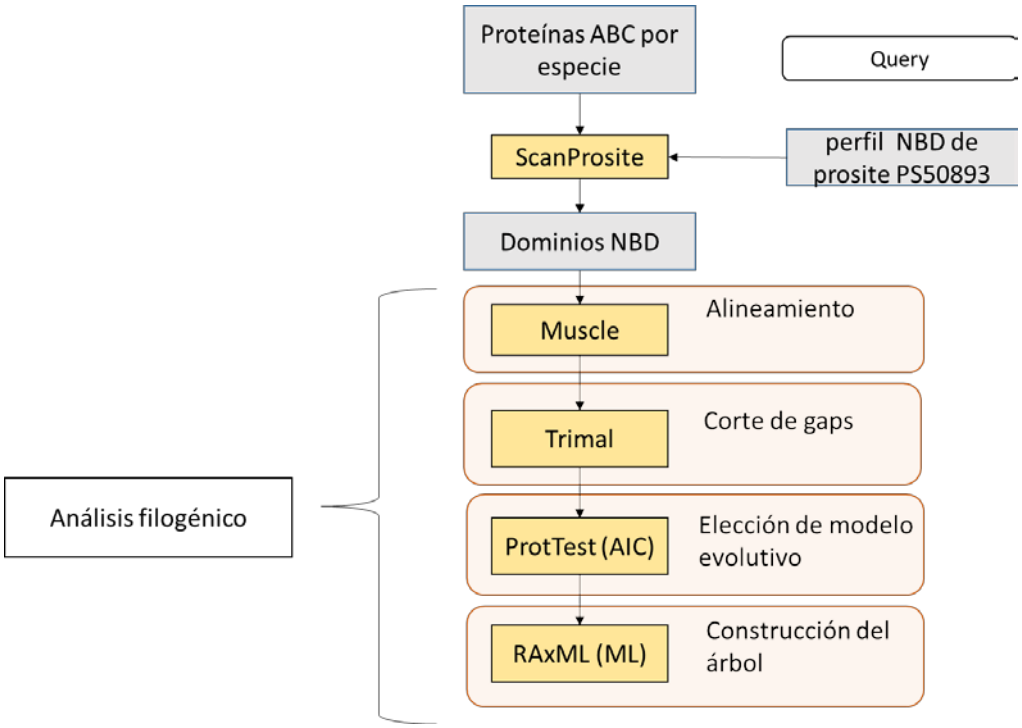

Figura 12. Pipeline para obtención de dominios NBD y análisis filogenéticos por especie.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Análisis Morfométrico

En esta sección se presentan los resultados del análisis morfométrico que sirvió de base para aislar a los individuos de *S. longicornis*. El análisis incluyó medidas de 54 individuos de monogéneos de 4 especies encontradas: 26 *Cichlidogyrus sclerosus,* 10 *C. tilapiae,* 1 *C. dossoui* cf. y 17 *S. longicornis* (Tabla 2, Figuras 13 y 14). Los análisis NMDS (Figura 15) y ANOSIM (Tabla 3) basados en el índice de Bray Curtis mostraron separación entre especies (stress= 0.04; R global= 0.772; $p<0.05$), excepto para *C. dossoui*. El análisis SIMPER identificó a la longitud total del cuerpo y las mediciones relativas de gripus como las medidas que más contribuyeron en la disimilitud entre especies (Tabla 4). Resultados similares (stress= 0.05; R global= 0.808; $p<0.05$) fueron obtenidos utilizando distancias euclidianas (Resultados no presentados).

La longitud del cuerpo fue comparada entre todas las especies. Los datos no presentaron distribución normal ni homocedasticidad (prueba de normalidad Shapiro-Wilk, W = 0.92626, P = 0.004; prueba de homocedasticidad Levene, F= 6.0355, $P=4.6^{e-3}$); por lo tanto, se aplicó la prueba Kruskal-Wallis la cual indicó diferencias significativas en la longitud del cuerpo entre las especies ($P < 0.001$). La prueba de Nemenyi indicó que la longitud del cuerpo es significativamente diferente ($P < 0.05$) entre las especies *S. longicornis, C. sclerosus* y *C. tilapiae,* siendo *C. sclerosus* la de mayor longitud y *C. tilapia* la de menor longitud (ver medidas en Tabla 2). Cabe aclarar que en este análisis no se consideró a *C. dossoui* cf. por no contar con datos suficientes. El único individuo de *C. dossoui* presentó una longitud del cuerpo de 295.56 µm, siendo 1.5 y 2.2 veces menor con relación a la longitud promedio de *S. longicornis* y *C. sclerosus*, respectivamente, pero similar a la longitud de *C. tilapiae.*

Las imágenes y las mediciones morfométricas permitieron establecer características útiles para la identificación de especies de monogéneos. Estas mediciones fueron el largo del cuerpo, barra dorsal H, y ancho de la aurícula de la barra dorsal. Existieron mediciones de otras estructuras

esclerotizadas que si bien en el análisis SIMPER contribuyeron a la separación de las especies no son fácilmente observables sin recurrir a la digestión del parásito. De las cuatro especies, se eligió a *S. longicornis* porque es relativamente más frecuente y fácil de identificar estando los individuos vivos, lo cual es una ventaja para estudios genómicos. Las características utilizadas para discriminar *S. longicornis* fueron largo del cuerpo, longitud de la aurícula, distancia entre las aurículas, y ancho de la aurícula de la barra dorsal. De acuerdo con Pariselle y Euzet (2009), las características distintivas de esta especie son: pene y vagina muy cortos, largo del pene menor a 70 µm, pieza accesoria del pene con terminación en pinzas con un componente en forma de gancho, y zona basal del accesorio del pene sin extensión. Estas caracteríaticas fueron observadas en nuestros especímenes.

Scutogyrus longicornis ha sido registrada en cultivos de tilapia en diversas regiones, incluyendo México (Madanire-Moyo et al., 2011; Paredes-Trujillo et al., 2016). Esta especie ha sido descrita como *Cichlidogirus longicornis* en diversos estudios en México; sin embargo, Mendoza-Garfias et al. (2017) indicaron que en realidad se trata de *Scutogyrus longicornis*. A pesar de que *C. longicornis* fue transferida al género *Scutogyrus* por Pariselle y Euzet (1995), muchos autores siguen manteniendo la nomenclatura antigua. Por otro lado, el sitio World Register of Marine Species (WoRMS, 2018) mantiene a *S. longicornis* y *C. longicornis* como especies válidas. Para evitar confusiones, en este trabajo basamos nuestra clasificación para esta especie tomando en cuenta los dos artículos mencionados anteriormente.

Cuadro 2. Longitud promedio de diferentes estructuras corporales de cuatro especies de monogéneos.

Mediciones	*S. longicornis*	*C. sclerosus*	*C. tilapiae*	*C. dossoui* cf.
Largo cuerpo	445.34	653.83	294.62	295.56
Ancho de cuerpo	96.78	128.57	82.12	62.68
Barra dorsal W	5.39	8.63	5.11	4.46
Barra dorsal H	36.20	11.35	13.75	12.72
Barra dorsal Y	15.75	8.76	7.75	13.23
Barra dorsal X	58.61	35.14	23.95	32.40
Barra dorsal ancho aurícula	17.09	11.10	4.39	6.89
Barra ventral largo	37.84	28.57	26.69	29.62
Barra ventral ancho	3.82	6.59	5.96	4.39
Gripus ventral A	37.05	31.45	27.46	29.41
Gripus ventral B	36.65	32.85	24.62	25.26
Gripus ventral C	6.08	3.27	4.18	7.51
Gripus ventral D	8.92	4.83	10.20	11.00
Gripus ventral E	9.00	9.54	6.82	7.00
Gripus dorsal A	36.80	30.86	35.02	24.34
Gripus dorsal B	32.35	31.19	24.52	20.93
Gripus dorsal C	12.29	3.90	3.51	6.17
Gripus dorsal D	10.75	5.60	13.80	10.71
Gripus dorsal E	7.62	8.73	6.60	7.16
OCM largo de penis	45.26	59.70	27.31	47.91
OCM pieza accesoria	36.42	50.11	35.40	39.58
OCM tacón	8.28	9.25	2.93	4.78
Unículus largo	37.27	-	-	16.22
Unículus ancho	4.5	-	-	-

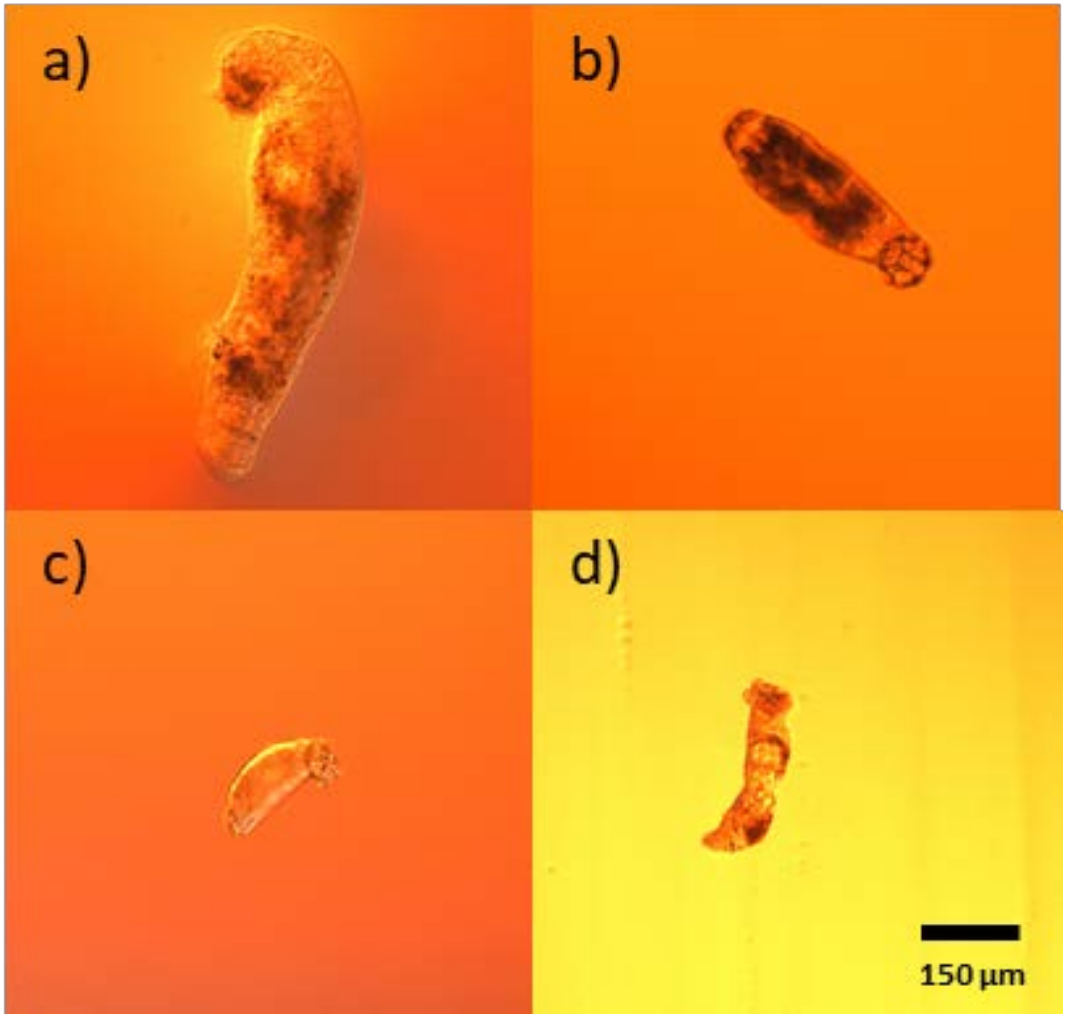

Figura 13. Especies de monogéneos encontradas en la tilapia. a) *Cichlidogyrus sclerosus*, b) *Scutogyrus longicornis*, c) *C. tilapiae* y d) *C. dossoui* cf.

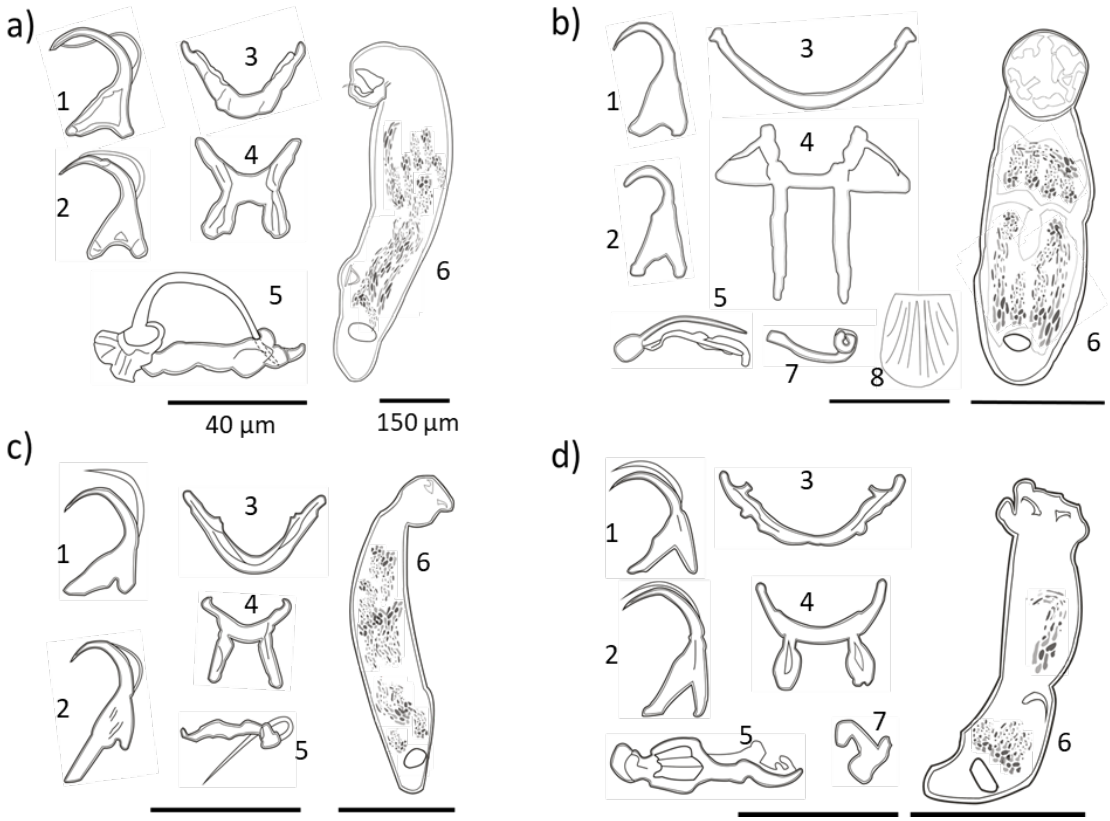

Figura 14. Estructuras esclerotizadas y cuerpo de cuatro especies de monogéneos encontradas en la tilapia. a) *C. sclerosus*, b) *S. longicornis*, c) *C. tilapiae* y d) *C. dossoui* cf. 1, gancho ventral; 2, gancho dorsal; 3, barra transversal ventral; 4, barra transversal dorsal; 5, órgano copulador masculino; 6, cuerpo entero; 7, vagina; 8, porción ribbed. Todas las barras de escalas del lado izquierdo equivalesn a 40 µm y todas ubicadas al lado derecho a 150 µm.

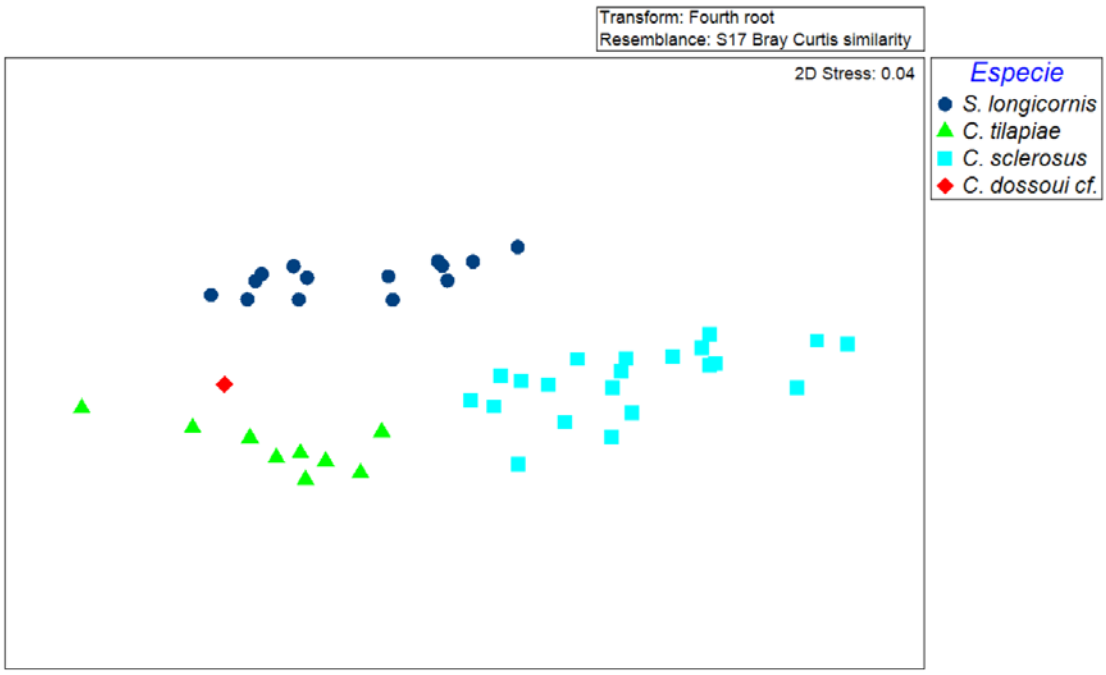

Figura 15. Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) de la morfometría proporcional de las 4 especies de monogéneos que se encontraron infectando a la tilapia. Estrés = 0.04. Los símbolos distinguen a cada una de las especies.

Cuadro 3. Análisis de similitud (ANOSIM) entre cada especie de monogéneo

Grupos	Estadístico R	Nivel de significancia
C. tilapiae, *S. longicornis*	0.708	0.001
C. tilapiae, *C. sclerosus*	0.87	0.001
C. tilapiae, *C. dossoui* cf.	0.216	n.s.
S. longicornis, *C. sclerosus*	0.777	0.001
S. longicornis, *C. dossoui* cf.	0.452	n.s.
C. sclerosus, *C. dossoui* cf.	0.94	0.045

Cuadro 4. Proporción de variación (%) en los datos de campo explicada por las relaciones morfológicas entre seis especies de peces según se determinó utilizando porcentajes de similitud (SIMPER). Se muestran las cinco razones que explicaron la mayor variación entre cada par de especies.

