



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“CARACTERIZACIÓN CELULAR,
MOLECULAR Y METABÓLICA DE LA
PARED QUÍSTICA DEL CISTICERCO
RACEMOSO DE *TAENIA SOLIUM*”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS DE LA VIDA.

MIGUEL ANGEL ORREGO SOLANO

LIMA-PERÚ

2022

Asesor:

Manuela Renee Verastegui Pimentel. MSc. PhD.

Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas

Departamento de Ciencias Celulares y Moleculares

Facultad de Ciencias y Filosofía

Universidad Peruana Cayetano Heredia

Co asesor:

Hector Hugo Garcia Lescano. MD. PhD

Laboratorio de Neurocisticercosis

Departamento de Ciencias Celulares y Moleculares

Facultad de Ciencias y Filosofía

Universidad Peruana Cayetano Heredia

Jurado evaluador de la tesis:

Dr. José Ronald Espinoza Babilón

Presidente

Dra. Iskra Tuero Ochoa

Vocal

Dr. Seth O'Neal

Vocal

Dra. Katherine Jessica Torres Fajardo

Secretaria

Agradecimientos

Esta tesis doctoral es el fruto del esfuerzo y apoyo conjunto de muchas personas que estuvieron a mi lado en todo este tiempo y que a pesar de la coyuntura sanitaria continuaron brindándome consejos para seguir adelante.

Por tal motivo deseo agradecer:

A mis asesores de tesis.

- Mi agradecimiento a la Dra. Manuela por todo su apoyo durante la ejecución de la tesis, por sus consejos y tiempo invertido.
- Un agradecimiento al Dr. Hugo Garcia por su confianza y continuo apoyo así como sus valiosas enseñanzas que me han permitido crecer y mejorar a nivel personal y profesional.

A mi familia

- A Maria Lupe, por su continuo apoyo en todos estos años, durante los cuales hemos logrado crecer juntos como una sola unidad.
- A mis hijos, Maria Fernanda y Miguel Eduardo, quienes a través de sus travesuras y ocurrencias supieron mitigar todos los momentos difíciles.
- A mi madre, quien supo inculcarme valores que fueron fundamentales en mi formación y por sus continuas palabras de apoyo.
- A la memoria de mi padre, a quien deseo dedicarle este trabajo y decirle:

¡Promesa cumplida!

Fuentes de Financiamiento

- Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) a través su unidad ejecutora Fondo Nacional para el Desarrollo de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (FONDECYT) y el Banco Mundial en el marco de la convocatoria E033-01-08-2018-FONDECYT/BM-Programas de doctorado en áreas estratégicas y generales.
- Este trabajo también fue financiado por el Centro Internacional Fogarty del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (NIH-USA) Training Grant D43 TW001140.

CARACTERIZACIÓN CELULAR, MOLECULAR Y METABÓLICA DE LA PARED QUÍSTICA DEL CISTICERCO RACEMOS DE TAENIA SOLIUM

INFORME DE ORIGINALIDAD

15%

INDICE DE SIMILITUD

12%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

4%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia Trabajo del estudiante	2%
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	2%
3	www.ncbi.nlm.nih.gov Fuente de Internet	1%
4	Miguel A. Orrego, Carlos M. Vasquez, Kayla Togneri, Juan P. Laclette, Hector H. Garcia, Theodore E. Nash. "Increased iron uptake in the bladder wall of racemose cysts of Taenia solium", Molecular and Biochemical Parasitology, 2022 Publicación	1%
5	www.jove.com Fuente de Internet	1%
6	patents.google.com Fuente de Internet	1%

Tabla de Contenidos

Índice de Figuras

Abreviaturas

Resumen

Summary

I.	Capítulo 1: Introducción General	1
1.1	Origen y clasificación taxonómica de <i>Taenia solium</i>	1
1.2	Ciclo biológico de <i>Taenia solium</i>	3
1.3	Etapas de desarrollo en <i>Taenia solium</i>	4
1.4	Enfermedades causadas por <i>Taenia solium</i>	5
1.4.1	Teniasis	5
1.4.2	Cisticercosis	6
1.4.3	Neurocisticercosis	7
1.5	Respuesta inmunológica e inflamación durante la NCC	8
1.6	Patología de la NCC	9
1.7	Tratamiento y control de la NCC	10
1.8	Neurocisticercosis racemosa	11
1.9	Justificación del estudio	13
1.10	Objetivos generales del estudio	14
1.11	Aspectos éticos	14
II.	Capítulo 2: Identificación y cultivo de células proliferativas de quistes racemosos de <i>Taenia solium</i>	15

2.1	Introducción	15
2.2	Objetivos	17
2.3	Metodología	17
2.3.1	Diseño experimental	17
2.3.2	Colecta de muestras	19
2.3.3	Ensayos de viabilidad	20
2.3.4	Hibridación <i>in situ</i> (ISH) en muestras de tejido	20
2.3.5	Inmunofluorescencia (IF) para histona H3 fosforilada	22
2.3.6	Generación de ADN complementario (ADNc) y PCR cuantitativa (qPCR)	23
2.3.7	Aislamiento de células y condiciones de cultivo	24
2.3.8	Evaluación de antígenos en sobrenadantes mediante ensayo por inmunoabsorción acoplado a enzima (Ag-ELISA)	25
2.3.9	Transcripción reversa PCR (RT-PCR)	26
2.3.10	Curvas de crecimiento y evaluación de la acción de la insulina	27
2.3.11	Análisis estadístico	28
2.4	Resultados	29
2.5	Discusiones	46
III.	Capítulo 3: Las células proliferativas en el quiste racemoso presentan la vía de señalización MAPK activa y responden al tratamiento con metformina	51
3.1	Introducción	51

3.2	Objetivos	52
3.3	Metodología	52
3.3.1	Diseño experimental	52
3.3.2	Colecta de muestras	53
3.3.3	Procesamiento de las muestras	53
3.3.4	Análisis bioinformático	53
3.3.5	Generación de ADN complementario (ADNc) y PCR cuantitativa (qPCR) para los receptores 1 y 2 de insulina	54
3.3.6	Inmunofluorescencia (IF) para las formas fosforiladas del receptor de insulina y ERK 1/2	54
3.3.7	Aislamiento de células proliferativas y condiciones de cultivo	55
3.3.8	Efectos <i>in vitro</i> de la metformina en secciones de quiste racemoso y células proliferativas	55
3.3.9	Eficacia <i>in vivo</i> del tratamiento con metformina en el modelo murino de cisticercosis con <i>T. crassiceps</i>	56
3.3.10	Análisis estadístico	56
3.4	Resultados	58
3.5	Discusiones	70
IV.	Capítulo 4: Incremento en la captación de hierro en la pared quística del cisticerco racemoso de <i>Taenia solium</i>	73
4.1	Introducción	73
4.2	Objetivos	76

4.3 Metodología	76
4.3.1 Diseño experimental	76
4.3.2 Colecta de muestras	76
4.3.3 Procesamiento de las muestras	76
4.3.4 Tinción con Azul de Prusia en secciones de quistes racemosos y vesiculares de <i>Taenia solium</i>	77
4.3.5 Generación de ADN complementario (ADNc) y PCR cuantitativa para los genes de <i>ferritina</i> y <i>melanotransferrina</i>	77
4.3.6 Análisis estadístico	78
4.4 Resultados	79
4.5 Discusiones	82
V. Capítulo 5:	85
5.1 Discusiones generales	85
5.2 Conclusiones	89
5.3 Limitaciones	90
VI. Referencias bibliográficas	91
VII. Anexos	

Índice de Figuras

Capítulo 1

- Figura 1:** Ubicación filogenética de *Taenia solium*. 2
- Figura 2:** Ciclo biológico de *Taenia solium*. 3
- Figura 3:** Prevalencia geográfica de *Taenia solium*. 7

Capítulo 2

- Figura 1:** Representación esquemática mediante diagrama de flujo del estudio. 18
- Figura 2:** Imágenes representativas de quiste racemoso. 30
- Figura 3:** Imagen macroscópica de muestras de quiste racemoso luego de realizarse la doble tinción. 31
- Figura 4:** Identificación *in situ* de células germinativas en muestras de quiste racemoso de *T. solium* mediante ISH. 33
- Figura 5:** Identificación *in situ* de células mitóticamente activas en muestras de quistes de *T. solium* mediante inmunofluorescencia (IF). 34
- Figura 6:** Identificación *in situ* de células germinativas en muestras de quiste de *Taenia crassiceps*. 35
- Figura 7:** Viabilidad de las células proliferativas y agregados presentes en los cultivos. 37

Figura 8: Células proliferativas aisladas de quiste racemoso de <i>T. solium</i> y quistes de <i>T. crassiceps</i> .	38
Figura 9: IF e ISH en agregado de células proliferativas de quiste racemoso expresando <i>plk1</i> y positivos a fosfo histona H3.	39
Figura 10: Imagen magnificada de agregado celular de quiste racemoso que expresa <i>plk1</i> rodeados de material extracelular.	40
Figura 11: Evaluación de sobrenadantes mediante Ag-ELISA y RT-PCR de los cultivos celulares.	42
Figura 12: Curvas de crecimiento de las células proliferativas y los efectos de la insulina.	44
Figura 13: Ensayos de ISH en células proliferativas de quistes racemosos de <i>T. solium</i> y quistes de <i>T. crassiceps</i> antes y después de ser cultivadas 1 semana con insulina.	45

Capítulo 3

Figura 1: Alineamiento múltiple de secuencias del receptor de insulina.	59
Figura 2: Identificación de dominios funcionales en la secuencia del receptor de insulina.	60
Figura 3: Alineamiento múltiple de las secuencias de ERK 1/2.	61
Figura 4: Identificación de los dominios funcionales en las secuencias de ERK 1/2.	62

Figura 5: qPCR para los receptores de insulina 1 y 2 en <i>T. solium</i> .	63
Figura 6: Identificación <i>in situ</i> del receptor de insulina fosforilado.	65
Figura 7: Identificación <i>in situ</i> de la proteína ERK 1/2 fosforilada.	66
Figura 8: Eficacia <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de la metformina (Met).	68

Capítulo 4

Figura 1: Identificación <i>in situ</i> de depósitos de hierro en la pared quística del cisticerco racemoso.	80
Figura 2: Niveles de expresión de la <i>ferritina</i> , <i>melanotransferrina</i> y <i>ribonuclótido reductasa</i> en el quiste de <i>T. solium</i> .	81

Abreviaturas

NCC: Neurocisticercosis

SNC: Sistema nervioso central

BHE: Barrera hematoencefálica

LCR: Líquido cefalorraquídeo

PBS: Tampón fosfato salino

RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute medium 1640

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazínico etanosulfónico

LNA: Ácido nucleico cerrado

ADNc: Ácido desoxirribunucleico complementario

ARN: Ácido ribonucleico

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RT-PCR: Transcripción reversa PCR

ISH: Hibridación *in situ*

DEPC: Dietilpirocarbonato

PFA: Paraformaldehido

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

PLK1: Quinasa tipo polo 1

IF: Inmunofluorescencia

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción acoplado a enzima

MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos

ERK 1/2: Quinasa regulada por señales extracelulares 1/2

TGF β : Factor de crecimiento transformante beta

EGF: Factor de crecimiento epidermal

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

FT: Ferritina

MTF: Melanotransferrina

RNR: Ribonucleótido reductasa

G: gravedades

SD: Desviación estándar

WNT: Proteína "*Wingless/Integrated*"

Resumen

La neurocisticercosis racemosa es una enfermedad agresiva causada por la expansión y proliferación aberrante de la membrana del quiste de *Taenia solium* dentro del espacio subaracnoideo del cerebro humano causando un efecto masa en el tejido nervioso e inflamación crónica. Considerando que el crecimiento es consecuencia de la proliferación de la pared quística del parásito, no existe evidencia directa reportada que apoye este postulado. Cestodes caracterizados por ser altamente proliferativos presentan un tipo de células totipotentes indiferenciadas denominadas células germinativas y se ha demostrado su participación en el crecimiento y desarrollo de los quistes. Se piensa que las células germinativas serían las responsables del desarrollo y crecimiento anormal del quiste racemoso.

En este trabajo, caracterizamos parcialmente la pared quística del cisticerco racemoso de *T. solium* y demostramos la presencia de células proliferativas, estas células están ausentes en la pared quística del cisticerco vesicular. Las células proliferativas presentan una morfología similar a las células germinativas descritas en otros cestodes y expresan altos niveles de la proteína quinasa tipo polo 1 (*plk1*). Establecimos un sistema de cultivo *in vitro* de células proliferativas y demostramos que las células aisladas de quistes racemosos son sensibles a la acción de la hormona insulina.

Adicionalmente, evaluamos puntualmente la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y demostramos que en los quistes racemosos presentan esta vía activada (fosforilada).

Procedimos a evaluar *in vitro* e *in vivo* la acción anti-proliferativa de la droga metformina empleando el sistema de cultivo celular y el modelo murino de cisticercosis con *Taenia crassiceps*. Observamos que la metformina disminuye la proliferación celular reduciendo los niveles de fosforilación de la quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (ERK 1/2).

Finalmente, evaluamos el metabolismo del hierro del parásito y observamos en la pared quística del cisticerco racemoso depósitos de hierro. Adicionalmente, los niveles de expresión de dos proteínas de unión a hierro (*ferritina* y *melanotransferrina*) y la *ribonucleótido reductasa* se encuentran sobre-expresados en la forma racemosa.

Estos resultados confirman que el quiste racemoso presenta características celulares, moleculares y metabólicas únicas, estrechamente ligadas a la presencia de células germinativas en su pared quística. Las células germinativas constituyen un novedoso blanco terapéutico que puede permitir la evaluación de nuevos fármacos para el tratamiento de la neurocisticercosis racemosa.

Palabras clave: neurocisticercosis, *Taenia solium*, células germinativas, quiste racemoso

Summary

Racemose neurocysticercosis is an aggressive disease caused by the aberrant expansion of the cyst form of *Taenia solium* within the subarachnoid space of the human brain and spinal cord resulting in a mass effect and chronic inflammation. Although expansion is likely caused by the proliferation and growth of the parasite bladder wall, there is little direct evidence of the mechanisms that underlie these processes. Studies in highly proliferative cestodes demonstrate the participation of undifferentiated totipotent cells called germinative cells in the growth and development of cysts. Germinative cells would be responsible for the abnormal growth and development of the racemose cyst.

In this work, we partially characterize the bladder wall of the racemose cyst of *T. solium* and demonstrate the presence of proliferative cells. These cells are absent in the bladder wall of the vesicular cyst. Proliferative cells present morphology similar to germinative cells described in other cestodes and express high levels of polo like kinase 1 (*plk1*). We established an *in vitro* culture system of proliferative cells and demonstrated that cells isolated from racemose cysts are sensitive to the action of the hormone insulin.

In addition, we evaluated the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway and demonstrated that the racemose cysts have active (phosphorylated) this pathway. We proceeded to evaluate *in vitro* and *in vivo* the anti-proliferative action of the drug metformin using the cell culture system and the murine model of cysticercosis with *Taenia crassiceps*. We observed

that metformin decreases cell proliferation by reducing the phosphorylation levels of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK 1/2).

Finally, we evaluated the iron metabolism of the parasite and observed iron deposits in the bladder wall of the racemose cyst. Additionally, the expression levels of two iron-binding proteins (*ferritin* and *melanotransferrin*) are overexpressed in the racemose form.

These results confirm that the racemose presents unique cellular, molecular and metabolic characteristics, closely linked to the presence of germinative cells in the bladder wall. Germinative cells constitute a novel therapeutic target that may allow the evaluation of new drugs for the treatment of racemose neurocysticercosis.

Key words: neurocysticercosis, *Taenia solium*, germinative cells, racemose cyst.

Capítulo 1: Introducción General

1.1 Origen y clasificación taxonómica de *Taenia solium*

Los platelmintos o gusanos planos dorso-ventrales se caracterizan por ser acelomados, presentan simetría bilateral son comúnmente hermafroditas que carecen de sistema respiratorio y circulatorio además presentan un sistema excretor primitivo de protonefridios basado en células flamígeras. Los primeros estudios filogenéticos (1) se basaron en características morfológicas y ecológicas; sin embargo, actualmente se emplean características moleculares. Los platelmintos incluyen a más de 20,000 especies clasificadas en 17 grupos, que incluyen a la clase Cestoda y a la subclase Eucestoda. La clase Cestoda representa uno de los grupos de helmintos parásitos más exitosos con aproximadamente 5000 especies clasificadas en 740 géneros (2, 3). (Fig. 1).

Taenia solium, es un parásito platelminto de la clase Cestoda, subclase Eucestoda, orden Cyclophyllidea y familia Taeniidae. El gusano adulto presenta un órgano de anclaje denominado escólex que posee cuatro ventosas y una corona de 22-32 ganchos (rostelo), y un estróbilo o cuerpo alargado y segmentado. Cada segmento o proglótido desarrolla órganos sexuales masculino y femenino que producen miles de huevecillos que son liberados al medio ambiente a través del poro genital (2-6).

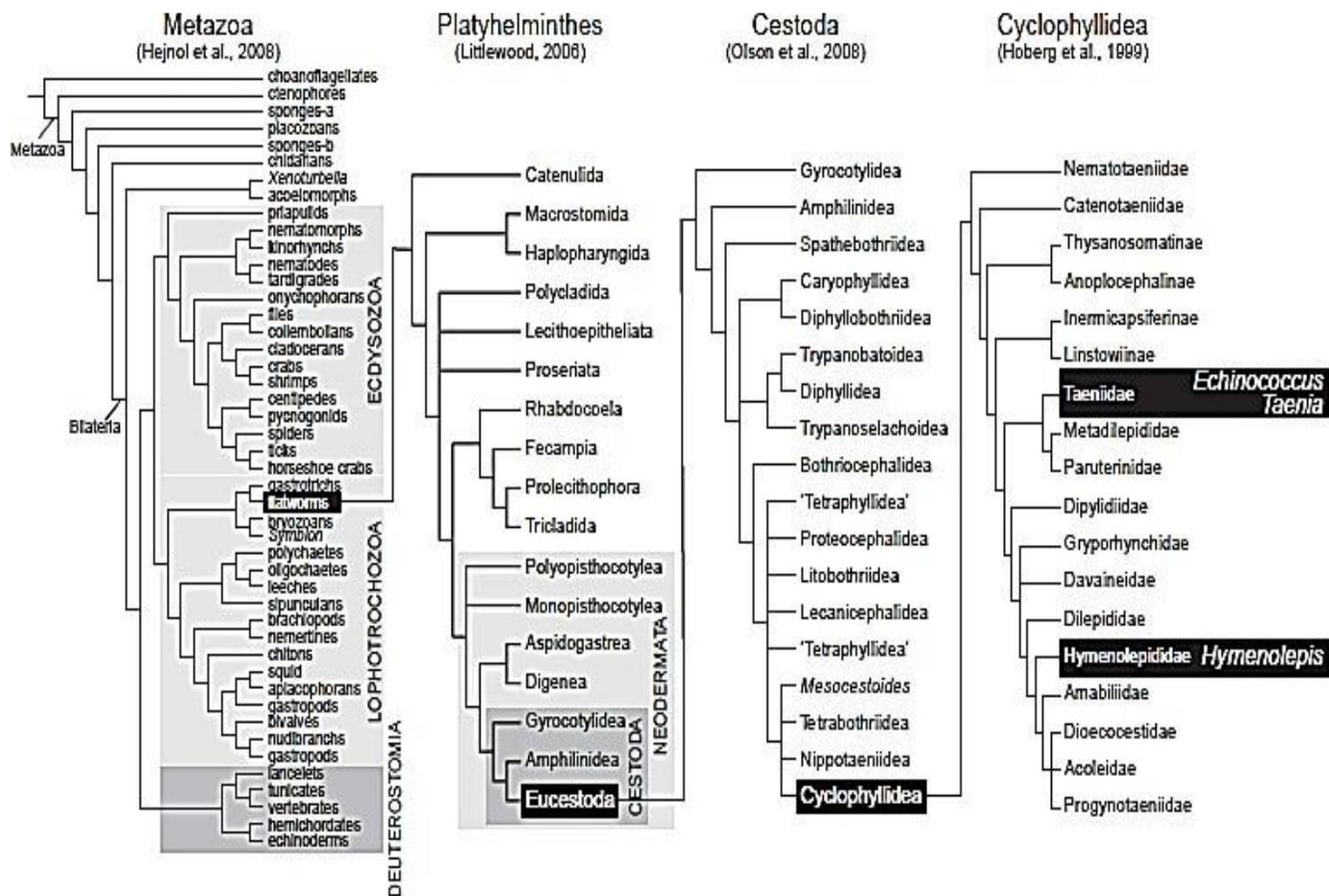


Figura 1: Ubicación filogenética de *Taenia solium*. Tomado de Olson et al. 2012 (2).

1.2 Ciclo biológico de *Taenia solium*

T. solium presenta un ciclo de vida complejo que incluye a dos hospederos mamíferos: el cerdo y el ser humano. El ser humano constituye el único hospedero definitivo, en cuyo intestino se desarrolla y habita la forma adulta del parásito, infección conocida como teniasis. Adicionalmente, el ser humano constituye el más importante reservorio y diseminador del parásito, mientras que el cerdo actúa como hospedero intermediario al portar los estadios larvales denominados quistes o cisticercos. Accidentalmente el ser humano también puede actuar como hospedero intermediario por contaminación fecal (4) (Fig. 2).

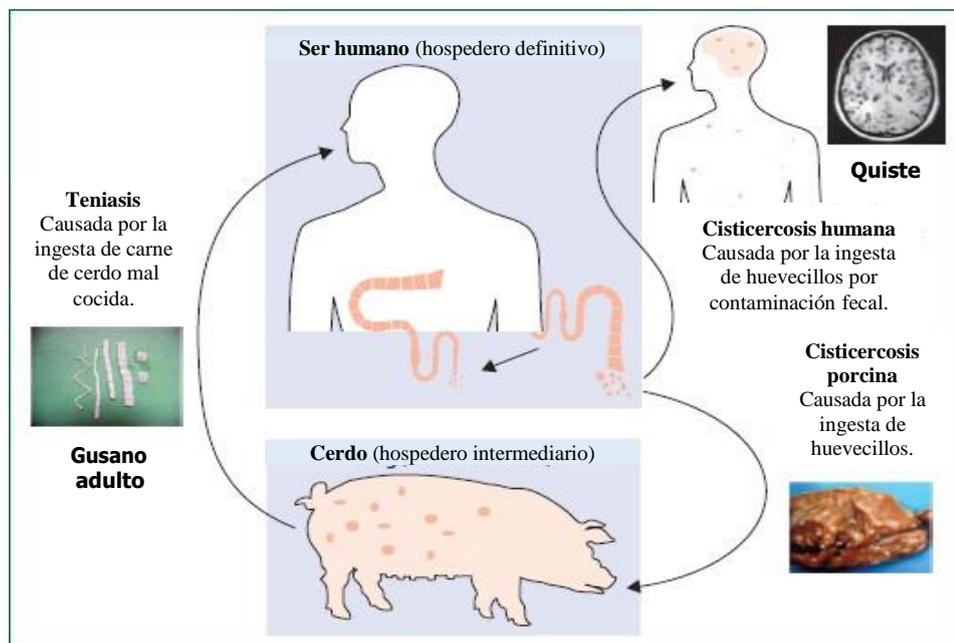


Figura 2: Ciclo biológico de *Taenia solium*. Tomado de Garcia et al.2014 (5).

1.3 Etapas de desarrollo en *T. solium*

Durante su ciclo de vida, el parásito presenta las siguientes etapas (6):

Huevo: Esta etapa es la responsable de la diseminación en el medio ambiente.

Los huevos de *T. solium* son microscópicos, de forma esférica, presentan una cobertura o cáscara externa delicada, y en su interior aloja al embrión hexacanto u oncosfera cubierto por una membrana gruesa, opaca, parduzca denominada embrióforo. El embrióforo protege a la oncosfera de varias condiciones ambientales desfavorables pero es fácilmente eliminado cuando llega al intestino del hospedero intermediario por la acción de las enzimas digestivas y del pH ácido.

