

# ARTÍCULOS DE REVISIÓN

## Acercamiento a los estudios actuales sobre el filo *Tardigrada* y su importancia en la medicina

ELIANA BELTRÁN-PARDO<sup>1</sup>  
JAIME BERNAL-VILLEGAS<sup>2</sup>

### Resumen

La siguiente revisión permite obtener una visión global de los diferentes estudios que se han llevado a cabo en la actualidad respecto a los tardígrados, principalmente a nivel molecular y genético. Los documentos consultados permiten un acercamiento a la anatomía del Tardígrado y al proceso de criptobiosis, así como a la taxonomía tradicional. Posteriormente, se abordan la genética y la biología molecular del Tardígrado, y se recopilan algunos de los resultados obtenidos respecto a su genoma, teniendo en cuenta genes o fragmentos secuenciados reportados en GenBank y estudios cromosómicos, con referencia a los métodos de extracción de ADN, taxonomía molecular, construcción de bibliotecas de ADNc y evolución-filogenia.

**Palabras clave:** tardígrados, criptobiosis, taxonomía molecular, filogenia.

### Title

Current studies on phylum *Tardigrada* and its importance in medicine

### Abstract

The following review allows a general vision of different studies that have been performed on Tardigrades, mainly those related to molecular biology and genetics. In general, this document shows some aspects on Tardigrade's anatomy, cryptobiosis processes and the methodology of traditional taxonomy. Then we follow with some of the findings reported on the genetics and molecular biology of Tardigrades, taking into account sequenced genes or fragments reported in GenBank and chromosomal studies, likewise, with reference to DNA extraction methods, molecular taxonomy, cDNA library construction and phylogeny-evolution.

**Key words:** Tardigrades, cryptobiosis, molecular taxonomy, phylogeny.

---

1 Microbióloga industrial, estudiante de doctorado, Instituto de Genética Humana, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.

2 M.D., Ph.D., director, Instituto de Genética Humana, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

## Introducción

Los tardígrados, u “osos de agua”, son micrometazoarios hidrófilos. La longitud de su cuerpo varía entre 50  $\mu\text{m}$  (en ejemplares juveniles) a 1.200  $\mu\text{m}$  (en adultos), excluyendo el último par de patas. Estos organismos están ampliamente distribuidos y muchas especies son cosmopolitas. Sus hábitats son principalmente semiacuáticos, como las películas de agua en musgos, líquenes, plantas hepáticas y ciertas angiospermas. Otros viven en el mar profundo o en las orillas, sobre algas, así como en agua dulce[1]. Las especies marinas son más variables en sus formas corporales y en su apariencia, y generalmente, exhiben baja densidad de población con alta diversidad de especies. Poseen dos formas de reproducción: sexual y por partenogénesis[2]. Son ovíparos y, generalmente, se alimentan de fluidos dentro de células animales o vegetales, perforando las paredes celulares con un par de estiletes orales[1].

Las dos características que les han dado importancia a estos animales para su estudio, son su capacidad de sobrevivir a ambientes extremos y su posición filogenética dentro de la evolución. En cuanto a la primera, cuando los tardígrados están rodeados por una película de agua permanecen activos, pero, si las condiciones ambientales cambian de manera desfavorable, pueden entrar en un estado latente co-

nocido como criptobiosis, del cual existen varios tipos: anhidrobiosis (desecación), criobiosis (bajas temperaturas), anoxibiosis (falta de oxígeno) u osmобiosis (cambios en la salinidad)[2, 3].

Hasta hace muy poco eran considerados como uno de los grupos de protostomos menos conocidos[2]. Sin embargo, en los últimos años el interés en estos organismos y sus capacidades excepcionales ha crecido en gran medida. En especial, se han realizado investigaciones con respecto a la identificación de nuevas especies, distribución[4-7], relaciones filogenéticas [8-23] y, efectos fenotípicos y bioquímicos involucrados en la criptobiosis[3,24-32]. A nivel molecular, más allá de los estudios filogenéticos se conoce muy poco[33]; sólo recientemente los tardígrados están siendo objeto de investigación en estudios moleculares[34].

El propósito de esta revisión es presentar una visión global de los diversos estudios que se han llevado a cabo respecto a estos animales, con miras a ilustrar el gran potencial que encierra su estudio en el contexto de la genómica.

## Aspectos generales

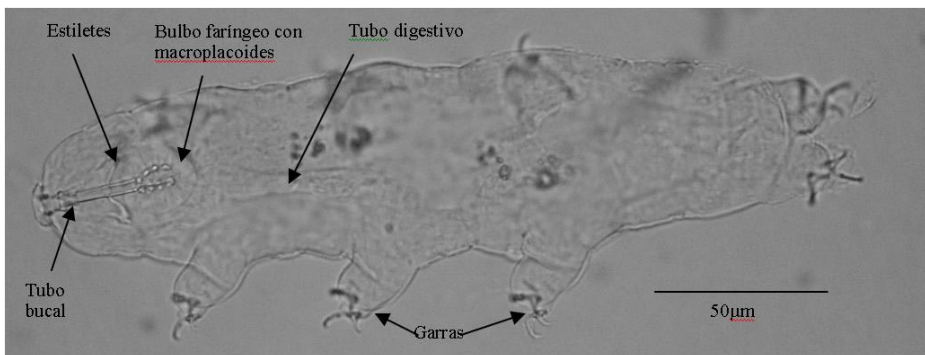
Los tardígrados poseen una anatomía muy interesante. Su longitud corporal es frecuentemente de menos de

un milímetro y se encuentran divididos en cinco segmentos con cuatro pares de patas, cada una de las cuales termina usualmente en garras, discos de succión o en ambas formas[15]. Su cuerpo presenta simetría bilateral. Tienen un sistema digestivo completo y la cavidad corporal está llena de un fluido tipo hemocele que cumple funciones en la circulación y la respiración. El sistema nervioso consiste en un cerebro dorsal lobulado y un cordón nervioso ventral (2,35). La mayoría son transparentes; sin embargo, se han observado algunos rojos, otros café, amarillos, blancos, verdes o naranja, color producto de los elementos de su dieta.

Uno de los aspectos más llamativos de los tardígrados es que comparten varias características morfológicas con tres grupos filogenéticos diferentes conocidos como artrópodos, nemátodos y Onychophorans (tabla 1).

Esto ha dificultado en gran medida la clasificación filogenética de los tardígrados pero, a su vez, los ha hecho más importantes en cuanto a los estudios evolutivos.

Por otro lado, aunque los tardígrados son organismos multicelulares, poseen un limitado número de células, el cual es casi constante en cada especie, aun si la mitosis ocurre en los tejidos somáticos del adulto[36]. Es decir, durante su crecimiento somático mantienen el número de células en la mayoría de los tejidos. Los tardígrados consumen energía incrementando el tamaño de su cuerpo, principalmente con el incremento del tamaño de las células (no del número) y produciendo nuevas estructuras cuticulares (cutícula, garras, tubo bucal y placoides) durante cada muda[37]. Se considera que el número de células se encuentra alrededor de 40.000 [38].



**Figura 1.** Se muestran algunas partes de un eutardígrado. A) Estiletos. B) Bulbo faríngeo con macroplocoides. C) Garras. D) Tubo digestivo. Barra de 50 µm. Microscopio de luz compuesto, 400X.

**Tabla 1**  
**Caracteres morfológicos que comparten los tardígrados con *Arthropoda*,  
*Nematoda* y *Onychophora***

<b>Tardígrados con</b>	
<i>Arthropoda</i> y <i>Onychophora</i>	<i>Nematoda</i>
Locomoción por medio de piernas	Cavidad del cuerpo <i>Pseudoceloma</i>
Presencia de ojos	Esqueleto hidrostático
Reproducción: ovíparos y monosexuales ( <i>Dioceus</i> )	Tubo digestivo completo
Ecología: terrestre y acuática	Ausencia de sistema circulatorio
	Reproducción: monosexuales ( <i>Dioeciis</i> )
	Ecología: terrestre o acuático

### Criptobiosis

Este proceso se caracteriza por ser un estado latente donde el metabolismo, la reproducción y la senescencia se reducen o cesan temporalmente[2], que permite una increíble tolerancia a una variedad de extremos ambientales tales como sequía, temperaturas de -273°C a 151°C, vacío, altas presiones alrededor de 600 MPa en perfluorocarbono[39], radiación[32,40-42] y químicos, que incluyen alcoholes y metilbromuro.