Especies	largo cuerpo	gripus ventral C	gripus dorsal C	gripus ventral D	gripus dorsal D	OCM largo de penis	barra dorsal H	barra dorsal Y	barra dorsal ancho aurícula	barra ventral ancho
C. tilapiae /S. longicornis	7.46	8.4	8.17	-	8.55	-	-	-	9.86	-
C. tilapiae /C. sclerosus	8.41	-	-	11.08	11.6	-	6.34	-	-	9.97
S. longicornis /C. sclerosus	-	8.79	10.77	7.83	7.64	-	10.33	-	-	-
C. tilapiae /C. dossoui cf.	-	12.22	12.47	-	-	6.63	-	8.76	8.75	-
S. longicornis /C. dossoui cf.	8.28	10.56	-	9.88	7.87	-	-	-	-	7.73
C. sclerosus /C. dossoui cf.	7.49	11.65	8.98	10.61	9.47	-	-	-	-	-

6.2. Ensamble de Novo del Genoma de *Scutogyrus longocornis*

La extracción de ADN se realizó a partir de un pool de 40 individuos de *S. longicornis* y se obtuvo la cantidad de 14 ng totales. La amplificación del genoma completo (WGA) utilizando el kit Repli-G single Cell permitió producir un escalamiento en el órden de microgramos de ADN para la construcción de la biblioteca. Los kits de reamplificación de ADN han sido usados en otros estudios para la secuenciación de helmintos pequeños (Laumer et al., 2015; Wang et al., 2018; Young et al., 2012). Esto ha permitido obtener cantidades sufiecientes de ADN para el proceso de secuenciación sin tener que recurrir a pool de individuos grandes y a la obtención de genomas con una baja heterogenicidad de genes. En nuestro estudio, el uso del kit permitió obtener el suficiente material genómico para cumplir con los protocolos de secuenciación.

Se contruyeron las bibliotecas y el material genético fue secuenciado para obtener 10 millones de lecturas. El tamaño del genoma obtenido mediante el ensamblador Megahit fue de 16,494,608 bases, con una cobertura de 107.1X. El programa BUSCO determinó que con estas lecturas sólo se

obtuvo el 14.9% del cluster de genes ortólogos del grupo metazoa. Este porcentaje fue relativamente bajo, pero fue lo esperado debido al número y tamaño de lecturas (lecturas cortas) utilizadas. La utilización de otras tecnologías de secuenciación como PacBio, el cual produce lecturas largas y el aumento de profundidad de secuenciación podrían ayudar a mejorar la calidad del ensamble.

Al supervisar los genes identificados con BUSCO, se identificaron genes de origen bacteriano, por lo cual la limpieza del meta-ensamble es crucial; sin embargo, para la extracción de las proteínas ABC de monogenéos no fue necesario por lo cual ninguna limpieaza fue realizada. El programa MAKER fue capaz de predecir un total de 5267 proteinas. Este archivo de proteínas de *S. longicornis* fue utilizado para la identificación de los transportadores ABC.

6.3.Identificación de Proteinas ABC

En total se identificaron 139 miembros de la familia ABC en las cinco especies de monogéneos (*S. longicornis*, *G. salaris*, *P. xenopodis*, *E. nipponicum* y *N. melleni*). En *S. longicornis* se encontraron 10 genes ABC en total (Tabla 5), específicamente 7 genes ABCB y 3 ABCC (Tabla 10). En *G. salaris* se identificaron un total de 34 genes ABC (Tabla 5), los cuales estuvieron distribuidos de la siguiente manera en cada subfamilia: 4 genes ABCA (1 transportador completo), 8 genes ABCB (2 transportadores completos y 4 parciales), 11 ABCC (2 transportadores completos), 1 ABCD, 1 ABCE, 5 ABCF y 5 ABCG (1 transportador parcial) (Tabla 6). El análisis filogenético de NBD agrupó a las proteínas ABC de *G. salaris* en clados que corresponden a sus respectivas subfamilias, previamente identificadas mediante BLASTp. Además, este análisis clasificó a los NBD de acuerdo a la terminación del dominio, N-terminal o C-terminal. Los dominios NBD de la subfamilia B presentaron mayor cercanía con los NBD de la subfamilia N-terminales de ABCC. Cada clado presentó valores bootstrap mayores a 84, con excepción de la subfamilia B (53) (Figura 16).

En *E. nippnicum* se identificaron un total de 46 genes ABC (Tabla 5), los cuales estuvieron distribuidos de la siguiente manera en cada subfamilia: 2 genes en ABCA (1 transportador

completo), 6 genes ABCB (1 transportador completo y 4 parciales), 18 ABCC (1 transportador completo y 2 parciales), 3 ABCD (2 transportadores parciales), 3 ABCE, 10 ABCF y 3 ABCG (1 transportador parcial) (Tabla 7). El análisis filogenético de NBD agrupó a las proteínas ABC de *E. nippnicum* en clados de sus respectivas subfamilias, previamente identificadas mediante BLASTp. Los dominios NBD de la subfamilia B presentaron mayor cercanía con los NBD de la subfamilia N-terminales de ABCC. Cada clado presentó valores bootstrap mayores a 89, con excepción de la subfamilia B (59) (Figura 17).

En *P. xenopodis* se identificaron 40 genes ABC (Tabla 5) distribuidos de la siguiente manera en cada subfamilia: 5 genes ABCA (1 transportador completo), 12 genes ABCB, 16 ABCC, 2 ABCE, 4 ABCF y 1 ABCG (Tabla 8). En *N. melleni* se encontraron 9 genes ABC (Tabla 5) distribuidos de la siguiente manera en cada subfamilia: 1 gen en ABCB, 4 en ABCC (1 transportador parcial), 1 ABCE y 3 ABCF (Tabla 9).

Estos 139 genes pertenecen a 7 de las 8 subfamilias de proteínas ABC presentes en eucariotas. De acuerdo con el número de dominios se encontraron nueve transportadores completos y 13 transportadores parciales, sin embargo, los análisis filogenéticos agruparon a varios integrantes de los transportadores parciales con transportadores completos de otros organismos. Las subfamilias B y C fueron las más grandes. Los análisis filogenéticos basados en el dominio NBD de *G. salaris* y *E nipponicum* agruparon con buen soporte bootstrap a las proteínas ABC en su respectiva subfamilia (Figura 16 y 17). Esto confirmó la asignación hecha previamente mediante BLASTp.

El número de transportadores ABC en monogéneos resultó mayor que en otros platelmintos parásitos como los tremátodos *S. mansoni* y *O. felineus* (Greenberg, 2013; Mordvinov et al., 2017), pero menor que en los artrópodos, con algunas excepciones (Dermauw y Van Leeuwen, 2014; Jeong et al., 2017). Probablemente, el número de transportadores se encuentra relacionado con características biológicas de cada grupo de organismos. Para parásitos ha sido sugerido que la historia de vida podría afectar la evolución de ciertos rasgos (Trouvé et al., 1998). Por ejemplo, se tiene la hipótesis de que los organismos en simbiosis pueden tener mejores condiciones nutricionales y que los endoparásitos presentan mejores condiciones en organismos homeotermos que en poiquilotermos (Calow, 1983). Es probable que el número de transportadores fue mayor en

monogéneos que en tremátodos porque los monogéneos son ectoparásitos y, aunque reciben protección del hospedero, están en contacto con el agua, mientras que los tremátodos son endoparásitos y están expuestos a una menor variabilidad ambiental.

Cuadro 5. Número de miembros de cada subfamilia ABC en 11 metazoarios. Las columnas en azul incluyen a las especies de monogéneos, en verde a tremátodos y en blanco otros organismos metazoarios.

ABC subfamily	*H. sapiens*	*C. elegans*	*D. pulex*	*T. urticae*	*D. melanogaster*	*S. longicornis*	*G. salaris*	*P. xenopodis*	*E. nipponicum*	*N. melleni*	*S. mansoni*	*O. felineus*
A	12	7	4	9	10	0	4	5	2	0	3	4
B FT	4	14	2	2	4	0	2	0	1	0	2	5
B	7	10	6	2	4	7	6	12	5	1	5	3
C	12	9	8	39	14	3	11	16	18	4	4	5
D	4	5	3	2	2	0	1	0	3	0	0	1
E	1	1	1	1	1	0	1	2	3	1	1	0
F	3	3	4	4	3	0	4	4	10	3	3	2
G	5	9	24	23	15	0	5	1	4	0	2	3
H	0	2	15	22	3	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	**48**	**60**	**67**	**104**	**56**	**10**	**34**	**40**	**46**	**9**	**20**	**23**

Con información de Dean et al. (2001), Sturm et al. (2009), Sheps et al. (2004), Dermauw et al. (2013), González-Cabo et al. (2011), Carmona-Antoñanzas et al. (2015); Greenberg (2013) y el estudio presente.

Cuadro 6. Resumen de los 34 transportadores ABC identificados en *G. salaris*.

Subfamilia	ID *G. salaris*	ID árbol	Largo de AA	Topolgía	Gen coincidente	Especie coincidente	E-value	Número de acceso
A	maker-scf7180006953177-augustus-gene-0.67-mRNA-1	GsABCA-26	306	NBD1	ATP-binding cassette sub-family A member 3	*Clonorchis sinensis*	4.00E-88	RJW73255.1
	snap_masked-scf7180006950751-processed-gene-0.4-mRNA-1	GsABCA-34	2182	TMD1-NBD1-TMD2-NBD2	ATP binding cassette sub family A	*Echinococcus multilocularis*	0.00E+00	CDS37906.1
	snap_masked-scf7180006953177-processed-gene-0.12-mRNA-1	GsABCA-41	292	TMD1	ATP-binding cassette sub-family A member 3	*Clonorchis sinensis*	6.00E-34	RJW73255.1
	snap_masked-scf7180006953352-processed-gene-0.8-mRNA-1	GsABCA-42	640	NBD1	ATP-binding cassette, subfamily A (ABC1), member 3	*Schistosoma bovis*	4.00E-96	RTG88537.1
B	genemark-scf7180006949975-processed-gene-0.1-mRNA-1	GsABCB-06	598	TMD1-NBD1	ATP-binding cassette, subfamily B (MDR/TAP), member 7	*Schistosoma bovis*	0.00E+00	RTG89431.1
	genemark-scf7180006952488-processed-gene-0.10-mRNA-1	GsABCB-10	1259	TMD1-NBD1-TMD2-NBD2	ATP-binding cassette subfamily transporter B1 member 4	*Opisthorchis felineus*	0.00E+00	AIJ28498.1
	maker-scf7180006947110-snap-gene-0.64-mRNA-1	GsABCB-11	574	TMD1-NBD1	ATP-binding cassette sub-family B member 8	*Clonorchis sinensis*	3.00E-142	RJW62083.1
	maker-scf7180006948145-snap-gene-0.52-mRNA-1	GsABCB-12	1057	TMD1-NBD1-TMD2-NBD2	ATP-binding cassette subfamily transporter B1 member 4	*Opisthorchis felineus*	0.00E+00	AIJ28498.1
	maker-scf7180006948182-snap-gene-0.292-mRNA-1	GsABCB-13	858	TMD1-NBD1	ATP binding cassette sub family B	*Echinococcus multilocularis*	0.00E+00	CDS39599.2
	maker-scf7180006953052-augustus-gene-0.21-mRNA-1	GsABCB-24	281	NBD1	multidrug resistance protein 1	*Echinococcus granulosus*	2.00E-96	CDS25222.1
	snap_masked-scf7180006952620-processed-gene-0.2-mRNA-1	GsABCB-38	600	TMD1-NBD1	ATP-binding cassette subfamily transporter B1 member 4	*Opisthorchis felineus*	0.00E+00	AIJ28498.1
	snap_masked-scf7180006952936-processed-gene-0.1-mRNA-1	GsABCB-39	173	TMD1	Multidrug resistance protein 1	*Schistosoma haematobium*	4.00E-44	XP_012800768.1
C	genemark-scf7180006948135-processed-gene-0.10-mRNA-1	GsABCC-04	644	TMD1	ATP-binding cassette subfamily C	*Clonorchis sinensis*	2.00E-56	GAA30468.2

					(CFTR/MRP) member 10			
	genemark-scf7180006951932-processed-gene-0.2-mRNA-1	GsABCC-08	2108	TMD1-NBD1-TMD2-NBD2	putative multidrug resistance protein 1 (ATP-binding cassette C1)	*Schistosoma mansoni*	1.00E-161	XP_018652084.1
	genemark-scf7180006952452-processed-gene-0.1-mRNA-1	GsABCC-09	207	NBD1-NBD2	ATP-binding cassette, subfamily C (CFTR/MRP), member 4	*Schistosoma bovis*	8.00E-46	RTG88243.1
	maker-scf7180006948439-snap-gene-0.7-mRNA-1	GsABCC-17	166	NBD1	multidrug resistance-associated protein 4	*Clonorchis sinensis*	1.00E-32	GAA49862.1
	maker-scf7180006949410-snap-gene-0.78-mRNA-1	GsABCC-19	1380	TMD1-NBD1-TMD2-NBD2	multidrug resistance-associated protein 4	*Clonorchis sinensis*	5.00E-176	GAA49862.1
	maker-scf7180006950617-snap-gene-0.7-mRNA-1	GsABCC-21	242	NBD1	ATP-binding cassette, subfamily C (CFTR/MRP), member 4	*Schistosoma bovis*	2.00E-52	RTG88243.1
	snap_masked-scf7180006949799-processed-gene-0.1-mRNA-1	GsABCC-32	83	TMD1	multidrug resistance-associated protein 4	*Clonorchis sinensis*	4.00E-16	GAA49862.1
	snap_masked-scf7180006950886-processed-gene-0.1-mRNA-1	GsABCC-35	163	NBD1	multidrug resistance-associated protein 4	*Clonorchis sinensis*	1.00E-50	GAA49862.1
	snap_masked-scf7180006952287-processed-gene-0.1-mRNA-1	GsABCC-36	292	TMD1	multidrug resistance associated protein 7	*Echinococcus multilocularis*	3.00E-31	CDS40693.1
	snap_masked-scf7180006952287-processed-gene-0.2-mRNA-1	GsABCC-37	268	NBD1	Multidrug resistance-associated protein 1	*Clonorchis sinensis*	6.00E-21	RJW63997.1
	snap_masked-scf7180006953393-processed-gene-0.13-mRNA-1	GsABCC-43	132	NBD1	multidrug resistance associated protein 7	*Echinococcus multilocularis*	2.00E-22	CDS40693.1
D	snap_masked-scf7180006953135-processed-gene-0.8-mRNA-1	GsABCD-46	198	TMD1	ATP-binding cassette, subfamily D (ALD), member 4	*Schistosoma bovis*	7.00E-15	RTG88839.1
E	augustus_masked-scf7180006952770-processed-gene-0.2-mRNA-1	GsABCE-02	606	NBD1-NBD2	ATP binding cassette sub family E	*Echinococcus multilocularis*	0.00E+00	CDS42811.1
F	genemark-scf7180006947414-processed-gene-0.3-mRNA-1	GsABCF-03	631	NBD1-NBD2	ATP-binding cassette, sub-family F, member 1	*Schistosoma japonicum*	0.00E+00	CAX69408.1

	genemark-scf7180006950154-processed-gene-0.9-mRNA-1	GsABCF-07	716	NBD1-NBD2	ATP-binding cassette sub-family F member 3	*Clonorchis sinensis*	0.00E+00	GAA29224.2
	maker-scf7180006950130-augustus-gene-0.40-mRNA-1	GsABCF-20	647	NBD1-NBD2	ABC transporter, ATP-binding protein	*Fasciola hepatica*	4.00E-170	PIS83244.1
	snap_masked-scf7180006948077-processed-gene-0.4-mRNA-1	GsABCF-29	208	NBD1	ATP-binding cassette sub-family F member 1	*Clonorchis sinensis*	9.00E-73	RJW62350.1
G	maker-scf7180006952783-snap-gene-0.11-mRNA-1	GsABCG-23	273	NBD1	ATP-binding cassette sub-family G member 1	*Schistosoma haematobium*	5.00E-83	XP_012795324.1
	maker-scf7180006953104-snap-gene-0.59-mRNA-1	GsABCG-25	574	NBD1-TMD2	ATP-binding cassette, subfamily G (WHITE), member 2	*Schistosoma bovis*	0.00E+00	RTG88619.1
	snap_masked-scf7180006949025-processed-gene-0.1-mRNA-1	GsABCG-30	118	TMD1	ATP-binding cassette subfamily G (WHITE) member 1	*Clonorchis sinensis*	2.00E-36	GAA55883.1
	snap_masked-scf7180006949772-processed-gene-0.1-mRNA-1	GsABCG-31	81	TMD1	ATP-binding cassette subfamily G (WHITE) member 1	*Clonorchis sinensis*	4.00E-31	GAA55883.1
	snap_masked-scf7180006950698-processed-gene-0.1-mRNA-1	GsABCG-33	193	TMD1	ATP binding cassette sub family G	*Echinococcus granulosus*	4.00E-47	CDS24253.1

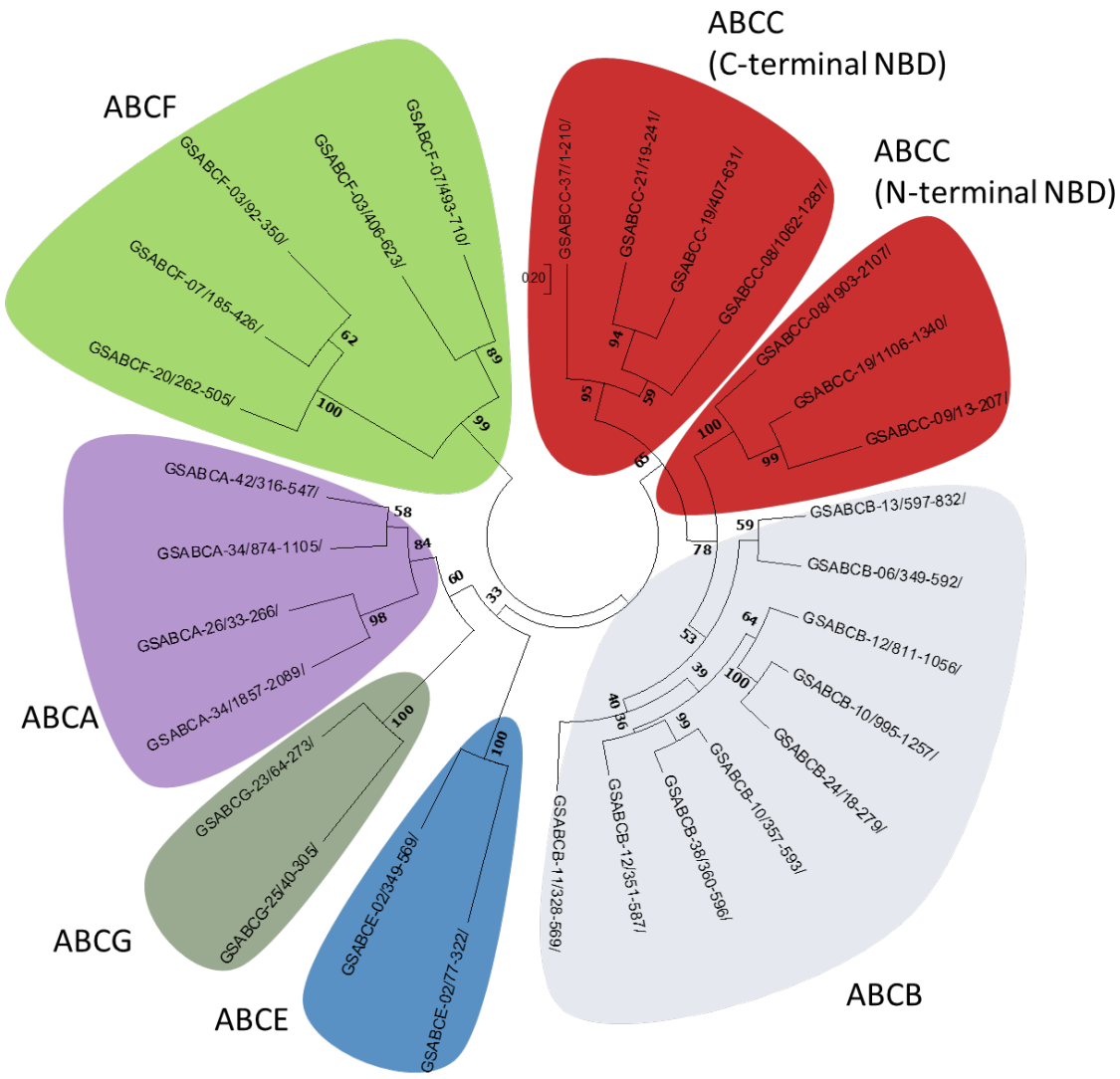

Figura 16. Árbol filogenético no enraizado de dominios NBD de proteínas ABC de *Gyrodactylus salaris*. Secuencias de dominios NBDs de aminoácidos predichos con ScanProsite sujetos a un análisis de máxima verosimilitud usando RAxML. El modelo de sustitución LG+G+I fue elegido. Los númerso en los nodos representan la frecuencia con la cual la topología del árbol fue obtenida con 1000 interacciones bootstrap. La barra de escala representa 0.2 sustituciones de aminoácidos por sitio. Las diferentes subfamilias de proteínas ABC están indicadas por colores sombreados.