Oncosfera: Larva o embrión globular, de unos 30 μm de diámetro y armada con 3 pares de ganchos; de ahí proviene el nombre de embrión hexacanto. La oncosfera libera enzimas proteolíticas que le permiten penetrar la mucosa intestinal, alcanzar el torrente sanguíneo, y migrar a órganos o tejidos internos del hospedero intermediario.

Cisticerco: Vesícula que contiene el escólex invaginado y que se aloja en los tejidos del hospedero intermediario. Es de forma ovoide que varían en tamaño desde unos milímetros hasta 1-2 cm de diámetro, la pared quística se caracteriza por presentar diversas regiones. La región externa o tegumento permite la absorción de nutrientes y excreción de metabolitos; presenta prolongaciones características denominadas microtrichas. En las regiones internas se encuentran fibras musculares, fibras de colágeno, corpúsculos calcáreos, células llamadas citones, células flamíferas y ductos.

Pre-adulto: Etapa comprendida entre el cisticerco y el adulto. Cuando los cisticercos presentes en carne de cerdo mal cocida, son ingeridos por el hospedero definitivo, el escólex evagina para adherirse a la mucosa intestinal empleando sus ventosas y ganchos, luego el parásito pierde la pared quística y crece a partir del cuello hasta desarrollar al adulto. Este crecimiento toma aproximadamente dos meses.

Adulto: Etapa reproductiva del parásito. El gusano presenta el escólex, un cuello alargado y el estróbilo, constituido por 700-1000 proglótidos. Los proglótidos pueden ser inmaduros o maduros, según su tamaño, forma, desarrollo de órganos reproductivos y el contenido de huevecillos. Cada proglótido maduro puede llegar a producir hasta 50 000 huevecillos. Cuando los proglótidos y huevecillos son liberados al ambiente e ingeridos por un nuevo hospedero intermediario, el ciclo biológico se completa (6).

1.4 Enfermedades causadas por *T. solium*

1.4.1 Teniasis

La teniasis, o infección con el parásito adulto, ocurre solo en el ser humano y en general, no produce síntomas (7). El ser humano desarrolla la teniasis luego de consumir carne de cerdo mal cocinada infectada con los quistes (4, 6). Luego de ser ingeridos, el escólex provisto de ventosas y una corona de ganchos evagina a nivel del intestino delgado y se ancla fuertemente a la mucosa intestinal, el estróbilo empieza a crecer hasta desarrollar el gusano adulto logrando alcanzar una longitud de 2-4 metros.

Luego de dos meses de la infección, los huevecillos o proglótidos maduros son eliminados a través de las heces (4, 6). La teniasis causa muy poca inflamación en la zona de anclaje; no genera un daño perceptible al tejido intestinal. Algunos de los malestares atribuidos a la teniasis son: dolor abdominal, distensión, diarrea o náuseas, aunque la mayoría de los pacientes no los presentan (7).

1.4.2 Cisticercosis

La cisticercosis es la infección con larvas o quistes de *T.solium*, ocurre luego de ingerir los huevecillos liberados al medio ambiente a través de las heces de personas con teniasis (4). En áreas con pobres sistemas sanitarios, los cerdos tienen acceso a las heces humanas; el ser humano también puede infectarse al consumir alimentos o agua contaminada con heces, o auto-infectarse por la vía fecal-oral, si es portador del gusano adulto. Luego de ser ingeridos, los huevecillos eclosionan en el intestino (humano o porcino) gracias a la acción del ácido gástrico, enzimas digestivas y fluidos intestinales, liberando a la oncosfera (6).

La oncosfera secreta enzimas proteolíticas, penetra la mucosa intestinal y alcanza el torrente sanguíneo para luego diseminarse a todo el organismo infectando músculos y diversos órganos. Las manifestaciones clínicas dependen del órgano infectado (5).

1.4.3 Neurocisticercosis

La neurocisticercosis (NCC) es el nombre que recibe la infección del sistema nervioso central (SNC) con los quistes de *T. solium* (4). La NCC es endémica en varios países en América Latina, África, Asia e India, en los cuales las condiciones de crianza de cerdos bajo pobres condiciones de salubridad e higiene permiten que se cumpla todo el ciclo biológico del parásito (Fig. 3). La NCC se ha convertido en un problema de salud pública en los países desarrollados debido a la migración de personas con teniasis provenientes de zonas endémicas (5).

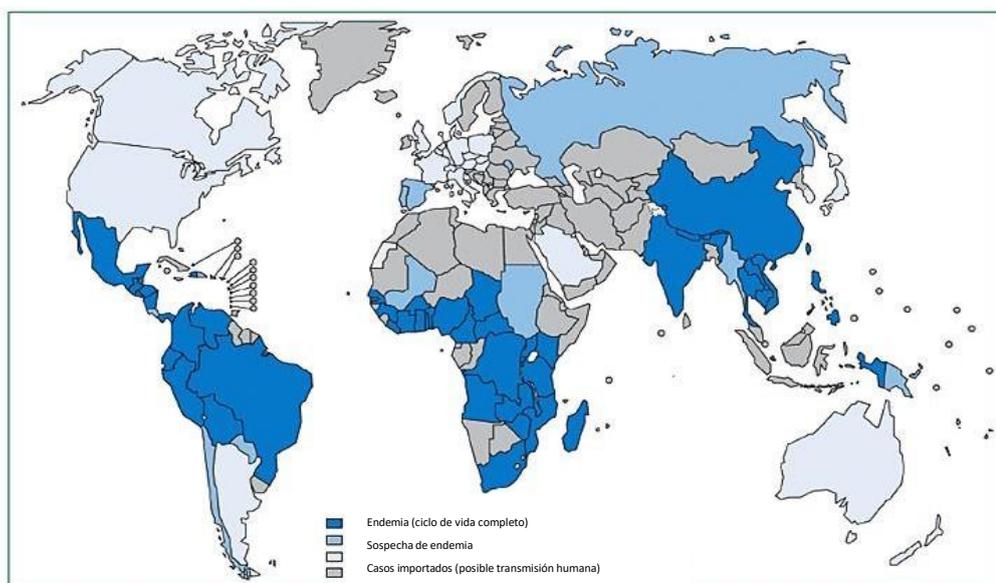


Figura 3: Prevalencia geográfica de *Taenia solium*. Tomado de Garcia et

La localización más común de los quistes o cisticercos es el parénquima cerebral, principalmente entre la unión de la materia gris con la blanca. Además se pueden hallar quistes en los ventrículos, espacio subaracnoideo, cisternas basales y columna vertebral (4).

La morfología de los quistes varía de acuerdo a su viabilidad e integridad. Quistes viables presentan una membrana traslúcida en donde el escólex es visible como un pequeño nódulo de 2-3 mm. Cuando el quiste empieza a degenerar por causas naturales o luego de administrarse drogas antihelmínticas, el fluido vesicular se vuelve opaco, denso y los bordes del quiste se tornan irregulares (4, 6).

1.5 Respuesta inmunológica e inflamación durante la NCC

Los quistes viables pueden o no generar una respuesta inmunológica en el tejido circundante del hospedero. Los cisticercos localizados en el parénquima cerebral permanecen aislados y protegidos del sistema inmunológico por la barrera hematoencefálica (BHE) (8). Estudios previos demuestran el establecimiento de mecanismos para la evasión inmunológica por parte del parásito, por ejemplo, mediante la secreción de antígenos capaces de inhibir la cascada del complemento (9). Luego de un periodo prolongado de varios años e incluso décadas (8), el parásito degenera produciendo un cuadro inflamatorio caracterizado por estar rodeado de un granuloma formado por una densa capa fibrosa rica en colágeno, células gigantes multinucleadas, las células más abundantes son macrófagos, linfocitos T CD3/CD8⁺, células plasmáticas y en menor proporción linfocitos T CD3/CD4⁺. Adicionalmente se observan eosinófilos, neutrófilos, mastocitos, activación y proliferación de la microglia, astrogliosis y posterior formación de cicatriz glial, edema, degeneración neuronal y una fuerte respuesta periférica caracterizada por un perfil mixto de

citoquinas Th1/Th2 (IL-12, INF- γ / IL-4, IL-13) y citoquinas pro-inflamatorias (IL-8, TNF- α) (10).

El proceso de neuroinflamación se encuentra estrechamente ligada a la generación de cuadros de convulsiones y epilepsia, que constituyen los síntomas clínicos más importantes de la NCC (11). El quiste también causa síntomas debido a un efecto de masa al ejercer presión y desplazamiento del tejido circundante o por obstruir el flujo del líquido cefalorraquídeo (LCR).

1.6 Patología de la NCC

La NCC es en muchos casos asintomática, pero cuando los síntomas se presentan suelen ser muy heterogéneos debido a la localización anatómica de las lesiones, a la carga parasitaria en el sistema nervioso, así como a la intensidad de la respuesta inmunológica (12-14). Los cuadros de epilepsia ocurren en el 50-80% de los pacientes con quistes cerebrales parenquimales o calcificaciones pero es menos frecuente en otras formas de NCC. Otras manifestaciones relevantes son hipertensión intracraneal, hidrocefalia o ambos en el 20-30 % de los casos (15). En el Perú existen zonas rurales donde se ha reportado que, en adultos, el 10% de los casos de epilepsia adquirida están directamente asociados a NCC (16).

Los quistes localizados en espacios subaracnoideos producen aracnoiditis difusa o local, causando hidrocefalia por la obstrucción mecánica del LCR o como resultado de ventriculitis y cicatrización (15).

En la NCC intraventricular el parásito es único y está libre dentro de la cavidad, es poco frecuente que el quiste se mueva de un ventrículo a otro. Los quistes son más frecuentes en el cuarto ventrículo, menos común es encontrarlos en el tercero y aún menos, en los ventrículos laterales (15). Parásitos intraventriculares pueden bloquear el LCR o producir inflamación del endotelio y plexos coroides.

1.7 Tratamiento y control de la NCC

El tratamiento de la NCC se realiza administrando fármacos antihelmínticos como el praziquantel o albendazol en combinación con antiinflamatorios corticoides como la dexametasona (5, 7). Los antiparasitarios destruyen a los quistes liberando una gran cantidad de antígenos que exacerban la respuesta inflamatoria, sin embargo la acción de los antiinflamatorios reduce estos efectos (5, 7).

Se han ejecutado diversos programas dirigidos a controlar la transmisión como el tratamiento contra la teniasis (17), tratamiento combinado de la teniasis y la cisticercosis porcina (18, 19), la administración de vacunas en cerdos (20) y planes de saneamiento e intervenciones educativas (21). Sin embargo, las conclusiones sobre la eficacia de estos programas se han visto limitadas por realizarse un seguimiento a pequeña escala.

1.8 Neurocisticercosis racemosa

La NCC racemosa es la forma menos común pero de mayor gravedad de la NCC extraparenquimal, ocurre cuando el quiste se desarrolla en la región subaracnoidea basal, en cisternas basales o la fisura de Silvio del cerebro (22).

La NCC racemosa se caracteriza por la presencia de una forma aberrante y proliferativa del parásito, que alcanza varios centímetros de diámetro, compuesta de múltiples vesículas interconectadas, formadas por una membrana translúcida, delicada y delgada (23). El quiste carece de escólex lo que resulta en una larva anormal y estéril (23). Como su apariencia se asemeja a la de un racimo de uvas recibe el nombre de quiste racemoso.

La NCC racemosa está asociada a un desplazamiento del tejido nervioso circundante, a una intensa reacción inflamatoria, fibrosis, engrosamiento de la leptomeninge en el tronco del cerebro, hidrocefalia, hipertensión intracraneal y meningitis; es clínicamente más agresiva que la forma parenquimal. La prevalencia exacta de la NCC racemosa se desconoce pero se presume que oscila en el 15-20% de los pacientes (23, 24). El cuadro resultante es un aumento de la tasa de mortalidad de alrededor del 50% (22).

El tratamiento de la NCC racemosa requiere la administración de fármacos antihelmínticos en combinación con anti-inflamatorios, comúnmente corticoesteroides, por largos periodos de tiempo para controlar la respuesta inflamatoria y la infección parasitaria (25).

Los eventos a nivel celular, molecular y metabólicos que promueven o favorecen el desarrollo y la proliferación del quiste racemoso aún no son comprendidos por completo. El quiste racemoso solo puede ser obtenido mediante intervención quirúrgica a los pacientes y la remoción del parásito solo es posible en algunos casos. Cuando el parásito se localiza en una región anatómica de difícil acceso o compromete la integridad de arterias o venas, la intervención es de alto riesgo para el paciente y no se realiza. La disponibilidad de material biológico es por lo tanto la principal limitante para estudiar y comprender la biología del quiste racemoso.

1.9 Justificación del estudio

Durante su desarrollo y crecimiento descontrolado en el espacio subaracnoideo, el quiste racemoso de *T. solium* responde a diversas señales o estímulos externos provenientes de su microambiente así como a señales internas; sin embargo los eventos o cambios a nivel celular, molecular y metabólicos responsables en el desarrollo y proliferación de esta forma aberrante de cisticerco son poco entendidos y estudiados.

La identificación de los eventos asociados al crecimiento continuo del quiste racemoso permitirá aprovechar estas características biológicas para múltiples fines incluyendo la identificación de moléculas con potencial diagnóstico o la evaluación de nuevos fármacos y tratamientos que contribuyan en el control de la infección y aumentar la efectividad de los tratamientos actuales. El presente proyecto exploratorio constituye el primer estudio dirigido a comprender las bases biológicas del quiste racemoso asociadas a su continuo crecimiento.

1.10 Objetivos generales del estudio

El objetivo general de esta tesis fue caracterizar parcialmente a nivel celular y molecular la pared quística del cisticerco racemoso de *T. solium*.

Los objetivos específicos fueron:

- Caracterizar histológicamente los componentes celulares de la pared quística del cisticerco racemoso.
- Identificar vías de señalización asociadas al desarrollo o crecimiento del cisticerco racemoso.
- Identificar genes con expresión diferencial en el cisticerco racemoso.
- Identificar cambios en el metabolismo del hierro en el cisticerco racemoso.

1.11 Aspectos éticos

Los protocolos para el uso de animales empleados en el presente estudio fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética Institucional para el uso de animales de la Escuela de Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (número de protocolo 006) y de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (SIDISI 62392 y 101250). Adicionalmente, se obtuvo la aprobación para el uso de muestras de quistes racemosos por parte del Comité de Ética del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN) (242-2018-DG-INCN).

Capítulo 2

Identificación y cultivo de células proliferativas de quistes racemosos de *Taenia solium*

2.1 Introducción

La naturaleza del quiste racemoso es poco estudiada y comprendida. El parásito presenta largos periodos de incubación para su desarrollo, alrededor de 1.5 a 2 décadas (25) y se postula que a medida que el escólex degenera la proliferación de la pared quística y vesículas aumenta. La teoría más aceptada que intenta explicar su origen propone una degeneración hidrópica, es decir, la degeneración del escólex como consecuencia del ingreso de grandes volúmenes de agua (26), sin embargo, esta teoría no es consistente con la histología previamente reportada del quiste racemoso que indica una organización aberrante comparado con el quiste vesicular parenquimal (23).

Estudios realizados en diferentes especies de parásitos han evidenciado una población de células madre denominadas células germinativas que participan en el crecimiento y dirigen la transición entre los diferentes estadios de los cestodes (26, 27). Adicionalmente, las células germinativas se describen como las únicas mitóticamente activas, auto renovables y con la capacidad de diferenciarse a cualquier tipo de célula somática. Las funciones biológicas de las células germinativas son poco comprendidas y su estudio es limitado debido a que los cestodes presentan ciclos de vida complejos que involucran a más de un hospedero (29).

Estudios publicados en *Echinococcus multilocularis* reportan un serie de marcadores celulares que permiten identificar células germinativas tales como la proteína quinasa tipo polo 1 (PLK1) (27), la proteína argonauta 2 (ARGO2), la proteína nanos (NANOS) (31), y un retrotransposon en miniatura de repetición terminal (TRIM) (32). En particular, *plk1* es expresado en la fase G2 tardía de la mitosis y meiosis.

Taenia crassiceps es un parásito cercano a *T. solium* cuyo estadio adulto se desarrolla en el intestino de cánidos y su cisticerco o quiste se encuentra presente en roedores, los cuales adquieren la infección luego de ingerir huevos presentes en las heces del hospedero definitivo (33). Debido a que el quiste de *T. crassiceps* prolifera normalmente de forma asexual por brotes, una gran cantidad de quistes pueden ser producidos en la cavidad peritoneal de ratones y así disponer del material biológico para mayores investigaciones (33). Células aisladas de fragmentos de la pared quística de *T. crassiceps* fueron capaces de regenerar el quiste, estos hallazgos sugieren la participación de las células madre en la proliferación de la membrana durante la formación y desarrollo de los nuevos quistes para la supervivencia del parásito dentro del hospedero (28).

Previamente, identificamos células proliferativas en el quiste vesicular de *T. solium*, estas células estuvieron limitadas a la región del cuello del escólex, que es la ubicación esperada para las células germinativas ya que los proglótidos se forman a partir de esta región (34). En el presente estudio evaluamos la presencia de células germinativas en la pared quística del cisticerco racemoso y

vesicular, evaluando la expresión de *plk1* y la fosforilación de la histona H3 como marcadores de proliferación. Adicionalmente, establecimos un protocolo para el aislamiento y cultivo de células proliferativas y procedimos a evaluar la acción de la hormona insulina en los cultivos celulares.

2.2 Objetivos

- Caracterizar histológicamente la pared quística del cisticerco racemoso de *T. solium*.
- Evaluar la viabilidad de la pared quística de los cisticercos racemosos.
- Identificar células proliferativas en la pared quística del cisticerco racemoso de *T. solium*.
- Establecer cultivos primarios de células germinativas de cisticercos racemosos de *T. solium*.
- Evaluar la acción de la hormona insulina en las células germinativas.

2.3 Metodología

2.3.1 Diseño experimental

Se empleó un total de seis muestras de quiste racemoso y doce vesiculares. Secciones de las muestras de quistes racemosos y seis quistes vesiculares fueron empleados para la identificación *in situ* de las células germinativas y observar la distribución de esta población celular en ambas formas del parásito. Secciones adicionales de los quistes racemosos y seis quistes vesiculares adicionales fueron empleados para el aislamiento del ARNm total. Adicionalmente, secciones de quistes racemosos fueron empleados para

establecer cultivos celulares primarios. Quistes de *T. crassiceps* de la cepa ORF fueron empleados como controles para los ensayos de hibridación y para estandarizar el protocolo de aislamiento celular. Un diagrama esquemático se muestra en la Figura 1.

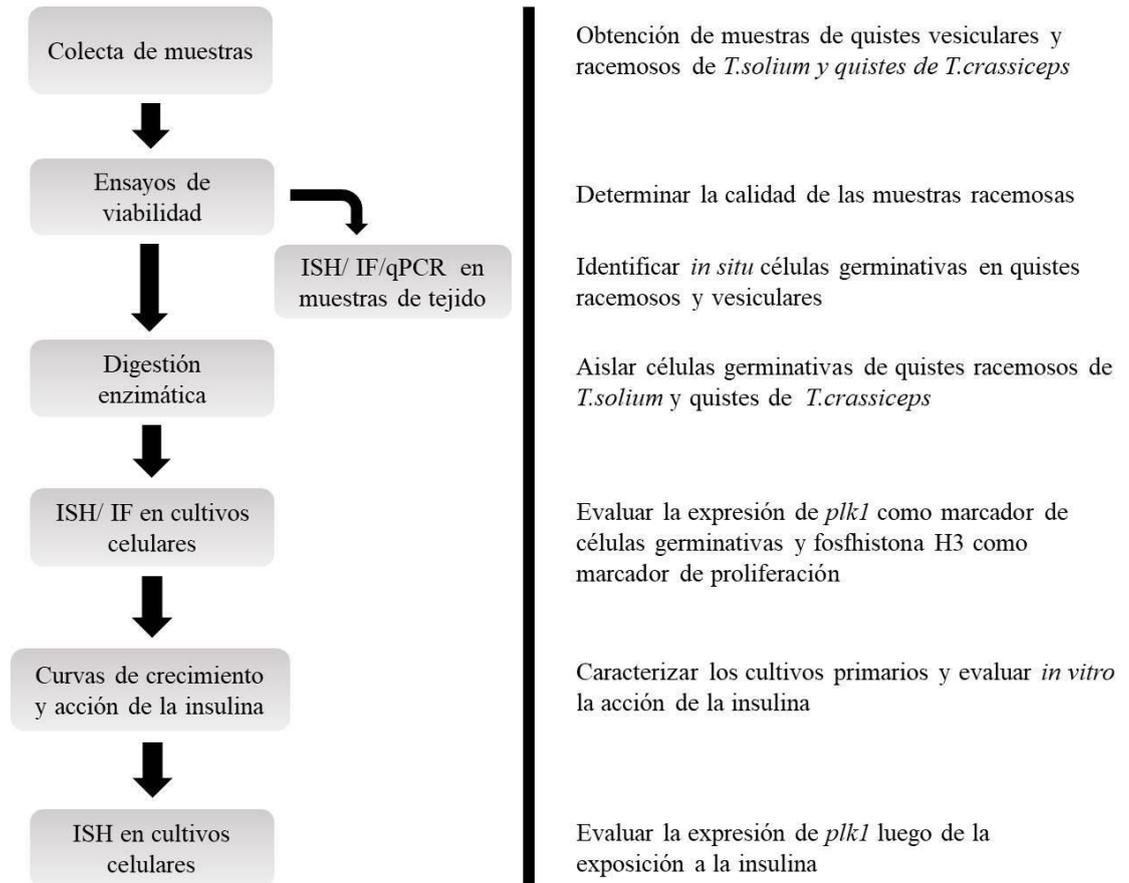


Figura 1: Representación esquemática mediante diagrama de flujo del estudio. Los procesos desde la colecta de muestras hasta el establecimiento de los cultivos primarios (izquierda) y el racional de cada uno de los pasos (derecha). ISH: hibridación *in situ*; IF: inmunofluorescencia; FFPE: fijado en formalina-embestado en parafina.

2.3.2 Colecta de muestras

Los remanentes de la pared quística de cisticercos racemosos extraídos luego de la cirugía fueron colectados de pacientes en la sala de operaciones del INCN y transportados al laboratorio en buffer fosfato salino estéril (PBS; pH 7.4; Gibco-Invitrogen, Gaithersburgs, MD). El origen de las muestras se mantuvo en el anonimato removiendo de los frascos cualquier identificación personal del paciente.

Las muestras de quistes vesiculares fueron obtenidas de cerdos naturalmente infectados de una zona endémica del Perú siguiendo los protocolos previamente publicados (35). Los quistes fueron removidos del músculo esquelético y transportados al laboratorio en PBS pH 7.4 suplementado con antibióticos penicilina (100 U/ml), estreptomina (100 µg/ml.) (Gibco-Invitrogen, Gaithersburg, MD).

Quistes de *T. crassiceps* de la cepa ORF fueron proporcionados por el Dr. Theodore Nash (Laboratorio de Enfermedades Parasitarias, NIAD, NIH, EE.UU) y se procedió de acuerdo a los protocolos de Robinson (33). Ratones hembra de seis semanas de la cepa BALB/c fueron inoculadas vía intraperitoneal con 10 quistes de *T. crassiceps* suspendidos en medio RPMI 1640. Luego de 3 meses, los animales fueron sacrificados y los quistes se colectaron de la cavidad abdominal en condiciones de esterilidad.

2.3.3 Ensayos de viabilidad

Las muestras de quiste racemoso fueron lavadas dos veces con PBS estéril y una vez con medio RPMI 1640 suplementado con 10 mM de HEPES (Gibco), 100 U/ml de penicilina, 100 g/ml de estreptomycin y 0.25 g/ml amfotericina B; todos de Gibco-Invitrogen, Gaithersburg, MD) y se dejaron estabilizar por 1 h a 37°C a 5% CO₂. La viabilidad de las muestras fue evaluada empleando el reactivo Mitotracker Red CM-H₂Xros (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) siguiendo las recomendaciones de manufactura. Las muestras fueron incubadas por 30 min en medio RPMI 1640 con 500 mM de Mitotracker; luego, lavadas con PBS y teñidas con azul de metileno al 1% por 30 segundos. Las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS para eliminar el exceso de la solución y se observaron con microscopio confocal a una longitud de onda de 599 nm. Secciones viables positivas a Mitotracker fueron fijadas en formalina e incluidas en parafina para los estudios histológicos, otras se emplearon para el aislamiento celular y otras fueron preservadas en RNAlater (Qiagen) a -70°C.