Con respecto a los procesos de osmobiosis y anoxibiosis, éstos no se han estudiado tan profundamente como la anhidrobiosis. El primero corresponde a un estado criptobiótico inducido por bajas tensiones de oxígeno en el agua. El tardígrado queda inmóvil, transparente, rígido y extendido debido a la absorción de agua resultante de la pérdida de control osmótico. No obstante, el organismo

puede recuperarse si el tiempo en anoxibiosis no excede de unas pocas horas a 3 a 5 días (con algunas excepciones). La osmobiosis ocurre cuando las presiones osmóticas son elevadas y existe un detrimento de la actividad del agua en la superficie del animal. Los tardígrados colocados en solución salina forman toneles contraídos y algunos se vuelven turgentes. La actividad se recupera al volver a las concentraciones osmóticas normales[2, 35].

Cuando se presentan procesos de criobiosis (respuesta a bajas temperaturas) o anhidrobiosis (deshidratación), la respuesta de los tardígrados es muy parecida fisiológicamente. A medida que el ambiente va cambiando, el animal contrae y retrae la cabeza y las patas, tomando la forma de barril o el estado conocido como tonel. Hay que tener en cuenta que la tasa de deshidratación debe ser lenta para asegurar la supervivencia y el

retorno a la vida activa con la adición de agua[35]. Existen varias hipótesis respecto a qué mecanismos emplean estos organismos para protegerse de las condiciones ambientales desfavorables. Una de ellas es la del “reemplazo de agua” que se basa principalmente en que los componentes polihidroxílicos, como la trealosa, reemplazan la capa de agua que rodea las macromoléculas[29], alterando las propiedades físicas de la membrana de fosfolípidos y estabilizando las membranas secas en los organismos anhidrobióticos[35].

Aunque los disacáridos, y en particular la trealosa, parecen ser especialmente importantes en el mantenimiento de la estabilidad estructural de las células y se ha probado que en muchos organismos anhidrobióticos en estado seco se induce su producción[3], varios autores han concluido que en estos mecanismos de protección celular no sólo están involucrados estos azúcares, sino que deben entrar otras moléculas que ayudan a preservar o a reparar las membranas, proteínas y ADN del daño ocasionado por el ambiente. Esto lo demuestran Schill *et al.*[29], quienes establecieron que la transcripción de la isoforma 2 de la proteína de choque térmico HSP70, se induce significativamente en la transición entre el estado activo y el criptobiótico, lo que resulta en un número de copias comparativamente alto de ARNm y, tam-

bién, durante la criptobiosis de *Milnesium tardigradum*.

En cuanto a radiación, se ha demostrado que el tardígrado puede resistir altas dosis, entre 4.400 a 5.000 Gy –rayos gamma– y 5.200 a 6.200 Gy –iones pesados– en estado tanto deshidratado como hidratado, pero radiaciones mayores a 1.000 Gy los hace estériles con *M. tardigradum*[41]. De esta misma forma, Jönsson *et al.*[40] demostraron que los tardígrados de la especie *Richtersius coronifer* son capaces de sobrevivir a radiaciones gamma entre 0,5 y 1 kGy, y continuar sus ciclos de muda y producción de huevos aunque estén irradiados; pero, en dosis superiores a 1 kGy, su frecuencia disminuye. Los autores también comprobaron la infertilidad de los organismos expuestos a radiación. Dichos resultados les permitió sugerir que la tolerancia a la radiación no se debe a protectores bioquímicos conectados con el estado desecado, sino que podría basarse en un eficiente mecanismo de reparación del ADN, cuya naturaleza es actualmente desconocida. Asimismo, Jönsson y Schill[32] sugieren que las proteínas de choque térmico HSP70 pueden estar involucradas en el sistema fisiológico y bioquímico inherente a la tolerancia a la desecación y la radiación en tardígrados, y cuyo rol podría estar conectado a procesos de reparación posteriores a la desecación, más que a la estabilización bioquímica en el estado seco.

Teniendo en cuenta los resultados de las diferentes investigaciones, cobran importancia los mecanismos de reparación posteriores al estado criptobiótico, los que por sí mismos le permiten al organismo recuperarse muy rápida y eficientemente, y de los cuales aún no se conoce cómo funcionan; sólo se sabe que algunas proteínas como las HSP70 podrían estar directamente relacionadas con este proceso en los tardígrados.

Los sistemas de reparación del ADN actúan en el mantenimiento de la integridad del genoma respecto a errores de replicación, aspectos ambientales y los efectos acumulativos del tiempo[43]. El estudio de estos sistemas de reparación genética es muy importante debido a que sus deficiencias en humanos pueden llevar a enfermedades como el *xeroderma pigmentosum*, la tricotiodistrofia, el síndrome de Cockayne, la anemia de Fanconi, la ataxia telangiectasia[44], el síndrome de Bloom y el cáncer colorrectal hereditario (*hereditary non-polyposis colon cáncer*, HNPCC)[43]. Debido a esto, dichos sistemas han sido bastante estudiados en varios organismos modelo, pero principalmente, en procariontes como *Escherichia coli*[45-47]. También otros microorganismos con eficientes sistemas de reparación se están estudiando en este mismo sentido, como la bacteria *Deinococcus radiodurans*[48], resistente a los daños producidos por rayos ultravioleta,

radiación ionizante, químicos tóxicos y desecación. Sin embargo, aunque se ha logrado elucidar muchos de los mecanismos involucrados en la reparación del ADN procarionte y eucariote, aún falta establecer varios de los factores implicados en los procesos. Además, es importante tener en cuenta que, aunque muchas de las vías de reparación del ADN pueden ser similares en organismos procariontes y eucariotes, como la reparación de escisión, este proceso en células eucariotes podría ser mucho más complejo que en las bacterias debido a la estructura de la cromatina, la cual puede afectar tanto la distribución del daño en el ADN como su accesibilidad a enzimas de reparación[49, 50].

Los estudios en *D. radiodurans* han demostrado que la resistencia a la radiación ionizante está funcionalmente ligada a la tolerancia a la desecación[3], lo cual podría decir que la mayoría de procesos involucrados en la resistencia a condiciones extremas de cualquier tipo, estarían directamente relacionados con la reparación eficiente del ADN. Sin embargo, de los genes que se conocen en *E. coli* y otros procariontes, relacionados con este proceso, *D. radiodurans* solamente posee algunos de éstos, por lo cual Liu *et al.*[47] sugieren que el fenotipo de resistencia de la bacteria puede atribuirse a vías o genes aún desconocidos. En su investigación, haciendo uso de microarreglos genéticos los auto-

res pudieron determinar algunos de los genes involucrados en el proceso ya conocidos (Rec A), y algunos nuevos (DR0070) que presentaban actividad transcripcional después de la irradiación ionizante. En un estudio más reciente, Zahradka *et al.*[51] lograron describir dos etapas relevantes del proceso de reparación del ADN de *D. radiodurans*, donde establecieron que mediante el mecanismo ESDSA (*extended synthesis-dependent strand annealing*) la bacteria realiza una síntesis extendida de las dos cadenas de ADN que han sufrido rupturas de doble cadena (*double strand breaks*) por radiación ionizante. Y, en la segunda etapa, parece que involucra entrecruzamiento dependiente de RecA. No obstante, los autores aducen que muchos detalles de este mecanismo aún no han sido clarificados. Por ejemplo: ¿cómo promueven las proteínas involucradas una reparación eficiente y de alta fidelidad a diferencia de otros organismos? La precisión con que reparan su ADN dichas bacterias es objeto de muchas hipótesis.