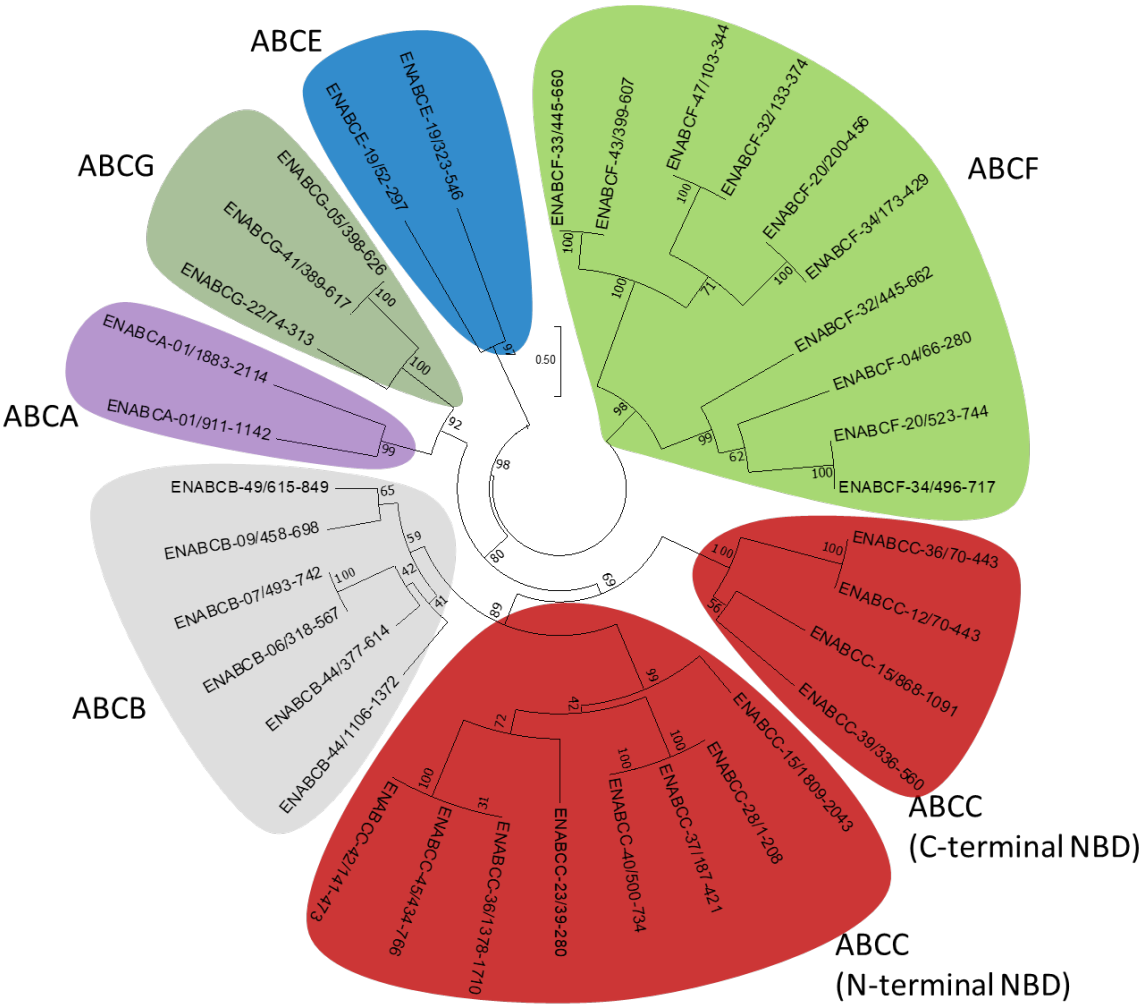

Figura 17. Árbol filogenético no enraizado de dominios NBD de proteínas ABC de Eudiplozoon nipponicum. Secuencias de dominios NBDs de aminoácidos predichos con ScanProsite sujetos a un análisis de máxima verosimilitud usando RAxML. El modelo de sustitución LG+G+I fue elegido. Los números en los nodos representan la frecuencia con la cual la topología del árbol fue obtenida con 1000 interacciones bootstrap. La barra de escala representa 0.5 sustituciones de aminoácidos por sitio. Las diferentes subfamilias de proteínas ABC están indicadas por colores sombreados.

Cuadro 7. Resumen de los 46 transportadores ABC identificados en *E. nipponicum*.

Subfamilia	*E. nipponicum* ID	ID árbol	Largo de AA	Topolgía	Gen coincidente	Especie coincidente	E-value	Número de acceso
A	E_nip_trans_11422_m.78063	EnABCA-01	2324	TMD1-NBD1-TMD2-NBD2	ATP-binding cassette subfamily A (ABC1) member 3	*Clonorchis sinensis*	0	GAA30631.2
	E_nip_trans_61784_m.386289	EnABCA-25	204	NBD1	ATP-binding cassette subfamily A (ABC1) member 3	*Clonorchis sinensis*	2.00E-28	GAA30631.2
B	E_nip_trans_10630_m.69576	EnABCB-06	578	TMD1-NBD1	ATP-binding cassette sub-family B member 8	*Clonorchis sinensis*	0	RJW62083.1
	E_nip_trans_10631_m.69591	EnABCB-07	753	TMD1-NBD1	ATP-binding cassette sub-family B member 8	*Clonorchis sinensis*	0	RJW62083.1
	E_nip_trans_16014_m.124495	EnABCB-09	743	TMD1-NBD1	ATP-binding cassette sub-family B member 7, mitochondrial	*Schistosoma haematobium*	0	XP_012793010.1
	E_nip_trans_14291_m.108033	EnABCB-44	1374	TMD1-NBD1-TMD2-NBD2	ATP-binding cassette subfamily transporter B1 member 4	*Opisthorchis felineus*	0	AIJ28498.1
	E_nip_trans_22285_m.166347	EnABCB-46	310	NBD1	ATP binding cassette subfamily B (MDR:TAP)	*Hymenolepis microstoma*	5.00E-22	CDS27727.2
	E_nip_trans_06622_m.29005	EnABCB-49	872	TMD1-NBD1	ATP binding cassette sub family B	*Echinococcus multilocularis*	0	CDS39599.2
C	E_nip_trans_17949_m.140288	EnABCC-02	598	TMD1	Multidrug resistance-associated protein 7	*Clonorchis sinensis*	8.00E-121	RJW62836.1
	E_nip_trans_33253_m.235956	EnABCC-11	348	TMD1	Multidrug resistance-associated protein 4	*Schistosoma haematobium*	1.00E-82	XP_012794305.1
	E_nip_trans_33257_m.235985	EnABCC-12	576	NBD1	Multidrug resistance-associated protein	*Echinococcus granulosus*	4.00E-35	XP_024354920.1
	E_nip_trans_06066_m.25167	EnABCC-15	2051	TMD1-NBD1-TMD2-NBD2	Multidrug resistance-associated protein 1	*Clonorchis sinensis*	2.00E-176	RJW63997.1
	E_nip_trans_34893_m.245828	EnABCC-16	312	TMD1	multidrug resistance-associated protein 4	*Clonorchis sinensis*	2.00E-42	GAA49862.1

	E_nip_trans_36589_m.253267	EnABCC-21	196	TMD1	Multidrug resistance-associated protein	*Echinococcus granulosus*	4.00E-29	XP_024354920.1
	E_nip_trans_15664_m.121231	EnABCC-23	285	NBD1	ATP-binding cassette subfamily C (CFTR/MRP) member 3	*Clonorchis sinensis*	2.00E-100	GAA50984.1
	E_nip_trans_22434_m.167152	EnABCC-24	132	NBD1	Multidrug resistance-associated protein 1	*Schistosoma haematobium*	1.00E-40	XP_012796463.1
	E_nip_trans_45039_m.314854	EnABCC-26	370	TMD1	multidrug resistance-associated protein 4	*Clonorchis sinensis*	1.00E-58	GAA49862.1
	E_nip_trans_46634_m.324380	EnABCC-28	382	NBD1	multidrug resistance-associated protein 4	*Clonorchis sinensis*	7.00E-81	GAA49862.1
	E_nip_trans_45434_m.317635	EnABCC-29	340	TMD1	Multidrug resistance-associated protein 4	*Schistosoma haematobium*	1.00E-82	XP_012794305.1
	E_nip_trans_09011_m.52954	EnABCC-36	1715	NBD1-TMD2-NBD2	ATP-binding cassette subfamily C (CFTR/MRP) member 10	*Clonorchis sinensis*	6.00E-71	GAA30468.2
	E_nip_trans_32981_m.234013	EnABCC-37	595	NBD1	multidrug resistance-associated protein 4	*Clonorchis sinensis*	7.00E-90	GAA49862.1
	E_nip_trans_20136_m.154936	EnABCC-39	670	TMD1-NBD1	multidrug resistance-associated protein 4	*Clonorchis sinensis*	2.00E-132	GAA49862.1
	E_nip_trans_17484_m.136702	EnABCC-40	908	TMD1-NBD1	multidrug resistance-associated protein 4	*Clonorchis sinensis*	9.00E-88	GAA49862.1
	E_nip_trans_40207_m.275535	EnABCC-42	478	NBD1	Multidrug resistance-associated protein 4	*Schistosoma haematobium*	4.00E-50	XP_012794305.1
	E_nip_trans_28753_m.197725	EnABCC-45	771	NBD1	Multidrug resistance-associated protein 4	*Schistosoma haematobium*	6.00E-48	XP_012794305.1
	E_nip_trans_01772_m.4778	EnABCC-51	121	NBD1	Multidrug resistance-associated protein 1	*Schistosoma haematobium*	2.00E-44	XP_012796463.1
D	E_nip_trans_16432_m.128192	EnABCD-52	593	TMD1-TMD2	ATP-binding cassette sub-family D member 4	*Clonorchis sinensis*	6.00E-10	RJW63429.1
	E_nip_trans_44431_m.310612	EnABCD-53	241	TMD1	ATP-binding cassette subfamily D (ALD) member 4	*Clonorchis sinensis*	2.00E-06	GAA52373.1
	E_nip_trans_44432_m.310626	EnABCD-54	550	TMD1-TMD2	ATP-binding cassette subfamily D (ALD) member 4	*Clonorchis sinensis*	6.00E-08	GAA52373.1
E	E_nip_trans_04378_m.19026	EnABCE-13	140	NBD1	ATP-binding cassette sub-family E member 1	*Schistosoma haematobium*	3.00E-73	XP_012797320.1

	E_nip_trans_67891_m.430419	EnABCE-19	581	NBD1-NBD2	ATP-binding cassette sub-family E member 1	*Clonorchis sinensis*	0	GAA55212.1
	E_nip_trans_61450_m.384853	EnABCE-35	227	NBD1	ATP-binding cassette, sub-family E (oabp),member, putative	*Schistosoma mansoni*	2.00E-118	XP_018645977.1
F	E_nip_trans_11464_m.78632	EnABCF-04	294	NBD1	ATP-binding cassette sub-family F member 1	*Schistosoma haematobium*	8.00E-167	XP_012797377.1
	E_nip_trans_69117_m.447205	EnABCF-20	769	NBD1-NBD2	ATP-binding cassette sub-family F member 3	*Clonorchis sinensis*	0	GAA29224.2
	E_nip_trans_60991_m.382452	EnABCF-27	348	NBD1-NBD2	ATP-binding cassette sub-family F member 2	*Clonorchis sinensis*	0	GAA53812.1
	E_nip_trans_15384_m.118653	EnABCF-32	670	NBD1-NBD2	ATP-binding cassette sub-family F member 2	*Clonorchis sinensis*	0	GAA53812.1
	E_nip_trans_11628_m.80655	EnABCF-33	66	NBD1	ATP binding cassette sub family F	*Hymenolepis microstoma*	3.00E-119	CDS26791.1
	E_nip_trans_11638_m.80807	EnABCF-34	742	NBD1-NBD2	ATP-binding cassette sub-family F member 3	*Clonorchis sinensis*	0	GAA29224.2
	E_nip_trans_50204_m.339563	EnABCF-38	286	NBD1-NBD2	ATP-binding cassette sub-family F member 2	*Clonorchis sinensis*	0	GAA53812.1
	E_nip_trans_41819_m.289745	EnABCF-43	608	NBD1	ATP-binding cassette sub-family F member 1	*Schistosoma haematobium*	2.00E-112	XP_012797377.1
	E_nip_trans_02563_m.8199	EnABCF-47	430	NBD1-NBD2	ATP-binding cassette sub-family F member 2	*Clonorchis sinensis*	0	GAA53812.1
	E_nip_trans_61524_m.385198	EnABCF-48	138	NBD1	ATP-binding cassette, sub-family F, member 1	*Schistosoma japonicum*	4.00E-65	CAX69408.1
G	E_nip_trans_70806_m.468366	EnABCG-05	626	NBD1	ATP-binding cassette sub-family G member 2	*Clonorchis sinensis*	4.00E-134	GAA57087.1
	E_nip_trans_10689_m.70314	EnABCG-08	365	TMD1	ATP-binding cassette sub-family G member 2	*Clonorchis sinensis*	7.00E-122	RJW61302.1
	E_nip_trans_24848_m.176802	EnABCG-22	692	NBD1-TMD2	ATP-binding cassette sub-family G member 1	*Schistosoma haematobium*	0	XP_012795324.1
	E_nip_trans_15017_m.115096	EnABCG-41	617	NBD1	ATP-binding cassette sub-family G member 2	*Clonorchis sinensis*	2.00E-134	GAA57087.1

Cuadro 8. Resumen de los 40 transportadores ABC identificados en *P. xenopodis*.

Subfamilia	*P. xenopodis* ID	ID árbol	Largo de AA	Topolgía	Gen coincidente	Especie coincidente	E-value	Número de acceso
A	PXEA_0000359901-mRNA-1	PxABCA-10	218	NBD1	ATP-binding cassette subfamily A (ABC1) member 3	*Clonorchis sinensis*	5.00E-82	GAA30631.2
	PXEA_0001301601-mRNA-1	PxABCA-27	1587	TMD1-NBD1-TMD2-NBD2	ATP-binding cassette sub-family A member 1	*Clonorchis sinensis*	0	RJW70412.1
	PXEA_0002040801-mRNA-1	PxABCA-40	150	NBD1	ATP-binding cassette sub-family A member 5	*Clonorchis sinensis*	5.00E-31	RJW59642.1
	PXEA_0002580401-mRNA-1	PxABCA-54	326	NBD1	ATP-binding cassette sub-family A member 1	*Schistosoma haematobium*	7.00E-84	XP_012793316.1
	PXEA_0002806901-mRNA-1	PxABCA-59	307	TMD1	ATP-binding cassette sub-family A member 3	*Schistosoma haematobium*	1.00E-63	XP_012800437.1
B	PXEA_0000015601-mRNA-1	PxABCB-01	144	TMD1	ATP-binding cassette sub-family B member 6 mitochondrial	*Clonorchis sinensis*	6.00E-56	GAA54835.1
	PXEA_0000049201-mRNA-1	PxABCB-02	222	NBD1	ABC transporter, ATP-binding protein	*Fasciola hepatica*	8.00E-104	PIS82145.1
	PXEA_0000100501-mRNA-1	PxABCB-03	117	NBD1	ABC transporter, ATP-binding protein	*Fasciola hepatica*	2.00E-38	PIS88575.1
	PXEA_0000383301-mRNA-1	PxABCB-11	120	NBD1	multidrug resistance protein 1	*Echinococcus multilocularis*	1.00E-49	CDI97795.1
	PXEA_0000811101-mRNA-1	PxABCB-15	188	TMD1	ATP-binding cassette sub-family B member 7	*Echinococcus granulosus*	3.00E-67	XP_024349525.1
	PXEA_0001072201-mRNA-1	PxABCB-22	91	NBD1	ATP-binding cassette sub-family B member 6	*Echinococcus granulosus*	7.00E-37	XP_024351800.1
	PXEA_0001494301-mRNA-1	PxABCB-31	124	NBD1	ATP-binding cassette sub-family B member 8	*Clonorchis sinensis*	5.00E-44	RJW61046.1
	PXEA_0002017601-mRNA-1	PxABCB-38	73	NBD1	multidrug resistance protein 1, 2, 3 (p glycoprotein 1, 2, 3), putative	*Schistosoma mansoni*	5.00E-17	XP_018647433.1
	PXEA_0002140201-mRNA-1	PxABCB-44	148	NBD1	multidrug resistance protein 1, 2, 3 (p glycoprotein 1, 2, 3), putative	*Schistosoma mansoni*	3.00E-45	XP_018647433.1
	PXEA_0002542901-mRNA-1	PxABCB-53	180	TMD1	ATP-binding cassette subfamily transporter B1 member 4	*Opisthorchis felineus*	8.00E-59	AIJ28498.1