2.3.4 Hibridación *in situ* (ISH) en muestras de tejido

Se diseñaron y sintetizaron sondas de tipo LNA marcadas con digoxigenina para los genes *plk1*; (5'TGTCTGACTCTCGACGTACGAT-3') y *actina* (5'-ATCTGCTGGAAGGTGGAGAGT-3') (Qiagen/Life Technologies, Gaithersburg, MD) empleando las secuencias de los genes *plk1* (TsM_001148400) y *actina* (TsM_000357600) anotadas en el genoma de *T. solium* (GeneDB, <https://www.genedb.org/#/species/Tsolium>) (36). Se empleó una sonda sentido del gen *plk1* como control y se incluyó en todos los

experimentos. La secuencia de *plk1* es de 1806 bp y codifica una proteína de 601 aa con una identidad de 89 % and 88% a las secuencias de *E. multilocularis* y *E. granulosus*, respectivamente. Las muestras embebidas en parafina fueron cortadas en secciones de 4 μ m y colocadas en láminas portaobjetos tratadas con poli-L-lisina y se procesaron según el protocolo de Solana (37). Todas las soluciones fueron preparadas antes de su uso y el agua empleada fue tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) para eliminar cualquier contaminación. Las secciones fueron desparafinadas a 56°C, rehidratadas en una batería de alcoholes en proporciones decrecientes (100% a 70%), permeabilizadas en buffer citrato (10 mM de ácido cítrico, 0.05% de Tween 20, pH 6.0) a 95°C por 30 min, luego incubadas en 0.2M de HCL, post fijadas en 4% de PFA/PBS por 20 min, incubadas dos veces en 0.1M de trietanolamina por 5 min y luego incubadas en 0.25% y 0.5% de anhídrido acético por 15 min cada uno.

Las secciones fueron incubadas 1 h a 56°C en buffer de pre-hibridación (50% de formamida, 5X SSC, 0.1% de Tween 20, 1 mg/ml de ARN de levadura, 10 mM de DTT, 0.1 mg/ml de heparina). Para la hibridación, las muestras fueron incubadas a 56°C por toda la noche en buffer de hibridación (10 % de sulfato de dextrano en buffer de pre-hibridación) con la sonda diluida a una concentración de 0.5 ng/ μ l., luego lavadas cuatro veces con buffer de lavado (50% de formamida, 5X de SSC, 0.1% de Tween 20) a 56°C por 15 min y cuatro veces a temperatura ambiente por 10 min con buffer MAB (99.4 mM de ácido maleico, 167 mM de NaCl, 0.1% de Triton x-100, pH 7.5) (37).

Las muestras fueron incubadas con buffer de bloqueo (Buffer MAB, 1% de BSA y suero de oveja) por 30 min a temperatura ambiente, incubadas a 4°C por toda la noche con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (AP) (Roche, Basel, Switzerland) diluido 1/500 en buffer de bloqueo, luego lavadas seis veces con buffer MAB por 15 min, incubadas en TMN por 5 min y finalmente reveladas con una solución de NBT/BCIP (Roche, Basel, Switzerland) (37). Las láminas fueron observadas con un microscopio de luz (Primo Star, Zeiss, Oberkochen, Germany) y las imágenes tomadas con una cámara calibrada (AxioCam ICc1, Zeiss, Oberkochen, Germany) empleando el software AxioVision (versión 4.6, Zeiss, Oberkochen, Germany).

2.3.5 Inmunofluorescencia (IF) para histona H3 fosforilada

Secciones de las muestras colocadas en láminas portaobjetos se desparafinaron y rehidrataron de forma similar a lo detallado en la hibridación, luego sumergidas en buffer citrato 10 mM (10 mM ácido cítrico, 0.05% de Tween 20, pH 6.0) a 95°C por 30 min, incubadas por 30 min con solución de bloqueo (PBS pH 7.2, 0.05% de Tween 20, 0.1 % de Triton X-100, 2% de suero de cabra, 2% de BSA) a temperatura ambiente en cámara húmeda, luego incubadas a 4°C por toda la noche con un anticuerpo policlonal anti fosfohistona H3 (Ser 10) hecho en conejo (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) diluido 1/800 en PBS, lavados tres veces por 2 min con solución de lavado (PBS pH 7.2, 0.05% de Tween 20) y luego incubados a temperatura ambiente por 30 min con un anticuerpo policlonal anti IgG de conejo (H+L) hecho en cabra marcado con fluoresceína (Jackson ImmunoResearch Lab,

West Grove, PA) diluido 1/500 en PBS. Las secciones fueron lavadas con PBS y cubierta con solución de montaje conteniendo DAPI (VectaShield, Vector, Laboratories, Burlingame, Ca). La línea celular humana U251 fue incluida como control de proliferación. Se tomaron imágenes empleando microscopio confocal (Zeiss, LSM880, Oberkochen, Germany).

2.3.6 Generación de ADN complementario (ADNc) y PCR cuantitativa (qPCR)

La qPCR se realizó empleando el ARN total de seis quistes racemosos y seis vesiculares. La pared quística y el escólex de los quistes vesiculares fueron separadas empleando un bisturí para aislar el ARN total de cada estructura por separado. Las muestras fueron homogenizadas en 1 ml de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se procedió con el aislamiento según protocolo del producto. La concentración fue determinada usando un espectrofotómetro UV (Nanodrop Productos, Wilmington, DE). El ADNc fue generado a partir de 500 ng de ARN total empleando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad con la polimerasa MultiScribe RT y cebadores aleatorios (Applied Biosystems, Foster City, CA) en un volumen final de 20 µl por reacción y empleando un protocolo de incubación de 10 min a 25°C luego 60 min a 37°C, 5 min a 95°C utilizando un termociclador SimpliAmp (Applied Biosystems, Foster City, CA). La qPCR fue realizada en volumen de 10 µl por reacción utilizando SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (BioRad Laboratories, Hercules, CA) con cebadores diseñados para *plk1* (TsM_001148400) (sentido: 5'-TCGACAATCTTGCCCGTAATC-3') (antisentido: 5'-GGTGTAGTCTTTATTCGCCTCTG-3')

y *gapdh* (TsM_000056400) (sentido: 5'-TCCAAGAGATGAATGCCAATGC-3') (antisentido: 5'-CAGAAGGAGCCGAGATGATGA-3'). La reacción de la qPCR se realizó por triplicado empleando los siguientes parámetros de ciclamiento: preincubación de 2 min a 50°C y 10 min a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 seg a 95°C y 1 min a 60°C en un sistema Lightcycler 96 (Roche, Basilea, Suiza). El escólex fue empleado como muestra calibradora y se expresaron los resultados como expresión relativa al gen endógeno *gapdh* utilizando la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (38).

2.3.7 Asilamiento de células y condiciones de cultivo

Las secciones de quistes racemosos de *T.solium* y quistes de *T.crassiceps* destinadas para el aislamiento celular fueron lavadas con PBS estéril suplementado con antibióticos: penicilina (100 U/ml), estreptomina (100 µg/ml) y anfotericina B (0.25 µg/ml; todos de la marca Gibco-Invitrogen) y se procedió según protocolo de Spiliotis (39) con modificaciones. Se agregaron 8 volúmenes de solución de tripsina (0.025%)/ EDTA (0.01%) y se incubaron por 15 min a 37°C, luego se agitó el tubo suavemente girándolo de lado a lado durante 3 min, el sobrenadante (solución primaria A) fue transferido a un tubo de 50 ml. Se agregaron 35 ml de PBS al tubo que contiene las membranas y nuevamente se agitó vigorosamente por 3 min, se colectó el sobrenadante (solución primaria B) y nuevamente se agregaron 35 ml de PBS, se agitó vigorosamente hasta que las membranas se vuelvan transparentes y queden flotando en la superficie y se colectó el sobrenadante (solución primaria C).

Las tres soluciones se juntaron y se centrifugaron a 400G por 5-10 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió con mucho cuidado el pellet con 5 ml de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal, 1 mM de piruvato de sodio, 0.01 mM de aminoácidos no esenciales, 0.2 % de glutamina, 1.6 μ M de mercaptoetanol, 25 mM de buffer HEPES, penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 μ g/ml) y anfotericina B (0.25 μ g/ml; todos de la marca Gibco-Invitrogen) y 2 g/L NaHCO₃. Las células fueron sembradas en placas de 12 pozos e incubadas a 37°C y 5% de CO₂. Las placas fueron observadas diariamente con un microscopio invertido (39).

2.3.8 Evaluación de antígenos excretorios/secretorios de *T.solium* en sobrenadante mediante ensayo por inmunoabsorción acoplado a enzima (Ag-ELISA)

Células aisladas de quistes racemosos y quistes de *T. crassiceps* fueron re suspendidas y sembradas en placas de 12 pozos en tres condiciones de densidad: baja densidad (< 100 células por pozo), media densidad (< 1000 células por pozo) y alta densidad (> 100000 células por pozo), incubadas por 48 horas a 37°C y 5% de CO₂ luego los sobrenadantes fueron colectados. Se empleó 100 μ l/pozo del anticuerpo monoclonal (TsW8) a una concentración de 2 μ g/ml para cubrir el fondo de las placas de 96 pozos (Nunc MaxiSorp) usando buffer carbonato-bicarbonato pH 9.6 (0.05 M de NaHCO₃/Na₂CO₃, Sigma, St. Louis, CA) a 37°C por 30 min. Luego, se agregó 100 μ l/pozo de solución de bloqueo (PBS pH 7.4, 0.05% de Tween-20 and 1% leche descremada) e incubada a 37°C por 30 min, lavada cinco veces con PBS pH

7.4, 0.05% Tween-20. Luego se agregó 100 µl de sobrenadante pre tratado con 5% de ácido tricloroacético (por duplicado), e incubadas a 37°C por 30 min en agitación constante. Luego de lavar cinco veces, se agregó 100 µl del anticuerpo monoclonal (TsW5-biotinilado a una concentración de 2 µg/ml en solución de bloqueo) e incubada a 37°C por 30 min en agitación. Luego de lavar cinco veces, se agregó 100 µl de estreptavidina diluida 1/10 000 en solución de bloqueo y se incubó a 37°C por 30 min en agitación y lavado cinco veces. Finalmente se agregó 100 µl de o-phenylenediamine (OPD/H₂O₂) diluido en buffer citrato e incubado en oscuridad por 15 min. La reacción fue detenida con 50 µl de H₂SO₄ 2N. La lectura de la densidad óptica (OD) se realizó empleando un lector de micro placas VersaMax ELISA (Molecular Devices), a 650 nm y los resultados se expresaron como OD ratio. Antígenos de excreción/secreción (E/S) fueron preparados siguiendo el protocolo previamente publicado (40) y empleados como controles positivos, usando 50 quistes vesiculares de *T. solium* y quiste racemoso.

2.3.9 Confirmación de la condición axénica de los cultivos celulares de *T. solium* mediante transcripción reversa PCR (RT-PCR)

Para detectar alguna posible contaminación con células del hospedero, se diseñaron cebadores específicos para el gen β-actina humano (NM_001101.5). El ARN total de tres cultivos celulares primarios de quistes racemosos fue aislado empleando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las concentraciones se determinaron empleando un espectofotómetro UV (Nanodrop Products, Wilmington, DE). Se generó el ADNc a partir de 500 ng de ARN total

empleando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad con la polimerasa MultiScribe RT y cebadores aleatorios (Applied Biosystems, Foster City, CA) en un volumen final de 20 µl por reacción y empleando un protocolo de incubación de 10 min a 25°C luego 60 min a 37°C, 5 min a 95°C utilizando un termociclador SimpliAmp (Applied Biosystems, Foster City, CA). La PCR se realizó empleando cebadores específicos (sentido: 5'-AGCCATGTACGTTGCTATCC-3') (antisentido: 5'-CGTAGCACAGCTTCTCCTTAAT-3') con un protocolo de 30 ciclos de 45 seg a 95°C, 45 seg a 57°C y 45 seg a 72°C. Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1%. El bromuro de etidio fue añadido al gel antes de la electroforesis a una concentración final de 0.5 µg/ ml, luego se realizó la electroforesis a 100V por 1 hora y se visualizó el gel bajo luz UV. Se generó ADNc a partir de células sanguíneas totales humanas y se utilizó como control positivo.

2.3.10 Curvas de crecimiento y evaluación de la acción de la insulina

El crecimiento celular fue evaluado para determinar el tiempo de duplicación de las células germinativas y evaluar la acción *in vitro* de la insulina. Células de tres cultivos primarios fueron resuspendidos y una alícuota de cada suspensión fue diluida para realizar el conteo celular y viabilidad con azul de trypan empleando un hemocitómetro. Se sembraron 10 000 células aisladas de quiste racemoso y quiste de *T. crassiceps* en placas de 24 pozos. Considerando 70 pmol/L los niveles basales de insulina en sangres durante ayunas, tres concentraciones de insulina fueron evaluadas (35, 70 y 140 pmol/L) por

triplicado, el conteo celular se realizó cada 24 horas. El tiempo de duplicación fue obtenido aplicando la siguiente fórmula (usando logaritmo de base 10):

$$\text{Tiempo de duplicación} = \frac{\text{Duración} \cdot \text{Log}(2)}{\text{Log}(\text{concentración final}) - \text{Log}(\text{concentración inicial})}$$

Para las evaluaciones de hibridación *in situ* e inmunofluorescencia empleando células aisladas empleamos los mismo protocolos indicados para las muestras de tejido (secciones 2.3.4 y 2.3.5) con algunas modificaciones, las células fueron fijadas con PFA/PBS a 4°C por toda la noche, todos los pasos se realizaron en tubos eppendorf y se centrifugaron entre cada paso.

2.3.11 Análisis estadístico

Se realizó estadística no paramétrica (prueba U, Mann-Whitney para dos grupos) usando el software Prism (Graphpad, San Diego, CA) para comparar la expresión relativa del gen *plkl* entre escólex (quiste vesicular) y pared quística (quiste racemoso) o pared quística (quiste vesicular) y pared quística (quiste racemoso). Diferencias con un valor $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Las curvas de crecimiento son presentadas como gráfico de puntos con la media \pm desviación estándar (SD). Las comparaciones cuantitativas de los efectos de la insulina sobre la proliferación celular *in vitro* se analizaron mediante one-way ANOVA y los valores $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

2.4 Resultados

Logramos obtener y procesar seis muestras de quiste racemoso colectados en un periodo de 12 meses. La observación de secciones aleatorias revela características histológicas variadas (Fig. 2B) que incluyen regiones de la membrana hipertróficas con integridad tisular (Fig. 2C), otras partes muestran degeneración (Fig. 2D) o necrosis (Fig. 2E). La proporción de estas regiones varía en cada muestra y entre ellas, además muchas de estas regiones se encuentran próximas entre sí. La identificación macroscópica de estas regiones fue difícil de realizar y requirió el uso de tinciones vitales que garanticen la selección de muestras viables para las siguientes etapas del estudio.

La viabilidad fue evaluada utilizando la actividad mitocondrial como principal indicador. Luego de la doble tinción con Mitotracker y azul de metileno, el tejido de los quistes racemosos presentaron dos coloraciones: azul o morado (Fig. 3A). La observación de las muestras con microscopio confocal, reveló que la coloración morada es causada por la combinación del azul de metileno y el Mitotracker indicando la presencia de mitocondrias funcionales (Fig. 3B-D). De este modo, las secciones moradas fueron seleccionadas para continuar los estudios.

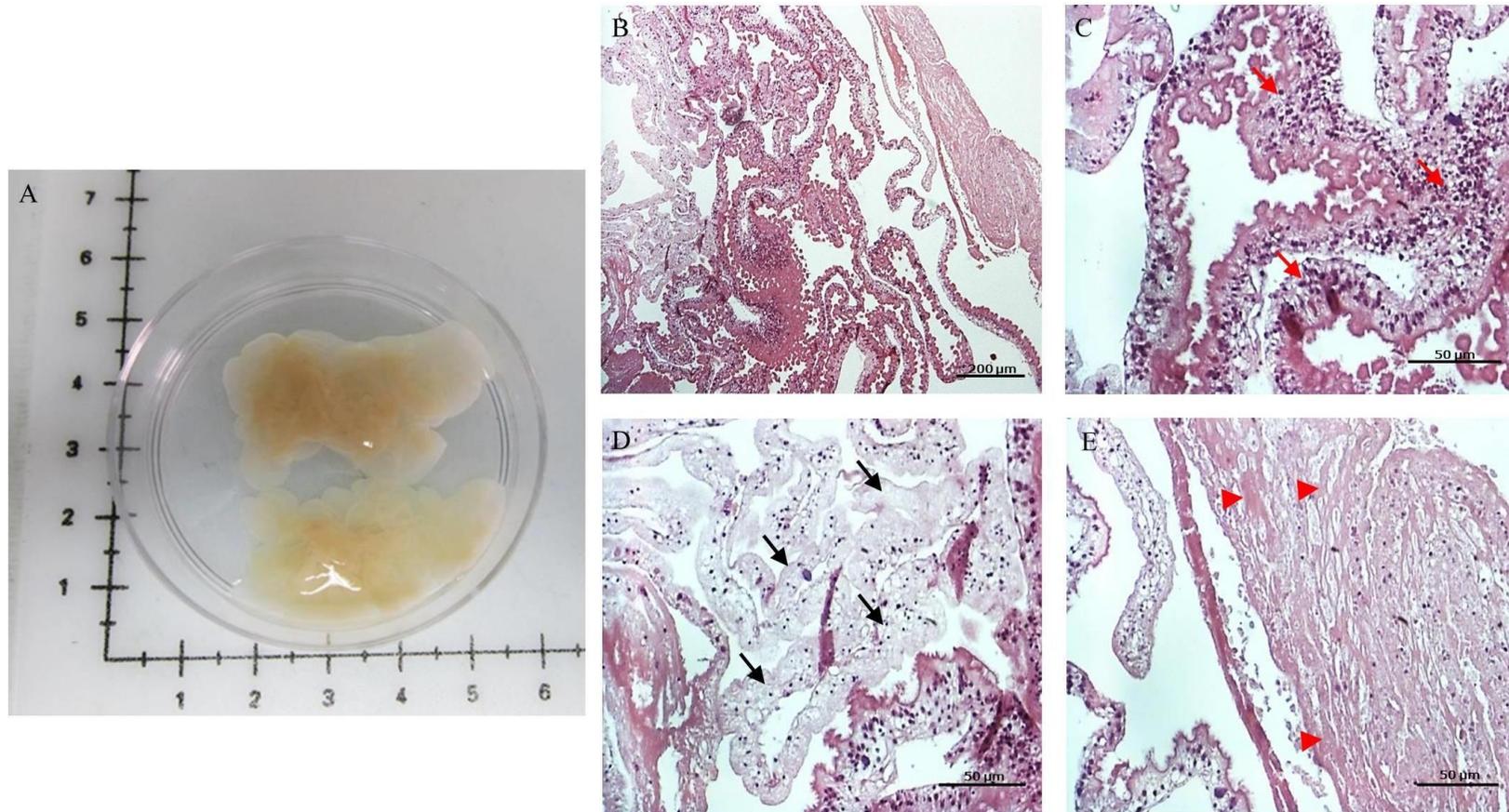


Figura 2: Muestras de quiste racemoso. Imagen macroscópica de una muestra representativa (A) y su tinción HE (B). Tres regiones seleccionadas por presentar diferentes características histológicas son mostradas; región con integridad (C) el tegumento se encuentra intacto con microtrichas presentes en la superficie (las flechas rojas señalan el tegumento); región degeneración tisular (flechas negras) (D); región con alto grado de necrosis (E) caracterizado por la ausencia de núcleos (cabezas de flecha).

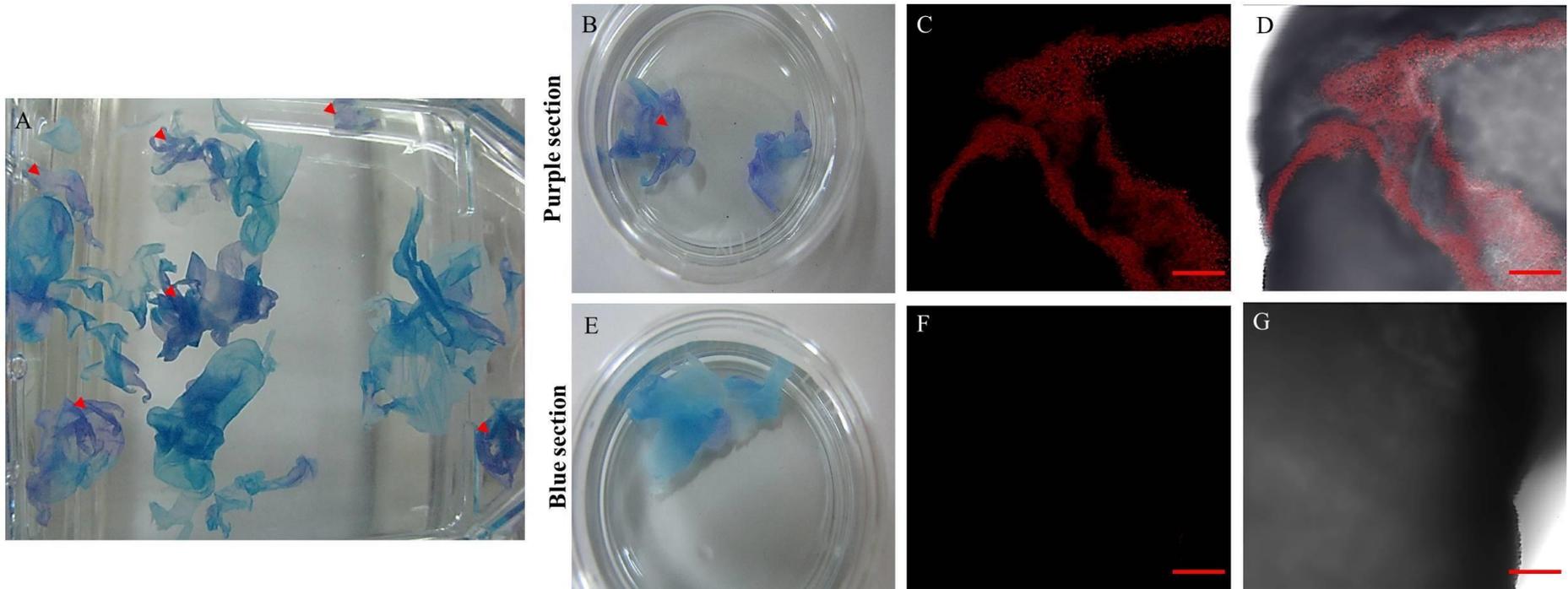


Figura 3: Muestra de quiste racemoso luego de la doble tinción. Imagen macroscópica de la muestra, secciones moradas (cabeza de flecha) y azules fueron separadas en placas Petri para las observaciones con microscopio confocal (A). Las secciones moradas y azules en placas Petri (B, E) se emplearon para la toma de imágenes con un objetivo 20X; se utilizó el filtro rojo para la detección del mitotracker (C, F) y se colocó la señal con el campo claro (D, G). En todas las secciones moradas se observó una señal positiva para el mitotracker. Después de 48 horas se repitió la tinción y se obtuvieron los mismos resultados. Barra de escala: 200 μ m.

La presencia y localización de células proliferativas se determinó en las muestras de quiste de *T. solium* (vesiculares obtenidos de cerdos infectados y racemosos obtenidos de pacientes con NCC subaracnoidea) y *T. crassiceps*. En los quistes racemosos, células expresando *plk1* estuvieron presentes en la pared quística del parásito (Fig. 4A) y notablemente ausentes en la pared quística de la forma vesicular (Fig. 4B). Adicionalmente, evaluamos los niveles de expresión de *plk1* y comprobamos un incremento significativo de *plk1* en el quiste racemoso comparado con el escólex y pared quística de la forma vesicular (Fig. 4F).