Todo lo anterior nos lleva pensar que el campo de la investigación de mecanismos de reparación del ADN es bastante amplio y aún incierto. Los tardígrados podrían ser muy interesantes, debido a que se partiría de un modelo ancestral evolutivo eucariota, con un eficiente sistema de reparación, más cercano al hombre que los procariotas. Asimismo, los resultados

encontrados en los diferentes estudios permiten reflexionar respecto a si existen homólogos de las proteínas, genes o vías encontradas en *Saccharomyces cerevisiae*, *D. radiodurans* y *E. coli*, y si éstos son de alguna manera diferentes. Hay otro aspecto que es importante tener en cuenta: *D. radiodurans*, al igual que otros procariotas, produce muchas copias idénticas de sus cromosomas durante la división celular, que se pueden usar como ADN patrón para reconstruir el ADN dañado[52], aspectos que generan cuestionamientos como el siguiente: si los tardígrados usaran los mismos mecanismos que *D. radiodurans*, ¿poseerían suficientes copias de los cromosomas para usarlos como ADN molde? Por otro lado, se sabe que en las levaduras existe una vía de respuesta global a nivel de activación transcripcional; sin embargo, en humanos no es así, debido a la heterogeneidad de las células de mamífero. En tardígrados, ¿la vía de respuesta será global o específica para un grupo de células?

Teniendo en cuenta lo anterior, se puede decir que la criptobiosis en tardígrados y otros invertebrados se caracteriza por varios eventos importantes que aún permanecen bastante indefinidos[29]. Sin embargo, en la actualidad este campo de estudio se ha convertido en un área de investigación muy importante, cuyas principales aplicaciones serían dirigidas

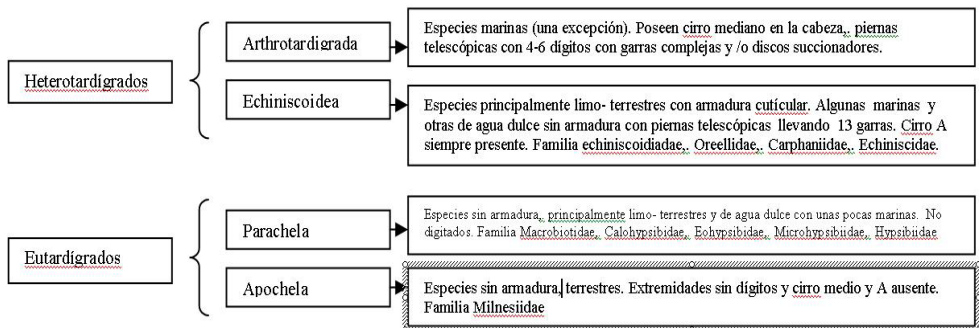
hacia la industria médica y alimentaria[3]. Además, es primordial resaltar el proyecto TARDIS liderado por el Ingemar Jönsson de la Universidad de Kristianstad, en colaboración con “Biopan-6 research platform” de la *European Space Agency* (ESA), que está evaluando la habilidad de los tardígrados en estado anhidrobiótico de sobrevivir bajo condiciones espaciales abiertas (vacío y radiación solar) (más información en <http://tardigradesinspace.blogspot.com>).

### Taxonomía tradicional

La taxonomía tradicional es una ciencia que permite clasificar los organismos en grupos, teniendo en cuenta las características fenotípicas[53]. Según Kinchin[54], el estudio sistemático de los tardígrados a un nivel específico implica que las especies se diferencian por características diminutas las cuales son difíciles de observar

y escasas. Otra dificultad surge del poco uso que se puede hacer de características cuantitativas, ya sea debido a que muchas estructuras son flexibles y éstas asumen una variedad de posiciones que hacen la medición imposible, o a que otras estructuras, como el bulbo faríngeo, se pueden deformar por la presión de la lámina cubreobjetos, o por los medios de montaje que se usan normalmente con tardígrados[54].

Teniendo en cuenta las características morfológicas externas de los tardígrados (forma de las garras o discos de succión, cutícula, apéndices cefálicos, aparato bucal y estructuras reproductivas), se han establecido, según Nelson[2], dos grupos taxonómicos principales: los heterotardígrados y eutardígrados. Estas dos clases se han dividido en cuatro órdenes y éstas, a su vez, en familias, con base tanto en caracteres morfológicos como en su hábitat (figura 2).



**Figura 2.** Esquema basado en la descripción taxonómica de Nelson, 2002, (Scuster *et al.*, 1980) y Kinchin, 1994. Primera columna: clases; segunda columna: órdenes. No se tuvo en cuenta la tercera clase desaparecida: mesotardígrada.

## Arthrotardigrada

Especies marinas (una excepción). Poseen cirro mediano en la cabeza, piernas telescópicas con 4-6 dígitos con garras complejas o discos succionadores.

Especies principalmente limo-terrestres con armadura cuticular. Algunas marinas y otras de agua dulce sin armadura, con piernas telescópicas que llevan 13 garras. Cirro A siempre presente. Familia *Echiniscoidiidae*, *Oreellidae*, *Carphaniidae* y *Echiniscidae*.

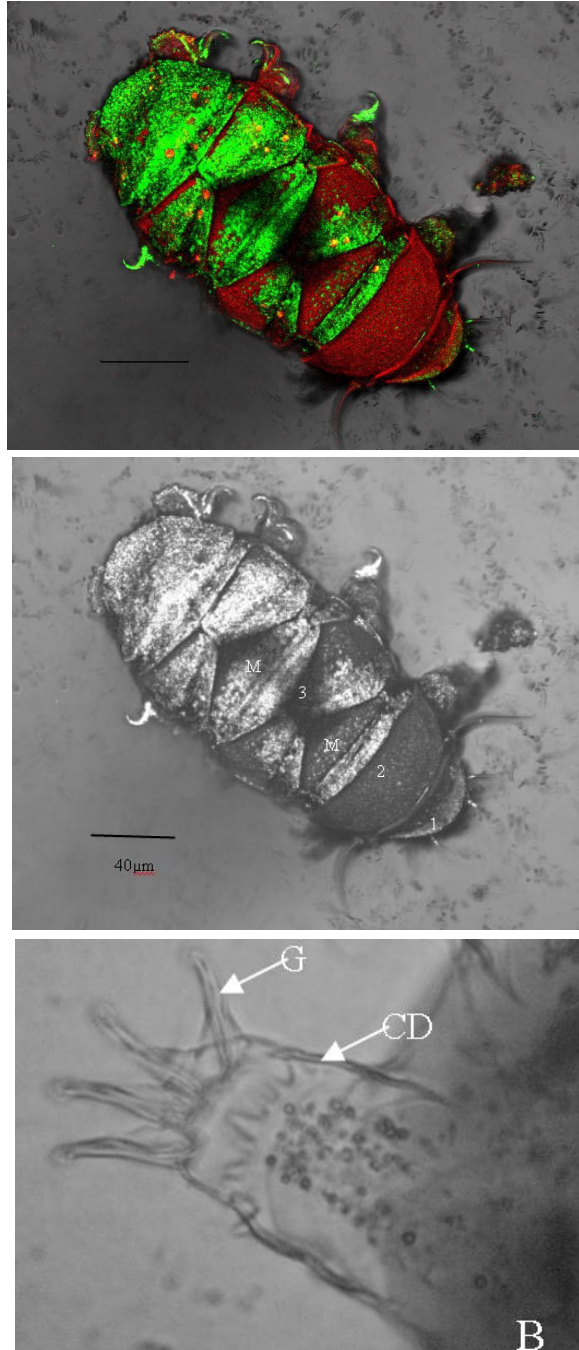
La clase heterotardígrada se caracteriza por la presencia de apéndices cefálicos, en tronco y patas. El gonoporo se encuentra separado del ano, carece de túbulos de Malpighi y posee estructuras cuticulares en forma de barra[2]. Un ejemplo de estos organismos se puede observar en la figura 3, donde se muestra claramente la estructura de la armadura de un miembro de la familia Echiniscidae. Las características de cada placa dorsal, el tamaño del organismo, la ausencia o presencia y el largo de apéndices y cirros, la forma y número de las garras, el color, la forma y organización de las estructuras en la cutícula, entre otros aspectos, permiten a los investigadores identificar las especies.

En Colombia se han encontrado varios organismos representantes de

cada clase, heterotardígrada y eutardígrada[55-57].

En cuanto a los eutardígrados, las garras, muy variables en forma, son lo más importante entre las estructuras externas visibles para la identificación de taxones[54]. En forma general, éstas se han clasificado en garras tipo 2-1-2-1 (*Hypsibidae* y *Calohypsibidae*) y 2-1-1-2 (*Macrobotidae*). La cutícula puede ser suave, granulada o con tubérculos, y puede o no tener poros. Las extensiones cuticulares son menos exageradas que las de heterotardígrados[54]. La estructura bucal también juega un rol importante para su identificación, teniendo en cuenta la anatomía interna y externa de la misma. Por otro lado, también la forma, la estructura y el color de los huevos son determinantes en la identificación de las especies.