	PXEA_0002815401-mRNA-1	PxABCB-60	250	NBD1	ATP-binding cassette subfamily transporter B1 member 4	*Opisthorchis felineus*	1.00E-93	AIJ28498.1
	PXEA_0003457201-mRNA-1	PxABCB-74	95	NBD1	ATP-binding cassette sub-family B member 8, mitochondrial	*Schistosoma haematobium*	6.00E-33	XP_012801046.1
C	PXEA_0000161801-mRNA-1	PxABCC-06	314	NBD1	ABC transporter, ATP-binding protein	*Opisthorchis viverrini*	3.00E-105	OON19972.1
	PXEA_0000334401-mRNA-1	PxABCC-08	106	TMD1	putative multidrug resistance associated protein	*Schistosoma mansoni*	4.00E-32	XP_018650283.1
	PXEA_0000985401-mRNA-1	PxABCC-18	270	NBD1	multidrug resistance-associated protein 4	*Clonorchis sinensis*	2.00E-67	GAA49862.1
	PXEA_0001350501-mRNA-1	PxABCC-29	273	NBD1	putative multidrug resistance protein 1 (ATP-binding cassette C1)	*Schistosoma mansoni*	5.00E-92	XP_018655393.1
	PXEA_0001599301-mRNA-1	PxABCC-32	209	NBD1	multidrug resistance-associated protein 4 (mrp/cmoat-related abc transporter	*Schistosoma mansoni*	2.00E-46	XP_018648723.1
	PXEA_0001634001-mRNA-1	PxABCC-34	121	NBD1	multidrug resistance-associated protein 1	*Clonorchis sinensis*	5.00E-43	GAA54906.1
	PXEA_0001703501-mRNA-1	PxABCC-35	82	NBD1	putative multidrug resistance protein 1 (ATP-binding cassette C1)	*Schistosoma mansoni*	1.00E-21	XP_018652084.
	PXEA_0002472901-mRNA-1	PxABCC-49	185	NBD1	multidrug resistance associated protein 7	*Echinococcus multilocularis*	2.00E-35	CDS40693.1
	PXEA_0002502301-mRNA-1	PxABCC-50	96	NBD1	multidrug resistance-associated protein 4	*Clonorchis sinensis*	5.00E-19	GAA49862.1
	PXEA_0002536301-mRNA-1	PxABCC-52	151	NBD1	Multidrug resistance-associated protein 1	*Schistosoma haematobium*	4.00E-56	XP_012796463.1
	PXEA_0002771901-mRNA-1	PxABCC-57	188	TMD1	Multidrug resistance-associated protein 1	*Clonorchis sinensis*	3.00E-43	RJW67461.1
	PXEA_0002795301-mRNA-1	PxABCC-58	167	NBD1	multidrug resistance-associated protein 1	*Clonorchis sinensis*	9.00E-38	GAA54906.1
	PXEA_0002831201-mRNA-1	PxABCC-61	297	TMD1	Multidrug resistance-associated protein 1	*Clonorchis sinensis*	2.00E-72	RJW63997.1
	PXEA_0002939101-mRNA-1	PxABCC-62	124	TMD1	multidrug resistance associated protein 1	*Echinococcus granulosus*	4.00E-25	CDS18168.1
	PXEA_0003034901-mRNA-1	PxABCC-67	217	TMD1	multidrug resistance-associated protein	*Schistosoma mansoni*	1.00E-26	ADF48912.1
	PXEA_0003188301-mRNA-1	PxABCC-69	137	NBD1	Multidrug resistance-associated protein 7	*Schistosoma haematobium*	2.00E-20	XP_012792070.1

E	PXEA_0000206901-mRNA-1	PxABCE-07	380	NBD1	ATP-binding cassette sub-family E member 1	*Clonorchis sinensis*	0	GAA55212.1
	PXEA_0000618801-mRNA-1	PxABCE-13	230	NBD1	ATP-binding cassette sub-family E member 1	*Schistosoma haematobium*	7.00E-117	XP_012797320.1
F	PXEA_0000997001-mRNA-1	PxABCF-19	141	NBD1	ATP-binding cassette sub-family F member 3	*Schistosoma haematobium*	6.00E-58	XP_012799084.1
	PXEA_0001001201-mRNA-1	PxABCF-20	74	NBD1	ATP-binding cassette sub-family F member 1	*Clonorchis sinensis*	2.00E-38	GAA48584.1
	PXEA_0001108801-mRNA-1	PxABCF-24	350	NBD1	ATP-binding cassette sub-family F member 1	*Schistosoma haematobium*	1.00E-157	XP_012797377.1
	PXEA_0002444301-mRNA-1	PxABCF-47	70	NBD1	ATP-binding cassette sub-family F member 3	*Clonorchis sinensis*	3.00E-24	GAA29224.2
G	PXEA_0003173601-mRNA-1	PxABCG-68	325	TMD1	ATP-binding cassette sub-family G member 2 domain protein	*Fasciola hepatica*	2.00E-95	PIS83506.1

Cuadro 9. Resumen de los 9 transportadores ABC identificados en *N. melleni*.

Subfamilia	*N. melleni* ID	ID árbol	Largo de AA	Topolgía	Gen coincidente	Especie coincidente	E-value	Número de acceso
B	NEOMEL_m.3094_g.3094	NmABCB-07	172	NBD1	ATP-binding cassette subfamily B (MDR/TAP) member 7	*Clonorchis sinensis*	2.00E-58	GAA50471.1
C	NEOMEL_m.82_g.82	NmABCC-02	331	NBD1	multidrug resistance-associated protein 4	*Clonorchis sinensis*	8.00E-51	GAA49862.1
	NEOMEL_m.3090_g.3090	NmABCC-03	202	NBD1	ATP-binding cassette subfamily C (CFTR/MRP) member 3	*Clonorchis sinensis*	2.00E-74	GAA50984.1
	NEOMEL_m.2209_g.2209	NmABCC-05	285	TMD1	putative multidrug resistance protein 1 (ATP-binding cassette C1)	*Schistosoma mansoni*	3.00E-75	XP_018655393.1
	NEOMEL_m.5266_g.5266	NmABCC-08	311	TMD1-NBD1	ATP-binding cassette subfamily C (CFTR/MRP) member 3	*Clonorchis sinensis*	4.00E-85	GAA50984.1
E	NEOMEL_m.728_g.728	NmABCE-01	326	NBD1-NBD2	ATP binding cassette sub family E	*Echinococcus multilocularis*	6.00E-154	CDS42811.1
F	NEOMEL_m.1909_g.1909	NmABCF-04	299	NBD1	ATP binding cassette sub family F	*Echinococcus multilocularis*	3.00E-77	CDS37942.1
	NEOMEL_m.2616_g.2616	NmABCF-06	252	NBD1	ATP-binding cassette sub-family F member 1	*Schistosoma haematobium*	2.00E-141	XP_012797377.1
	NEOMEL_m.2574_g.2574	NmABCF-09	283	NBD1	ATP-binding cassette sub-family F member 2	*Schistosoma haematobium*	3.00E-109	XP_012799636.1

Cuadro 10. Resumen de los 10 transportadores ABC identificados en *S. longicornis*.

Subfamilia	*S. longicornis* ID	ID árbol	Largo de AA	Topolgía	Gen coincidente	Especie coincidente	E-value	Número de acceso
B	maker-k51_1437-augustus-gene-0.1-mRNA-1	SlABCB-01	131	NBD	ABC transporter, ATP-binding protein	Fasciola hepatica	3.00E-41	PIS81152.1
	snap_masked-k51_37921-processed-gene-0.5-mRNA-1	SlABCB-03	464	TMD	Multidrug resistance protein 1	Clonorchis sinensis	1.00E-76	RJW63348.1
	snap_masked-k51_20356-processed-gene-0.0-mRNA-1	SlABCB-04	174	TMD	multidrug resistance protein 1	Clonorchis sinensis	4.00E-25	GAA54706.1
	augustus_masked-k51_37698-processed-gene-0.2-mRNA-1	SlABCB-06	190	NBD	ATP-binding cassette sub-family B member 7	Clonorchis sinensis	9.00E-55	RJW61723.1
	maker-k51_35954-snap-gene-0.2-mRNA-1	SlABCB-09	123	NBD	ATP-binding cassette subfamily B (MDR/TAP) member 1	Clonorchis sinensis	2.00E-43	GAA30924.2
	snap_masked-k51_10767-processed-gene-0.0-mRNA-1	SlABCB-11	242	NBD	ABC transporter, ATP-binding protein	Fasciola hepatica	4.00E-84	PIS81152.1
	snap_masked-k51_2859-processed-gene-0.1-mRNA-1	SlABCB-12	132	NBD	ATP binding cassette sub family B	Hymenolepis microstoma	6.00E-43	CDS33443.1
C	maker-k51_32457-snap-gene-0.0-mRNA-1	SlABCC-07	281	NBD	ABC transporter, ATP-binding protein	Opisthorchis viverrini	1.00E-66	OON14998.1
	snap_masked-k51_12426-processed-gene-0.1-mRNA-1	SlABCC-08	82	TMD	multidrug resistance associated protein 1	Echinococcus granulosus	8.00E-24	CDS18168.1
	maker-k51_5766-augustus-gene-0.0-mRNA-1	SlABCC-10	176	NBD	Multidrug resistance-associated protein 1	Schistosoma haematobium	2.00E-70	XP_012796463.1

6.4. Análisis Filogenéticos por Subfamilia

6.4.1. Subfamilia ABCA

La subfamilia A está conformada por transportadores completos que desempeñan funciones vinculadas al transporte de lípidos (Wenzel et al., 2007). En monogéneos se encontraron 11 ABCA, de los cuales, PxABCA-40 y PxABCA-54 de *P. xenopodis*, en distintos grupos, resultaron relacionados a los genes ABCA5, ABCA8, ABCA9, ABCA10, ABCA12 y ABCA13 de *H. sapiens* (Figura 18). Estos genes son conocidos por su participación en el transporte de lípidos. Específicamente, ABCA5 participa en el transporte de colesterol neuronal (Fu et al., 2015). ABCA8 está vinculado al eflujo de colesterol y actúa como modulador de los niveles de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDLc) (Trigueros-Motos et al., 2017). Mutaciones de ABCA8 provocan un nivel HDLc significativamente más bajo en plasma (Trigueros-Motos et al., 2017). ABCA9 y ABCA10 se sabe que pueden actuar como transportadores de lípidos en macrófagos de humano (Piehler et al., 2002; Wenzel et al., 2003). ABCA12 funciona como un transportador de lípidos de queratinocitos epidérmicos y sus mutaciones pueden originar la pérdida de la barrera lipídica de la piel (Akiyama et al., 2005). La función de ABCA13 es poco conocida, pero se sugiere que un déficit de ABCA13 induce el deterioro de la maduración o migración neuronal y la función de la red neuronal (Iritani et al., 2018).

Para los platelmintos parásitos datos genómicos han sugerido que la pérdida de peroxisomas y la pérdida o reducción sustancial en la vía de biosíntesis de ácidos grasos son características de una estrategia adaptativa (Hahn et al., 2014; Tsai et al., 2013); sin embargo posee los genes necesarios para su metabolismo, lo cual ha evidenciado una dependencia de los lípidos del hospedero (Wang et al., 2011). La importancia de los lípidos en platelmintos parásitos ha sido demostrada para *Schistosoma mansoni*, en el cual son importantes para la maduración y desarrollo del parásito, producción de huevos y forma parte de la membrana celular y del tegumento (Furlong, 1991). Además, se ha encontrado que tasas altas de lípidos metabolizados por el parásito podrían estar involucradas en la producción de células T reguladoras del hospedero la cuales suprimen la activación del sistema inmunitario, mejorando así la supervivencia del parásito (van der Kleij et

al., 2002). Proteínas de unión y transporte de ácidos grasos han sido encontrados en parásitos monogéneos que podrían ayudar a la adquisición de lípidos (Hahn et al., 2014; Wang et al., 2011). Se puede inferir que la subfamilia ABCA puede estar involucrado en el transporte de lípidos en *P. xenopodis*, cumpliendo roles esenciales.

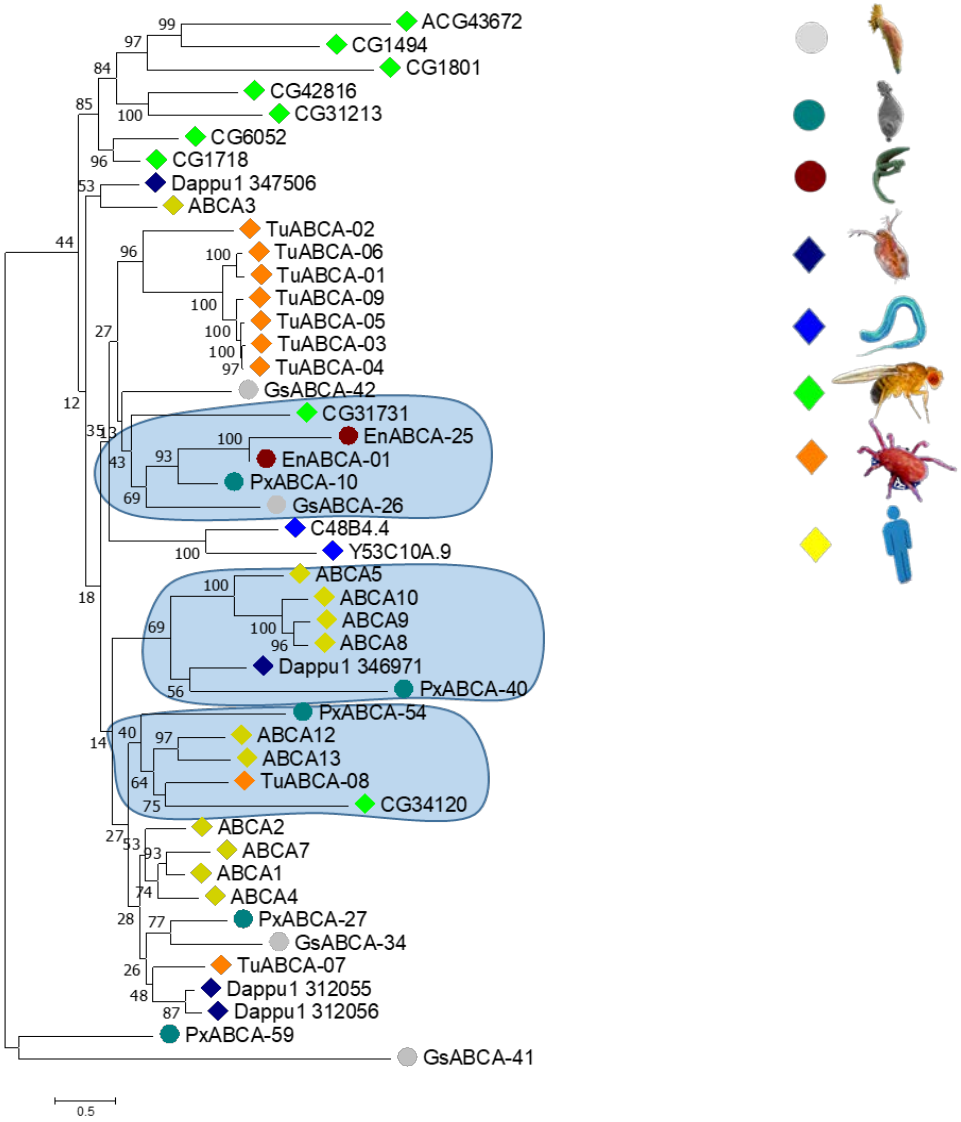

Figura 18. Análisis filogenéticos de transportadores ABCA de ocho especies de metazoarios. El árbol filogenético fue construido con el método de máxima verosimilitud en el programa RAxML con un bootstrap de 1000 interacciones con el modelo de sustitución de aminoácido LG+G+I+F. En la gráfica los círculos representan a las especies de monogéneos y los diamantes a otras especies no monogéneos. Cada especie está representada por un color de la siguiente manera: gris, *G. salaris*; verde turquesa, *P. xenopodis*; guinda, *E. nipponicum*; azul, *C. elegans*; amarillo, *H. sapiens*; verde, *D. melanogaster*; azul oscuro, *D. pulex*; naranja, *T. urticae*. La barra de escala representa la tasa de sustitución de aminoácidos por sitio. Los transportadores ABC de monogéneos relacionados con otros metazoarios están indicadas por el sombreado color celeste.

6.4.2. Subfamilia ABCB

En total, se identificaron 34 transportadores ABCB en los monogéneos. De estos, 11 se agruparon junto a transportadores completos y 14 junto a transportadores parciales de la subfamilia B de otros metazoarios (Figura 19). Específicamente, los genes EnABCB-44 de *E. nipponicum*, GsABCB-10, GsABCB-12, GsABCB-24 y GsABCB-39 de *G. salaris*, SlABCB-04, SlABCB-11, SlABCB-01 y SlABCB-09 de *S. longicornis*, y PxABCB-11 y PxABCB-60 de *P. xenopodis* se agruparon con los transportadores completos ABCB1 (MDR1), ABCB4 (MDR3), ABCB5 y ABCB11 (BSEP) de *H. sapiens*, y MDR49, MDR50, MDR65 y CG10226 de *D. melanogaster*. Los transportadores completos se caracterizan por su capacidad de transportar fármacos. En humanos, ABCB1 es capaz de exportar medicamentos no modificados (Sharom, 2008); ABCB5 participa en la expulsión de fármacos en células tumorales y en el desarrollo de quimioresistencia en células de melanoma maligno para el sustrato de doxorubicina (Frank et al., 2005). Asimismo, en *D. melanogaster*, se ha demostrado que la supresión de MDR65 (ortólogo de ABCB) y MDR50 puede aumentar la susceptibilidad del organismo a diferentes insecticidas, como los piretroides y el DDT (Gellatly et al., 2015; Sun et al., 2017).

En cuanto a platelmintos parásitos, los experimentos realizados con el tremátodo *S. mansoni* han indicado que los transportadores ABCB intervienen en la expulsión de fármacos. Por ejemplo, Kasinathan et al. (2014) observaron que la movilidad de los parásitos disminuyó cuando co-administraron praziquantel junto con inhibidores y reguladores de la expresión del gen Pgp (ABCB1), lo cual no sucedió cuando se aplicó el praziquantel solo. Además, la cuantificación de la fluorescencia de praziquantel mediante microscopía fue mayor en aquellos parásitos tratados con inhibidores, lo que comprueba la influencia de este gen en el transporte de fármacos en tremátodos. Con base en estas evidencias, es posible sugerir que los genes de la subfamia B de monogéneos relacionados con ABCB1 del humano y MDR de *Drosophila* podrían estar implicados en la expulsión de fármacos. Por lo tanto, estos genes de monogéneos podrían ser potenciales blancos de compuestos antihelmínticos.

Cabe señalar que el análisis filogenético reveló una extensa expansión de genes transportadores completos ABCB en *G. salaris* al igual que en *H. sapiens*, *C. elegans y T. urticae,* lo cual puede estar relacionado a la diversidad de sustratos que pueden ser transportados, tal como sucede en humanos. Algo similar sucede con las enzimas CYPs, involucradas en la primera fase del mecanismo de detoxificación. Estas enzimas generalmente están presentes en múltiples copias, por lo cual se sugiere que su expansión se dio por duplicaciones locales de genes impulsadas por la exposición a toxinas y patógenos (Matoušková et al., 2016).

En cuanto a los transportadores parciales ABCB, se observaron tres grupos (Figura 19). En uno de los grupos se encuentran los genes PxABCB-74 de *P. xenopodis*, EnABCB-06 y EnABCB-07 (probablemente parálogos) de *E. nipponicum,* GsABCB-11 de *G. salaris* relacionados al gen ABCB8 de *H. sapiens.* Se sabe que ABCB8 posee un papel importante y específico en la quimiorresistencia de varias líneas celulares de melanoma contra el fármaco doxorubicina (Elliott et al., 2009). La pérdida de este gen podría generar células sensibles a tratamientos de melanoma con doxorubicina y originar daños relacionado al ADN mitocondrial (Elliott et al., 2009). Entonces, podría suponerse que los genes de monogéneos relacionados con ABCB8 desempeñan una función transportadora de fármacos.

En otro grupo de transportadores parciales se encontraron los genes NmABCB-07 de *N. melleni*, GsABCB-06 de *G. salaris*, EnABCB-09 de *E. nipponicum*, PxABCB-15 de *P. xenopodis*, SlABCB-06 y SlABCB-12 de *S. longicornis* relacionados con ABCB7 de *H. sapiens* y Abtm-1 de *C. elegans.* Esto es interesante porque ABCB7 es un transportador interno de membrana mitocondrial que regula la biosíntesis del grupo hemo y del compuesto sulfuro de hierro (Fe-S) en humanos y mamíferos (Kumar et al., 2019; Pondarré et al., 2006). Se piensa también que ABCB7 está involucrado en la transferencia de hierro de las mitocondrias al citosol, el cual es esencial en todos los eucariotas para diversas funciones vitales, incluida la respiración, la regulación de genes y la replicación y reparación del ADN (Cavadini et al., 2007). En *C. elegans,* Abtm-1 se encuentra relacionado con la acumulación de hierro férrico, aumento del estrés oxidativo y eventos apoptóticos prematuros. Se ha demostrado que la modulación de Abtm-1 por RNAi produce una letalidad sustancial, aunque una proporción significativa de gusanos pueden sobrevivir hasta la

edad adulta (Pondarré et al., 2006). Los genes de monogéneos relacionados con ABCB7 y Abtm-1 podrían también estar desempeñando dichas funciones vitales.