Como ensayo complementario, analizamos la actividad mitótica por inmunofluorescencia para detectar histona H3 fosforilada en la serina 10 (Fig. 5). La localización de la tinción de hibridación y la señal de la inmunofluorescencia indica la presencia de células mitóticamente activas solo en la pared quística del cisticerco racemoso.

Los quistes de *T. crassiceps* de la cepa ORF fueron de menor tamaño que los de *T. solium*, carentes de escólex y normalmente se propagan por división asexual durante este proceso múltiples vesículas se desarrollan a partir de un quiste madre para formar nuevos quistes. Células expresando *plk1* estuvieron presentes en toda la pared quística de *T. crassiceps* concentrándose en las regiones de crecimiento y desarrollo de los nuevos cisticercos (Fig. 6B) lo cual es consistente con el esencial rol de la proliferación.

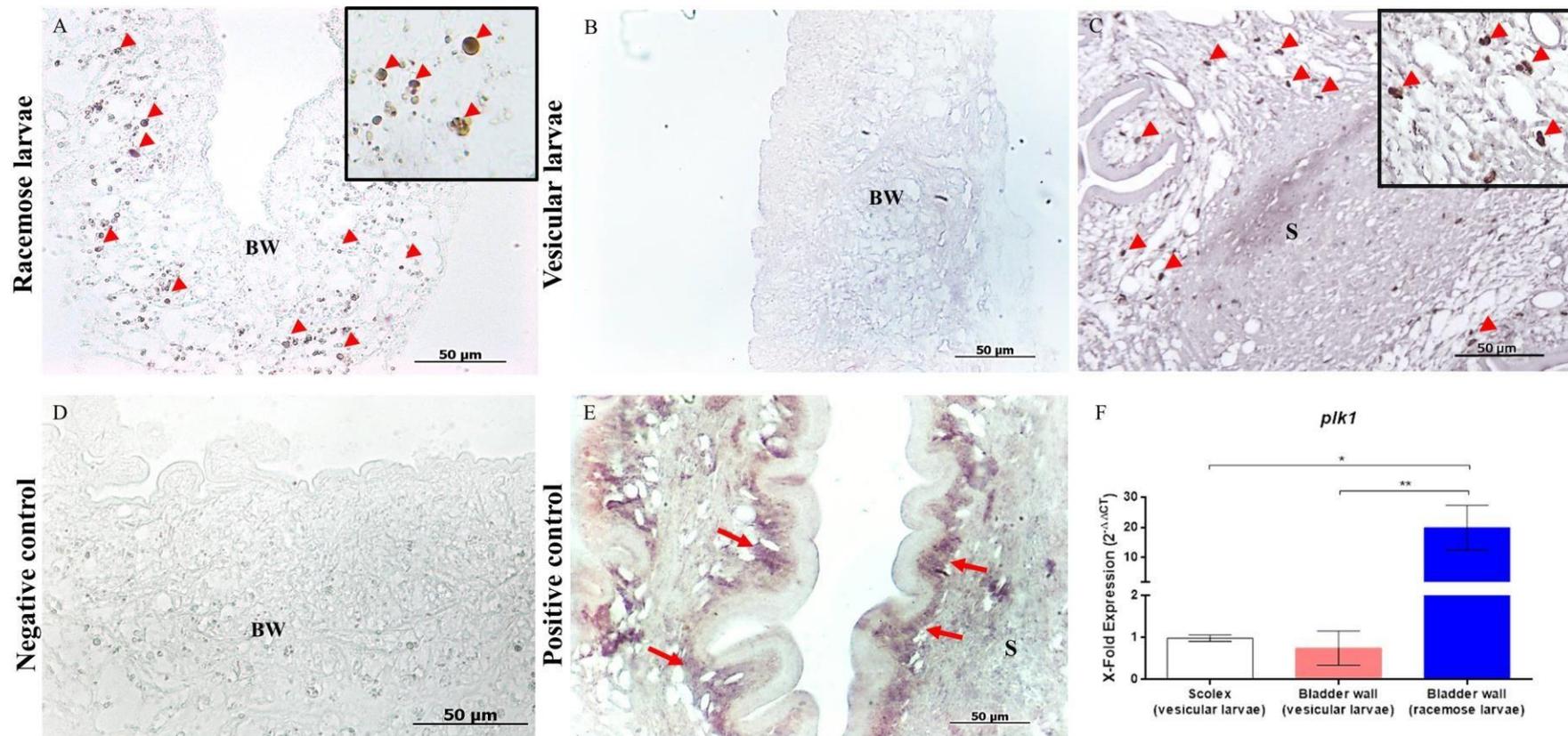


Figura 4: Identificación *in situ* de células germinativas en muestras de quiste racemoso de *Taenia solium* mediante ISH. Células que expresan *plk1* fueron observadas en la pared quística de los cisticercos racemosos (A), siendo ausentes en pared quística (B) y limitadas solo al cuello del escólex de los quistes vesiculares (cabezas de flecha) (C). Una imagen aumentada se insertó (A, C). Se empleó una sonda sentido de *plk1* como control negativo (D) y una sonda antisentido para actina como control positivo (E) en muestras de quiste vesicular donde una fuerte tinción de las fibras musculares fue observada (flechas rojas). Expresión diferencial del gen *plk1* en los quistes racemosos (F). PCR cuantitativo empleando ADNc generado a partir de 500 ng del ARN total de quistes racemosos comparado con escólex y pared quística del cisticerco vesicular. Los resultados se normalizaron con el gen endógeno *gapdh* y expresados como un incremento en la expresión. Diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión genética se indican con asteriscos (Prueba U, Mann-Whitney). Los asteriscos representan niveles de significancia: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$. BW: pared quística; S: escólex.

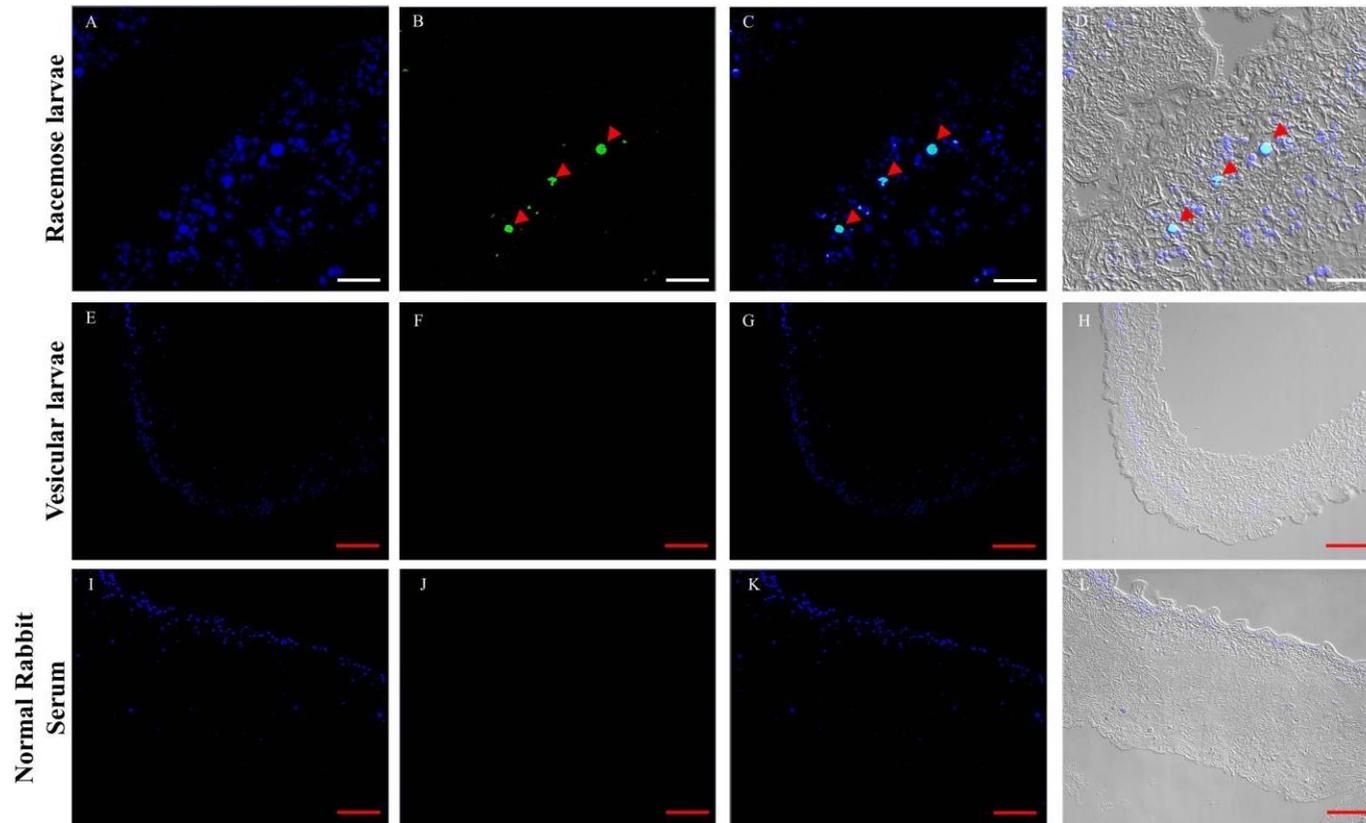


Figura 5: Identificación *in situ* de células mitóticamente activas en muestras de quistes de *Taenia solium* mediante inmunofluorescencia (IF). Ensayos de IF realizados en quistes racemosos y vesiculares. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (A, E, I), células positivas para fosfo histona H3 (cabeceras de flechas) se observaron solo en la forma racemosa (B). Colocalización (C, G, K) y colocalización con campo claro (D, H, L). Muestras de quistes racemosos incubadas con suero total de conejo sano fueron empleadas como control de reacción (I-L). Las imágenes se tomaron emplean un objetivo 20X; imágenes del quiste racemoso: zoom 3; imágenes del quiste vesicular y control: zoom 1. Barra de escala blanca: 20 μm ; barra de escala roja: 50 μm .

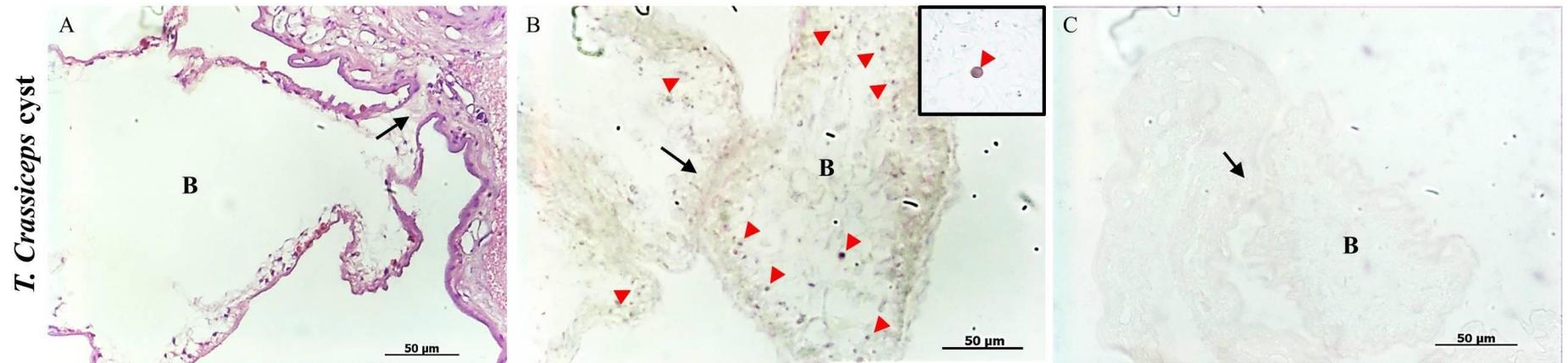


Figura 6: Identificación *in situ* de células germinativas en muestras de quiste de *Taenia crassiceps*. Se realizó tinción HE (A) e ISH en quistes de *T. crassiceps* (B). Se observaron células que expresan *plk1* en la región de brote (flechas negras) y a lo largo de la pared quística (cabezas de flecha rojas). Una imagen aumentada se insertó. La sonda sentido (C) fue empleada como control negativo. B: brote.

Las células aisladas de la pared quística de cisticercos racemosos presentan diversas características morfológicas. Luego de la primera semana de cultivo en presencia de agentes reductores, solo las células proliferativas sobreviven, esto se confirmó con ensayos de viabilidad realizado en los cultivos celulares (Fig.7). Las células proliferativas incrementan en número y cubren el fondo del pozo de la placa de cultivo, pero son fácilmente separadas mediante pipeteo. Las células aisladas y cultivadas de quistes racemosos de *T. solium* y quistes de *T. crassiceps* presentan una morfología similar a las descritas en células germinativas de *E. multilocularis* y neoblastos de las planarias de vida libre (41) con un prominente núcleo, poco citoplasma y un diámetro aproximado de 8-12 μm (Fig. 8). Luego de la tercera semana de cultivo, células que expresan *plk1* forman agregados (Fig. 9) que incrementan en tamaño y están compuestos por células de diferentes tamaños rodeadas por material extracelular (Fig. 10). Las células crecieron por al menos 6 meses (15 pasajes) con una baja densidad.

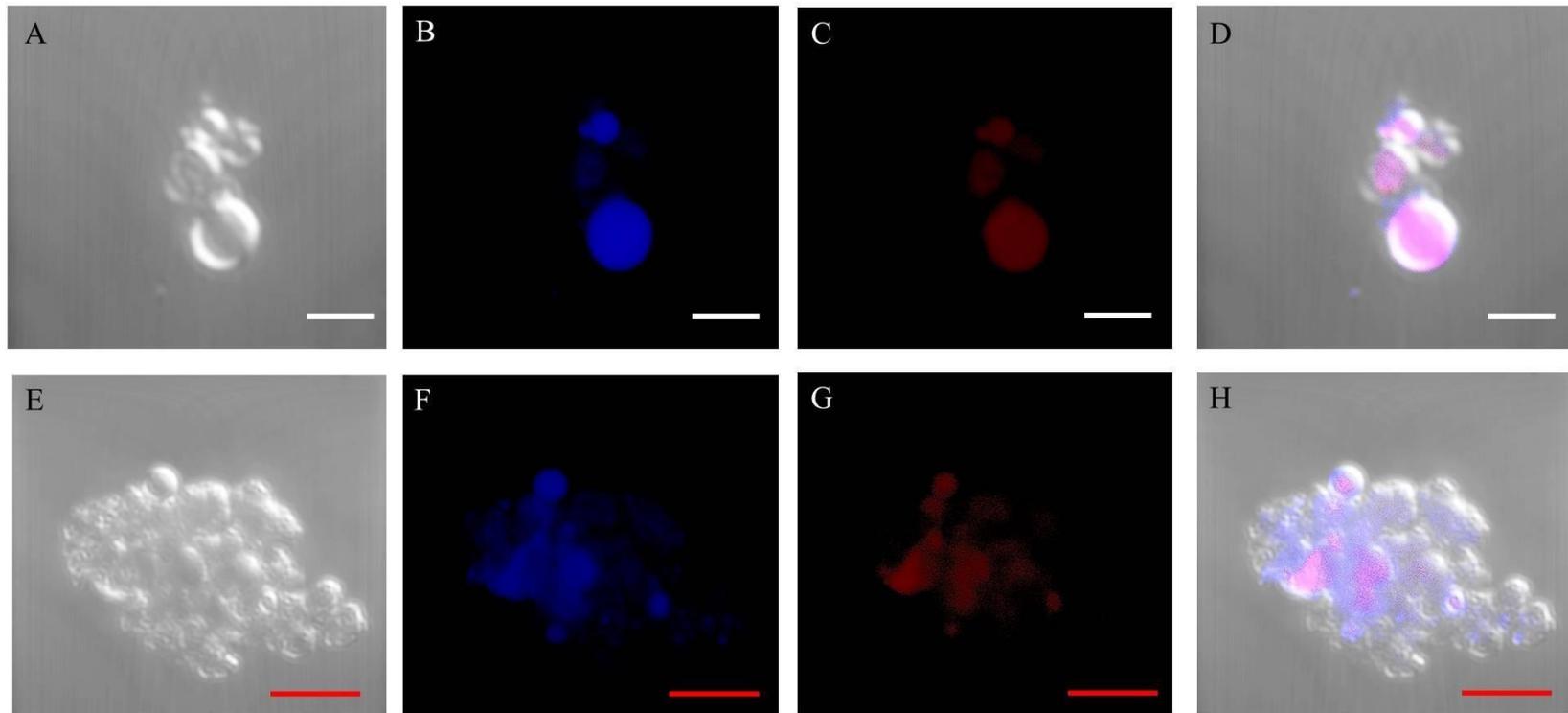


Figura 7: Viabilidad de las células proliferativas y agregados presentes en los cultivos. Luego de transcurridas 3 semanas desde su aislamiento las células de quistes racemosos y los agregados observados fueron cultivados en presencia de mitotracker. Las imágenes fueron captadas con un objetivo 40X mediante microscopia confocal a campo claro (A, E). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (B, F), el filtro rojo para mitotracker (C, G) y la colocalización de las señales (D, H). Barra de escala blanca: 5 μm ; barra de escala roja: 10 μm .

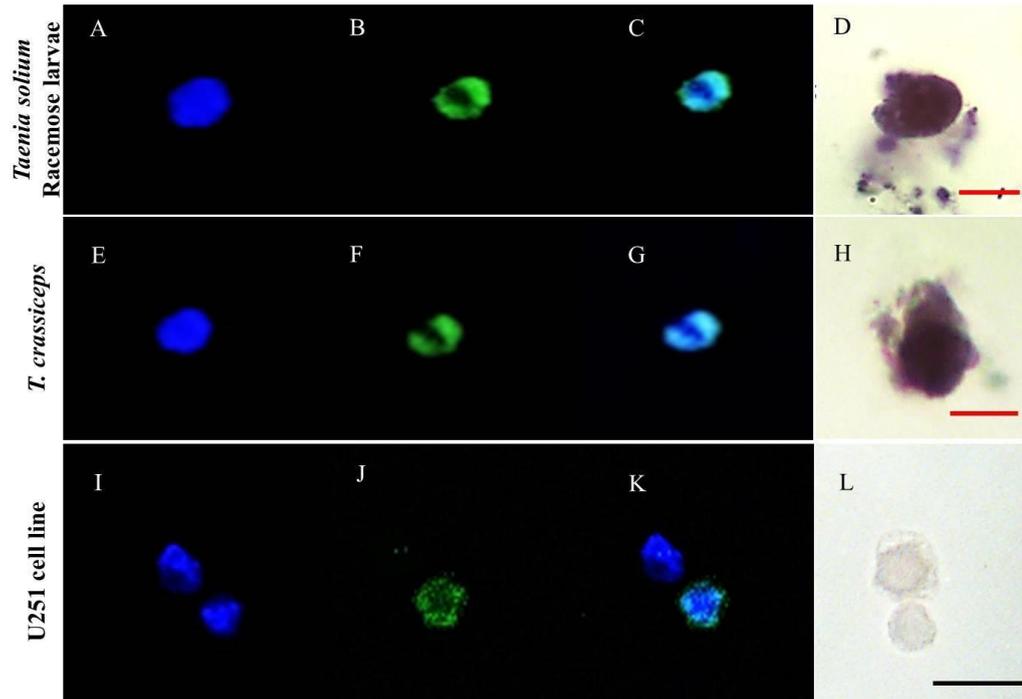


Figura 8: Células proliferativas aisladas de quiste racemoso de *Taenia solium* y quistes de *Taenia crassiceps*. Células aisladas mediante digestión enzimática y cultivadas de quistes racemosos y quistes de *T. crassiceps*. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (A, E, I), se evaluó la fosfo histona H3 (B, F, J). Se muestra la superposición de ambas señales (C, G, K) observada mediante microscopía confocal. Adicionalmente, se evaluó la expresión de *plk1* (*in situ*) (D, H, L). La línea celular humana de glioblastoma U251 fue empleada como control de proliferación (J, K) y de especificidad (L). Barra de escala roja: 10 μm ; barra de escala negra: 20 μm .

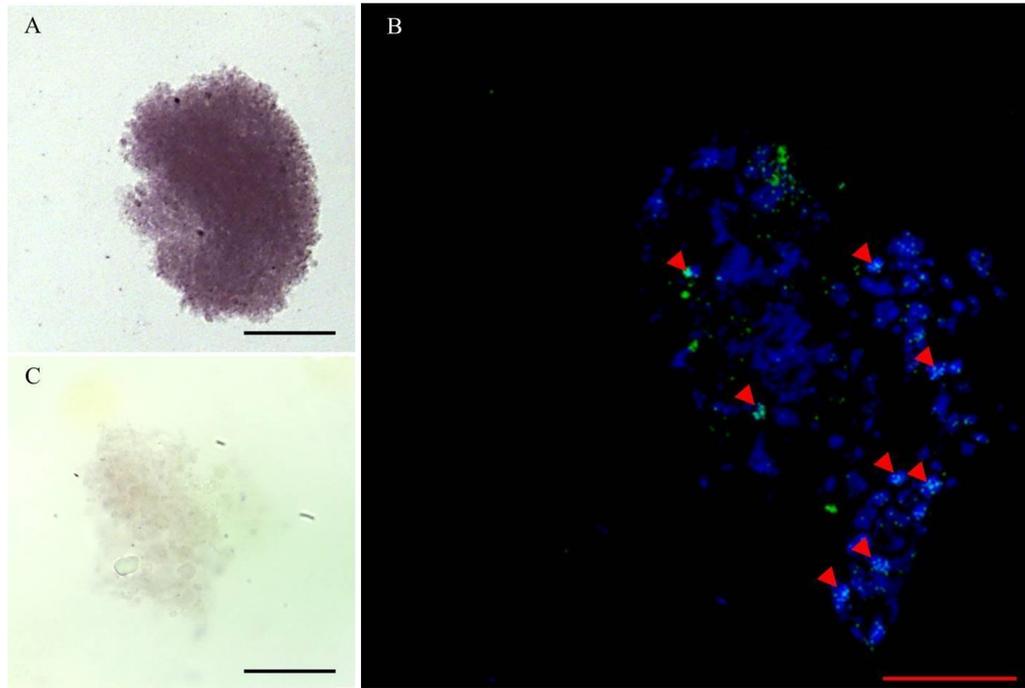


Figura 9: IF e ISH en agregado de células proliferativas de quiste racemoso. Los agregados expresan *plk1* (A) y fueron reactivos a fosfo histona H3 (cabezas de flecha) (B), los núcleos fueron teñidos con DAPI. La sonda sentido se empleó como control negativo (C). Barra de escala: 50 μ m.

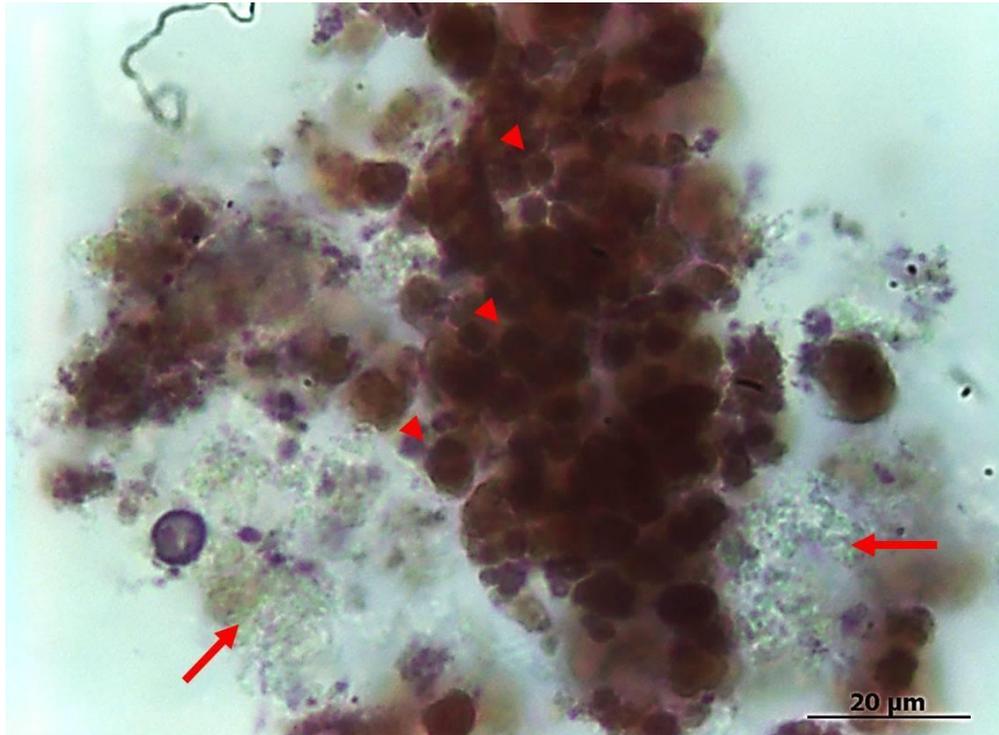


Figura 10: Imagen magnificada de agregado celular de quiste racemoso que expresa *plk1*. Las células en cultivo tienden a formar agregados con presencia de células de diversos tamaños (cabezas de flechas) rodeados de material extracelular (flechas).