Como se puede observar, a grandes rasgos la identificación de especies de tardígrados o invertebrados por su morfología es una tarea bastante difícil, ya que se requiere de mucha experiencia en cuanto a los montajes de las láminas para realizar las diapositivas (debido al pequeño tamaño y estructura de los organismos), conocimientos de las características morfológicas e inversión de bastante tiempo. Además, según Schill y Steinbrück[58], estos organismos poseen un alto grado de plasticidad fenotípica que podría no permitir una identificación definitiva de



**Figura 3.** A. Heterotardigrado. Barra: 40  $\mu\text{m}$ . Adulto, 400X. Microscopio confocal Olympus IX81 FV 1000. Autofluorescencia -láser de dos canales + DIC (1) Placa frontal. (2) Escapular. (3) Par de placas 1. (4) Par de placas 2. (5) Placa terminal. (M) Placas medias.

las especies, en algunos casos. Dicha plasticidad también se observa en diferentes etapas de la vida, por lo cual es difícil establecer su identidad en etapas tempranas. Por último, es importante tener en cuenta que el número de especies ya identificadas está alrededor de 960 o más[58] dentro del *phylum* tardígrada; por lo tanto, esta tarea se convierte en algo bastante complejo.

### **Genética y biología molecular del tardígrado**

El tamaño del genoma de estos organismos es bastante pequeño, se ha estimado que está en el orden de 120 megabases (Mb) y, con respecto a tamaños de genoma haploide, los tardígrados también poseen los más pequeños valores C encontrados en animales, en un rango de 0,08 a 0,82 picogramos (pg) (datos publicados en *Animal Genome Size Database*, <http://www.genomesize.com/results.php?page=1>). Se ha establecido que existen variaciones del tamaño entre especies individuales, pero no se segrega a líneas taxonómicas más altas [59]. En general, en los tardígrados, el tamaño pequeño del genoma y la baja variación podrían estar relacionados con el alto grado de especialización del filo[59].

En la actualidad, existen muchas secuencias de aminoácidos y nucleótidos reportadas al *National Center*

*for Biotechnology Information* (NCBI). Sin embargo, un gran porcentaje corresponde a secuencias de una sola biblioteca genómica, algunas son de proteínas putativas y muy pocas están completas (alrededor de 11). La mayoría de estas últimas pertenecen a la unidad de ARN ribosómico 18S de varias especies, usadas para estudios de identificación y filogenéticos. Se ha estado trabajando en la determinación de las secuencias de otros genes descritas parcialmente en NCBI, donde se puede ver que el interés de los investigadores respecto a estos organismos se ha incrementado en una gran medida en los últimos años (tabla 2). Entre las secuencias parciales reportadas en NCBI, podemos encontrar el gen de la subunidad I de la citocromo oxidasa a nivel mitocondrial, el gen de la subunidad de ARN ribosómico 28S y 18S de varias especies, y la subunidad II de ARNm de la ARN polimerasa, entre otros. Además, existe en GenBank un considerable número de fragmentos secuenciados de ADN y ARNm de una biblioteca particular (ETS, TardiBase) (60). Según Goldstein y Blaxter[61], la mayoría de los genes *Hox* relacionados con el desarrollo de especies de agua dulce, ya han sido secuenciados. Respecto a proteínas, sólo existen unos pocos datos de aquéllas determinadas por sus secuencias de ácidos nucleicos[19, 29, 60].

**Tabla 2**  
**Secuencias de nucleótidos y proteínas reportadas para tardígrados en NCBI. El asterisco (\*) indica proteínas no putativas**

Gen/secuencia nucleótidos	Organismo	No. de secuencias reportadas/No acceso	Sec. com-pleta	Secuencia aminoácidos/ No. de acceso
Subunidad I de citocromo oxidasa (COI) mitocondrial	<i>Echiniscus blumi</i>	1 EF620382	no	ABV25051
	<i>Echiniscus testudo</i>	16 EF620381- 67	no	ABV25050 - 36
	<i>Ramazottius oberhaeuseri*</i>	1 EF620418	no	ABU62765*
	<i>Thulinus stephaniae*</i>	1 EF620417	no	ABU62764*
	<i>Isohypsibius prosostomus*</i>	1 EF620416	no	ABU62763*
	<i>Isohypsibius granulise*</i>	1 EF620415	no	ABU62762*
	<i>Halobiotus crispae*</i>	3 EF620414-12	no	ABU62761*
	<i>Richtersius coronifer</i>	2 AY598781-80	no	AAT97625-24
	<i>Macrobiotus richtersi</i>	2 AY598779-78	no	AAT97623-22
	<i>Xerobiotus pseudohufelandi</i>	1 AY598776	no	AAT97620
	<i>Macrobiotus terminalis</i>	1 AY598775	no	AAT97619
	<i>Macrobiotus sp. 'hufelandi' group AG-2004</i>	2 AY598774-73	no	AAT97618-17
	<i>Murrayon pullari</i>	1 AY598772	no	AAT97616
	<i>Dactylobiotus parthenogeneticus</i>	1 AY598771	no	AAT97615
	<i>Amphibolus volubilis</i>	1 AY598770-69	no	AAT97614-13
Proteína relacionada CDC5	<i>Thulinus stephaniae*</i>	1 EU020325.1		ABV81266.1
Isoforma 2 de la proteína HSP70	<i>Milnesium tardigradum*</i>	2 AJ579532-31	no	CAE18450-49*
RNAm para actina	<i>Hypsibius klebelsbergi</i>	1 AM501548	no	CAM58511
	<i>Ramazottius oberhauseri</i>	1 AM501547	no	CAM58510
	<i>Macrobiotus sp</i>	1 AM501546	no	CAM58509
Gen para beta-actina Putative flightless	<i>Milnesium tardigradum</i>	1 AJ579530	no	CAE18448
I-like protein mRNA	<i>Thulinia stephaniae</i>	1 DQ200942	no	ABA43701
Glicógeno sintetasa putativa	<i>Thulinia stephaniae</i>	1 DQ165328	no	AAZ95088
Factor de elongación 2 RNAm	<i>Thulinia sp.,</i>	6 AY305533-527	no	AAR01325-29
	<i>Richtersius coronifer,</i>			
	<i>Macrobiotus islandicus</i>			
	<i>Isohypsibius elegans*</i>	1 AF240833		AAK12358
	<i>Echiniscus viridissimus*</i>			
	<i>Milnesium tardigradum</i>			
Subunidad grande de la RNA polimerasa II. RMAm	<i>Milnesium tardigradum*</i>	3 AF139016,AF2	no	AAF26666, AAK12367-66*
	<i>Thulinia stephaniae*</i>	40888-87		24 AAR15061-37
	<i>Richtersius coronifer*</i>	24 AY305655-31		