Hubo un grupo más de transportadores parciales en el que aparecieron los genes EnABCB-49 de *E. nipponicum*, GsABCB-13 de *G. salaris*, PxABCB-01 y PxABCB-22 de *P. xenopodis* relacionados a ABCB6 de *H. sapiens* y CG4225 de *D. melanogaster*. ABCB6 se encuentra en la membrana externa de la mitocondria, en donde regula el transporte de porfirina, componente esencial de hemo o hemoglobina y enzimas que contienen hemo (Kumar et al., 2019). En ratones, ABCB6 media la exportación de porfirinas en las células rojas (Fukuda et al., 2016). Asimismo, el gen CG4225 de *D. melanogaster*, que es el transportador ortólogo del ABCB6 humano, desempeña un papel protector en respuesta a la exposición de metales como el cadmio (Sooksa-Nguan et al., 2009). Al igual que los otros dos grupos de transportadores parciales, se encontró una baja expansión de genes en este grupo y presencia en tres especies de monogéneos con una sola copia. Esto puede estar relacionado a funciones esenciales en el que está vinculado este transporador.

Cabe señalar que los genes ABCB2 y ABCB3, que son transportadores relacionados con el procesamiento de antígenos en humano (Praest et al., 2018), no fueron encontrados en monogéneos ni en artrópodos, pero si en *C. elegans*. Los invertebrados carecen de una respuesta inmune adaptativa, por lo tanto se esperaba la ausencia de ABCB2 y ABCB3 en monogéneos, al igual que como sucede en artrópodos. La presencia de estos genes en *C. elegans* puede significar la presencia de funciones no relacionadas con la presentación de antígenos como lo sugirieron Sturm et al. (2009), sin embargo su funcionalidad sigue siendo desconocida.

Para *S. longicornis* la subfmilia ABCB fue la única que estuvo representada por un número esperado de genes en comparación con otros monogéneos. Este no fue el caso para la subfamilia ABCC, en donde se encontraron pocos miembros, mientras que en las subfamilias restantes estuvieron ausentes. El bajo número o ausencia de genes ABC para determinadas subfamilias se pudo deber a la calidad del ensamble, a pesar de esto, se obtuvieron genes en subfamilias de transportadores involucradas en el mecanismo de detoxificación.

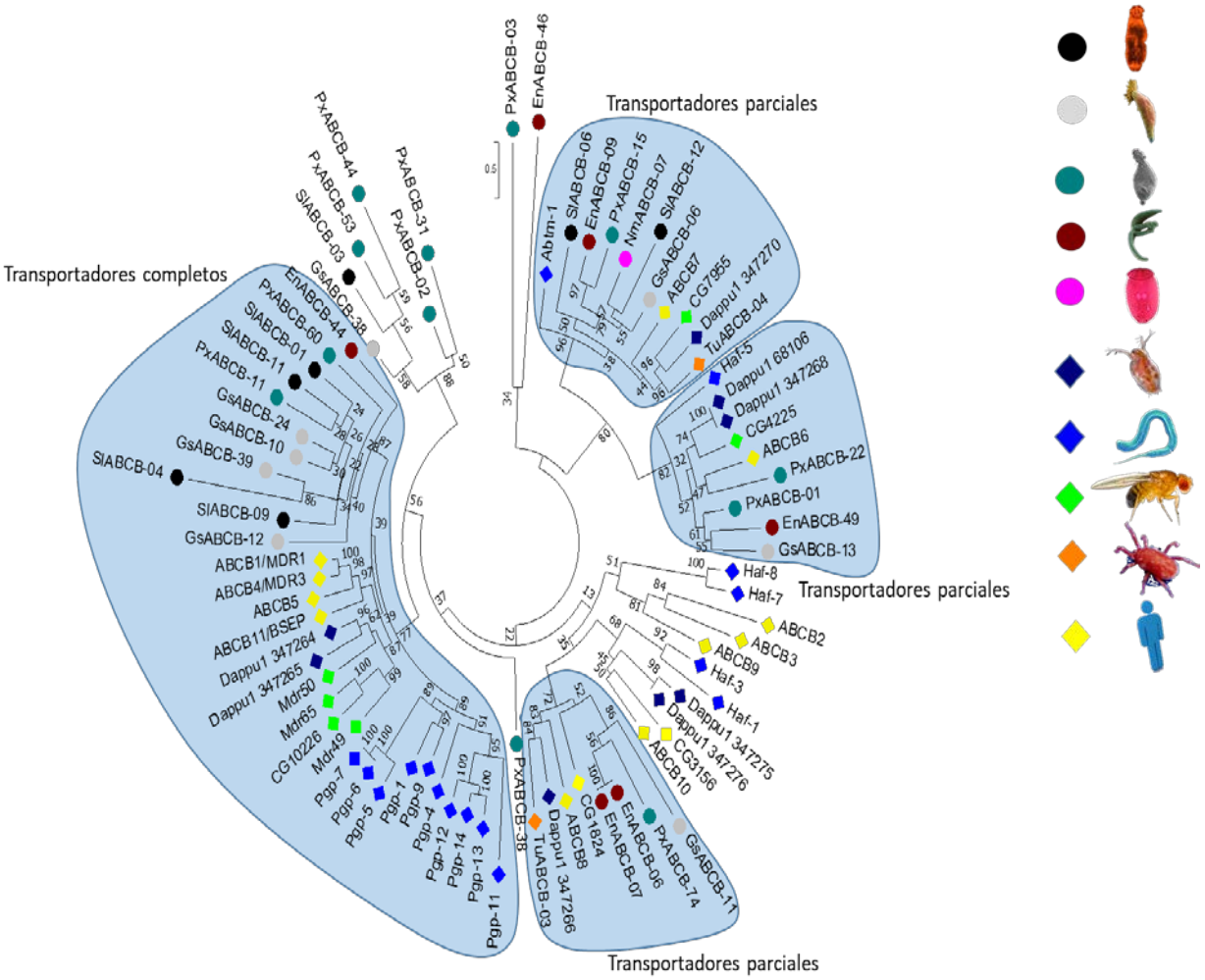

Figura 19. Análisis filogenéticos de transportadores ABCB de 10 especies de metazoarios. El árbol filogenético fue construido con el método de máxima verosimilitud en el programa RAxML con 1000 interacciones Bootstrap. Se eligió el modelo de sustitución de aminoácidos LG+G+I+F. Cada especie está representada por un color de la siguiente manera: gris, *G. salaris*; verde turquesa, *P. xenopodis*; guinda, *E. nipponicum*; rosado *N. melleni*; círculo negro, *S. longicornis*; azul, *C. elegans*; amarillo, *H. sapiens*; verde, *D. melanogaster*; azul oscuro, *D. pulex*; naranja, *T. urticae*. La barra de escala representa la tasa de sustitución de aminoácidos por sitio. Los transportadores ABC de monogéneos relacionados con otros metazoarios están indicadas por el sombreado color celeste.

6.4.3. Subfamila ABCC

Con 52 integrantes, la subfamilia C es la más grande de todos los ABC encontrados en los monogéneos. El análisis filogenético de esta subfamilia reveló que la duplicación de genes puede ser extensiva tanto en monogéneos como en otros metazoarios y que las relaciones de ortología son escasas (Figura 20). La duplicación de genes específica para cada linaje ha sido encontrada en diversas investigaciones (eg., Dermauw et al., 2013; Dermauw y Van Leeuwen, 2014; Carmona-Antoñanzas et al., 2015; Chang-Bum et al., 2017). Los eventos de duplicación contribuyen a la aparición de funciones genéticas nuevas, al surgimiento de compensación funcional, al fortalecimiento del sistema biológico y a facilitar procesos adaptativos, caso contrario a los genes de copia única (Zhang et al., 2002; Gu et al., 2003; Zhang, 2003).

La expansión de genes en algunas subfamilias ABC se debe probablemente a tasas altas de nacimiento y muerte de genes, ya que este proceso se ha encontrado en familias multigénicas asociadas a características fisiológicas variables entre especies, como la respuesta inmune o la resistencia a enfermedades (Zhang, 2003), permitiendo a los organismos generar conjuntos de genes diversificados para enfrentar diferentes patógenos o ambientes adversos (Nei et al., 2000; Bass y Field, 2011). Por ejemplo, se ha sugerido que la duplicación o amplificación de genes de detoxificación de insecticidas es quizá el mecanismo más común de evolución adaptativa en los artrópodos (Bass y Field, 2011). Este fenómeno podría estar relacionado a las proteínas transportadoras transmembranales. Dermauw et al. (2013) argumentaron que los genes duplicados han sido retenidos en linajes específicos de las subfamilias C, G y H del ácaro *T. urticae*, esto debido a su importancia en la detoxificación de acaricidas. Asimismo, en *Tribolium castaneum,* la expansión de la subfamilia C sugiere la posibilidad de que la propensión conocida de esta especie a desarrollar resistencia a los insecticidas podría estar relacionada a eventos de duplicación (Broehan et al., 2013). A diferencia de tremátodos, los monogéneos se encuentran interactuando con el ambiente y con el hospedero, por lo cual es más probable que esten expuestos a xenobióticos potencialmente tóxicos, esto podría explicar el número de expansiones en monogéneos mayor que en tremátodos.

La subfamilia C posee funciones relacionadas al transporte de iones, la secreción de toxinas y la transducción de señales (Dean et al., 2001a). Aunque no hubo una relación clara o significativa entre miembros de la subfamilia C de monogéneos y otros metazoarios (Figura 20), se observó al gen GsABCC-37 de *G. salaris* cerca de MRP5, MRP8 y MRP9 de *H. sapiens*. La función de MRP5 involucra el transporte de conjugados de glutamato y compuestos análogos de glutamato, pudiendo afectar los niveles de metabolitos endógenos, toxinas y medicamentos en el cerebro (Jansen et al., 2015). Por su parte, MRP8 participa en procesos fisiológicos que involucran ácidos biliares, esteroides conjugados y nucleótidos cíclicos a través del transporte de una variedad de lipófilos conjugados (Chen et al., 2005). Además, se sugiere que este transportador se encuentra relacionado a la resistencia de cáncer de mama por tener como sustrato a MTX, un compuesto utilizado en tratamiento adyuvante del cáncer (Chen et al., 2005). MRP9 es derivado de la duplicación de MRP8 y muy cercano a ABCC5 (Tammur et al., 2001). En general, los MRPs son bien conocidos por su capacidad de transportar una amplia variedad de sustratos, tanto en mamíferos como en invertebrados (Chang-Bum et al., 2017). Por lo tanto, investigaciones futuras podrían incluir al gen GsABCC-37 como un blanco de fármacos para controlar la gyrodactilosis en peces.

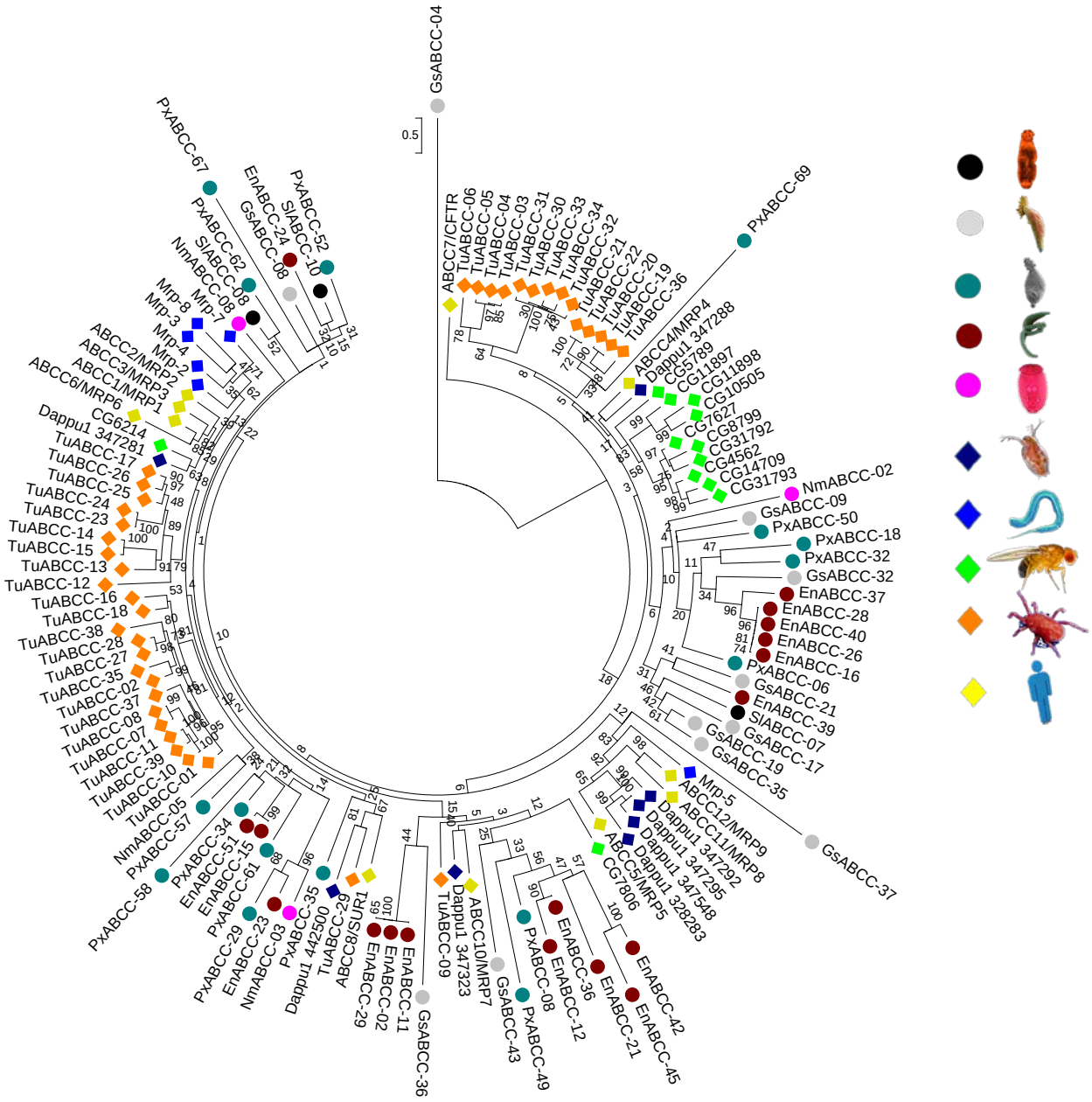

Figura 20. Análisis filogenético de transportadores ABCC de 10 especies de metazoarios. El árbol filogenético fue construido con el método de máxima verosimilitud en el programa RAxML con un bootstrap de 1000 interacciones con el modelo de sustitución de aminoácido LG+G+I+F. Cada especie está representada por un color de la siguiente manera: gris, *G. salaris*; verde turquesa, *P. xenopodis*; guinda, *E. nipponicum*; rosado, *N. melleni*; círculo negro, *S. longicornis*; azul, *C. elegans*; amarillo, *H. sapiens*; verde, *D. melanogaster*; azul oscuro, *D. pulex*; naranja, *T. urticae*. La barra de escala representa la tasa de sustitución de aminoácidos por sitio.

6.4.4. Subfamila ABCD

La subfamilia D se encuentra formada por transportadores parciales que son proteínas ubicadas en membranas peroxisomales (Dean et al., 2001a) y residentes en el retículo endoplasmático (RE) (Morita y Imanaka, 2012). Además, estas proteinas están involucrados en el transporte de acil-CoA de cadena muy larga y ramificada (Morita y Imanaka, 2012). En el presente estudio, se identificaron un total de 4 genes ABCD en monogéneos, de los cuales el gen GsABCD-46 de *G. salaris* se agrupó con los genes C5G10.3 de *C. elegans*, Dappu1303977 de *D. pulex* y ABCD4 de *H. sapiens* (Figura 21). Los otros tres genes (pertenecientes a *E. nipponicum*) no se agruparon con genes de otros metazoarios. ABCD4 se colocaliza con proteínas lisosomales (Coelho et al., 2012) y en el retículo endoplasmático (Morita y Imanaka, 2012). Por su homología con ABCD1 en humano y por estar ubicado en el RE se especula que ABCD4 funciona como un transportador de ciertas moléculas de lípidos esenciales para el metabolismo de los lípidos en el RE (Morita y Imanaka, 2012). Además, ABCD4 está involucrado en defectos hereditarios en humanos relacionados con la afectación del metabolismo de la vitamina B12 (cobalamina) (Coelho et al., 2012). Los pocos eventos de duplicación de genes encontrados en esta subfamilia y la evidente relación filogenética hacen especular que la función de ABCD4 en monogéneos probablemente se conserva con relación a los otros metazoarios.

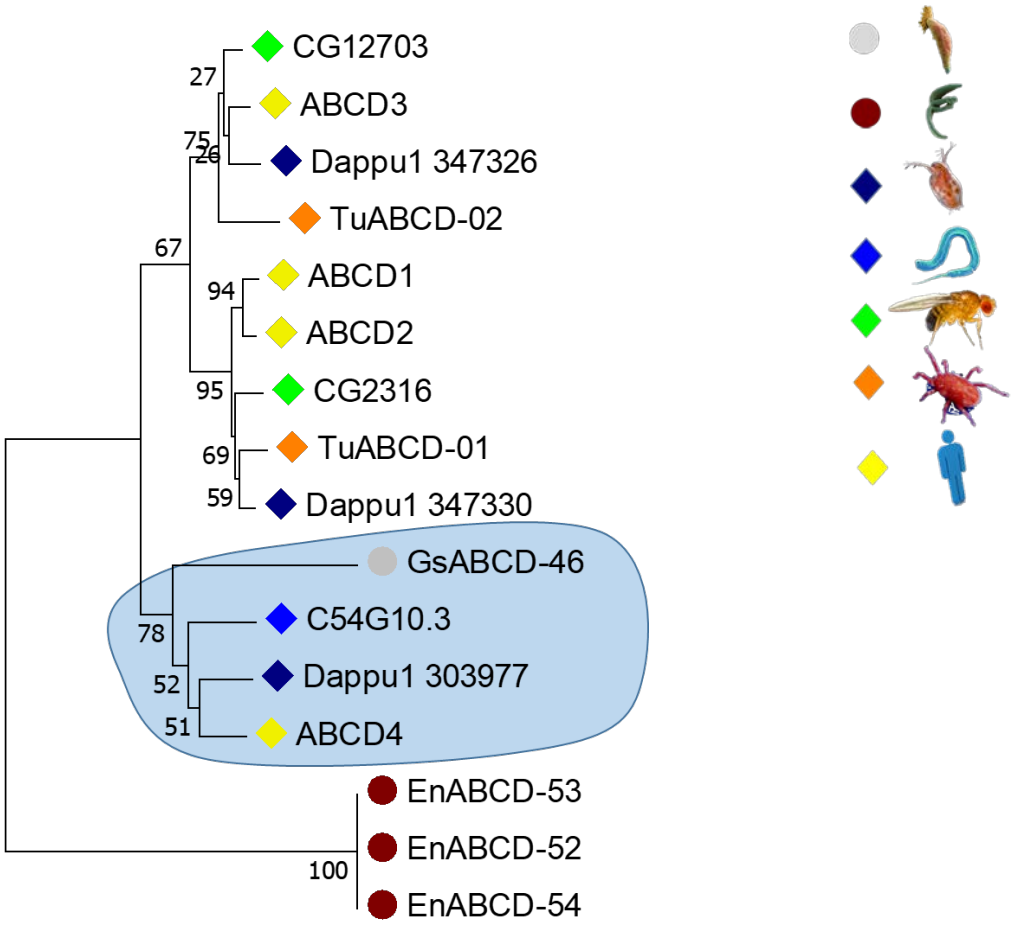

Figura 21. Análisis filogenético de transportadores ABCD de siete especies de metazoarios. El árbol filogenético fue construido con el método de máxima verosimilitud en el programa RAxML con 1000 interacciones bootstrap. Se eligió el modelo de sustitución de aminoácidos LG+G+I+F. Cada especie está representada por un color de la siguiente manera: gris, *G. salaris*; guinda, *E. nipponicum*; C. elegans; amarillo, *H. sapiens*; verde, *D. melanogaster*; azul oscuro, *D. pulex*; naranja, *T. urticae*. La barra de escala representa la tasa de sustitución de aminoácidos por sitio. Los transportadores ABC de monogéneos relacionados con otros metazoarios están indicadas por el sombreado color celeste.