Para confirmar el origen parasitario de las células en cultivo, sobrenadantes procedentes de diferentes cultivos fueron evaluados empleando un ELISA casero basado en anticuerpos monoclonales anti *T. solium* (42). Solo las muestras de cultivos con alta densidad de células de quiste racemoso produjeron niveles significativos de antígenos, estos resultados son consistentes con las evaluaciones obtenidas para los pacientes con NCC subaracnoidea (42). Todos los sobrenadantes de células de *T. crassiceps* fueron negativos (Fig. 11A).

Para descartar alguna posible contaminación con células del hospedero en los cultivos de quiste racemoso, el ARN total aislado de tres cultivos primarios fue evaluado mediante RT-PCR empleando cebadores específicos para el gen *β -actina* humano. Luego de realizar la electroforesis para visualizar el producto de amplificación observamos que los cultivos estuvieron libres de contaminación con células del hospedero (Fig. 11B).

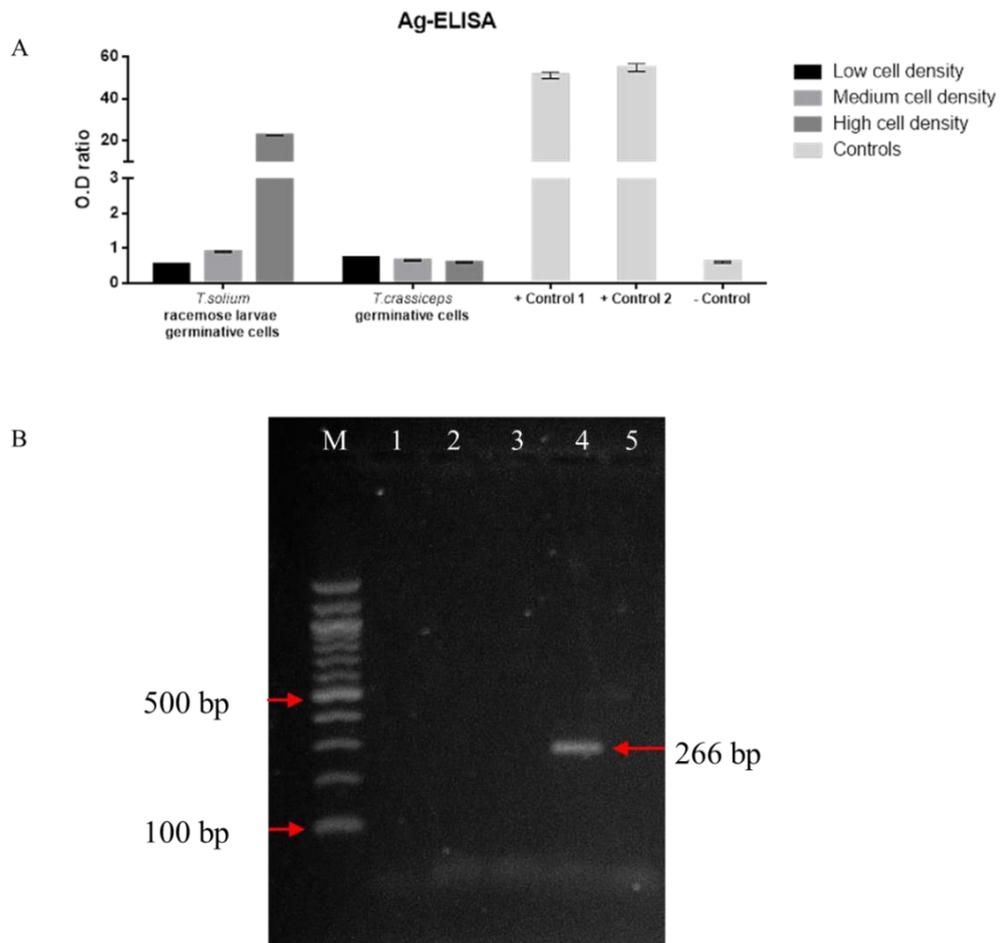


Figura 11: Evaluación de sobrenadantes mediante Ag-ELISA y RT-PCR de los cultivos celulares. Evaluación de sobrenadantes obtenidos de cultivos celulares con diferentes densidades empleando anticuerpos monoclonales anti-*T. solium* (A). Los valores fueron expresados como ratio dividiendo la densidad óptica (OD) de las muestras con el OD del punto de corte. Un ratio >1 se consideró positiva. Se utilizaron antígenos excretores/secretores como controles positivos (1 y 2) y medio de cultivo RPMI como control negativo. Electroforesis en gel de agarosa para los productos de la RT-PCR (B). El ADNc se generó a partir del ARN total aislados de tres cultivos celulares de quistes racemosos. El producto de amplificación específico (~266 pb) para el gen β -globina humana solo se observó en el ADNc obtenido de células sanguíneas humanas empleadas como control positivo (flecha izquierda). M: marcador para ADN de 100 pb; 1-3: muestras de cultivos celulares; 4: control positivo; 5: master mix.

El tiempo de duplicación de las células aisladas de quiste racemoso y quiste de *T. crassiceps* fue de 113 h y 79 h respectivamente. La fase estacionaria de la curva de crecimiento no pudo ser alcanzada quizá debido al lento crecimiento. La adición de la insulina a 35 pmol/L produjo un significativo incremento en el crecimiento de las células de quiste racemoso luego de 24 horas y a 70 pmol/L luego de 72 horas (Fig. 12A). Las células de *T. crassiceps* solo mostraron un incremento significativo en su crecimiento con insulina a 35 pmol/L luego de 48 horas (Fig. 12B). Adicionalmente, la insulina redujo el tiempo de duplicación en ambos cultivos pero las células de quiste racemoso mostraron mayor crecimiento a menor concentración de insulina comparado con *T. crassiceps* indicando una mayor sensibilidad a la insulina (Fig. 12). Altas concentraciones de insulina disminuyeron el crecimiento de ambos cultivos. Observamos que la acción pro mitótica de la insulina no alteró la expresión de *plk1* (Fig. 13). Estos hallazgos sugieren la importancia de las hormonas del Sistema Endocrino y Paracrino del hospedero en el desarrollo y crecimiento del parásito (43).

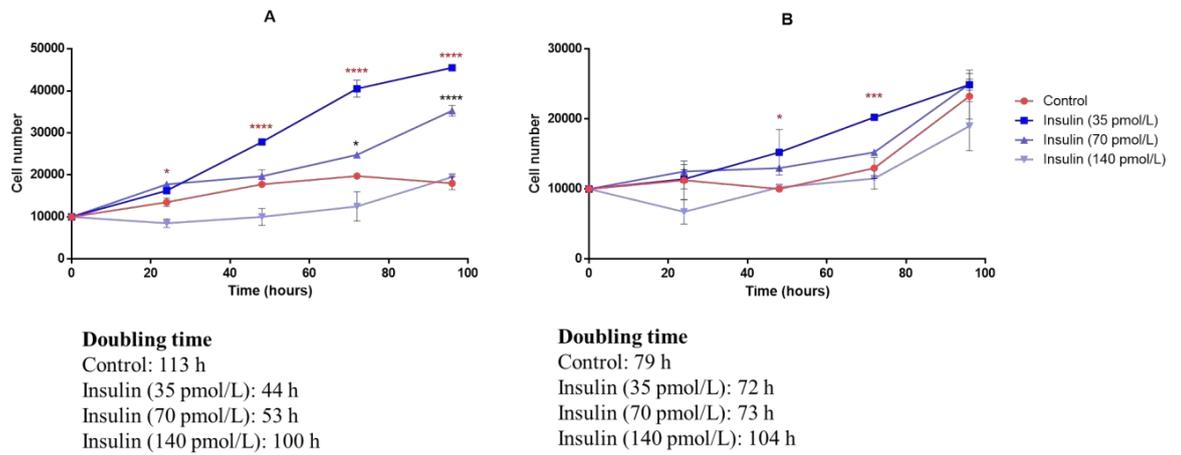


Figura 12: Curvas de crecimiento de las células proliferativas y los efectos de la insulina. Curvas de crecimiento de células aisladas de quistes racemosos de *T. solium* (A) y quistes de *T. crassiceps* (B). Insulina a 35 pmol/L generó un incremento significativo en las células del quiste racemoso luego de 24 horas (asteriscos rojos) y a 70 pmol/L luego de 72 horas (asteriscos negros). En el caso de *T. crassiceps*, las células se incrementaron significativamente con 35 pmol/L luego de 48 horas (asteriscos rojos). Altas concentraciones (140 pmol/L) disminuyeron ambos cultivos. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (tratados y control). Prueba one-way ANOVA (*: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$).

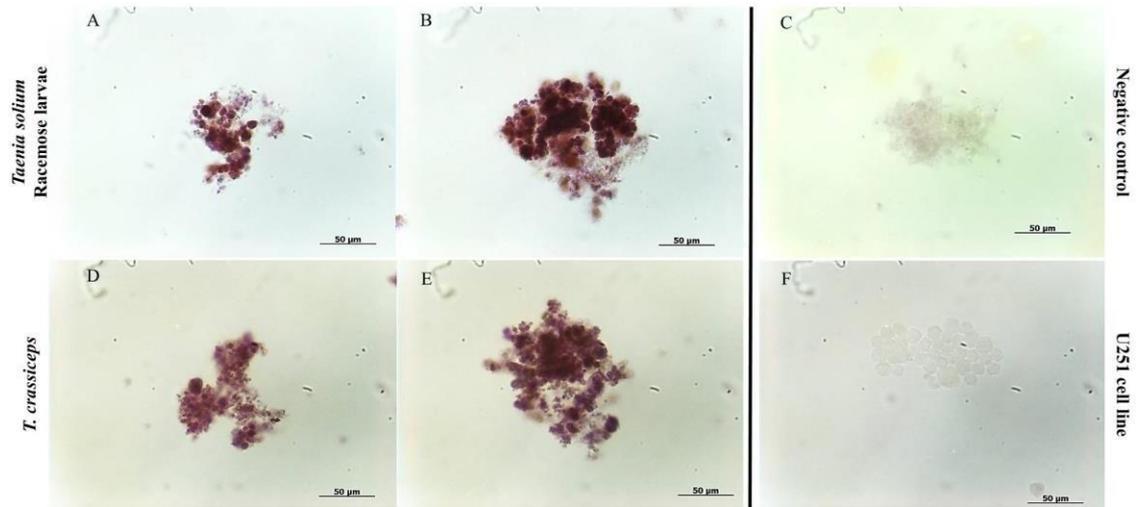


Figura 13: Ensayos de ISH en células proliferativas de quistes racemosos de *T. solium* y quistes de *T. crassiceps*. Células que expresan *plk1* antes (A, D) y después de ser cultivadas 1 semana con insulina (B, E). La sonda sentido (C) se empleó como control negativo. La línea celular humana de glioblastoma U251 se empleó como control de especificidad.

2.5 Discusiones

La naturaleza y características del quiste racemoso son poco estudiadas. Zenker sugirió que el quiste racemoso y vesicular pertenecían a *T. solium* luego de identificar escólex degenerados dentro de formas racemosas (44) posteriormente su identidad fue confirmada por métodos moleculares (45). Adicionalmente, la constante asociación del quiste racemoso con otras formas de NCC en el mismo paciente también sugiere un origen con *T. solium* (46). A inicios del siglo 20, había una aceptación general que el masivo crecimiento del quiste observado en necropsias se debía a una proliferación del cisticerco (47). Sin embargo, el crecimiento *in vivo* del quiste racemoso y su extensión ha sido documentado recientemente y solo luego de obtenerse imágenes por resonancia magnética, lo que permitió una detallada caracterización así como el seguimiento continuo de pacientes tratados y no tratados (25). Existiendo una falta de evidencia directa de la proliferación y de los procesos involucrados en el anormal crecimiento del parásito.

Plk1 desempeña múltiples funciones en el ciclo celular (48) y está dinámicamente regulada durante la mitosis en sus niveles de expresión, activación y distribución dentro de la células (49). Estudios previos demostraron que *plk1* es altamente expresada en diversos tipos de cáncer humano y su sobre-expresión está asociado con una baja prognosis de los pacientes (50). Nuestros resultados demuestran la presencia de una gran cantidad de células proliferativas en la pared quística del cisticerco racemoso y observamos que estas células están ausentes en la pared quística de la forma

vesicular (Fig. 4A y 4B). Una posible razón del inesperado número de células positivas a *plk1* es una desregulación en la expresión génica generando la presencia del mensajero en la fase G1/S del ciclo celular del mismo modo que ha sido reportado en células cancerígenas (51, 52). Estas observaciones son corroboradas con la evaluación de los niveles de expresión de *plk1* que revelan diferencias significativas entre ambas formas del parásito (Fig. 4F).

Como una evaluación complementaria, observamos un pequeño número de células positivas a fosfohistona H3 (promedio: 96 células por cas mm² de tejido) comparado con el número de células que expresan *plk1* (promedio: 695 células por cada mm² de tejido) (Fig. 5); estos resultados son consistentes con la rápida transición de la fase M del ciclo celular descrita en otras especies de cestodes (53, 54). Estos hallazgos constituyen la primera evidencia clara de la proliferación y crecimiento descontrolado de la pared quística del cisticerco racemoso similar a un tumor.

Nuestras observaciones sugieren que las células proliferativas presentes en la pared quística del cisticerco racemoso son células germinativas debido a las características morfológicas que presentan y por su capacidad de proliferar como se ha reportado y descrito en otros cestodes (28, 31). Sin embargo, se necesitan mayores estudios para identificar la totalidad de células germinativas y caracterizar subpoblaciones de acuerdo a la expresión de marcadores celulares específicos.

Debido a que las células proliferativas están presentes solo en el escólex del quiste vesicular (34, 55), su presencia en la pared quística del cisticerco racemoso sugiere que esto podría ser consecuencia de la incorporación o absorción del escólex a la pared quística en expansión durante las fases iniciales de su desarrollo.

El quiste racemoso prolifera de manera continua y un posible mecanismo involucrado sería causado por su localización en el espacio subaracnoideo, una zona del cerebro carente de los beneficios nutricionales si se compara con el parénquima cerebral. Esto puede llevar a la incorporación del escólex y una pérdida de la coordinación normal del desarrollo incluyendo la inhibición de la proliferación celular y organización tisular como respuesta a sus demandas nutricionales y energéticas.

Adicionalmente, la sobreexpresión de genes que promueven el crecimiento, la pérdida de función de genes represores, como consecuencia de mutaciones o factores epigenéticos, mutaciones o una inusual respuesta a factores de crecimiento del hospedero como la insulina pueden contribuir y explicar el desarrollo de la forma racemosa. Estos conceptos requieren explorarse en futuros estudios.

El quiste racemoso presenta características proliferativas similares a un tumor, esto de por sí, sugiere un crecimiento anormal (23). Junto a su continua proliferación y crecimiento por largos periodos de tiempo, su morfología

tisular es también anormal. De forma similar a los tumores de animales superiores, el quiste racemoso conserva las características del tejido que le dio origen pero con una organización y estructura variada o desordenada (23, 56). Diferencias tisulares fueron encontradas entre las muestras y en cada una de ellas. La habilidad de proliferar del quiste racemoso tiene profundas implicancias para su tratamiento. Como ejemplo, los quistes parenquimales que no presentan potencial para proliferar, tienen un tratamiento corto y efectivo que elimina a la mayoría de quistes (25). Luego de iniciado el tratamiento, una respuesta inmunológica es inducida, siendo importante y aparentemente esencial en la eliminación de los quistes (57). En contraste, tiempos similares de tratamiento no eliminan a la forma racemosa y frecuentemente vuelve a crecer (57). En estos casos, el tratamiento requiere ser administrado por mayores periodos de tiempo. Esto es consistente con la necesidad de eliminar todas las células proliferativas.

Nosotros hemos logrado establecer un cultivo primario de células proliferativas de *T. solium* y *T. crassiceps*. Solo las células con capacidad proliferativa sobreviven en presencia de agentes reductores (Fig. 8), incrementan en número y son sensibles a la insulina (Fig. 12). No observamos un efecto diferente de la insulina como se ha reportado previamente (43) quizá debido a que la pared quística del cisticerco racemoso de *T. solium* y el cisticerco de *T. crassiceps* proliferan de una forma similar. Estos cultivos no resultaron en la regeneración completa del quiste. Solo observamos la formación de agregados (Fig. 10)

quizá debido a diferencias en el medio de cultivo que empleamos comparado con los cultivos de *E. multilocularis* (39) o a la propia naturaleza del parásito.

La reacción cruzada entre antígenos de *T. solium* y *T. crassiceps* permite el uso de *T. crassiceps* en pruebas de serodiagnóstico para cisticercosis humana (58). Sin embargo, los ensayos de ELISA no detectaron antígenos del parásito en los sobrenadantes de cultivos celulares de *T. crassiceps* (Fig. 11A) quizá debido a la baja sensibilidad del ensayo y del uso de diferentes anticuerpos monoclonales, esto es consistente con el amplio rango de sensibilidad y especificidad en ensayos de ELISA basados en el uso de diferentes antígenos de *T. solium* y *T. crassiceps* (59).

La importancia de estos cultivos radica en su potencial uso para estudiar la biología celular del desarrollo de *T. solium* y otros cestodes, la biología de las células germinativas, el metabolismo celular, la identificación de moléculas para el diagnóstico y nuevos fármacos para el tratamiento de la enfermedad. Compuestos como BI2536 (60) que inhibe la expresión del gen *plk1* o la metformina (61) que se ha reportado logra inhibir el desarrollo de parásitos como *E. multilocularis* podrían ser evaluados en los cultivos y demostrar su habilidad de eliminar o inhibir su proliferación. La eliminación o inhibición de las células germinativas puede constituir una forma de controlar el crecimiento o la eliminación del quiste racemoso y evitar su recuperación luego de administrar pequeñas dosis de antihelmínticos.

Capítulo 3

Las células proliferativas en el quiste racemoso presentan la vía de señalización MAPK activa y responden al tratamiento con metformina

3.1 Introducción

La vía de señalización de la insulina participa en diversos procesos biológicos como la captación de la glucosa, la síntesis de glucógeno, el crecimiento y proliferación celular (62). Los principales componentes de la vía de señalización de la insulina se han identificado en varias especies de platelmintos incluido *T. solium* (63, 64). La señalización se inicia por la unión del ligando a los receptores tirosina quinasa de superficie (62). Tras la unión de la insulina al receptor (tetramero $\alpha_2\beta_2$) se induce la auto fosforilación de diversos residuos de tirosina presentes en la subunidad β (65, 66).

Las dos principales cascadas de señalización intracelular de la insulina en vertebrados e invertebrados son la cascada de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK)/quinasa regulada por señal extracelular 1/2 (ERK1/2) y la vía de fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K)/ proteína quinasa B (62).

La metformina (Met) (N, N-dimetilbiguanida) es un agente anti-hiperglucémico ampliamente empleado en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, es además eficaz contra el cáncer y contra parásitos altamente proliferativos como *E. multilocularis* y *E. granulosus* (61, 67). La actividad antiproliferativa de la metformina se atribuye en parte a la activación de la

proteína quinasa activada por AMP (AMPK) con supresión de la diana de rapamicina en mamíferos (mTOR) así como de ERK 1/2 (68).

En el capítulo previo identificamos células proliferativas en la pared quística del cisticerco racemoso y demostramos la acción pro mitótica *in vitro* de la insulina. En el presente estudio evaluamos puntualmente la vía de señalización MAPK-ERK 1/2 en quistes racemosos. Adicionalmente evaluamos *in vitro* e *in vivo* la actividad antiproliferativa de la metformina.

3.2 Objetivos

- Determinar los niveles de expresión del receptor de insulina en los quistes racemosos y vesiculares de *T. solium*.
- Caracterizar *in silico* el receptor de insulina y la quinasa ERK 1/2 de *T. solium*.
- Determinar si la vía de señalización de las MAPK se encuentra activa en los quistes racemosos de *T. solium*.
- Evaluar *in vitro* e *in vivo* la actividad antiproliferativa de la metformina.

3.3 Metodología

3.3.1 Diseño experimental

Muestras de quistes vesiculares y racemosos de *T. solium* fueron empleados para comparar los niveles de expresión de los receptores 1 y 2 de insulina mediante PCR cuantitativa y para evaluar los niveles de fosforilación de la vía

de señalización MAPK-ERK 1/2 por inmunofluorescencia. Adicionalmente evaluamos la acción *in vitro* de la metformina sobre células proliferativas aisladas de la pared quística de cisticercos racemosos. Finalmente empleamos el modelo murino de cisticercosis con *T. crassiceps* para evaluar *in vivo* la efectividad de la metformina para inhibir la proliferación celular en el parásito.

3.3.2 Colecta de muestras

Para la colecta de muestras de quistes racemosos y vesiculares de *T. solium* y quistes de *T. crassiceps*, se ejecutaron los protocolos indicados en la sección 2.3.2

3.3.3 Procesamiento de las muestras

Para determinar la viabilidad, selección y procesamiento de todas las muestras empleadas en este estudio se ejecutaron los protocolos indicados en la sección 2.3.3

3.3.4 Análisis Bioinformático

Las secuencias de amino ácidos del receptor de insulina y de ERK 1/2 de *T. solium*, *E. multiloculares*, *Mus musculus* y *Homo sapiens* fueron descargadas de los servidores GenBank y GeneDB para ser analizadas mediante BLAST. Los residuos de fosforilación conservados fueron identificados mediante CLUSTALW. Adicionalmente se identificó la presencia de dominios funcionales con la herramienta Pfam. Todas las herramientas bioinformáticas están disponibles en el dominio www.genome.jp

3.3.5 Generación de ADN complementario (ADNc) y PCR cuantitativo (qPCR) para los receptores 1 y 2 de insulina

Para generar el ADNc y las posteriores evaluaciones mediante qPCR se ejecutaron los protocolos indicados en la sección 2.3.6 empleando ARN total aislado de seis quistes racemosos y seis vesiculares. Para el presente estudio se diseñaron cebadores específicos para el receptor de insulina 1 (MT242602.1) (sentido: 5'-AGAGGTTGCAGGCGTTAAA-3') (antisentido: 5'-CACGGAACCAGAGAAGATACAC-3'), receptor de insulina 2 (MT242603.1) (sentido: 5'-GAACGAGCCTAACAGTCCTAAC-3') (antisentido: 5'-GCTGCGTCATCCTCCAAATA-3') reportados previamente (64), y *gapdh* (TsM_000056400) (Forward: 5'-TCCAAGAGATGAATGCCAATGC-3') (Reverse: 5'-CAGAAGGAGCCGAGATGATGA-3').