Gen/secuencia nucleótidos	Organismo	No. de secuencias reportadas/No acceso	Sec. completa	Secuencia aminoácidos/ No. de acceso
	<i>Macrobiotus islandicus</i> *			
	<i>Isohypsibius elegans</i> *			
	<i>Echiniscus viridissimus</i> *			
Factor de elongación 1-alfa 40	<i>Milnesium tardigradum</i>	1 AF063419	no	AAD21858
	<i>Thulinia stephaniae</i>	5 AY305486-81		AAQ88245-
	<i>Richtersius coronifer</i>			
	<i>Macrobiotus islandicus</i>			
	<i>Isohypsibius elegans</i>			
	<i>Echiniscus viridissimus</i>			
Receptor kinasa I acoplado a proteína G	<i>Thulinus stephaniae</i> *	1 EU020572	no	ABV81513.1
RNAm para proteína MSX	<i>Milnesium tardigradum</i> *	1 AB302966	no	BAF91580*
Neurofibromina	<i>Thulinus stephaniae</i> *	EU026267	no	ABW04821*
Proteína nucleolar rica en cisteína	<i>Thulinus stephaniae</i> *	1 EU026223	no	BW04857.1*
Espaciador interno transcrito 2	<i>Echiniscus testudo</i>	17 EF620400-384	no	no
	<i>Echiniscus blumi</i>	1 F620383		
Receptor P2X	<i>Hypsibius dujardini</i>	1 ACL14328	—	EU979525
Subunidad ribosomal grande RNA	<i>Especies no determinadas, no cultivadas.</i>	7 DQ086763- 757	no	no
		452	no	no
RNAr 18S SSU – MOTU		AM088141		
		AM088472-021		
		AY969278		
RNA ribosomal 18S	<i>Thulinia stephaniae</i>	6 AF056023	no	no
	<i>Halobiotus crispae</i>	EF620404-01		
	<i>Isohypsibius granulifer</i>	Z93337		
	<i>Halobiotus crispae</i>	1 EU038077		
	<i>Isohypsibius prosostomus</i>			
	<i>Hypsibius</i> sp			
	<i>Cornechiniscus lobatus</i>			
Gen RNA ribosomal 18S	<i>Echiniscus testudo</i>	8 DQ839607-601	sí	no
	<i>Echiniscus granulatus</i>			
	<i>Macrobiotus tonolii</i>	3 U32393- U49912		
	<i>Richtersius coronifer</i>	U49909		
	<i>Macrobiotus richtersi</i>			
	<i>Macrobiotus sapiens</i>			
	<i>Macrobiotus areolatus</i>			
	<i>Macrobiotus</i> sp			
	<i>Milnesium tardigradum</i>			
Gen de RNA ribosomal 5.8S y espaciador interno trascrito 2	<i>Thulinus stephaniae</i>	6 EF620424- 419	no	no
	<i>Isohypsibius granulifer</i>			
	<i>Isohypsibius prosostomus</i>			
	<i>Halobiotus crispae</i>			
	<i>Halobiotus crispae</i>			
	<i>Ramazzottius oberhaeuseri</i>			

Gen/secuencia nucleótidos	Organismo	No. de secuencias reportadas/No acceso	Sec. completa	Secuencia aminoácidos/ No. de acceso
Gen de rRNA ribosomal 28S	<i>Halobiotus crispae</i>	7 EF620411- 405	no	no
	<i>Ramazzottius oberhaeuseri</i>	1 AY210826		
	<i>Thulinus stephaniae</i>			
	<i>Isohypsibius prosostomus</i>			
	<i>Isohypsibius granulifer</i>			
	<i>Milnesium</i> sp.			
Rco factor de elongación 2 RNAm,	<i>Richtersius coronifer</i>	6 AY305532-27	no	AAR01324- 19
	<i>Macrobotus islandicus</i>			
Mis factor de elongación 2 RNAm,	<i>Isohypsibius elegans</i>			
Iso factor de elongación 2 RNAm,	<i>Echiniscus viridissimus</i>			
	<i>Echiniscus viridissimus</i>			
Factor de elongación 2 EviB y EviA				
Gen fushi tarazu (ftz)	<i>Milnesium tardigradum</i> *	1 AF237819	no	AAF63163*
EST, DNAC	<i>Hypsibius dujardini</i>	5235 CO742088- CD449043	no	no
RNAm (biblioteca de RNAm)				
Pequeño inserto de la librería genómica de DNA	<i>Hypsibius dujardini</i>	1063 CZ258607- CZ257545	no	no

Recientemente, se dio un paso importante en la biología molecular de los tardígrados como organismo modelo. El *National Human Genome Research Institute* (NHGRI) lidera un proyecto conjunto con varias universidades de Estados Unidos y del Reino Unido, que busca entender mejor la composición del transcriptoma y proteoma en diferentes nodos evolutivos en Ecdysozoa y reconstruir el genoma ancestral del mismo. Dentro de este proyecto se contempla la secuenciación completa del genoma de *Hypsibius dujardini*, así como la construcción de una biblioteca BAC (más información al respecto en <http://www.genome.gov/10002154>).

Sólo desde los años setenta se realizaron estudios específicos sobre los cromosomas de los tardígrados, en los que se determinó que éstos son similares en forma (redondeada o en forma de vara corta sin evidencia de cromosomas sexuales) y en número (frecuentemente  $n=5$  o  $n=6$ ) en varias especies de tardígrados[36]. En la actualidad, los estudios de bandeo cromosómico son muy pocos; en uno de ellos, publicado por Rebecchi *et al.* [36], se realiza el cariotipo de *Macrobotus richtersi* (Eutardigrada, Macrobiotidae), el cual permite conocer algunas de las características de los cromosomas de estos organismos. Los autores establecen que la escasez en

este tipo de investigaciones se debe, probablemente, al pequeño tamaño de los animales y de sus cromosomas, al número limitado de divisiones celulares y a la dificultad de obtener montajes permanentes con este material.

En 2003, se avanzó un poco más en este aspecto, cuando Rebecchi *et al.*[62] publicaron una investigación respecto a los modos reproductivos y los polimorfismos genéticos en tres poblaciones de *Richtersius coronifer*, dos partenogenéticas (con reproducción asexual) y una amfimíctica (con reproducción sexual). En este trabajo se determinó que existe un nivel relativamente bajo de variabilidad genética en *R. coronifer* y dicha variabilidad es significativamente más baja en poblaciones partenogenéticas que en anfimícticas lo cual, de acuerdo con los autores, sirve como base para la hipótesis de una partenogénesis automíctica en *R. coronifer*, es decir, que en estos animales la regulación del número de cromosomas se daría con dos divisiones madurativas, en vez de una sola como sucede en *Drosophila*. Esta hipótesis explicaría la casi completa ausencia de heterocigotes que observaron en todas las poblaciones femeninas de *R. coronifer*. El estudio se basó en el uso de análisis cariológicos (agrupación de especies con base en sus cariotipos), la evaluación de la proporción de hembras y macho en la población (*sex ratio*), y el

examen de la estructura genética usando polimorfismos de algunas enzimas el análisis de la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg de frecuencias genotípicas.

En otro estudio, cuyo objetivo fue establecer la distribución filogenética de la secuencia del telómero (TTAGG)<sub>n</sub> en artrópodos no insectos y en parientes cercanos de los artrópodos, Schultze (1834) demostró ausencia de ambas repeticiones teloméricas (TTAGG)<sub>n</sub> o (TTAGGG)<sub>n</sub> en los tardígrados *Milnesium tardigradum* y *Macrobotus hufelandi*, mediante las técnicas de hibridación por método de Southern o *in situ* en preparaciones cromosómicas –FISH–, lo cual los ubica filogenéticamente como grupos hermanos de los artrópodos, aunque su motivo de ADN telomérico sea aún desconocido[22].

### Extracción de ADN

La extracción y purificación de ADN intacto es frecuentemente muy difícil debido a dos problemas principales: el diminuto tamaño de los individuos y la escasa cantidad de ADN total en invertebrados. Otras dificultades que se pueden tener son: la escogencia del protocolo de extracción o kit comercial, las enzimas polimerasas, las secuencias de reacción, la obtención de los especímenes y su aislamiento[58]. Sin embargo, se han estandarizado varios métodos que

permiten la extracción de ADN con eficiencias variables.

Schill[63] ofrece una excelente comparación de los diferentes protocolos para extracción de ADN y amplificación por PCR de genes mitocondiales de tardígrados. En ese estudio se muestra que, de los tardígrados frescos activos no preservados en etanol, se obtiene más cantidad de ADN, independientemente del kit de extracción que se use. Se recomienda, si es necesario preservar los especímenes, hacerlo por deshidratación para mantenerlos vivos y así evitar la degradación del ADN y problemas con la extracción. En cuanto a la extracción de ADN, el autor recomienda el kit comercial NucleoSpin® Tissue kit, con el cual obtuvo los mejores resultados en cuanto a calidad y cantidad de ADN. Pero también, se pueden usar otros kits comerciales de extracción ADN de mamíferos o tejidos. Algunos autores[60, 29] han usado la mezcla fenólica comercial Trizol® para obtener ADN y ARN con buenos resultados. Otro método que se puede usar es el método publicado por Floyd *et al.* en 2002[64], diseñado para nemátodos, pero que se ha usado en tardígrados[65], el cual no es muy costoso y es sencillo, aunque la cantidad y calidad de ADN es variable.

En la investigación que se desarrolló para este trabajo, se usó el kit de

NucleoSpin para tejidos de Clontech y el método de Floyd *et al.*[64], con individuos representantes de cada una de las cuatro especies descritas anteriormente. Se usó un solo organismo por extracción. En todos los casos se obtuvieron mejores resultados con el kit en cuanto a calidad y cantidad del ADN.