6.4.5. Subfamila ABCE

La subfamilia E se considera muy conservada debido a su baja expansión (Sturm et al., 2009). Sus integrantes se caracterizan por carecer de TMD, por lo cual no pueden desempeñar una función transportadora (Vasiliou et al., 2009). En el presente estudio se encontraron 7 genes ABCE en los monogéneos, tres de ellos pertenecientes a *E. nipponicum*, dos a *P. xenopodis*, uno a *G. salaris* y

uno a *N. melleni*, todos estos formando un grupo de genes homólogos (Figura 22), sin agruparse con genes de otros metazoarios.

Lo que se conoce acerca de la funcionalidad de ABCE es que el miembro ABCE1 es una proteína que reconoce el oligoadenilato producido en respuesta a ciertas infecciones virales (Dean et al., 2001a). En humanos, las funciones biológicas y la regulación de la proteína ABCE1 involucran principalmente la inhibición de la RNasa L, y consecuente respuesta en la producción de interferón, la cual es parte de la defensa inmune innata contra infecciones virales y que en casos donde la infección no puede ser convatida puede originar eventos apoptóticos (Tian et al., 2012). Además, ABCE1 desempeña funciones relacionadas con con la traducción y carcinogénesis (Tian et al., 2012). En *C. elegans* la interferencia de ABCE ha resultado en letalidad embrionaria y un crecimiento lento (Zhao et al., 2004). En *D. melanogaster*, las mutaciones de ABCE pueden resultar partes del cuerpo con tamaños desproporcionados y un crecimiento lento, este último vinculado con reguladores de la traducción (Coelho et al., 2005). Dada la ortología entre los genes de monogéneos y de otras especies se puede inferir una funcionalidad similar. Algo interesante es la presencia de copias únicas de este gen en monogéneos de la clase Monopisthocotylea, similar a lo encontrado en otros taxa, y la presencia de duplicaciones para la clase Polyopisthocotylea.

En los genomas de varios metazoarios, incluyendo los tremátodos *S. mansoni* y *S. japonicum*, la subfamilia E está representada mayormente por un gen ABCE1 esencial de una sola copia (Greenberg, 2013; Dermauw y Van Leeuwen, 2014; Carmona-Antoñanzas et al., 2015; Liu et al., 2013; Navarro-Quiles et al., 2018). Sin embargo, hay organismos como el pez gato y el bacalao (Liu et al., 2013) y los mosquitos *Anopheles gambiae, Aedes aegypti* y *Culex pipiens quinquefasciatus* (Lu et al., 2016) que presentan duplicaciones de este gen. Cabe señalar que en el tremátodo *O. felineus* ningún miembro de la subfamilia E ha sido identificado (Mordvinov et al., 2017). En monogéneos se encontraron duplicaciones de genes en *P. xenopodis* y *E. nipponicum*, ambos pertenecientes a la clase Polyopisthocotylea. Las proteínas de esta subfamilia son altamente conservadas a través de diversos taxa, lo cual sugiere su rol en procesos biológicos celulares fundamentales (Sturm et al., 2009). Esto nos indica que esta expansión es típica en monogéneos polyopistocotilides.

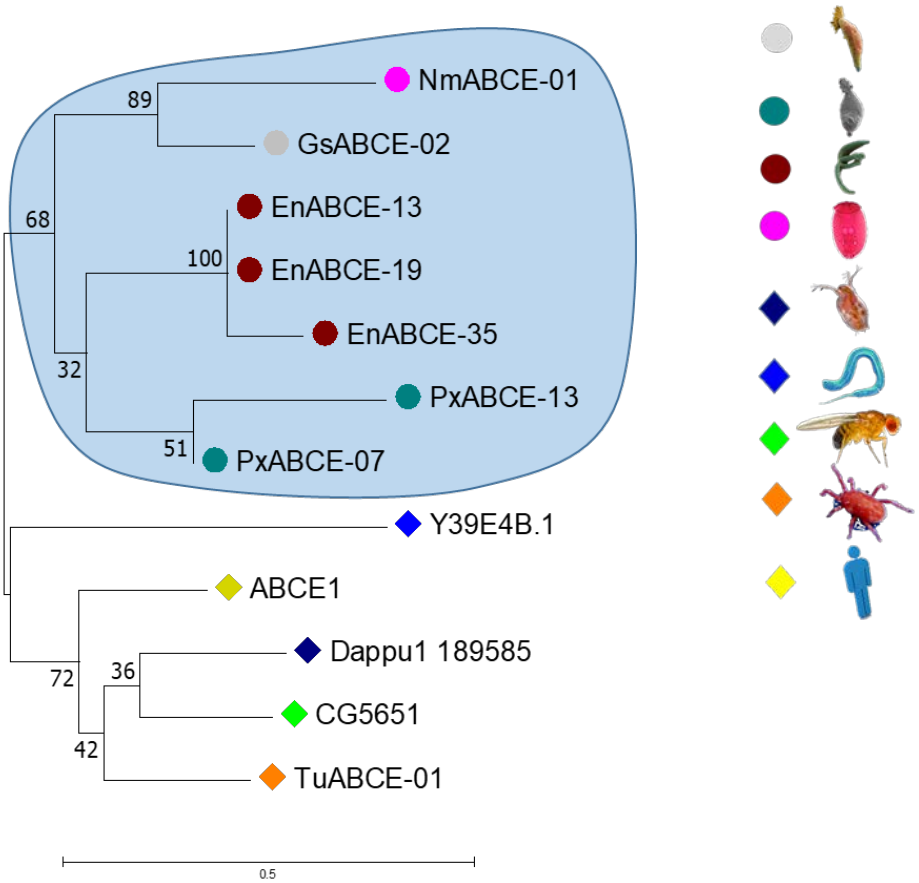

Figura 22. Análisis filogenético de transportadores ABCE de nueve especies de metazoarios. El árbol filogenético fue construido con el método de máxima verosimilitud en el programa RAxML con 1000 interacciones bootstrap. Se eligió el modelo de sustitución de aminoácidos RTREV+G+I+F. Cada especie está representada por un color de la siguiente manera: gris, *G. salaris*; verde turquesa, *P. xenopodis*; guinda, *E. nipponicum*; rosado, *N. melleni*; azul, *C. elegans*; amarillo, *H. sapiens*; verde, *D. melanogaster*; azul oscuro, *D. pulex*; naranja, *T. urticae*. La barra de escala representa la tasa de sustitución de aminoácidos por sitio. Los transportadores ABC de monogéneos relacionados con otros metazoarios están indicadas por el sombreado color celeste.

6.4.6. Subfamila ABCF

La subfamilia F desempeña funciones relacionadas a la traducción y en su control (Paytubi et al., 2009), y se caracteriza por estar compuesta por genes que tienen solo dominios NBD (Dean et al., 2001a), lo que vuelve improbable su función como transportador (Vasiliou et al., 2009). En el presente estudio se identificaron 21 genes ABCF de monogéneos los cuales formaron cuatro grupos (Figura 23). En el grupo I, los genes EnABCF-20 y EnABCF-34 de *E. nipponicum*, PxABCF-19 y PxABCF-47 de *P. xenopodis*, y GsaABCF-07 de *G. salaris* se agruparon con ABCF3 de *H. sapiens*, la cual es una proteína no transmembranal, ubicada en el citoplasma, que contribuye a la

proliferación celular (Zhou et al., 2013). La sobreexpresión de ABCF3 aumenta la proliferación de células de cáncer de hígado humano in vitro y la interrupción de su interacción con TPD52L2 disminuye significativamente el crecimiento celular (Zhou et al., 2013). En *C. elegans*, se conoce que el homólogo de ABCF3 probablemente controlan el inicio de la traducción en *C. elegans* (Hirose y Horvitz, 2014).

En el grupo II estuvieron GsABCF-29 de *G. salaris*, EnABCF-04 de *E. nipponicum*, PxABCF-24 de *P. xenopodis* y NmABCF-06 de *N. melleni* junto a ABCF1 de *H. sapiens*, que es una proteína ubicada en el núcleo y citoplasma de las células (Zhou et al., 2013). Esta proteína es también llamado ABC50 y desempeña un rol esencial en la iniciación de la traducción en mamíferos (Paytubi et al., 2009). El grupo III estuvo formado sólo por los genes de monogéneos PxABCF-20, NmABCF-04, GsABCF-20, EnABCF-43 y EnABCF-33. El grupo IV estuvo formado por los genes EnABCF-32, EnABCF-38, EnABCF-27, EnABCF-48 y EnABCF-47 de *E. nipponicum*, NmABCG-09 de *N. melleni*, y GsABCF-09 de *G. salaris*¸ los cuales, aunque con un soporte bajo, se relacionaron con el gen ABCF2 de *H. sapiens*. Al igual que ABCF3, ABCF2 es una proteína no membranal ubicada en el citoplasma (Zhou et al., 2013). En humanos, ABCF2 es un elemento de respuesta antioxidante funcional (Bao et al., 2017). Los elementos funcionales de respuesta antioxidante han sido identificados en la región promotora de transportadores de fármacos ABC, como MRP2, MRP3, MRP4 y ABCG2, por lo cual han sido relacionados con la quimioresistencia, como ha sido observado en tratamientos con cisplatino contra el cáncer de ovario (Bao et al., 2017). La funcionalidad complementaria que posee ABCF2 para la regulación transcripcional encontrada en humanos puede ser similar a la encontrada en otros metazoarios incluyendo monogéneos.

Los genes ABCF de monogéneos presentraron un número bajo de duplicaciones, excepto en *E. nipponicum*. Las proteínas ABCF son altamente conservadas y pocos miembros son encontrados en los organismos metazoarios, por lo cual se especula su funcionalidad en procesos biológicos celulares fundamentales (Sturm et al., 2009). Las cercanias filogenéticas entre los ABCF de *H. sapiens* y de monogéneos hacen suponer una funcionalidad similar sin embargo no se puede esclarecer el número elevado en *E. nipponicum*. Como se mencionó anteriormente para la subfamilia C, los eventos de duplicación pueden contribuir a la aparición de funciones genéticas nuevas y dirigir a procesos adaptativos (Zhang et al., 2002; Zhang, 2003).

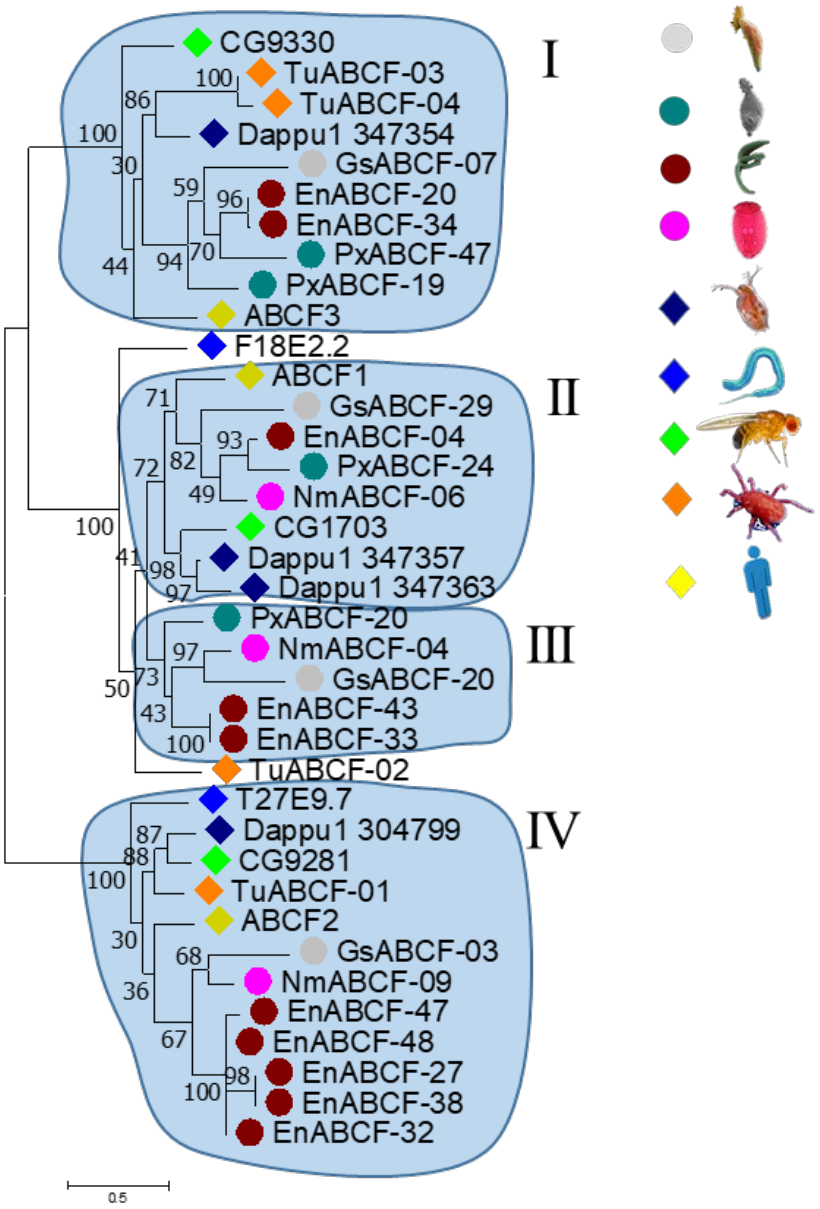

Figura 23. Análisis filogenético de transportadores ABCF de nueve especies de metazoarios. El árbol filogenético fue construido con el método de máxima verosimilitud en el programa RAxML con 1000 interacciones bootstrap. Se eligió el modelo de sustitución de aminoácidos LG+G+I. Cada especie está representada por un color de la siguiente manera: gris, *G. salaris*; verde turquesa, *P. xenopodis*; guinda, *E. nipponicum*; rosado, *N. melleni*; azul, *C. elegans*; amarillo, *H. sapiens*; verde, *D. melanogaster*; azul oscuro, *D. pulex*; naranja, *T. urticae*. La barra de escala representa la tasa de sustitución de aminoácidos por sitio. Los transportadores ABC de monogéneos formaron cuatro grupos se indicadan con el sombreado color celeste.

6.4.7. Subfamila ABCG

La subfamilia G se encuentra involucrada en el transporte de lípidos a través de las membranas (Woodward et al., 2011) y está formada por transportadores parciales (Dean et al., 2001a) que forman dímeros para funcionar como transportadores de membrana (Schmitz et al., 2001). En este estudio se encontraron 10 genes ABCG de monogéneos integrados en dos grupos (Figura 24). El grupo I se formó por los genes EnABCG-08 de *E. nipponicum,* PxABCG-68 de *P. xenopodis,* GsaABCG-25 de *G. salaris* y ABCG2/BCRP de *H. sapiens*. ABCG2, también conocido como proteína de resistencia al cáncer de mama (Glavinas et al., 2004), se encuentra involucrado en el transporte de una amplia gama de sustratos estructural y funcionalmente diversos, como quimioterapéuticos, antibióticos e inhibidores de la HMG-CoA reductasa (conocidos como estatinas) (Woodward et al., 2011). La estrecha relación encontrada en este grupo de genes sugiere que los monogéneos podrían desempeñar función transportadora de fármacos, por lo que sería interesante explorar su funcionalidad ante la aplicación de antiparasitarios o fármacos en general.

En el grupo II aparecen GsABCG-31, GsABCG-33, GsABCG-23 y GsABCG-30 de *G. salaris* y EnABCG-22 de *E. nipponicum* que de alguna forma se relacionan con ABCG4/WHITE y ABCG-1/WHITE1 de *H. sapiens*. ABCG1 es un transportador implicado en procesos de exportación de lípidos de macrófagos (Allikmets, 2000), aunque la expresión ubicua de este gen en tejidos sugiere que interviene en la homeostasis de los lípidos celulares (Klucken et al., 2000). El “gen blanco” en *Drosophila* ha sido reportado como homólogo de ABCG1 (Klucken et al., 2000). Este transportador actúa en *Drosophila* como un importador dimérico de moléculas como guanina y triptófano, las cuales son precursoras para la pigmentación ocular (Chen et al., 1996). ABCG4 se encuentra en el cerebro y en la retina neural del ojo y está estrechamente relacionado con ABCG1, más que con cualquier otro miembro (Dean et al., 2001a; Oldfield et al., 2002). Una gran expansión de este grupo de genes es encontrada en artrópodos; sin embargo, en monogéneos solo se encontraron pocos representantes en *G. salaris* y *P. xenopodis*. Probablemente los ABCG no desempeñan funciones esenciales en monogéneos, aunque se requieren más estudios para confirmarlo.