3.3.6 Inmunofluorescencia (IF) para las formas fosforiladas del receptor de insulina y ERK 1/2.

Se emplearon muestras de quistes de *T. solium* (7 racemosos y 12 vesiculares) siguiendo el mismo protocolo indicado en la sección 2.3.5. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti receptor IGF fosforilado (Tyr1135/1136) / (Tyr1150/1151) y anti p44/42-ERK 1/2 fosforilado (Thr202/Tyr204) ambos de la misma casa comercial (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) en una dilución 1:250 recomendada por el fabricante. Se realizó la captura de imágenes empleando microscopio confocal (Zeiss, LSM 880; Oberkochen, Alemania). Se seleccionaron aleatoriamente 5 imágenes por cada condición de

3 réplicas independientes y se contó el número de células positivas para el receptor de insulina fosforilado o ERK 1/2 fosforilado y el total de núcleos (67).

3.3.7 Aislamiento de células proliferativas y condiciones de cultivo

Las secciones de quiste racemoso y de *T. crassiceps* seleccionadas para el aislamiento celular fueron procesadas ejecutando los protocolos indicados en la sección 2.3.7.

3.3.8 Efectos *in vivo* de la metformina en secciones de quiste racemoso y células proliferativas

Para evaluar los efectos de la metformina se emplearon secciones de pared quística y células proliferativas previamente aisladas y en cultivo. Tres secciones viables de quistes racemosos (de 5mm cada una) seleccionadas de forma aleatoria, fueron cultivadas en presencia de metformina (4 mM) por dos semanas, secciones no tratadas se emplearon como control. Las muestras tratadas y no tratadas se procesaron para realizar ensayos de IF con el objetivo de evaluar los efectos directos de la metformina sobre la vía de señalización MAPK-ERK 1/2 en la pared quística de quistes racemosos (67).

Además, se resuspendieron tres cultivos primarios de células proliferativas y se evaluó la viabilidad con el colorante Azul de Tripan utilizando un hemocitómetro. Se sembraron 200, 000 células aisladas de quistes racemosos y de *T. crassiceps* en placas de 24 pozos y se cultivaron en presencia de tres

concentraciones de metformina (0.4, 4, y 40 mM) por triplicado, células no tratadas se emplearon como control y el conteo celular se realizó cada 24 horas (67).

3.3.9 Eficacia *in vivo* del tratamiento con metformina en el modelo murino de cisticercosis con *T. crassiceps*

Ratones hembra de seis semanas de edad infectadas con 10-20 quistes de *T. crassiceps* (cepa ORF) fueron distribuidas aleatoriamente en 2 grupos: 6 ratones recibieron durante 3 meses metformina (50 mg/kg/día) en forma de suspensión en agua administrada vía oral con sonda, el tratamiento se inició luego de transcurrir 24 horas post infección; 4 ratones que recibieron solo agua se emplearon como controles. Al finalizar el tratamiento los animales fueron sacrificados, los quistes fueron colectaron cuidadosamente de la cavidad peritoneal y se determinó el peso total. La eficacia del tratamiento se calculó mediante la siguiente fórmula: $100 \times [(\text{peso medio de los quistes del grupo control}) - (\text{peso medio de los quistes del grupo tratado})] / (\text{peso medio de los quistes del grupo control})$ (67).

3.3.10 Análisis estadístico

Se realizó estadística no paramétrica (prueba U, Mann-Whitney para dos grupos) usando el software Prism (Graphpad, San Diego, CA) para comparar la expresión relativa de las dos isoformas del receptor de insulina en ambos tipos de cisticercos (vesicular y racemoso) y también para analizar los efectos *in vivo* de la metformina en el modelo murino de cisticercosis con *T. crassiceps*.

Se calcularon los ratios de células positivas por IF respecto a la fluorescencia de los núcleos y las curvas de crecimiento en los ensayos de proliferación celular se presentan como un gráfico de puntos con la media \pm desviación estándar (SD). Todas las comparaciones cuantitativas de los efectos de la metformina *in vitro* se analizaron mediante one-way ANOVA y los valores $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

3.4 Resultados

Para determinar el porcentaje de identidad del receptor de insulina y ERK 1/2, analizamos las secuencias de aminoácidos empleando la herramienta BLAST. El receptor de insulina 1 (QKL20108.1) y 2 (QKL20109.1) de *T. solium* presentaron un alto porcentaje de identidad (83%) con las secuencias de *E. multilocularis* (AJ458426.1; HG326255.1) y del 32% al 49% con *H. sapiens* (AH002851.2). Adicionalmente, ERK 1/2 (TsM_000447200) presentó una identidad del 95% con *E. multilocularis* (EmuJ_000891000.1; EmuJ_000803700.1) y del 69% con *H. sapiens* (NP_002736.3).

El alineamiento múltiple de secuencias revela que las secuencias primarias de aminoácidos del receptor de insulina y ERK 1/2 de *T. solium* son altamente conservados en los residuos de tirosina y treonina comparado con *E. multilocularis*, *H. sapiens* y *M. musculus* (Fig. 1, 3). Por otro lado, estas secuencias presentan los dominios estructurales típicos para el receptor de insulina y proteína quinasa (Fig. 2, 4).

Homo	VVME LM AHGDLKSYLRSLRPEAENNPGRPPPTLQEMIQMAAEIADGMAYLN AKK FVHRDL	1160
Mouse	VVME LM AHGDLKSHLRSLRPDAENNPGRPPPTLQEMIQMTAEIADGMAYLN AKK FVHRDL	1150
EmIR1	VVME LM ESGDLASYLRKL---GDSGIGFVKPA--QAYLWAVQIADGMAYLERKKYVHRDL	1479
TsoIR1	VVME LM MENGDLASYLRKL---GDSGIGFVKPA--QAYLWAVQIADGMAYLERKKYVHRDL	1459
EmIR2	VVME LM QHGDLATYLRHRMAQEDYSQGSVSPE--YAIKWAAEVADGMAYLEYKGFVHRDL	1463
TsoIR2	VVME LM QHGDLATYLRHRMAQEDYSQGSVSPE--YAIKWAAEVADGMAYLEYKGFVHRDL	1438
	***** ** :.* * :. * * :.:******: * :*****	
Homo	AARNCMVAHDFTVKIGDFGMDTRDIYETDYYRKG GK GLLPVRWMAPESLKDGVFTTSSDMW	1220
Mouse	AARNCMVAHDFTVKIGDFGMDTRDIYETDYYRKG GK GLLPVRWMSPE SL KDGVFTASSDMW	1210
EmIR1	AARNCLVDGRGVVKVGD F GLCRDIYERNYYHKV G GAGKLPVRWMAPE SL QSA Y FTSRSDVW	1539
TsoIR1	AARNCLVDGRGVVKVGD F GLCRD V YERNYYHKV G GAGKLPVRWMAPE SL QSA Y FTSRSDVW	1519
EmIR2	AARNCLVG V GLTVKIGDFGLTRD V SGHLYYRKEGRARLPVRWMAPEALNEAYFTFKSDVW	1523
TsoIR2	AARNCLVG V GLTVKIGDFGLTRD V SGHLYYRKEGRARLPVRWMAPEALNEAYFTFKSDVW	1498
	*****: * .*:*****: ** :.* * * .*****:***:.. ** **:*	
Homo	SFGVVLWEITSLAEQPYQGLSNEQVLKFMVDGGYLD---QP NC PERVTDLMRMNCWQFNP	1277
Mouse	SFGVVLWEITSLAEQPYQGLSNEQVLKFMVDGGYLD---PP NC PERLTDLMRMNCWQFNP	1267
EmIR1	SFGVVLWEIATMA CL PYQGM SH NEVISYVLDGNTLVSGGAPINCP LL QSVMLYCWSYRP	1599
TsoIR1	SFGVVLWEIATMA CL PYQGM SH NEVISYVLDGNTLVSGGAPINCP LL QSVMLYCWSYRP	1579
EmIR2	SYGVVLWEIATFAALPFSGLSHEEVIALVWNGGHLGKQGWPPKFPDILLDVMQACWHS DP	1583
TsoIR2	SYGVVLWEIATFAALPFSGLSHEEVIALVWNGGHLGKQGWPPKFPDILLDVMQACWHR DP	1558
	*:*****:.* *.:*:*:*: *:*.* * * : * :.* ** *	
Homo	KMRPTFLEIVNLLKDDLHP-SFPEVSFFHSEENK---APESEEELEMEFEDM---ENVPLD	1330
Mouse	KMRPTFLEIVNLLKDDLHP-SFPEVSFFYSEENK---APESEEELEMEFEDM---ENVPLD	1320
EmIR1	AQRPTFLHLLYLLAPRFADADFRQASYFYVGDFTTQQPPPCQDFEKSTSN SA IATPAT	1659
TsoIR1	VQRPTFLHLLFLLAPRFADADFRQASYFYVGDFTTQQPPPCQDFEKSTSN S AVSVAVPAA	1639
EmIR2	ECRPSFGTIIISMLEPYVSS-VFCTNSFYLN-----QNP TR RRLEVLQADLGGEEVVAK	1636
TsoIR2	ECRPSFGTIIISMLEPYVSS-VFRTNSFYLN-----QNP TR RRQEVSHVDFGGRGESMVK	1611
	**:* :.:* * . * *:* * * . * :	

Figura 1: Alineamiento múltiple de secuencias del receptor de insulina. Comparación de las secuencias de aminoácidos correspondientes al dominio tirosina quinasa del receptor de insulina de *T. solium* (TsoIR1, TsoIR2); *E. multilocularis* (EmulR1, EmulR2); *Homo sapiens* (Homo) y *Mus musculus* (Mouse). Los rectángulos rojos resaltan los sitios conservados de fosforilación correspondientes a residuos de tirosina. Los asteriscos (*) indican residuos idénticos en dicha posición, el doble punto (:) indica sustitución conservativa y el punto (.) indica sustitución semi-conservativa.

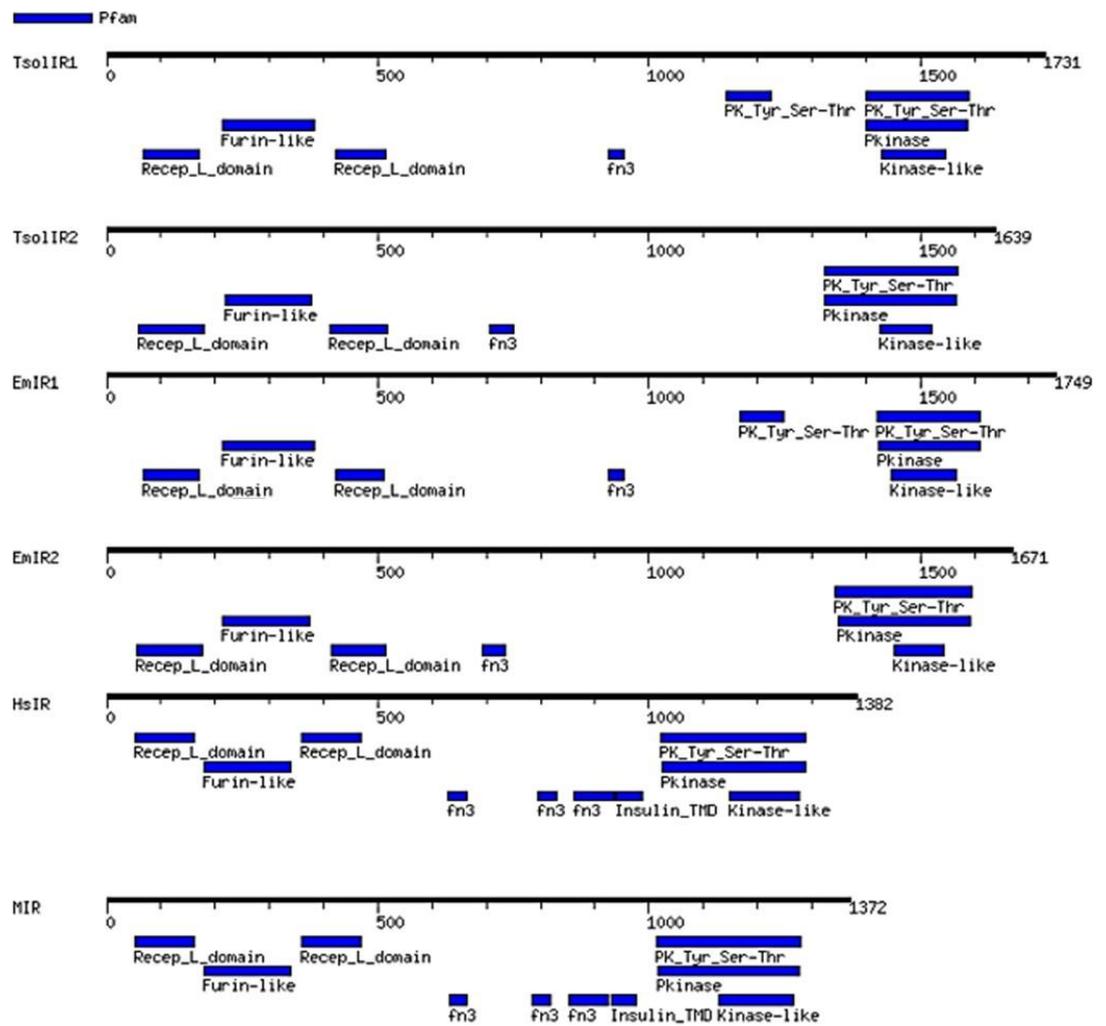


Figura 2: Identificación de dominios funcionales en la secuencia del receptor de insulina. La localización y tamaño de los dominios identificados en las secuencias de aminoácidos son mostrados como barras azules en *T. solium* (TsolR1, TsolR2); *E. multilocularis* (EmulR1, EmulR2); *Homo sapiens* (HsIR) y *Mus musculus* (MIR). El dominio de unión a ligando (LBD) está constituido los dominios L del receptor y los dominios similares a furina. Fn3: dominio de fibronectina 3

```

Emul      -----MTSSSKTSSKSATFEVGPNYVDFKMLGEGAYGVVFSAVDNRSGERVAIKKSTPFE 55
Emu       ---MSGDISDPYTIKGQVFDIGPRFTNLNYIGEGAYGMVISAFDHQRNERVAIKRITPFE 57
Tsol      --MSGDILDPMYIKGQKFDIGPRFTDLTYIGEGAYGMVISAFDNQRNERVAIKRITPFE 57
Homo      MAAAAAAGAGPEMVRGQVFDVGPRTNLSYIGEGAYGMVCSAYDNVNKVRVAIKKISPFE 60
Mouse     --MAAAAAAGPEMVRGQVFDVGPRTNLSYIGEGAYGMVCSAYDNLNKVRVAIKKISPFE 58
          .      .:  *:*:*:..... :*****:* * * *:      *****: :***

Emul      HQTYCQRTYREVKILLRFKHENIIDIRDVILVGDLETMKDVIYVQTCMDTDLYRLLKSQ 115
Emu       HQTYCQRTYREIRILSRDLHENIIPLYDVFT-TSNFEDMKEVYIVEKYMETDLYKFLKVQ 116
Tsol      HQTYCQRTYREIRILSRDLHENIIPLYDVFT-TSSFEDMKEVYIVEKYMETDLYKFLKVQ 116
Homo      HQTYCQRTLREIKILLRFKHENIIGINDIIR-APTIEQMKDVIYVQDLMETDLYKLLKTQ 119
Mouse     HQTYCQRTLREIKILLRFKHENIIGINDIIR-APTIEQMKDVIYVQDLMETDLYKLLKTQ 117
          ***:**** **:** *: ***** :*::      .:* **:*****: *:*****:*** *

Emul      AISNDHICYFLYQILRGLKYIHSANVIHRDLKPSNLLINANCDLKICDFGLARLNDPMDH 175
Emu       QLSREHTCYFLYQMLRGLKYIHSANVLHRDLKPSNILLNRMCDLRICDFGLARIADPQCD 176
Tsol      QLSREHTCYFLYQMLRGLKYIHSANVLHRDLKPSNILLNRMCDLRICDFGLARIADPQCD 176
Homo      HLSNDHICYFLYQILRGLKYIHSANVLHRDLKPSNLLNTTCDLKICDFGLARVADPDHD 179
Mouse     HLSNDHICYFLYQILRGLKYIHSANVLHRDLKPSNLLNTTCDLKICDFGLARVADPDHD 177
          :*.:* *****:*****:*****:*. * **:******: ** *

Emul      HNGMLTEYVATRWRAPPEIMLNSKGYTHAIDVWSVGCIFAEMFDRQPLFPGKHYVDQLTL 235
Emu       QAGLLTEYVATRWRAPPEIMLTSKVYTKAIDLWSIGCILAEMYSNRVLFPGKHYIDQLKM 236
Tsol      QAGLLTEYVATRWRAPPEIMLTSKVYTKAIDLWSIGCILAEMYSNRVLFPGKHYIDQLKM 236
Homo      HTGFLTEYVATRWRAPPEIMLNSKGYTKSIDIWSVGCILAEMLSNRPIFPGKHYLDQLNH 239
Mouse     HTGFLTEYVATRWRAPPEIMLNSKGYTKSIDIWSVGCILAEMLSNRPIFPGKHYLDQLNH 237
          : *:******:*****.* * **:*:*:*:*:* * * .. :*****:*** .

Emul      ILQVLGYPAEGDREWIVNTKAASFVNRFITYSKQPWNRLYPNATPQALDLLDRLLAFNPA 295
Emu       ILEVLGSPHQEDINSISNTKARTYLEQLPKRKKIPWQQLFPFADPKGLDLLDRLLCFAPS 296
Tsol      ILEVLGSPHQEDINSISNTKARMYLEQLPKRQKIPWQQLFPFADPKGLDLLDRLLCFAPS 296
Homo      ILGILGSPSQEDLNCIINLKARNYLLSLPHKNKVPWNRLFPNADSKALDLDKMLTFNPH 299
Mouse     ILGILGSPSQEDLNCIINLKARNYLLSLPHKNKVPWNRLFPNADSKALDLDKMLTFNPH 297
          ** :* * * : * : * * * * :: :      .* **:*:* * * :.*****:* * *

```

Figura 3: Alineamiento múltiple de las secuencias de ERK 1/2. Comparación de la secuencia de aminoácidos correspondiente al dominio tirosina quinasa de ERK 1/2 de *T. solium* (Tsol); *E. multilocularis* (Emul, Emu); *Homo sapiens* (Homo) y *Mus musculus* (Mouse). El rectángulo rojo resalta el motivo conservado TEY correspondiente a los residuos de treonina-ácido glutámico-tirosina. Los asteriscos (*) indican residuos idénticos en dicha posición, el doble punto (:) indica sustitución conservativa y el punto (.) indica sustitución semi-conservativa.

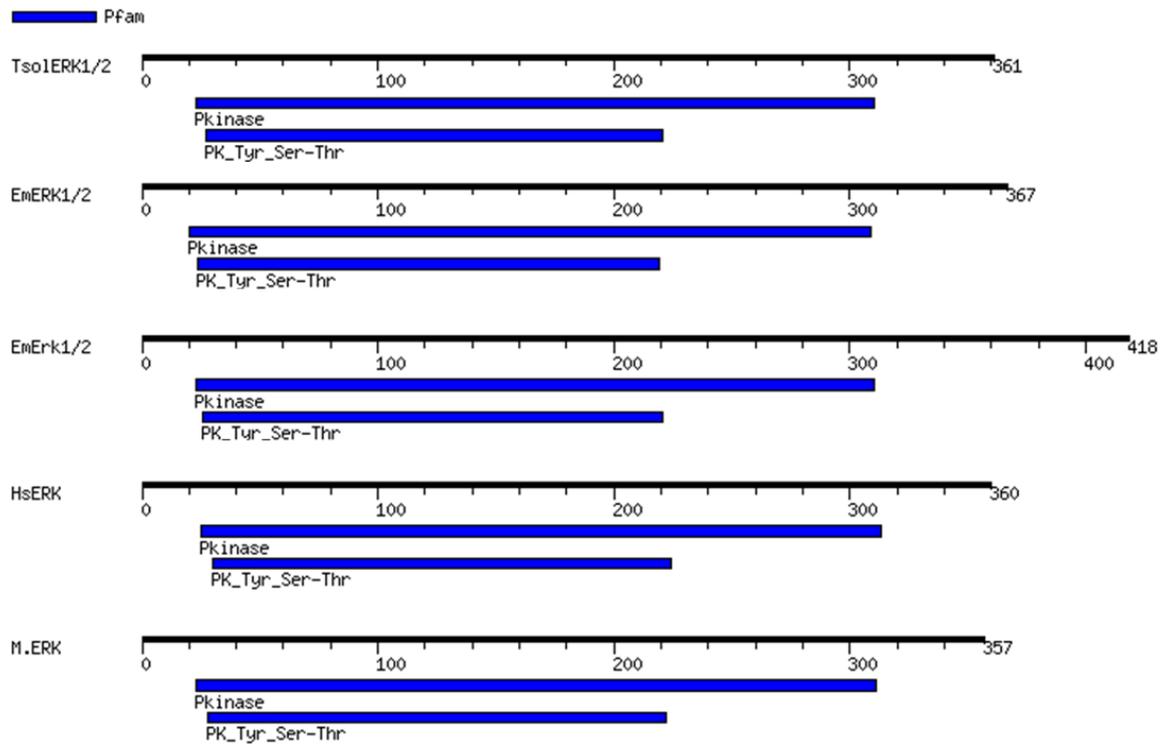


Figura 4: Identificación de los dominios funcionales en las secuencias de ERK 1/2. La localización y tamaño del dominio proteína quinasa identificado en las secuencias de aminoácidos son mostrados como barras azules en *T. solium* (TsolERK1/2); *E. multilocularis* (EmERK1/2, Emerk1/2); *Homo sapiens* (HsERK) y *Mus musculus* (MERK).

Los niveles de expresión de ambas isoformas del receptor de insulina de *T. solium* se determinaron mediante PCR cuantitativo empleando cebadores específicos. Los niveles de expresión de ambas isoformas se encuentran significativamente incrementados en el quiste racemoso comparado con el quiste vesicular (mediana: 4.5 para el quiste racemoso versus 1.0 para el quiste vesicular, valor $P < 0.01$, prueba U Mann-Whitney) (Fig. 5).

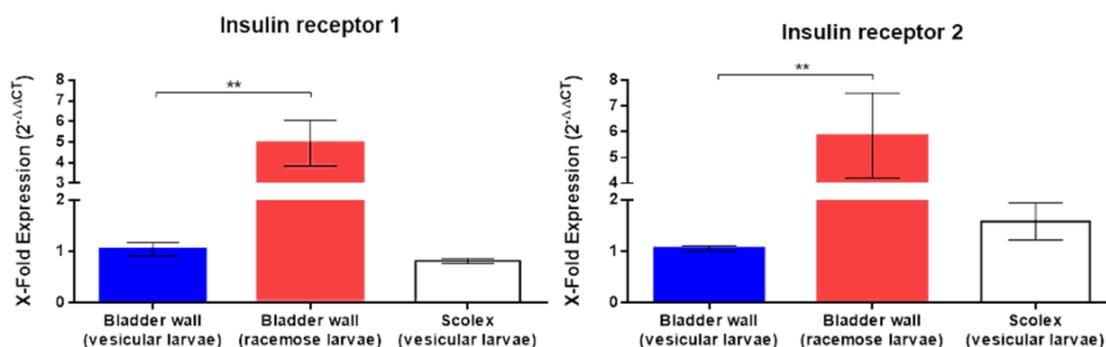


Figura 5: qPCR para los receptores 1 y 2 de *T. solium*. PCR cuantitativo empleando ADNc generado con 500 ng del ARN total de quistes racemosos comparado con la pared quística y escólex del cisticerco vesicular. Los resultados están normalizados con el gen endógeno *gapdh* y expresados como incremento de la expresión. Diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión son indicadas con asteriscos (Prueba U Mann-Whitney). Los asteriscos representan los niveles de significancia **: $P < 0.01$.

Empleando muestras de tejido de quiste racemoso y vesicular evaluamos por IF los niveles de fosforilación de la vía de señalización MAPK. El número de células positivas para el receptor de insulina fosforilado fue significativamente elevado en la pared quística de cisticerco racemoso comparado con el vesicular (media: 626.7 células en el quiste racemoso versus 0 células en el quiste vesicular, valor $P < 0.0001$, prueba one-way ANOVA) (Fig. 6B, J); estas células estuvieron completamente ausentes en la forma vesicular (Fig. 6E). A continuación, evaluamos los niveles de fosforilación de la proteína ERK 1/2 y de forma similar, observamos células positivas solo en la pared quística del cisticerco racemoso (media: 104.3 células para el quiste racemoso versus 0 células para el quiste vesicular, valor $P < 0.001$, prueba one-way ANOVA) (Fig. 7B, E, J).