### **Taxonomía molecular**

En relación con lo dicho anteriormente respecto a la taxonomía tradicional, se puede decir que ésta posee muchas limitaciones. En este sentido se han propuesto varios métodos moleculares que permitan identificar especies, usando secuencias cortas de ADN, conocidas como código de barras, firma de secuencias o unidades taxonómicas operacionales moleculares (*molecular operational taxonomic units*, MOTU), con el fin de facilitar los estudios de biodiversidad e identificar especies aunque estén en diferentes etapas de la vida[63].

Los sistemas propuestos para la identificación molecular general deben cumplir, de acuerdo con Schill y Steinbrück[58], con las siguientes condiciones: 1) alto número de copias de las moléculas por célula, 2) sitios de unión a los iniciadores muy conservados, y 3) distintos patrones de variabilidad. Con base en esto, la subunidad ribosómica grande codificada por el núcleo (LSU; 28S) y el gen

de la subunidad pequeña de ARN ribosómico (SSU; 18S), son secuencias candidato prometedoras[58], debido a que cumplen con dichas condiciones y ya han sido usadas en varios estudios con diferentes objetivos, como la reconstrucción filogenética o como MOTU para la identificación de nemátodos y tardígrados[64, 58].

En el sur de Escocia, Blaxter *et al.*[65] aplicaron el sistema de código de barras de ADN basado en ARN ribosómico 18S (SSU 64) a tardígrados y definieron unidades taxonómicas operacionales moleculares (MOTU) para los mismos, correlacionándolas con géneros y especies identificados morfológicamente (*Macrobotus*, *Hypsibius*, *Thulinia*, *Milnesium tardigradum*, *Murrayon hibernicus* y *Ramazzottius novemcinctus*).

El uso de códigos de barras para identificación de taxonomía animal ha sido bastante debatido (65-68), debido a la variabilidad que se presenta en las secuencias respecto a los taxones definidos tradicionalmente. Un problema intrínseco de usar ARNr como código de barras molecular reside en los alineamientos, pues la inserción de bases y las deleciones (*indels*) son comunes en secuencias de ARNr, lo cual hace necesario añadirle espacios (*gaps*) a cada secuencia con “*indels*” para el alineamiento con otros; además, teniendo en cuenta que no se han definido parámetros de alineamiento

universales, asignar espacios en el ADN es subjetivo y no hay consenso en qué define un alineamiento múltiple “bueno” o “mejor”. Como resultado, aun cuando el proceso de alineamiento se realice cuidadosamente por investigadores experimentados, se pueden introducir errores humanos[69].

Los investigadores que apoyan este método[64-66], aducen que la creación de nuevos taxones basada en la diferencia de secuencias podría ser errónea. Sin embargo, si se poseen los suficientes datos, se podría clasificar cuidadosamente cada grupo taxonómico. Estas clasificaciones requieren bastante estudio, pero en el caso de los tardígrados, el código de barras de ADN podría ser la única herramienta universal disponible. Asimismo, las unidades taxonómicas operacionales moleculares, MOTU, proveerían un útil punto de partida para análisis biológicos posteriores[65].

En otro estudio desarrollado por Schill y Steinbrück (58), se usó la técnica de *riboprinting* para llegar al mismo fin de identificación y diferenciación de especies a nivel molecular. Esta técnica se basa en la determinación de la variación de los sitios de restricción en las secuencias de ADN ribosómico. Esto implica que el análisis de las diferencias que presentan los patrones de los fragmentos de restricción entre especies o poblaciones,

puede reflejar diferencias en las secuencias de los sitios de restricción parciales, lo cual permitiría analizar simultáneamente un gran número de pruebas en forma relativamente rápida y a un bajo costo (Steinbrück *et al.*, 1991, citado por 58). Según los autores, al comparar el método del código de barras molecular basado en COI ADNmt, 18S ADNr o 28S ADNr, con su método, que se apoya en la discriminación de bandas visibles obtenidas por el uso de un pequeño set de 11 enzimas de restricción, se logra una rápida pero confiable identificación sin secuenciación. Esto indica que el *riboprinting* parece ser una técnica eficiente para identificar tardígrados, los cuales son difíciles de distinguir por características morfológicas solamente. Sin embargo, es importante tener en cuenta que este método necesita que más especies sean identificadas y caracterizadas para que pueda usarse para propósitos taxonómicos. Por otro lado, según los autores, otro uso que se le puede dar al método es que es posible chequear el ADN total extraído para verificar si hay impurezas de otras especies en un corto tiempo. El *riboprinting* es más un método suplementario para una rápida y menos costosa identificación de especies[58].

### **Biblioteca de ADNc**

Una biblioteca genómica es una colección de fragmentos de ADN en la que se espera esté incluidos el mayor

número de secuencias posibles de un genoma o las secuencias contenidas en un cromosoma. En una biblioteca genómica es posible seleccionar fragmentos de ADN entre millones de secuencias clonadas en cantidad suficiente para ser analizada[70]. Asimismo, las bibliotecas de ADNc, que son una representación en ADN del ARNm, se consideran un útil prerequisite para un detallado análisis de proteínas que permite la producción de proteínas recombinantes[60]; además, la existencia de dichas bibliotecas permite que la búsqueda de genes o secuencias determinadas sea más fácil. Con respecto a los tardígrados, existen dos bibliotecas conocidas de ADNc. La primera es tipo EST (*expressed sequence tag*) de *Hypsibius dujardini*, publicada por Daub *et al.* en 2003[71], cuyas secuencias se encuentran publicadas en NCBI (Nº de acceso: CK326773). La segunda corresponde a una colección de ADNc de *Hypsibius klebelsbergi*, elaborada por Kiehl *et al.*, con 2000 individuos[60]. Ellos, a diferencia de Daub *et al.*[71], no cultivaron los organismos sino que los aislaron de hoyos de criocónita en el glaciar Langtalferner, 2.580 m, en los Alpes Ötztal (Austria), asegurando que, debido a las características morfológicas tan evidentes de esta especie y el hecho de ser casi única en dicho hábitat, la biblioteca se puede construir con la seguridad de que la contaminación de ácidos nucleicos foráneos es mínima y se

evitan variaciones proteicas especie-específicas. Por otro lado, también realizaron el análisis de la proteína actina en tardígrados, con el fin de caracterizarla, y también de sus isoformas, así como de diferentes proteínas de unión a actina.

### **Evolución y análisis filogenéticos**

Los diferentes artículos que se han publicado respecto a la asociación del grupo tardígrado con artrópodos, onicóforos, nemátodos o, en general, con el nuevo grupo llamado Ecdysozoa (animales que mudan), han analizado las secuencias o el comportamiento de diferentes genes o grupos de ellos para poder elucidar dichas relaciones filogenéticas y evolutivas. Entre ellos, podemos encontrar: el factor de elongación 2 (11), genes *HOX* o del desarrollo[12], ADNr 18S[13, 72-74], ARNr 18S[15, 16, 75], ARNr 18S y 28S[20, 76], el gen que codifica para ARN de transferencia mitocondrial, Leu designada *cox 1-L(UUR)* y *rrnL-L(CUN)-Nad1*[14, 23], o mediante el análisis multigenético[18]. En otras investigaciones, Regier *et al.*[19] estudiaron al mismo tiempo relaciones evolutivas entre familias de tardígrados y de éstos con respecto a Arthropoda y Onychophora, teniendo en cuenta el tiempo evolutivo de divergencia de cada grupo con los tardígrados. Para esto, usaron tres genes, entre los cuales está el factor

de elongación –lá, el factor de elongación 2 y la subunidad grande de ARN polimerasa II. En la actualidad, aún existen dudas respecto a la ubicación filogenética de estos organismos, por las posiciones encontradas de varios autores. El último reporte encontrado en este aspecto es el de Ryu *et al.*[23], en el cual determinaron la existencia de dos linajes Lophotrochoa y Ecdysozoa, mediante el uso de ADN mitocondrial[77]. En el primero, ubicaron nemátodos, moluscos y anélidos, y en el segundo, Tardigrada y Arthropoda, estos últimos en una posición mucho más cercana filogenéticamente, lo que corrobora lo establecido por otros autores[13,15]. Sin embargo, no determinaron si los tardígrados son miembros de los artrópodos o si son un grupo hermano. En cuanto el estudio de las relaciones filogenéticas entre familias de tardígrados, el ADNr 18S y el ARN 18S han sido los más utilizados por los investigadores[8, 9, 17, 58, 78].