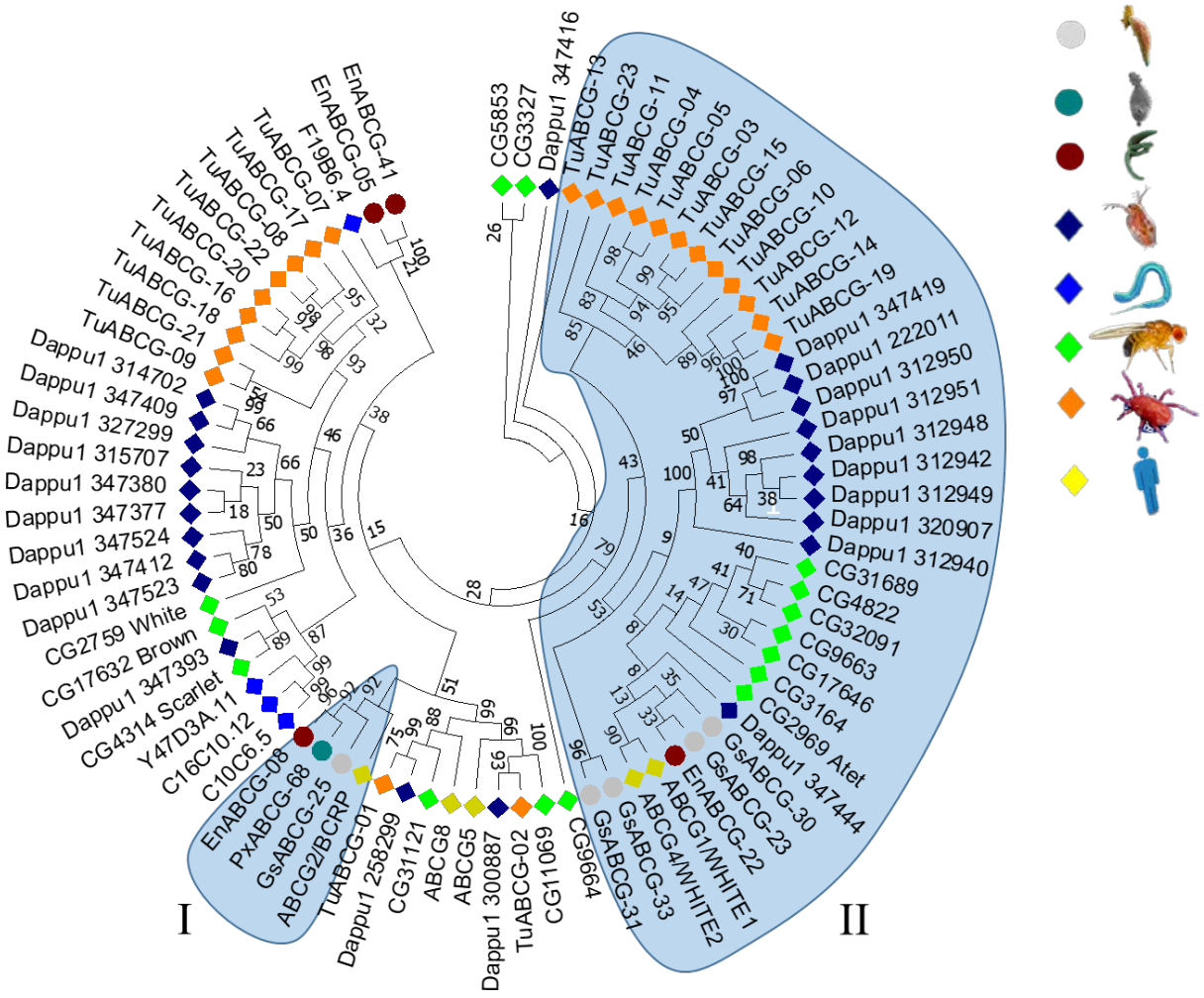

Figura 24. Análisis filogenético de los transportadores parciales ABCG de ocho especies de metazoarios. El árbol filogenético fue construido con el método de máxima verosimilitud en el programa RAxML con 1000 interacciones bootstrap. Se eligió el modelo de sustitución de aminoácido LG+G+I+F. Cada especie está representada por un color de la siguiente manera: gris, *G. salaris*; verde turquesa, *P. xenopodis*; guinda, *E. nipponicum*; azul, *C. elegans*; amarillo, *H. sapiens*; verde, *D. melanogaster*; azul oscuro, *D. pulex*; naranja, *T. urticae*. Los transportadores ABC de monogéneos relacionados con otros metazoarios están indicadas por el sombreado color celeste.

7. CONCLUSIONES

Los análisis filogenéticos de las subfamilias ABC revelaron pocos casos de ortología uno a uno. Los transportadores ABC son conservados en los genomas de los eucariotas y procariotas. A pesar de ello, las relaciones de ortología son menos frecuentes en comparación con otras familias de genes conservados (Sheps et al., 2004). Esta evolución atípica de los transportadores ABC se ha atribuido a la pérdida y nacimiento de genes, así como a la readquisición de funciones análogas en linajes distantemente relacionados, expandidos recientemente (Sheps et al., 2004; Zhao et al., 2007).

Se identificaron transportadores ABC de monogéneos que tuvieron relación filogenética con transportadores de humanos que desempeñan función de transporte de fármacos como lo son ABCB1, ABCC5 y ABCG2. Transportadores ABC de *N. melleni* y *G. salaris* (especies que causan problemas en peces de cultivo) estuvieron incluídos dentro de esta relación. Estudios acerca de la funcionalidad de estas proteínas pueden ser de interés para el entendimiento de la acción de antihelmínticos.

Los monogéneos mostraron una expansión de la subfamilia C, la cual también se ha observado en la araña roja *T. urticae*. Dermauw et al. (2013) sugirieron que esta expansión de genes le ha conferido a *T. urticae* mayor protección contra insecticidas, por lo cual estos genes han sido retenidos después de eventos de duplicación.

Varios grupos de genes ortólogos de copia única en varias subfamilias fueron detectados. Este fue el caso de varios grupos transportadores parciales pertenecientes a la subfamilia ABCB, relacionada con la regulación en la biosíntesis del grupo hemo, y ABCF, el cual está involucrado en la iniciación de la traducción, donde su funcionalidad en procesos metabólicos esenciales hacen inferir funciones similares en monogéneos.

Los monogéneos *G. salaris*, *P. xenopodis* y *E. nipponicum* presentaron un mayor número de integrantes ABC que los tremátodos, lo cual puede estar relacionado con sus características

biológicas (por ejemplo, tremátodos siendo endoparásitos y los monogéneos ectoparásitos). A pesar de que *P. xenopodis* es un endoparásito, este pudo haber retenido muchos de los transportadores.

8. RECOMENDACIONES

Es necesario resecuenciar el ADN de *S. longicornis* para obtener el número de lecturas necesarias que permitan mejorar el ensamble de esta especie.

Los transportadores ABC de la subfamilia B podrían estar relacionados a la detoxificación de antiparasitarios por lo que sería importante comprobar la funcionalidad aquí inferida, por ejemplo, estudios de edición genómica para el silenciamiento génico.

Además, realizar bioensayos utilizando inhibidores de estas subfamilias pueden darnos una señal de su uso, para el mejoramiento de fármacos.

9. REFERENCIAS

Abascal F., Zardoya R. y Posada D. 2005. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. Bioinformatics. 21(9):2104-2105.

Akiyama M., Sugiyama-Nakagiri Y., Sakai K., McMillan J.R., Goto M., Arita, K., Tsuji-Abe Y., Tabata N., Matsuoka K., Sasaki R., Sawamura D. y Shimizu H. 2005. Mutations in lipid transporter ABCA12 in harlequin ichthyosis and functional recovery by corrective gene transfer. The Journal of Clinical Investigation. 115(7): 1777-1784.

Akoll P., Fioravanti M. L., Konecny R. y Schiemer F. 2012. Infection dynamics of Cichlidogyrus tilapiae and C. sclerosus (Monogenea, Ancyrocephalinae) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) from Uganda. Journal of Helminthology. 86(3):302-310.

Aller S.G., Yu J., Ward A., Weng Y., Chittaboina S., Zhuo R., Harrell M., Trinh Y.T., Zhang Q., Urbatsch I.L. y Chang G. 2009. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. Science, 323(5922):1718-1722.

Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. y Lipman D.J. 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Andrews S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.

Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenco S.I., Pham S., Prjibelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A. y Pyshkin A.V. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. Journal of Computational Biology. 19(5):455-477.

Bao L., Wu J., Dodson M., Rojo de la Vega E.M., Ning Y., Zhang Z., Yao M., Zhang D.D., Xu C. y Yi, X. 2017. ABCF2, an Nrf2 target gene, contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. Molecular Carcinogenesis. 56(6):1543-1553.

Bass C. y Field L.M. 2011. Gene amplification and insecticide resistance. Pest Management Science. 67(8):886-890.

Boeger W. A. y Kritsky D. C. 2001. Phylogenetic relationships of the Monogenoidea. Systematics Association Special Volume. 60:92-102.

Bolger A.M., Lohse M. y Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics. 30(15):2114-2120.

Buchmann K., Roepstorff A. y Waller P.J. 1992. Experimental selection of mebendazole-resistant gill monogeneans from the European eel, *Anguilla anguilla L*. Journal of Fish Diseases. 15(5):393-408.

Calow P. (1983). Pattern and paradox in parasite reproduction. Parasitology. 86(4):197-207.

Cantatore D.M. y Timi J.T. 2010. *Acanthochondria helicoleni* sp. nov.(Copepoda, Chondracanthidae) parasitic on *Helicolenus lahillei* (Scorpaeniformes, Sebastidae) from Argentinean waters. Acta Parasitologica. 55(4):386-391.

Capella-Gutiérrez S., Silla-Martínez J.M. y Gabaldón T. 2009. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. Bioinformatics. 25(15):1972-1973.

Carmona-Antoñanzas G., Carmichael S.N., Heumann J., Taggart J.B., Gharbi K., Bron J.E., Bekaert M. y Sturm A. (2015). A survey of the ATP-binding cassette (ABC) gene superfamily in the salmon louse (Lepeophtheirus salmonis). PloS One. 10(9):e0137394.

Cavadini P., Biasiotto G., Poli M., Levi S., Verardi R., Zanella I., Derosas M., Ingrassia R., Corrado M. y Arosio, P. 2007. RNA silencing of the mitochondrial ABCB7 transporter in HeLa cells causes an iron-deficient phenotype with mitochondrial iron overload. Blood. 109(8):3552-3559.

Chen H., Rossier C., Lalioti M.D., Lynn A., Chakravarti A., Perrin G. y Antonarakis S.E. 1996. Cloning of the cDNA for a human homologue of the *Drosophila* white gene and mapping to chromosome 21q22. 3. American Journal of Human Genetics. 59(1):66.

Chen Z.Q., Dong J., Ishimura A., Daar I., Hinnebusch A.G. y Dean, M. 2006. The essential vertebrate ABCE1 protein interacts with eukaryotic initiation factors. Journal of Biological Chemistry. 281(11):7452-7457.

Chen Z.S., Guo Y., Belinsky M.G., Kotova E. y Kruh G.D. 2005. Transport of bile acids, sulfated steroids, estradiol 17-β-D-glucuronide, and leukotriene C4 by human multidrug resistance protein 8 (ABCC11). Molecular Pharmacology. 67(2):545-557.

Cioli D., Pica-Mattoccia L. y Archer S. 1995. Antischistosomal drugs: past, present... and future?. Pharmacology & Therapeutics. 68(1):35.

Coelho C.M., Kolevski B., Bunn C., Walker C., Dahanukar A. y Leevers S.J. 2005. Growth and cell survival are unevenly impaired in pixie mutant wing discs. Development. 132(24):5411-5424.

Coelho D., Kim J.C., Miousse I.R., Fung S., du Moulin M., Buers I., ... Suormala T., Burda P., Frapolli M., Stucki M., Nürnberg P., Thiele H., Robenek H., Höhne W., Longo N., Pasquali M., Mengel E., Watkins D., Shoubridge E.A., Majewski J., Rosenblatt D.S., Fowler B., Rutsch F. y Baumgartner M.R. 2012. Mutations in ABCD4 cause a new inborn error of vitamin B 12 metabolism. Nature Genetics. 44(10):1152.

Coles G.C. 2006. Drug resistance and drug tolerance in parasites. Trends Parasitol. 22:348.

Dassa E. y Bouige P. 2001. The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. Research in Microbiology. 152(3-4):211-229.

Davidson A. L., Dassa E., Orelle C. y Chen J. 2008. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 72(2):317-364.

De Castro E., Sigris C. J., Gattiker A., Bulliard V., Langendijk-Genevaux P.S., Gasteiger E., Bairoch A. y Hulo N. 2006. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. Nucleic Acids Research. 34(suppl_2):W362-W365.

Dean M., Hamon Y. y Chimini G. 2001a. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. Journal of Lipid Research. 42(7):1007-1017.

Dean M., Rzhetsky A. y Allikmet R. 2001b. The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. Genome Research. 11:156-166.

Dermauw W., Osborne E.J., Clark R.M., Grbić M., Tirry L. y Van Leeuwen T. 2013. A burst of ABC genes in the genome of the polyphagous spider mite *Tetranychus urticae*. BMC Genomics. 14(1):317.

Dermauw W. y Van Leeuwen T. 2014. The ABC gene family in arthropods: comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 45:89-110.

Dinh H.T. y Hutson K.S. 2014. Reproductive strategies of the insidious fish ectoparasite, *Neobenedenia* sp. (Capsalidae: Monogenea). PLoS ONE 9(9):e108801

Douëllou L. (1993). Monogeneans of the genus *Cichlidogyrus* Paperna, 1960 (Dactylogyridae: Ancyrocephalinae) from cichlid fishes of Lake Kariba (Zimbabwe) with descriptions of five new species. Systematic Parasitology. 25:159–186.

Edgar R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research. 32(5):1792-1797.

Elliott A.M. y Al-Hajj M.A. 2009. ABCB8 mediates doxorubicin resistance in melanoma cells by protecting the mitochondrial genome. Molecular Cancer Research. 7(1):79-87.

Fallon P.G., Tao L.F., Ismail M.M. y Bennett J.L. 1996. *Schistosome* resistance to praziquantel: fact or artifact?. Parasitology Today. 12(8):316-320.

Fannes W., Vanhove M. P. y Huyse T. 2017. Redescription of Cichlidogyrus tiberianus Paperna, 1960 and *C. dossoui* Douëllou, 1993 (Monogenea: Ancyrocephalidae), with special reference to the male copulatory organ. Systematic Parasitology. 94(1):133-144.

Finn, R.D., Coggill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Mistry, J., Mitchell, A.L., Potter, S.C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., Salazar, G.A., Tate, J., Bateman, A. 2016. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. Nucleic Acids Res. 44(D1), D279-D285.

Frank N.Y., Margaryan A., Huang Y., Schatton T., Waaga-Gasser A.M., Gasser M., Sayegh M.H, Sadee W. y Frank M.H. 2005. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. Cancer Research. 65(10):4320-4333.

Furlong S.T. 1991. Unique roles for lipids in Schistosoma mansoni. Parasitology Today. 7(2):59-62.

Fu Y., Hsiao J.H.T., Paxinos G., Halliday G.M. Kim W.S. 2015. ABCA5 regulates amyloid-β peptide production and is associated with Alzheimer's disease neuropathology. Journal of Alzheimer's Disease. 43(3):857-869.

Fukuda Y., Cheong P.L., Lynch J., Brighton C., Frase S., Kargas V., Rampersaud E., Wang Y., Sankaran V.G., Yu B., Ney P.A., Weiss M.J., Vogel P., Bond P.J., Ford R.C., Trent R.J., Schuetz J.D. 2016. The severity of hereditary porphyria is modulated by the porphyrin exporter y Lan antigen ABCB6. Nat Commun 7:12353.

Gellatly K.J., Yoon K.S., Doherty J.J., Sun W., Pittendrigh B.R. y Clark J.M. 2015. RNAi validation of resistance genes and their interactions in the highly DDT-resistant 91-R strain of Drosophila melanogaster. Pesticide Biochemistry and Physiology. 121:107-115.

Glavinas H., Krajcsi P., Cserepes J. y Sarkadi B. 2004. The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. Current Drug Delivery. 1(1):27-42.

González-Cabo P., Bolinches-Amorós A., Cabello J., Ros S., Moreno S. y Baylis H., 2011. Disruption of the ATP-binding cassette B7 (ABTM-1/ABCB7) induces oxidative stress and premature cell death in Caenorhabditis elegans. The Journal of biological chemistry. 286:21304–14.

Goosen N. y Moolenaar G. F. 2001. Role of ATP hydrolysis by UvrA and UvrB during nucleotide excision repair. Research in Microbiology. 152(3-4):401-409.

Gu Z., Steinmetz L.M., Gu X., Scharfe C., Davis R.W. y Li, W.H. 2003. Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. Nature. 421(6918):63.

Greenberg R.M. 2013. ABC multidrug transporters in schistosomes and other parasitic flatworms. Parasitology international. 62(6):647-653.

Greenberg R.M. 2014. Schistosome ABC multidrug transporters: From pharmacology to physiology. International Journal for Parasitology. Drugs and Drug Resistance. 4(3):301-309.

Hahn C., Fromm B. y Bachmann L. 2014. Comparative genomics of flatworms (Platyhelminthes) reveals shared genomic features of ecto-and endoparastic Neodermata. Genome Biology and Evolution. 6(5):1105-1117.

Hayward C. 2005. Helminth parasites III: Monogenea Polyopisthocotylea (ectoparasitic flukes). En: Rohde K. (Ed.). Marine Parasitology. Csiro Publishing, Oxford, Collingwood, Australia, 55-63.

Higgins CF. 2007. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. Nature. 446:749–57.

Hirazawa N., Ishizuka R. y Hagiwara H. 2016. The effects of *Neobenedenia girellae* (Monogenea) infections on host amberjack *Seriola durmerili* (Carangidae): Hematological and histopathological analyses. Aquaculture. 461:32-39.

Hirose T. y Horvitz H.R. 2014. The translational regulators GCN-1 and ABCF-3 act together to promote apoptosis in *C. elegans*. PLoS Genetics. 10(8):e1004512.

Holt C. y Yandell M. 2011. MAKER2: an annotation pipeline and genome database management tool for second-generation genome projects. BMC Bioinformatics. 12:491.

Howe K.L., Bolt B.J., Shafie M., Kersey P. y Berriman M. 2017. WormBase ParaSite− a comprehensive resource for helminth genomics. Molecular and Biochemical Parasitology. 215:2-10.

Hurvich C.M. y Tsai C.L. 1989. Regression and time series model selection in small samples. Biometrika. 76(2):297-307.

Igeh P.C., Dos Santos Q.M. y Avenant-Oldewage A. 2017. Redescription of Cichlidogyrus philander (Monogenea, Ancyrocephalidae) using scanning electron microscopy (SEM) and molecular analysis. Parasite. 24.

Iritani S., Torii Y., Habuchi C., Sekiguchi H., Fujishiro H., Yoshida M., Go Y., Irikif A., Isoda M. & Ozaki N. 2018. The neuropathological investigation of the brain in a monkey model of autism spectrum disorder with ABCA13 deletion. International Journal of Developmental Neuroscience. 71:130-139.

James C. E., Hudson A. L. y Davey M. W. 2009. Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest?. Trends in Parasitology. 25(7):328-335.

Jansen R.S., Mahakena S., de Haas M., Borst P. y van de Wetering K. 2015. ATP-binding cassette subfamily C member 5 (ABCC5) functions as an efflux transporter of glutamate conjugates and analogs. Journal of Biological Chemistry. 290(51):30429-30440.

Jeong C.B., Kim B.M., Lee J.S. y Rhee J.S. 2014. Genome-wide identification of whole ATP-binding cassette (ABC) transporters in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*. BMC Genomics. 15(1):651.

Jeong C.B., Kim B.M., Kang H.M., Choi I.Y., Rhee J.S. y Lee J.S. 2015. Marine medaka ATP-binding cassette (ABC) superfamily and new insight into teleost Abch nomenclature. Scientific Reports. 5:15409.

Jeong C.B., Kim H.S., Kang H.M. y Lee J.S. 2017. ATP-binding cassette (ABC) proteins in aquatic invertebrates: evolutionary significance and application in marine ecotoxicology. Aquatic Toxicology. 185:29-39.

Kasinathan RS y Greenberg RM. 2012. Pharmacology and potential physiological significance of schistosome multidrug resistance transporters. Experimental Parasitology. 132:2-6.

Kasinathan R.S., Sharma L.K., Cunningham C., Webb T.R. y Greenberg R. M. 2014. Inhibition or knockdown of ABC transporters enhances susceptibility of adult and juvenile schistosomes to praziquantel. PLoS Neglected Tropical Diseases. 8(10):e3265.

Klucken J., Büchler C., Orsó E., Kaminski W.E., Porsch-Özcürümez M., Liebisch G., Kapinsky M., Diederich W., Drobnik W., Dean M., Allikmets R. y Schmitz G. 2000. ABCG1 (ABC8), the human homolog of the Drosophila white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. Proceedings of the National Academy of Sciences. 97(2):817-822.