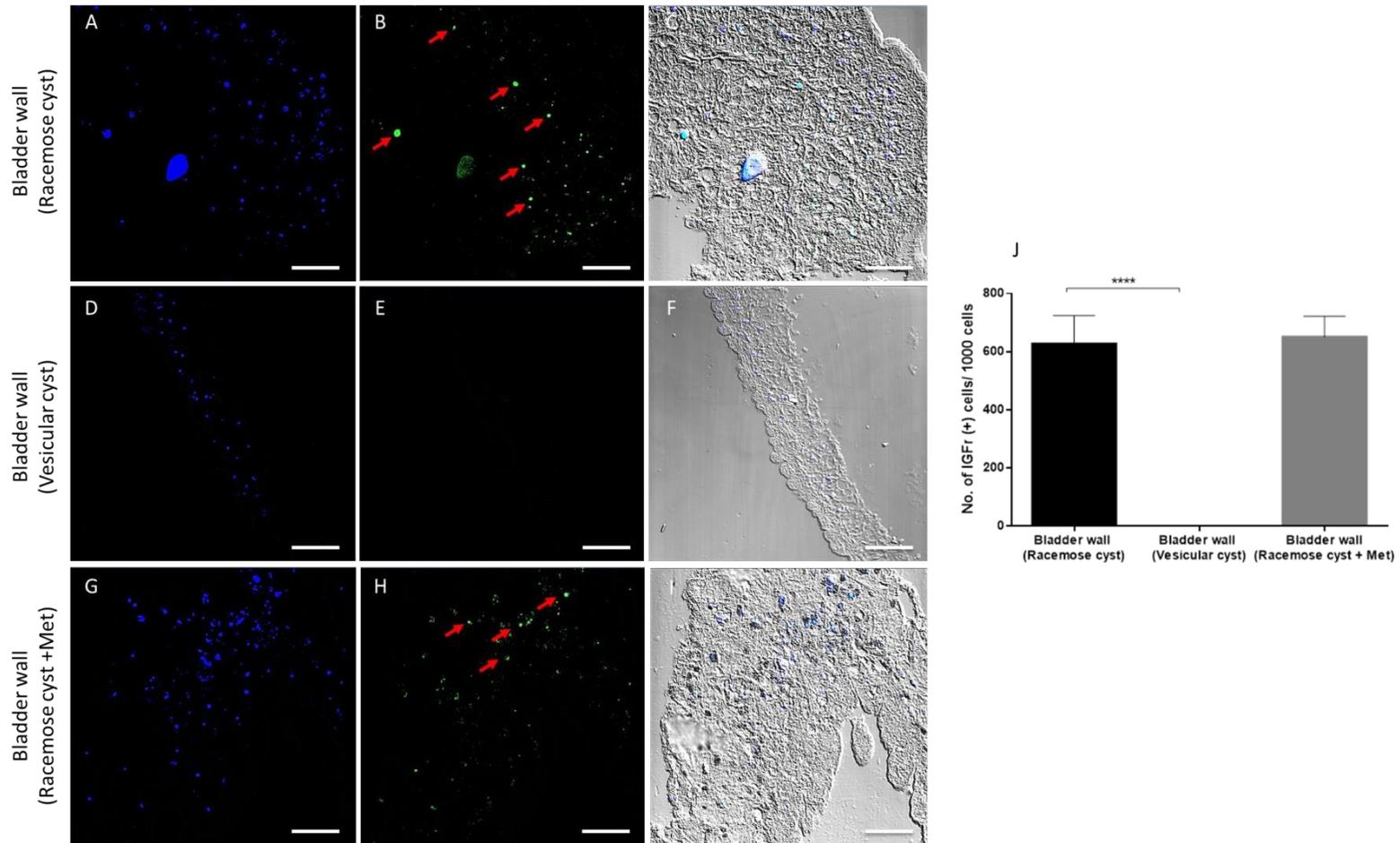


Figura 6: Identificación *in situ* del receptor de insulina fosforilado. IF realizada en quistes racemosos, vesiculares y racemosos tratados con metformina (Met). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (A, D, G), células positivas para el receptor de insulina fosforilado (B, E, H) fueron observadas solo en la pared quística del cisticerco racemoso (flechas rojas). Colocalización con campo claro (C, F, I). Imágenes representativas. El gráfico (J) representa el ratio de células positivas para el receptor de insulina fosforilado y la fluorescencia de núcleos en quistes racemosos no tratados, tratados con Met (4 mM) en relación con los quistes vesiculares. Los valores son expresados como medianas \pm la desviación estándar. Prueba One-way ANOVA (****: $P < 0.0001$)

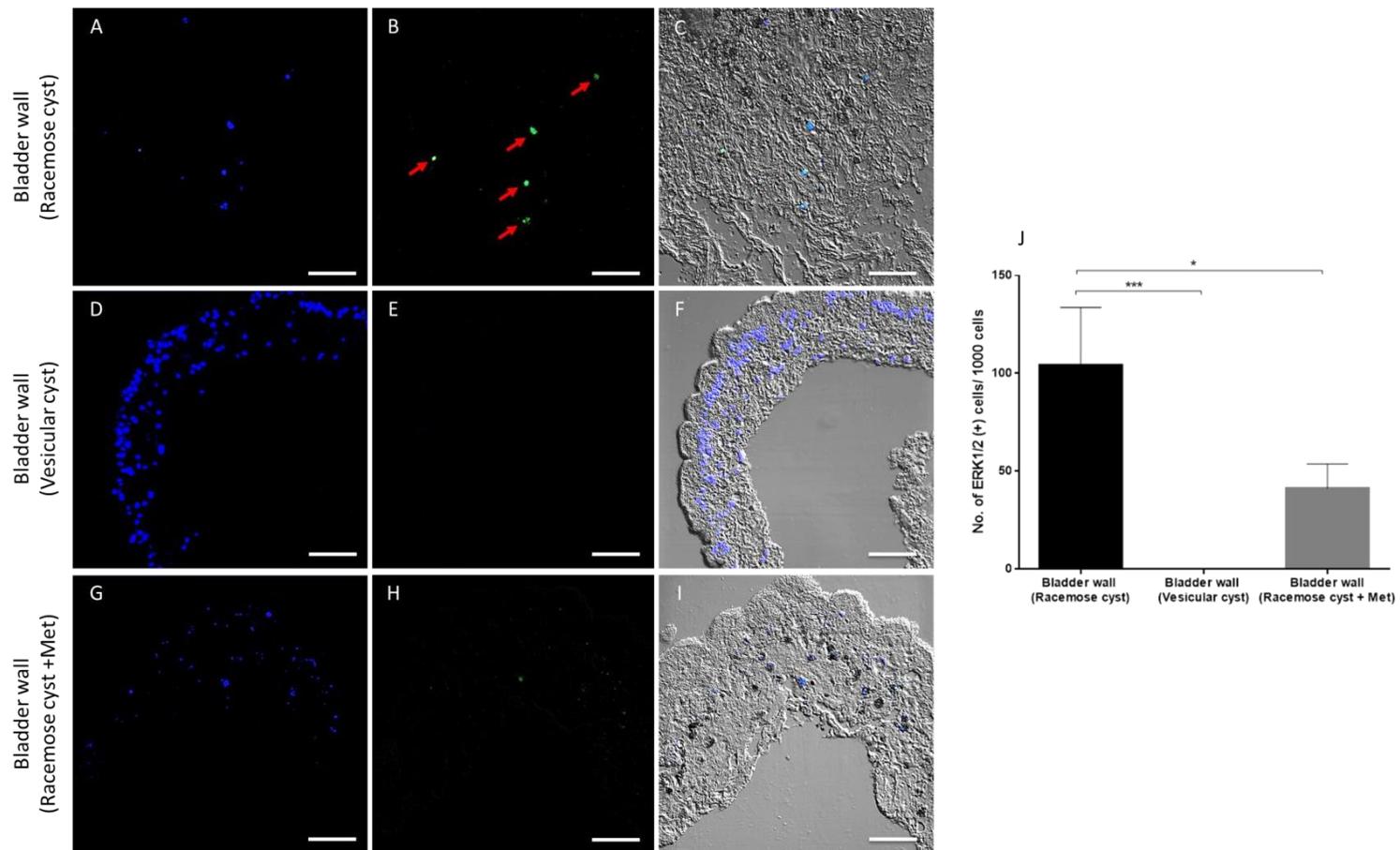


Figura 7: Identificación *in situ* de la proteína ERK 1/2 fosforilada. IF realizada en quistes racemosos, vesiculares y racemosos tratados con metformina (Met). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (A, D, G), células positivas para ERK 1/2 (B, E, H) fueron observadas solo en la pared quística del cisticerco racemoso (flechas rojas). Colocalización con campo claro (C, F, I). Imágenes representativas. El gráfico (J) representa el ratio de células positivas para ERK 1/2 fosforilado y la fluorescencia de núcleos en quistes racemosos no tratados, tratados con Met (4 mM) en relación con los quistes vesiculares. Los valores son expresados como medianas \pm la desviación estándar. Prueba One-way ANOVA (*: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$)

Procedimos a evaluar los efectos directos de la metformina (Met) en la pared quística del cisticercos racemoso. Secciones fueron incubadas por dos semanas en presencia de Met, para luego evaluar los niveles de fosforilación del receptor de insulina y de ERK 1/2 mediante IF. Observamos que Met (4mM) no tuvo efectos en los niveles de fosforilación del receptor de insulina (Fig. 6H, J) (media: 650 células para el quiste racemoso tratado versus 626 células para el quiste racemoso no tratado, prueba one-way ANOVA), sin embargo Met produjo una reducción significativa en los niveles de fosforilación de ERK 1/2 en las secciones tratadas comparado con las no tratadas (media: 41.3 células para el quiste racemoso tratado versus 104.3 células para el quiste racemoso no tratado, valor $P < 0.05$, prueba one-way ANOVA) (Fig. 7H, J).

Para evaluar los efectos de la metformina sobre las células proliferativas, empleamos secciones de pared quística de cisticercos racemosos y de *T. crassiceps* para aislar y establecer cultivos celulares como describimos previamente. Cultivamos las células proliferativas en presencia de 3 diferentes concentraciones de Met y observamos que luego de 24 horas, Met (4, 40 mM) redujo significativamente la proliferación en las células aisladas de quiste racemoso de *T. solium* (media: 270 000 células para el control versus 188 333 células para el tratamiento a 4 mM y 155 000 células para el tratamiento a 40 mM, valor $P < 0.001$; $P < 0.0001$, prueba one-way ANOVA) y en las células aisladas de quiste de *T. crassiceps* (media: 250 000 células para el control versus 188 000 células para el tratamiento a 4 mM y 150 000 células para el tratamiento a 40 mM, valor $P < 0.01$; $P < 0.001$, prueba one-way ANOVA) (Fig. 8A, B).

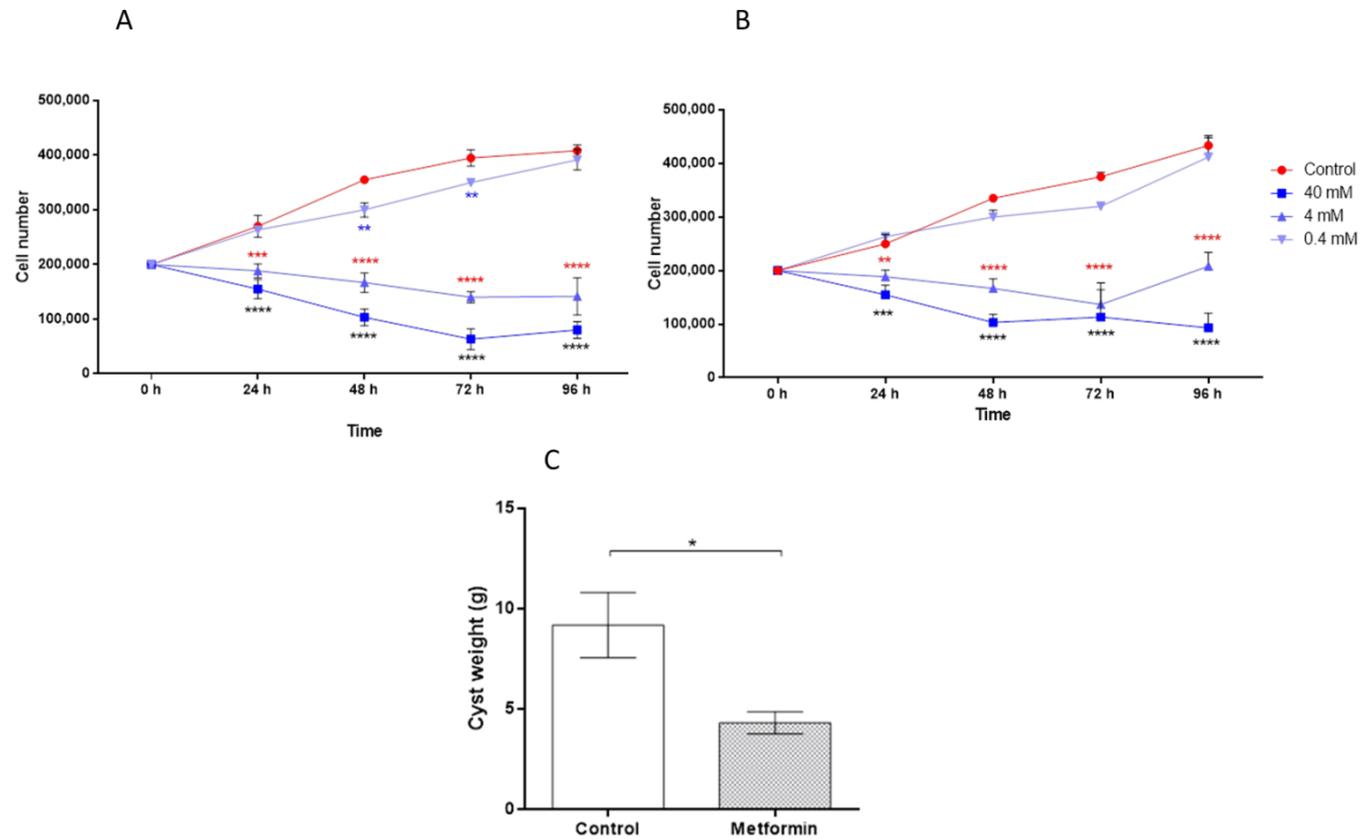


Figura 8: Eficacia *in vitro* e *in vivo* de la metformina (Met). Curvas de crecimiento de células aisladas de quistes racemosos de *T. solium* (A) y quistes de *T. crassiceps* (B). Met a 4 y 40 mM ocasionó una reducción significativa la proliferación celular luego de 24 horas (asteriscos rojos y negros). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (tratados y control). Prueba one-way ANOVA (**: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$). El gráfico en (C) muestra el peso de los quistes de *T. crassiceps* colectados de ratones no tratados (control) y tratados (Met 50 mg/Kg/día). Prueba U Mann-Whitney (*: $P < 0.05$).

Finalmente, evaluamos la eficacia *in vivo* del tratamiento con Met empleando el modelo murino de cisticercosis con *T crassiceps*. Como describimos en el capítulo previo, los quistes de la cepa ORF proliferan asexualmente en la cavidad peritoneal, sin embargo, los ratones que recibieron Met (5 mg/Kg/ día) vía oral por 3 meses presentaron una reducción significativa en el número de quistes y el peso total en un 53% en comparación con los ratones que recibieron solo agua empleados como control (mediana: 8.594 gramos para el control versus 4.331 gramos para el grupo tratado con Met, valor $P < 0.05$, prueba U Mann-Whitney) (Fig. 8C). Durante este periodo no se observaron alteraciones en el consumo de alimento.

3.5 Discusiones

Las dimensiones anormales que alcanza el quiste racemoso y su morfología sugieren alteraciones en vías de señalización asociadas con la proliferación celular. La vía MAPK desempeña un papel fundamental, en diversos organismos desde los vertebrados a los invertebrados incluidos los cestodes, en la traducción de señales extracelulares para generar diversas respuestas en la célula que incluyen proliferación, diferenciación o desarrollo (69, 70). Aunque se han identificado vías conservadas en *T. solium* (61) se desconoce su participación en la proliferación de la pared quística del cisticerco racemoso. Nuestras observaciones revelan por primera vez la presencia de células con el receptor de insulina en su forma activa (fosforilada) así como el mediador intracelular ERK 1/2 (Fig. 6, 7). Estos hallazgos sugieren la importancia en la activación de la vía MAPK/ERK en la proliferación de la pared quística del cisticerco racemoso de *T. solium*.

La vía de señalización de la insulina es altamente conservada y desempeña un papel fundamental en el crecimiento celular y la regulación metabólica (71, 72). Previamente, identificamos células proliferativas en la pared quística del cisticerco racemoso y estas células fueron sensibles a la acción de la insulina reduciendo su tiempo de duplicación (73). En este estudio demostramos que las dos isoformas del receptor de insulina se encuentran significativamente sobre expresadas en los quistes racemosos (Fig. 5), lo que probablemente indicaría un mayor requerimiento energético de las células en proliferación comparado con el quiste vesicular.

A diferencia del quiste racemoso, la forma vesicular constituye un estadio latente no proliferativo adaptado para sobrevivir en un microambiente adverso y con sus propias demandas energéticas. Se necesitan más estudios para identificar la totalidad de alteraciones metabólicas que ocurren en el quiste racemoso asociadas a su continua proliferación.

Los quistes racemosos presentan características proliferativas similares a las de un tumor, lo que de por sí sugiere un crecimiento anormal (23). De forma similar a los tumores de animales superiores, el quiste racemoso presenta alteraciones en la expresión genética y la activación de la vía MAPK. Considerando que la tumorigénesis se produce por la interacción sinérgica de vías de señalización complejas como MAPK, PI3K/Akt/ mTOR, Ras y Myc (71, 74), este estudio tuvo como objetivo evaluar puntualmente la vía MAPK-ERK 1/2. Se necesitan más estudios para determinar si las otras vías mencionadas participan en el desarrollo y proliferación del quiste racemoso.

Met inhibió la proliferación de los cultivos celulares de quistes racemosos y de *T. crassiceps* (Fig. 8A, B). Adicionalmente, secciones de la pared quística del cisticercos racemoso cultivadas en presencia de Met por dos semanas presentaron una reducción significativa del número de células positivas para la forma activa de ERK 1/2, estos hallazgos confirman la actividad anti-proliferativa de Met sobre las células germinativas presentes en la pared quística actuando puntualmente en ERK 1/2 y son consistentes con estudios preclínicos (75).

Empleando el modelo murino de cisticercosis, evaluamos *in vivo* la acción de Met y observamos una reducción del 53% en el peso de los quistes (Fig. 8C). Considerando que los quistes de *T. crassiceps* se caracterizan por una alta proliferación de la pared quística, estos resultados sugieren una acción selectiva de Met sobre las células germinativas reduciendo su tasa de proliferación y con ello inhibir la formación de nuevas vesículas.

Las concentraciones de Met utilizadas en nuestras evaluaciones *in vitro* (40, 4 y 0.4 mM) fueron altas en comparación con las concentraciones obtenidas en el plasma de los pacientes después de tomar Met (76); sin embargo, son más bajas que las concentraciones utilizadas para evaluar sus efectos *in vitro* sobre las células madre cancerígenas (75). Estudios previos reportaron que las concentraciones de Met necesarias para inducir efectos biológicos *in vitro* son mayores que los niveles plasmáticos *in vivo* debido a una posible acumulación de Met en órganos como el intestino (77, 78).

El quiste vesicular constituye un estadio latente no proliferativo, mientras que el quiste racemoso presenta características celulares y metabólicas diferentes, por lo que se debe considerar y evaluar fármacos con otros mecanismos de acción. El uso de Met para el tratamiento de la NCC racemosa representa una alternativa atractiva por actuar directamente sobre las células proliferativas pero que requiere mayores evaluaciones como su uso en combinación con praziquantel o albendazol, lo que podría mejorar la eficacia del tratamiento antihelmíntico actual.

Capítulo 4

Incremento en la captación de hierro en la pared quística del cisticerco racemoso de *T. solium*

4.1 Introducción

El espacio subaracnoideo es el área comprendida entre la aracnoides y la piamadre que rodea al cerebro y la médula espinal y a través de la cual circula el líquido cefalorraquídeo (LCR) (79). El LCR presenta una composición muy distinta con una limitada presencia de micronutrientes y factores de crecimiento comparado con la sangre (79). Sin embargo, el quiste racemoso se desarrolla y prolifera por largos periodos en ese microambiente (25). A pesar de que los requerimientos metabólicos del quiste racemoso son desconocidos, esta forma de quiste podría estar adaptada a la composición especial del LCR.

El hierro es un micronutriente inorgánico que tiene una participación esencial en numerosos procesos biológicos que incluyen la síntesis de ADN y ARN, respiración celular, actividad enzimática y metabolismo (80). Alteraciones en el metabolismo del hierro se asocian con proliferación celular, resistencia a drogas y evasión inmunológica (81).

El metabolismo del hierro que involucra consumo, almacenamiento, uso y exportación es altamente controlado debido a que el hierro libre es tóxico para las células (82). Un aumento en las concentraciones de hierro en combinación con H_2O_2 genera especies reactivas de oxígeno a través de reacciones de

Fenton (83), pudiendo ocasionar ruptura de las hebras del ADN, mutagénesis, activación de oncogenes o inhibición de genes supresores tumorales, daño en las proteínas celulares y peroxidación de lípidos (83). El exceso de hierro es neutralizado por la proteína ferritina (84) y luego es exportado o empleado de acuerdo a los requerimientos celulares.

A pesar del papel fundamental que tiene el hierro como cofactor en diversos procesos celulares, hay poca información sobre los mecanismos para la captación de este metal en *T. solium* y su papel en la proliferación continua de la pared quística de forma racemosa. Realizamos una búsqueda en el genoma de *T. solium* de las principales proteínas de unión y transporte de hierro y logramos identificar los genes de la *ferritina* y *melanotransferrina*. Adicionalmente identificamos el gen de la *ribonucleótido reductasa*.

La ferritina (FT) es una proteína de unión a hierro constituida por 24 subunidades de cadenas pesadas (H) o ligeras (L), juntas forman una estructura esférica que puede almacenar 4,500 átomos de hierro (84). FT puede ser detectada extracelularmente en suero y constituye un importante marcador de los niveles de hierro. Adicionalmente, elevados niveles en la expresión de *FT* están asociados con diversas patologías (85).

La melanotransferrina (MTF) es una proteína de transporte de hierro homologa a la transferrina sérica (86). MTF se encuentra principalmente anclada en la superficie celular y presenta una estructura bilobular. Adicionalmente, presenta puentes disulfuro y un sitio de unión a hierro en el extremo N-terminal. *MTF* es altamente expresada en células de melanoma (86).

La ribonucleótido reductasa (RNR) es una enzima clave para la síntesis *de novo* de deoxiribonucleótidos trifosfatos (dNTPs) (87), bloques de construcción para la preplicación y reparación del ADN (87, 88). RNR cataliza la sustitución del grupo OH en la posición 2' de un ribonucleósido di o tri fosfato por un átomo de hidrógeno y usa metales como el hierro o manganeso como cofactores (89). La clase más estudiada de RNRs es la Ia la cual emplea un centro de dos átomos de hierro como cofactor para generar el radical tirosilo (88, 89). Los eucariotas solo presentan enzimas de la clase Ia (88).

El quiste racemoso responde y se adapta a un microambiente con bajos niveles de factores de crecimiento y micronutrientes para suplir o compensar sus requerimientos metabólicos; sin embargo estos cambios o alteraciones en el metabolismo del parásito son poco comprendidos. En este estudio empleamos métodos histopatológicos y análisis molecular por PCR cuantitativa, para comparar el metabolismo de hierro entre las dos formas de quiste de *T. solium*.