Existen otros trabajos que manejan a nivel teórico estas relaciones filogenéticas; entre éstos se pueden encontrar los publicados por Blaxter[21] y por Huson *et al.*[10]. Asimismo, es posible hallar un aporte interesante que soporta la hipótesis de la existencia de un grupo Ecdysozoa ([http://www.nematodes.org/tardigrades/Tardigrades\\_and\\_Ecdysozoa.html](http://www.nematodes.org/tardigrades/Tardigrades_and_Ecdysozoa.html)).

## Conclusión

En este trabajo se logró recolectar información sobre gran parte de los avances que en la actualidad se han alcanzado en el estudio molecular de los tardígrados. Hay muchos proyectos propuestos y en los cuales ya se han dado algunos pasos, como podemos ver en la página Web del laboratorio Blaxter, (<http://www.nematodes.org/tardigrades/Tardigrades.html>), así como el proyecto TARDIS y la propuesta de secuenciación Ecdysozoa. Sin embargo, aún falta mucho por estudiar y descubrir respecto a estos pequeños animales invertebrados con grandes capacidades.

Los hallazgos en cuanto a los mecanismos que emplean los tardígrados para resistir las condiciones ambientales extremas, de una u otra forma han indicado la importancia que podrían tener estos organismos y sus mecanismos especiales en la medicina genómica. Es importante plantear nuevos estudios que permitan develar las muchas posibilidades que se podrían presentar en la búsqueda para la solución molecular a muchas de las enfermedades que afectan el sistema de reparación del ADN. El trabajo que se viene al respecto es grande, pero es un camino del cual ya conocemos su existencia y, que una vez lo recorramos, podremos saber si éste era el adecuado para entender dichos mecanismos.

## Bibliografía

1. Brusca R, Brusca G. The Phylum tardigrada. In: *Invertebrates*. Sunderland: Massachussets, USA. Ed. Sinauer Associates. 1990;674.
2. Nelson D. *Current status of the tardigrada: evolution and ecology*. Integ Comp Biol. 2002;42:652-9.
3. Jönsson I. Causes and consequences of excess resistance in cryptobiotic metazoans. *Physiol Biochem Zool*. 2003; 76:429-35.
4. Mehlen R. *Tardigrada: taxonomy and distribution in Costa Rica*. Trans Am Microsc Soc. 1969;88:498-505.
5. Collins M, Bateman L. *The ecological distribution of tardigrades in newfoundland*. Zool Anz. 2001; 240:291-7.
6. Nelson D, Adkins R. *Distribution of tardigrades within a moss cushion: Do tardigrades migrate in response to changing moisture conditions?* Zool Anz. 2001;240:493-500.
7. Peluffo M, Peluffo J, Rocha A, Doma I. Tardigrade distribution in a medium-sized city of central Argentina. *Hydrobiol*. 2006;558:141-50.
8. Nichols PB, Nelson DR, Garey JR. A family level analysis of tardigrade phylogeny. *Hydrobiol*. 2006;558:53-60.
9. Kiehl E, Dastych H, D'haese J, Greven H. The 18s rDNA sequences support polyphyly of the hypsibiidae (eutarigrada). *J Limnol*. 2007;66:21-5.
10. Huson D, Bryant D. *Application of phylogenetic networks in evolution-*

- ary studies. *Mol Biol Evol.* 2006;23:254-67.
11. Regier J, Shultz J. *Elongation factor-2: a useful gene for arthropod phylogenetics.* *Mol Phylog Evol.* 2001;20:136-48.
  12. Telford T. Evidence for the derivation of the *Drosophila fushi tarazu* gene from a hox gene orthologous to lophotrochozoan lox5. *Curr Biol.* 2000;10:349-52.
  13. Giribet G, Carranza S, Baguna J, Riutort M, Ribera C. First molecular evidence for the existence of a tardigrada + arthropoda clade. *Mol Biol Evol.* 1996;13:76-84.
  14. Boore J, Lavrov D, Brown W. Gene translocation links insects and crustaceans. *Nature.* 1998;392:16.
  15. Garey JR, Krotec M, Nelson DR, Brooks J. Molecular analysis supports a tardigrade-arthropod association. *Invertebr Biol.* 1996;115:79-88.
  16. Garey JR, Nelson DR, Mackey L, Li J. Tardigrade phylogeny: congruency of morphological and molecular evidence. *Zool Anz.* 1999;238:205-10.
  17. Jørgensen A, Kristensen R. Molecular phylogeny of tardigrada-investigation of the monophyly of heterotardigrada. *Mol Phylogenet Evol.* 2004;32:666-70.
  18. Philippe H, Lartillot N, Brinkmann H. Multigene analyses of bilaterian animals corroborate the monophyly of ecdysozoa, lophotrochozoa, and protostomia. *Mol Biol Evol.* 2005; 22:1246-53.
  19. Regier J, Shultz J, Kambic R, Nelson D. Robust. Support for tardigrade clades and their ages from three protein-coding nuclear genes. *Inv Biol.* 2004;123:93-100.
  20. Petrov NB, Vladychenskaya N. 2005. Phylogeny of molting protostomes (ecdyszoa) as inferred from 18s and 28s rARN gene sequences. *Mol Biol.* 2005;39:503-13. Translated from *Molekulyarnaya Biologiya.* 2005;39: 590-601.
  21. Blaxter M. Sum of the arthropod parts. *Nature* 2001;413:13.
  22. Vi'tkova' M, Ji\_ri' K, Traut W, Zrzav J, Marec F. The evolutionary origin of insect telomeric repeats, (ttagg)n. *Chrom Res.* 2005;13:145-56.
  23. Ryu SH, Lee JM, Jang KH, Choi EH, Park J, Chang C, et al. Partial mitochondrial gene arrangements support a close relationship between tardigrada and arthropoda. *Mol Cells.* 2007;24:351-7.
  24. Bertolani R, Guidetti R, Jönsson I, Altiero T, Boschini D. Rebecchi L. Experiences with dormancy in tardigrades. *J Limnol.* 2004;63:16-25.
  25. Crowe JH, Higgins RP. The revival of macrobiotus areolatus murray (tardigrada) from the cryptobiotic state. *Trans Am Microsc Soc.* 1967;86:286-94.
  26. Wesh P, Ramlov H. Trealose acumulation in the tardigrade *Adorybiotus coronifer* during anhidrobiosis. *J Exp Zool.* 1991;258:303-11.
  27. Ramlov H, Westh P. Survival of the cryptobiotic eutardigrade *Adorybiotus coronifer* during cooling to -196°C: effect of cooling rate, trehalose level, and short-term acclimation. *Cryobiol.* 1992;29:125-30.