Kriventseva E.V., Kuznetsov D., Tegenfeldt F., Manni M., Dias R., Simão F.A. y Zdobnov E.M. 2018. OrthoDB v10: sampling the diversity of animal, plant, fungal, protist, bacterial and viral genomes for evolutionary and functional annotations of orthologs. Nucleic acids research. 47(D1):D807-D811.

Korf I. 2004. Gene finding in novel genomes. BMC Bioinformatics. 5:59.

Kumar V., Kumar T.S. y Kartha C.C. 2019. Mitochondrial membrane transporters and metabolic switch in heart failure. Heart Failure Reviews. 24(2):255-267.

Laing R., Kikuchi T., Martinelli A., Tsai I. J., Beech R.N., Redman E., Holroyd N., Bartley D. J., Beasley H., Britton C., Curran D., Devaney E., Gilabert A., Hunt M., Jackson F., Johnston S.L., Kryukov I., Li K., Morrison A.A., Reid A. J., Sargison N., Saunders G.I., Wasmuth J.D., Wolstenholme A., Berriman, M., Gilleard J.S. y Cotton J.A. 2013. The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. Genome Biology. 14:R88

Laumer C.E., Hejnol A. Giribet G. 2015. Nuclear genomic signals of the 'microturbellarian'roots of platyhelminth evolutionary innovation. Elife. 4:e05503.

Leprohon P., Légaré D. y Ouellette M. 2011. ABC transporters involved in drug resistance in human parasites. Essays in Biochemistry. 50:121-144.

Li D., Luo R., Liu C.M., Leung C.M., Ting H.F., Sadakane, K., Yamashita H. y Lam T.W. 2016. MEGAHIT v1. 0: a fast and scalable metagenome assembler driven by advanced methodologies and community practices. Methods. 102:3-11.

Liu S., Li Q. y Liu Z. 2013. Genome-wide identification, characterization and phylogenetic analysis of 50 catfish ATP-binding cassette (ABC) transporter genes. PLoS ONE. 8:e63895.

Lomsadze A., Ter-Hovhannisyan V., Chernoff Y.O. y Borodovsky M. 2005. Gene identification in novel eukaryotic genomes by self-training algorithm. Nucleic Acids Res. 33:6494–6506.

Lu H., Xu Y. y Cui F. 2016. Phylogenetic analysis of the ATP-binding cassette transporter family in three mosquito species. Pesticide Biochemistry and Physiology. 132:118-124.

Madanire-Moyo G.N., Matla M.M., Olivier P.A.S. y Luus-Powell W.J. 2011. Population dynamics and spatial distribution of monogeneans on the gills of *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) from two lakes of the Limpopo River System, South Africa. Journal of Helminthology. 85(2):146-152.

Matoušková P., Vokřál I., Lamka J. y Skálová L. 2016. The role of xenobiotic-metabolizing enzymes in anthelmintic deactivation and resistance in helminths. Trends in Parasitology. 32(6): 481-491.

McKellar Q.A. y Jackson F. 2004. Veterinary anthelmintics: old and new. TRENDS in Parasitology. 20(10):456-461.

Mendoza-Garfias B., García-Prieto L. y Pérez-Ponce de León G. 2017. Checklist of the Monogenea (Platyhelminthes) parasitic in Mexican aquatic vertebrates. Zoosystema. 39(4):501-598.

Morales-Serna F.N., Chapa-López M., Martínez-Brown J.M., Ibarra-Castro L., Medina-Guerrero R.M. y Fajer-Ávila E.J. 2018a. Efficacy of praziquantel and a combination anthelmintic (Adecto®) in bath treatments against *Tagia ecuadori* and *Neobenedenia melleni* (Monogenea), parasites of bullseye puffer fish. Aquaculture. 492:361-368.

Morales-Serna F.N., Medina-Guerrero R.M., Pimentel-Acosta C., Ramírez-Tirado J.H. y Fajer-Ávila E.J. 2018b. Parasite infections in farmed Nile tilapia *Oreochromis niloticus* in Sinaloa, Mexico. Comparative Parasitology. 85:212-216.

Mordvinov V.A., Ershov N. I., Pirozhkova D.S., Pakharukov Y.V. y Pakharukova M.Y. 2017. ABC transporters in the liver fluke *Opisthorchis felineus*. Molecular and Biochemical Parasitology. 216:60-68.

Navarro-Quiles C., Mateo-Bonmatí E. y Micol J.L. 2018. ABCE proteins: from molecules to development. Frontiers in Plant Science. 9:1125.

Nei M., Rogozin I.B. y Piontkivska H. 2000. Purifying selection and birth-and-death evolution in the ubiquitin gene family. Proceedings of the National Academy of Sciences. 97(20):10866-10871.

Nicolao M.C., Denegri G.M., Cárcamo J.G. y Cumino A.C. 2014. P-glycoprotein expression and pharmacological modulation in larval stages of *Echinococcus granulosus*. Parasitology International. 63(1):1-8.

Ofori P.A., Mizuno A., Suzuki M., et al. 2018. Genome-wide analysis of ATP binding cassette (ABC) transporters in tomato. PLoS One, 13(7):e0200854.

Ogawa K. 2015. Diseases of cultured marine fishes caused by Platyhelminthes (Monogenea, Digenea, Cestoda). Parasitology. 142(1):178-195.

OIE (World Organisation for Animal Health). (2012). Aquatic Animal Health Code, Infection with *Gyrodactylus salaris*. Disponible en http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/2.3.03_GYRO.pdf. Accessed Feb 28 2016.

Oldfield S., Lowry C.A., Ruddick J. y Lightman S.L. 2002. ABCG4: a novel human white family ABC-transporter expressed in the brain and eye. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. 1591(1-3):175-179.

Omrani B.S. 2014. Tri-hooked monogenean parasite (Heteronchocleidus buschkieli; Ancyrocephalidae: Heteronchocleidinae) isolated from ornamental fish (Colisa lalia) imported into Iran. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 20(4):541-544.

Pahor-Filho E., Klosterhoff M.C., Marchiori N.C. y Júnior J.P. 2017. Moderate pathogenic effect of *Ligophorus uruguayense* (Monogenoidea, Ancyrocephalidae) in juvenile mullet *Mugil liza* (Actinopterygii, Mugilidae) from Brazil. Anais da Academia Brasileira de Ciencias. 89: 2997-3003.

Paredes-Trujillo A., Velázquez-Abunader I., Torres-Irineo E., Romero D. y Vidal-Martínez V.M. 2016. Geographical distribution of protozoan and metazoan parasites of farmed Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) (Perciformes: Cichlidae) in Yucatán, México. Parasites & Vectors. 9(1):66.

Pariselle, A. y Euzet, L. 1995. Scutogyrus gen. n. (Monogenea, Ancyrocephalidae) for *Cichlidogyrus longicornis minus* Dossou, 1982, *C. l. longicornis*, and C. *l. gravivaginus* Paperna and Thurston, 1969, with Description of Three New Species Parasitic on African Cichlids. Journal-Helminthological Society Washington. 62:157-173.

Pariselle A. y Euzet L. 2009. Systematic revision of dactylogyridean parasites (Monogenea) from cichlid fishes in Africa, the Levant and Madagascar. Zoosystema. 31(4):849-898.

Pariselle A., Nyom A.R.B. y Bilong C.F. 2013. Checklist of the ancyrocephalids (Monogenea) parasitizing Tilapia species in Cameroon, with the description of three new species. Zootaxa. 3599(1):78-86.

Parra G., Bradnam, K. y Korf I. 2007. CEGMA: a pipeline to accurately annotate core genes in eukaryotic genomes. Bioinformatics. 23(9):1061-1067.

Paytubi S., Wang X., Lam Y.W., Izquierdo L., Hunter M.J., Jan E., Hundal H.S. y Proud, C.G. 2009. ABC50 promotes translation initiation in mammalian cells. Journal of Biological Chemistry 284(36):24061-24073.

Piehler A., Kaminski W.E., Wenzel J.J., Langmann T. y Schmitz G. 2002. Molecular structure of a novel cholesterol-responsive A subclass ABC transporter, ABCA9. Biochemical and Biophysical Research Communications. 295(2):408-416.

Pondarré C., Antiochos B.B., Campagna D.R., Clarke S. L., Greer E.L., Deck K.M., McDonald A., Han A-P., Medlock A., Kutok J.L., Anderson S.A., S. Eisenstein R.S. y Fleming M.D. 2006. The mitochondrial ATP-binding cassette transporter Abcb7 is essential in mice and

participates in cytosolic iron–sulfur cluster biogenesis. Human Molecular Genetics. 15(6):953-964.

Posada D. y Buckley, T.R. 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. Systematic Biology. 53(5):793-808.

Potter S.C., Luciani A., Eddy S.R., Park Y., Lopez R. y Finn R. D. 2018. HMMER web server: 2018 update. Nucleic Acids Research. 46(W1):W200-W204.

Praest P., Luteijn R.D., Brak-Boer I.G. J., Lanfermeijer J., Hoelen H., Ijgosse L., Costa A.I., GorhamJr. R.D., Lebbink R.J. y Wiertz E.J.H.J. 2018. The influence of TAP1 and TAP2 gene polymorphisms on TAP function and its inhibition by viral immune evasion proteins. Molecular Immunology. 101:55-64.

Reed P., Francis-Floyd R., Klinger R. y Petty D. 2009. Monogenean parasites of fish. Fisheries and Aquatic Sciences. University of Florida UF, IFAS Extension. FA28, USA. 4:1-4.

Sandoval-Gío J.J., Rodríguez-Canul R. y Vidal-Martínez V.M. 2008. Humoral antibody response of the tilapia *Oreochromis niloticus* against *Cichlidogyrus* spp. (Monogenea). Journal of Parasitology. 94: 404-409.

Sarkadi B., Homolya L., Szakács G. y Váradi A. 2006. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. Physiological Reviews. 86(4):1179-1236.

Schelkle B., Shinn A.P., Peeler E. y Cable J. 2009. Treatment of gyrodactylid infections in fish. Diseases of Aquatic Organisms. 86:65-75.

Sheps J.A., Ralph S., Zhao Z., Baillie D.L. y Ling, V. 2004. The ABC transporter gene family of *Caenorhabditis elegans* has implications for the evolutionary dynamics of multidrug resistance in eukaryotes. Genome Biology. 5(3):R15.

Sharom F.J. 2008. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. Pharmacogenomics. 9(1):105-127.

Simão F.A., Waterhouse R.M., Ioannidis P., Kriventseva E.V. y Zdobnov, E.M. 2015. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. Bioinformatics. 31(19):3210-3212.

Smit A.F.A. y Hubley R. 2015. RepeatModeler Open-1.0. 2008–2015. Seattle, USA: Institute for Systems Biology. Disponible en http://www.repeatmasker. Último acceso Mayo de 2018.

Sooksa-nguan T., Yakubov B., Kozlovskyy V.I., Barkume C.M., Howe K.J., Thannhauser T.W., Rutzke M.A., Hart J.J., Kochian L.V., Rea P.A. y Vatamaniuk O.K. 2009. *Drosophila* ABC Transporter, DmHMT-1, Confers Tolerance to Cadmium DmHMT-1 AND ITS YEAST HOMOLOG, SpHMT-1, are not essential for vacuolar phytochelatin sequestration. Journal of Biological Chemistry. 284(1):354-362.

Stamatakis A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics. 30(9):1312-1313.

Stanke M, Waack S. 2003. Gene prediction with a hidden Markov model and a new intron submodel. Bioinformatics 19(Suppl. 2):ii215–ii225.

Sturm A., Cunningham P. y Dean M. 2009. The ABC transporter gene family of *Daphnia pulex*. BMC Genomics. 10(1):170.

Sugiura N. 1978. Further analysts of the data by akaike's information criterion and the finite corrections: Further analysts of the data by akaike's. Communications in Statistics-Theory and Methods. 7(1):13-26.

Sun H., Buchon N. y Scott J.G. 2017. Mdr65 decreases toxicity of multiple insecticides in Drosophila melanogaster. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 89:11-16.

Szakács G., Paterson J. K., Ludwig J.A., Booth-Genthe C. y Gottesman M.M. 2006. Targeting multidrug resistance in cancer. Nature Reviews Drug Discovery. 5(3):219.

Tammur J., Prades C., Arnould I., Rzhetsky A., Hutchinson A., Adachi M., Schuetz J.D., Swoboda K.J., Ptácek L.J., Rosier M., Dean, M. y Allikmets R. 2001. Two new genes from the human ATP-binding cassette transporter superfamily, ABCC11 and ABCC12, tandemly duplicated on chromosome 16q12. Gene. 273(1):89-96.

Tatusov R.L., Fedorova N.D., Jackson J.D., Jacobs A.R., Kiryutin B., Koonin E.V., Krylov D.M., Mazumder R., Mekhedov S.L., Nikolskaya A.N., Rao B.S., Smirnov S., Sverdlov A.V., Vasudevan S., Wolf Y.I, Yin J.J. y Natale D.A. 2003. The COG database: an updated version includes eukaryotes. BMC Bioinformatics. 4(1):41.

Tian Y., Han X. y Tian D.L. 2012. The biological regulation of ABCE1. IUBMB life. 64(10):795-800.

Trouvé S., Sasal P., Jourdane J., Renaud F. y Morand S. 1998. The evolution of life-history traits in parasitic and free-living platyhelminthes: a new perspective. Oecologia. 115(3):370-378.

Trigueros-Motos L., van Capelleveen J.C., Torta F., Castaño D., Zhang L.H., Chai E.C., Kang M., Dimova L.G., Schimmel A.W.M., Tietjen I., Radomski C., Tan L.J., Thiam C.H., Narayanaswamy P., Wu D.H., Dorninger F., Yakala G.K., Barhdadi A., Angeli V., Dubé M.-P., Berger J., Dallinga-Thie G.M., Tietge U.J.F., Wenk M.R., Hayden M.R., Hovingh G.K. y Singaraja R.R. 2017. ABCA8 regulates cholesterol efflux and high-density lipoprotein cholesterol levels. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 37(11):2147-2155.

Valenzuela-Muñoz V., Sturm A. y Gallardo-Escárate C. 2015. Transcriptomic insights on the ABC transporter gene family in the salmon louse Caligus rogercresseyi. Parasites & Vectors. 8(1):209.

Van der Kleij D., Latz E., Brouwers J.F., Kruize Y. C., Schmitz M., Kurt-Jones E.A. y Tielens A.G. 2002. A novel host-parasite lipid cross-talk schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. Journal of Biological Chemistry. 277(50):48122-48129.

Van Leeuwen T., Vontas J., Tsagkarakou A., Dermauw W. y Tirry L. 2010. Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: a review. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 40(8):563-572.

Vasiliou V., Vasiliou K. y Nebert D.W. 2009. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. Human Genomics. 3(3):281.

Wanders R.J., Visser W.F., van Roermund C.W., Kemp S. y Waterham H.R. 2007. The peroxisomal ABC transporter family. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology. 453(5):719-734.

Wang X., Chen W., Huang Y., Sun J., Men J., Liu H., Luo F., Guo L., Lv X., Deng C., Zhou C., Fan Y., Li X., Huang L., Hu Y., Liang C., Hu X., Xu J. y Yu X. 2011. The draft genome of the carcinogenic human liver fluke Clonorchis sinensis. Genome biology. 12(10):R107.

Wang D., Korhonen P.K., Gasser R.B. y Young N.D. 2018. Improved genomic resources and new bioinformatic workflow for the carcinogenic parasite *Clonorchis sinensis*: biotechnological implications. Biotechnology advances. 36(4):894-904.

Wenzel J.J., Kaminski W.E., Piehler A., Heimerl S., Langmann, T. y Schmitz G. 2003. ABCA10, a novel cholesterol-regulated ABCA6-like ABC transporter. Biochemical and Biophysical Research Communications 306(4):1089-1098.

Wenzel J.J, Piehler A, Kaminski W.E. 2007. ABC A-subclass proteins: Gatekeepers of cellular phospho- and sphingolipid transport. Frontiers in Bioscience. 12:3177-3193.

Whittington I.D. 1998. Diversity “down under”: monogeneans in the Antipodes (Australia) with a prediction of monogenean biodiversity worldwide. International Journal for Parasitology. 28(10):1481-1493.

Whittington I.D. 2005. Helminth parasites III: Monogenea Monopisthocotylea (ectoparasitic flukes). En: Rohde K. (Ed.). Marine Parasitology. Csiro Publishing, Oxford, Collingwood, Australia, 63-72.

Whittington I.D. y Chisholm L.A. 2008. Diseases caused by Monogenea. In: Eiras J.C., Senger H., Wahlii T. y Kapoor B.G. (Editors). Fish Diseases. Science Publishers, Inc, New Hampshire, USA. Pp 683-816.

Wilkens S. 2015. Structure and mechanism of ABC transporters. F1000prime reports. 7.

Wolstenholme A.J., Fairweather I., Prichard R., von Samson-Himmelstjerna G. y Sangster N.C. 2004. Drug resistance in veterinary helminths. Trends in Parasitology. 20(10):469-476.

Wong K., Ma J., Rothnie A., Biggin P.C. y Kerr I.D. 2014. Towards understanding promiscuity in multidrug efflux pumps. Trends in Biochemical Sciences. 39(1):8-16.

Woodward O.M., Köttgen A. y Köttgen M. 2011. ABCG transporters and disease. The FEBS Journal. 278(18):3215-3225.

WoRMS Editorial Board. 2018. World Register of Marine Species. Disponible en http://www.marinespecies.org at VLIZ. Accessed 2018-07-15.

Young L., Leonhard K., Tatsuta T., Trowsdale J. y Langer T. 2001. Role of the ABC *transporter* Mdl1 in peptide export from mitochondria. Science. 291(5511):2135-2138.

Young N.D., Jex A.R., Li B., Liu S., Yang L., Xiong Z., Li Y., Cantacessi C., Hall R.S., Xu X., Chen F., Wu X., Zerlotini A., Oliveira G., Hofmann A., Zhang G., Fang X., Kang Y., Campbell B.E., Loukas A., Ranganathan S., Rollinson D., Rinaldi G., Brindley P.J., Yang H., Wang J., Wang J. y Gasser R.B. Whole-genome sequence of *Schistosoma haematobium*. Nature genetics. 44(2):221.

Zhang J., Zhang Y.P. y Rosenberg H.F. 2002. Adaptive evolution of a duplicated pancreatic ribonuclease gene in a leaf-eating monkey. Nature Genetics. 30(4):411.

Zhang J.Z. 2003. Evolution by gene duplication: an update. Trends Ecol. Evol. 18:292-298.

Zhao Z., Fang L.L., Johnsen R. y Baillie D.L. 2004. ATP-binding cassette protein E is involved in gene transcription. Biochemical and Biophysical Research Communications. 323:104-111.

Zheng H, Zhang W, Zhang L, Zhang Z, Li J, Lu G, Zhu Y, Wang Y, Huang Y, Liu J, Kang H, Chen J, Wang L, Chen A, Yu S, Gao Z, Jin L, Gu W, Wang Z, Zhao L, Shi B, Wen H, Lin R, Jones MK, Brejova B, Vinar T, Zhao G, McManus DP, Chen Z, Zhou Y y Wang S. 2013. The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. Nature Genetics. 45:1168–1175.

Zhou, J., Lin, Y., Shi, H., Huo, K., & Li, Y. 2013. hABCF3, a TPD52L2 interacting partner, enhances the proliferation of human liver cancer cell lines in vitro. Molecular Biology Reports, 40(10):5759-5767.