28. Jönsson I, Rebecchi L. Experimentally induced anhidrobiosis in tardigrade *Richtersdius coronifer*: phenotypic factors affecting survival. *J Exp Zool.* 2002;293:578-84.
29. Schill R, Steinbrück G, Köhler HR. Stress gene (hsp70) sequences and quantitative expression in *Milnesium tardigradum* (tardigrada) during active and cryptobiotic stages. *J Exp Biol.* 2004;207:1607-13.
30. Rebecchi L, Guidetti R, Borsari S, Altiero T, Bertolani R. Dynamics of long term anhydrobiotic survival of lichen-dwelling tardigrades. *Hydrobiol.* 2006;558:23-30.
31. Jönsson KI, Borsari S, Rebecchi L. Anhydrobiotic survival in populations of the Tardigrades *Richtersius coronifer* and *Ramazzottius oberhaeuseri* from Italy and Sweden. *Zool Anz.* 2001;240:419-23.
32. Jönsson KI, Schill R. Induction of Hsp70 by desiccation, ionising radiation and heat-shock in the eutardigrade *Richtersius coronifer*. *Comp. Biochem. Physiol.* 2007;146:456-60.
33. Goldstein B, Blaxter M. Tardigrades, quick guide. *Curr Biol.* 2002;12:r475.
34. Jørgensen A, Moberg N, Kristensen RM. A molecular study of the tardigrade *Echiniscus testudo* (Echiniscidae) reveals low DNA sequence diversity over a large geographical area. *J Limnol.* 2007;66:77-83.
35. Nelson D. Tardigrada. In: *Ecology and classification of North American freshwater invertebrates*. Lawrence USA. Academic Press; 1991;501.
36. Rebecchi L, Altiero T, Bertolani R. Banding techniques on tardigrade chromosomes: the karyotype of macrobiotus richtersi (eutardigrada, macrobiotidae). *Chromosome Res.* 2002;10:437-43.
37. Guidetti R, Colavita C, Altiero T, Bertolani, Rebecchi L. Energy allocation in two species of eutardigrada. *J Limnol.* 2007;66:111-8.
38. Gregory TR. Genome sizes of miscellaneous invertebrates. In: *The C-value enigma* (thesis). Ontario. Canada: University of Guelph; 2002. p. 11.
39. Seki K, Toyoshima M. Preserving tardigrades under pressure. *Nature.* 1998;395:853-4.
40. Jönsson KJ, Harms-ringdahl M, Torudd J. Radiation tolerance in the eutardigrade *Richtersius coronifer*. *Int J Radiat Biol.* 2005;81:649-56.
41. Horikawa D, Tetsuya S, Chihiro K, Masahiko T, Takahiro K, Yuichi N, et al. Radiation tolerance in the tardigrade *Milnesium tardigradum*. *Int J Radiat Biol.* 2006;82:843-8.
42. Horikawa D, Sakashita T, Katagiri C, Watanabe M, Nakahara A, Okuda T, et al. Radiation tolerance in water bears. 36th Cospar Scientific Assembly; 2006; 16-23.
43. Yu Z, Chen J, Ford B, Brackley M, Glickman B. *Human DNA repair systems: an overview*. Environ Mol Mutagen. 1999;33:3-20.
44. Huang I, Sheridan R. Genetic and biochemical studies with ataxia telangiectasia. *Hum Genet.* 1981;59:1-9.

45. Hanawalt P. Concepts and models for DNA repair: from *Escherichia coli* to mammalian cells. *Environ Mol Mut.* 1989;14:90-8.
46. He A, Rohatgi P, Hersh M, Rosenberg S. Roles of *E. coli* double-strand-break-repair proteins in stress-induced mutation. *DNA Repair.* 2006;5:258-73.
47. Liu L, Jizhong Z, Marina V, Omelchenko, Alex S, Beliaev S, *et al.* Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. *PNAS.* 2003;100:4191-6.
48. Edwards J, Battista J. Using DNA microarray data to understand the ionizing radiation resistance of *Deinococcus radiodurans*. *Trends Biotechnol.* 2003;21:9.
49. Hanawalt. P, Cooper P, Ganesan A, Lloyd S, Smith C, Zolan. M. Repair responses to DNA damage: enzymatic pathways in *E. coli* and human cells. *J Cell Biochem.* 2004;18:271-83.
50. Pinto L, Regis C, Oliveira LD, Machado A, Machado. C. *Escherichia coli* as a model system to study DNA repair genes of eukaryotic organisms. *Genet Mol Res.* 2003;2:77-91.
51. Zahradka K, Slade D, Bailone A, Sommer S, Averbek D, Petranovic M, *et al.* Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*. *Nature.* 2006;5:569-73.
52. Lovett S. Microbiology. Resurrecting a broken genome. *Nature.* 2006; 443: 517-19.
53. Madigan M, Martinko J, Parker J. Taxonomía y nomenclatura. En: Capella I, Álvarez D, Aguado P, editores. Brock: *Biología de los microorganismos.* Octava edición. Madrid, España: Prentice Hall; 2000;627.
54. Kinchin I. Tardigrade description. In: Kinchin I; The biology of tardigrades. First edition. London: Portland Press; 1994.
55. Jerez J, Narváez E, Restrepo R. Tardígrados en musgos de la Reserva El Diviso (Santander, Colombia). *Rev Col Entomol.* 2002;28:199-206.
56. Marcus E. *IV Tardigrada* (The Percy Sladen Trust Expedition to Lake Titicaca). *Trans Linn Soc London.* 1939;3:45-9.
57. Führman O, Mayor E. Voyage d'exploration scientifique en colombie. En: 2ème partie des mémoires de la société des sciences naturelles de neuchâtel. *Neuchâtel: Attiques Editeurs;* 1914.
58. Schill RO, Steinbrück G. Identification and differentiation of heterotardigrada and eutardigrada species by ribotyping. *J Zool Syst Evol Res.* 2007;45:184-90.
59. Garagna S, Rebecchi L, Guido A. Genome size variation in tardigrada. *Zool J Linn Soc.* 1996;116:115-21.
60. Kiehl E, Dastyh H, D'haese J, Greven H. A cDNA library of the eutardigrade *hypsibius klebelsbergi* mihelèè, 1959 and analysis of the actin gene. *J Limnol.* 2007;66:152-7.
61. Goldstein B, Blaxter M. *Tardigrades.* *Curr Biol.* 2002;12:R475.
62. Rebecchi L, Rossi V, Altiero T, Bertolani R, Menozzi P. Reproductive

- modes and genetic polymorphism in the tardigrade *Richtersius coronifer* (eutar-digrada, macrobiotidae). *Invert Biol.* 2003;122:19-27.
63. Schill RO. Comparison of different protocols for DNA preparation and PCR amplification of mitochondrial genes of tardigrades. *J Limnol.* 2007;66:164-70.
  64. Floyd R, Eyuaem A, Papert A, Blaxter M. Molecular barcodes for soil nematode identification. *Mol Ecol* 2002; 11:839-50.
  65. Blaxter M, Elsworth B, Daub J. *DNA taxonomy of a neglected animal phylum: an unexpected diversity of tardigrades.* Proc R Soc Lond. 2004; 271:189-92.
  66. Blaxter M, Mann J, Chapman T, Thomas F, Whitton C, Floyd R, *et al.* Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Phil Trans R Soc B* 2005;360:1935-43
  67. Trewick SA. DNA barcoding is not enough: mismatch of taxonomy and genealogy in New Zealand grasshoppers (Orthoptera: Acrididae). *Cladistics.* 2007;24:240-54.
  68. Larson BM. *DNA barcoding: the social frontier.* Front Ecol Environ. 2007;5:437-42.
  69. Chu KH, Li CP, Qi J. Ribosomal RNA as molecular barcodes: a simple correlation analysis without sequence alignment. *Bioinformatics.* 2006;22: 1690-701.
  70. Álvarez ME, Montaña J, Acuña R, Gaitán A, Pacheco M. Construcción de una biblioteca genómica de *Coffea arabica* var. Colombia y evaluación con una secuencia homóloga a ubiquitina. *Universitas Scientiarum.* 2004;9:81-90.
  71. Daub JF, Thomas A, Aboobaker ML, Blaxter. A survey of genes expressed in the tardigrade *Hypsibius dujardini*; 2003. Disponible en: NCBI CK326773 y <http://zeldia.cap.ed.ac.uk/tardigrades/tardibase.html>.
  72. Giribet G, Distel DL, Polz M, Sterrer W, Wheeler WC. Triploblastic relationships with emphasis on the acoelomates and the position of gnathostomulida, cycliophora, plathelminthes, and chaetognatha: a combined approach of 18s rDNA sequences and morphology. *Syst Biol.* 2000;49:539-62.
  73. Giribet G, Ribera C. A review of arthropod phylogeny: new data based on ribosomal DNA sequences and direct character optimization. *Cladistics.* 2000;16:204-31.
  74. Moon S, Kim W. Phylogenetic position of the tardigrada based on the 18s ribosomal RNA gene sequences. *Zool J Linn Soc.* 1996;116:61-9.
  75. Garey JR, Schmidt-Rhaesa A, Near TJ, Nadler SA. The evolutionary relationships of rotifers and acanthocephalans. *Hydrobiol.* 1998;387/388:83-91.
  76. Mallatt TM, Eddy SR. tRNA scan-se: a program for improved detection of transfer rna genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:955-64.
  77. Aguinaldo AM, Turbeville J, Linford LS, Rivera MC, Garey JR, Raff RA, *et al.* Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature.* 1997;387:489-93.
  78. Guidetti R, Bertolani R. Phylogenetic relationships in the macrobiotidae (Tardigrada: Eutar-digrada: Parachela). *Zool Anz.* 2001;260:371-6.