4.2 Objetivos

- Identificar *in situ* depósitos de hierro en los quistes racemosos y vesiculares de *T. solium*.
- Determinar los niveles de expresión de proteínas de unión a hierro (*ferritina* y *melanotransferrina*) en quistes racemosos y vesiculares mediante PCR cuantitativo.

4.3 Metodología

4.3.1 Diseño experimental

Se emplearon muestras de tejido de quistes racemosos y vesiculares de *T. solium* para identificar depósitos de hierro realizando una tinción con azul de Prusia. Adicionalmente, el ARN total aislado de ambas formas de quiste fue empleado para evaluar y comparar los niveles de expresión de *FT*, *MTF* y *RNR*.

4.3.2 Colecta de muestras

Para la colecta de muestras de quistes racemosos y vesiculares de *T. solium* y quistes de *T. crassiceps*, se ejecutaron los protocolos indicados en la sección 2.3.2

4.3.3 Procesamiento de las muestras

Para determinar la viabilidad, selección y procesamiento de todas las muestras empleadas en este estudio se ejecutaron todos los protocolos indicados en la sección 2.3.3

4.3.4 Tinción con Azul de Prusia en muestras de membrana

Para identificar la presencia de depósitos de hierro en las muestras de tejido se empleó el kit Iron Stain de Abcam (ab150674, Abcam, Cambridge, Reino Unido). Las muestras embebidas en parafina de 5 quistes racemosos y 6 vesiculares fueron cortadas en secciones de 4 μm y puestas sobre láminas portaobjetos tratadas con poli-L-lisina para luego ser procesadas. Las secciones fueron desparafinadas a 56°C y rehidratadas en soluciones decrecientes de etanol (100% a 70%), luego incubadas en una solución de tinción preparada combinando volúmenes iguales de soluciones de ferrocianuro de potasio y de ácido clorhídrico por 3 min. Las secciones fueron lavadas con agua destilada y teñidas con una solución nuclear fast red por 5 min. Finalmente, las secciones fueron deshidratadas con etanol al 95% seguido con etanol absoluto. Como control positivo se emplearon muestras de bazo de ratón. Las muestras fueron observadas con un microscopio de luz (Primo Star, Zeiss, Oberkochen, Alemania) y se tomaron las imágenes empleando una cámara calibrada (AxioCam ICc1, Zeiss, Oberkochen, Alemania) empleando el programa Axio Vision (versión 4.6, Zeiss, Oberkochen, Alemania).

4.3.5 Generación de ADN complementario (ADNc) y PCR cuantitativo (qPCR) para los genes de *ferritina*, *melanotransferrina* y *ribonucleótido reductasa*

Para generar el ADNc y las posteriores evaluaciones mediante qPCR se procedió con los protocolos indicados en la sección 2.3.6 empleando ARN total aislado de seis quistes racemosos y seis vesiculares. Se diseñaron cebadores

específicos para los genes de *ferritina* (TsM_000026400) (sentido: 5'-TGGTGGCATTGTTTA-3') (antisentido: 5'-CATTGACCTCTCGCTCGATTT-3'), *melanotransferrina* (TsM_000830600) (sentido: 5'-GAATTCCCGCTCGTCTCATTAT-3') (antisentido: 5'-TTCCTGGTGCTGCATTAGTC-3'), *ribonucleótido reductasa* (TsM_000697400) (sentido: 5'-CTACGGCGGAAAGGGTTTAT-3') (antisentido: 5'-AGCGACAATTCATGCCAATAAG-3') y *gapdh* (TsM_000056400) (sentido: 5'-TCCAAGATGAATGCCAATGC-3') (antisentido: 5'-CAGAAGGCCGAGATGA-3'). Todas las secuencias están disponibles en el repositorio WormBase https://parasite.wormbase.org/Taenia_solium_prjna170813/Info/Index/

4.3.6 Análisis estadístico

Se empleó estadística no paramétrica (Prueba U de Mann-Whitney) utilizando el software Prism (Graphpad, San Diego, CA) para comparar la expresión relativa de *ferritina*, *melanotransferrina* y *ribonucleótido reductasa* en el quiste racemoso y vesicular. Las diferencias con valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativas.

4.4 Resultados

Utilizando muestras de tejido de quistes racemosos y vesiculares, evaluamos el contenido de hierro mediante la tinción con azul de Prusia, observamos depósitos de hierro sólo en la pared quística del cisticerco racemoso (Fig. 1A); regiones análogas de los quistes vesiculares fueron completamente ausentes a una tinción positiva a hierro (Fig. 1B). Adicionalmente, empleamos muestras de quistes de *T. crassiceps* y observamos depósitos de hierro en la pared quística cerca de los puntos de formación de los nuevos brotes (Fig. 1C).

La expresión de las dos proteínas de unión a hierro y RNR se determinó mediante PCR cuantitativa utilizando cebadores específicos. Observamos un incremento significativo en los niveles de expresión para los tres genes en el quiste racemoso en comparación con los quistes vesiculares (mediana de *FT*: 6,4 para la pared quística del cisticerco racemoso versus 1,0 para la pared quística del cisticerco vesicular, valor $P < 0,0022$, prueba U de Mann-Whitney); (mediana de *MTF*: 10,16 para la pared quística del cisticerco racemoso versus 1,0 para la pared quística del cisticerco vesicular, valor $P < 0,0121$, prueba U de Mann-Whitney); (mediana de RNR: 89.88 para pared quística del cisticerco racemoso versus 1.0 para la pared quística del cisticerco vesicular, valor $P < 0.0004$, prueba U de Mann-Whitney) (Fig. 2).

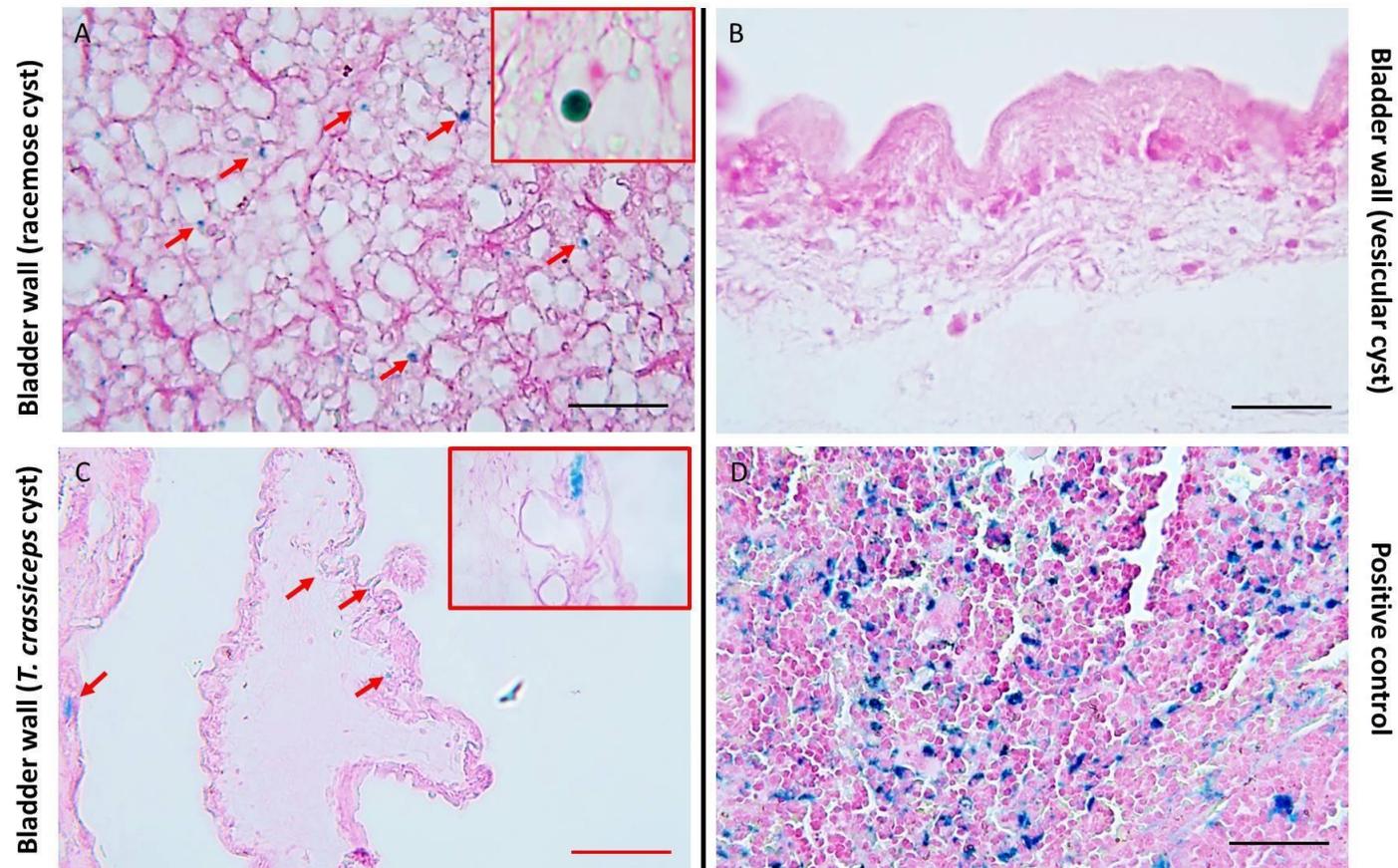


Figura 1: Identificación *in situ* de depósitos de hierro en la pared quística del cisticerco racemoso. Tinción con azul de Prusia realizada en muestras de quistes racemosos (A), vesiculares (B) y quistes de *T. crassiceps* (C). Los depósitos de hierro férrico solo fueron observadas en el quiste racemoso y en los quistes de *T. crassiceps* (flechas rojas). Se inserta una imagen ampliada (cuadrado rojo en A y C). El tejido de bazo de ratón (D) fue empleado como control positivo. Imágenes representativas. Barra de escala roja: 100 μ m, barra de escala negra: 50 μ m.

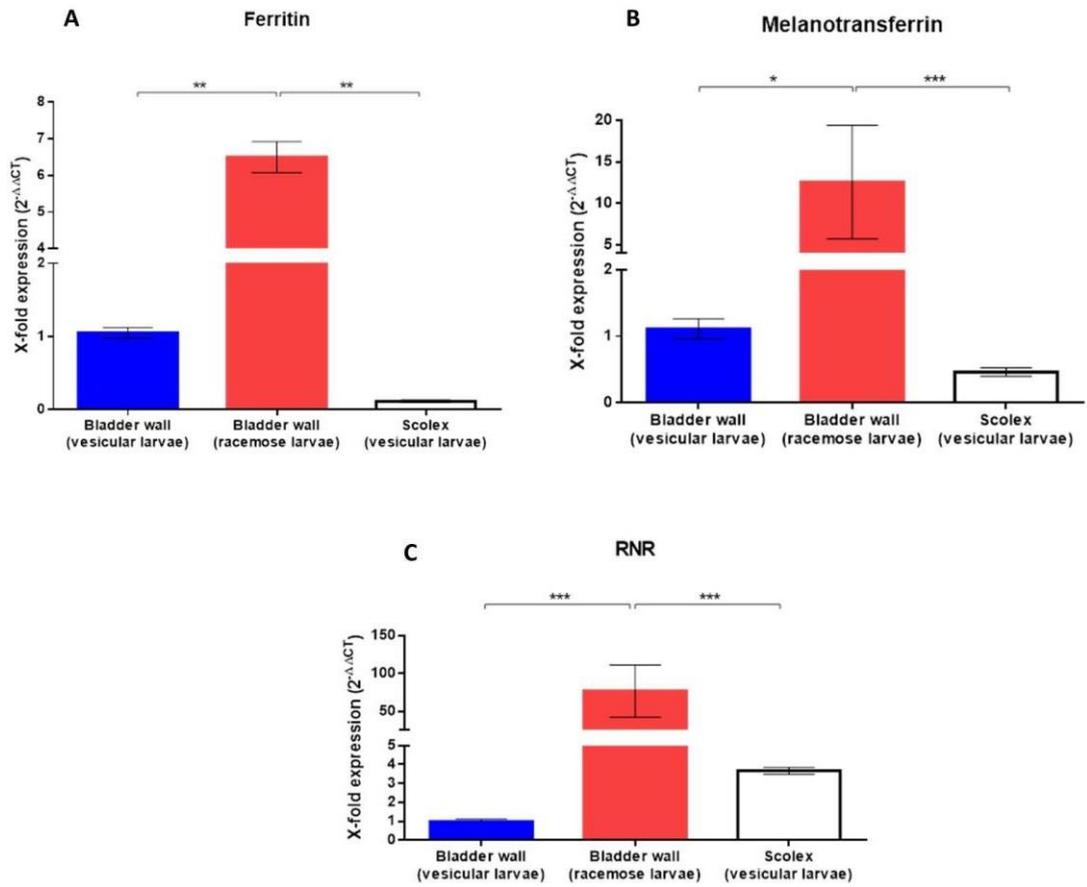


Figura 2: Niveles de expresión de la *ferritina*, *melanotransferrina* y *ribonucleótido reductasa* en el quiste de *T. solium*. PCR cuantitativo empleando ADNc generado a partir de 500 ng de ARN total de quistes racemosos y vesiculares. Los resultados fueron normalizados empleando los niveles de expresión del gen *gapdh*. Diferencias significativas (Prueba U, Mann-Whitney) en los niveles de expresión son indicadas con el asterisco. *: $P < 0.005$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

4.5 Discusiones

Los procesos que conducen a la formación del quiste racemoso así como los cambios moleculares y metabólicos asociados a su proliferación son desconocidos. Es probable que en comparación con el quiste vesicular quiescente, los quistes racemosos en proliferación requieran mayores niveles de nutrientes y aporte energético.

El hierro es un elemento indispensable requerido en múltiples procesos esenciales para la célula que incluyen la síntesis de cofactores para la producción de energía a través de la transferencia de electrones entre los complejos de la cadena de respiración mitocondrial (90). Adicionalmente, la enzima ribonucleótido reductasa requiere de hierro para la síntesis de los deoxiribonucleótidos empleados durante la replicación del ADN (91). Empleando muestras de quiste racemoso, observamos la presencia de depósitos de hierro en la pared quística a diferencia de la forma vesicular (Fig. 1A, B)

La cepa ORF de *T. crassiceps* prolifera por brotes (33) y al igual que en el quiste racemoso, observamos depósitos de hierro en la pared quística cerca de los puntos de formación de los nuevos brotes (Fig. 1C). Ambos resultados sugieren que parásitos altamente proliferativos absorben y almacenan hierro para suplir los requerimientos metabólicos asociados con su continua proliferación.

Estudios previos demostraron que los quistes de *T. solium* establece mecanismos para adquirir nutrientes del hospedero (92-94). Se ha postulado que el quiste vesicular podría captar complejos plasmáticos de haptoglobina-hemoglobina del hospedero como una fuente de hierro (94). Sin embargo, el quiste racemoso se desarrolla en un microambiente particular, esto significa que el parásito no tiene las mismas fuentes nutricionales. Nuestros resultados de qPCR demuestran un significativo incremento en la expresión de dos genes cuyos productos son proteínas de unión a hierro (Fig. 2A, B). Esto podría sugerir una adaptación del parásito para captar y almacenar el escaso hierro presente en el LCR.

En los capítulos 2 y 3 del presente trabajo, demostramos la presencia de células mitóticamente activas en la pared quística del quiste racemoso y estas células tienen la vía de señalización MAPK activa (73, 95). Para asegurar la división celular, el parásito requiere mantener los niveles de dNTPs necesarios para la síntesis de nuevas moléculas de ADN. La RNR, enzima que requiere hierro para catalizar el paso limitante en la síntesis de dNTPs, es esencial para la proliferación de la célula. Nuestros resultados de qPCR demuestran que en el quiste racemoso hay un incremento significativo en la expresión del gen RNR (Fig. 2C), esto sugiere una estrecha asociación con la presencia de depósitos de hierro y su participación en la continua proliferación de la pared quística.

El quiste vesicular constituye un estadio latente no proliferativo, mientras que el quiste racemoso presenta características celulares y metabólicas muy particulares (73, 95). El uso de fármacos como la deferoxamina (DFO), un agente quelante (96) podría ser evaluada en combinación con las drogas antihelmínticas como el praziquantel o albendazol para el tratamiento de la NCC racemosa, en un intento por mejorar la eficacia del tratamiento antihelmíntico actual.

Capítulo 5

5.1 Discusiones generales

El objetivo general de esta tesis fue caracterizar parcialmente la pared quística del cisticerco racemoso de *T. solium*, identificando cambios en los componentes celulares de esta estructura, en la expresión relativa de genes asociados a su continua proliferación y aumento en la captación del hierro. Este estudio pudo concretarse al contar con acceso a material biológico extremadamente valioso por obtenerse solo mediante intervención quirúrgica.

En el capítulo 2 se caracterizó mediante histología una colección de muestras de quistes racemosos y demostramos que la pared quística es una estructura heterogénea presentando regiones viables proliferativas y regiones con diferentes grados de degeneración tisular y necrosis. Adicionalmente demostramos que a diferencia del quiste vesicular, el quiste racemoso presenta células germinativas mitóticamente activas distribuidas en su pared quística. Este estudio constituye el primer reporte sobre la presencia e importancia de esta particular población celular en los eventos de proliferación y expansión de la pared quística del parásito. Nuestros resultados nos permiten proponer el modelo de absorción del escólex que explicaría la naturaleza proliferativa, aberrante y estéril (por carecer de escólex) del quiste racemoso.

T. crassiceps es una de las especies en las que se ha reportado previamente la presencia de células proliferativas, su inclusión en el presente estudio representa un excelente control para las evaluación histológicas y morfológicas de las células germinativas corroborando la importancia de estas células en el crecimiento continuo del cisticerco.

Por otra parte, establecimos un protocolo que permite aislar y cultivar de las células germinativas y demostramos que las células son sensibles a la acción de la hormona insulina, lo que reflejaría el tropismo natural durante el desarrollo del cisticerco racemoso y la estrecha interacción hospedero-parásito. El sistema de cultivos celulares constituye una poderosa herramienta para evaluar en futuros ensayos la acción de otras biomoléculas que permitan acondicionar el medio de cultivo con el objetivo de lograr la regeneración total del cisticerco; además poder evaluar fármacos que actúen sobre las células germinativas y que puedan ser empleados en el tratamiento de la NCC racemosa.

Luego de observar los efectos de la insulina sobre las células germinativas evaluamos en el capítulo 3 la vía de señalización intracelular de esta hormona, particularmente la vía de las MAPK y demostramos que el quiste racemoso presenta la vía MAPK activa. Si bien los principales componentes de la vía fueron previamente reportados en *T. solium*, este trabajo demuestra por primera vez el importante papel que tiene la vía MAPK-ERK 1/2 en la proliferación de

la pared quística del cisticerco racemoso. La vía MAPK representa un blanco terapéutico atractivo para la evaluación de drogas de bajo costo como la metformina.

En el capítulo 4, evaluamos el metabolismo del hierro en el quiste racemoso y demostramos que a diferencia del quiste vesicular, el quiste racemoso presenta depósitos de hierro en la pared quística. Este estudio demuestra por primera vez el aumento en la captación y almacenamiento de este micronutriente en la forma racemosa lo que indicaría la adaptación del parásito a un medio ambiente limitado en factores de crecimiento y nutrientes. La presencia de depósitos de hierro podría suplir las demandas energéticas asociadas a los procesos de proliferación a través de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, sin embargo, se requieren mayores estudios para determinar el posible aumento en la síntesis de proteínas de la cadena respiratoria como el Citocromo C en el quiste racemoso.

Estudios realizados en *E. multilocularis*, demuestran el importante papel de la vía WNT en el desarrollo coordinado y direccionado del parásito regulando la expresión de genes asociados a proliferación y diferenciación a través de los llamados ejes de polarización anterior/posterior. Dado que el quiste racemoso carece de escólex, las posibles alteraciones en la vía de señalización WNT así como su participación en la proliferación de la pared quística del cisticerco

racemoso son desconocidas por lo que se recomienda evaluar en futuros estudios la vía WNT en el quiste racemoso.

Finalmente, este estudio demuestra que el quiste racemoso presenta alteraciones en los niveles de expresión génica asociados a la presencia de células mitóticamente activas en su pared quística, sin embargo recomendamos realizar la caracterización molecular completa de las células germinativas para poder identificar: subpoblaciones, marcadores de superficie para optimizar su aislamiento y componentes secretados que puedan ser empleados en sistemas de diagnóstico.

5.2 Conclusiones generales

Basados en los resultados obtenidos podemos indicar que el cisticerco racemoso de *T. solium* presenta características celulares, moleculares y metabólicas únicas en comparación al cisticerco vesicular. Estas características permiten comprender las bases biológicas de su formación y desarrollo y a su vez nos permiten abordar la infección desde otro enfoque para proponer la evaluación de nuevas drogas con el objetivo de mejorar la eficacia de los actuales esquemas de tratamiento en la NCC racemosa.

De esta forma podemos resaltar las principales conclusiones:

1. El quiste racemoso presenta células germinativas mitóticamente activas distribuidas en su pared quística y las células son sensibles *in vitro* a la acción de la hormona insulina.
2. El quiste racemoso presenta la vía MAPK activa y responde *in vitro* e *in vivo* al tratamiento con metformina.
3. El quiste racemoso presenta depósitos de hierro en la pared quística y una alta expresión en genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo del hierro.

5.3 Limitaciones

El presente estudio presentó dos principales limitaciones:

1. Las muestras de quistes empleadas en el presente estudio provienen de diferentes hospederos (racemosos obtenidos de pacientes y vesiculares de cerdos infectados), lo que podría resultar un sesgo en los resultados obtenidos, sin embargo, no existe reporte que describa el desarrollo de quistes racemosos en cerdos y no se contó con el acceso a muestras de quistes vesiculares humanos.
2. Debido a principios éticos, no se contó con los permisos necesarios para acceder al historial clínico de los pacientes intervenidos para la obtención de los remanentes de quiste racemoso, de esta forma no se obtuvo la información relevante como: neuroimágenes, edad y género de los pacientes, administración previa de antihelmínticos u otros medicamentos que puedan afectar directamente en la viabilidad de las muestras.
3. La ejecución del presente proyecto durante el estado de emergencia sanitaria no permitió el envío de muestras al extranjero para realizar ensayos adicionales planteados en un inicio como el análisis del transcriptoma mediante RNAseq de ambas formas del quiste de *T. solium*. Por otra parte, la adquisición de reactivos también fue limitada, ante esta situación se optó por evaluar un número reducido de marcadores celulares y biomoléculas de fácil acceso como la insulina.

Referencias bibliográficas

1. Ruppert EE, Barnes RD. Invertebrate zoology. 6th ed. Fort Worth: Saunders College Pub. 1994.
2. Olson PD, Zarowiecki M, Kiss F, Brehm K. Cestode genomics – progress and prospects for advancing basic and applied aspects of flatworm biology. *Parasite Immunology*. 2012; 34: 130-150.
3. Bobes RJ, Fragoso G, Fleury A, García-Varela M, Scitutto E, Larralde C, Laclette JP. Evolution, molecular epidemiology and perspectives on the research of taeniid parasites with special emphasis on *Taenia solium*. *Infection, Genetics and Evolution*. 2014; 23: 150-160.
4. García HH, Gonzalez AE, Evans CA, Gilman RH, Cysticercosis Working Group in Peru. *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet*. 2003; 16; 362 (9383):547-56.
5. García HH, Nash TE, Del Brutto OH. 2014. Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *Lancet Neurol*. 13 (12): 1202-15.
6. Pawlowski ZS. *Taenia solium*: Basic biology and Transmission. In *Taenia solium Cysticercosis from basic to clinical science*. Singh G, Prabhakar S. CABI Publishing. 2002. NY, USA.
7. Nash TE, Garcia HH. Diagnosis and treatment of neurocysticercosis. *Nature reviews Neurology*. 2011; 7: 584-594.
8. Restrepo BI, Alvarez JI, Castaño JA, Arias LF, Restrepo M, Trujillo J, et al. Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile. *Infect. Immun*. 2001; 69(7): 4554-60.

9. Laclette JP, Shoemaker CB, Richter D, Arcos L, Pante N, Cohen C, et al. Paramyosin inhibits complement C1. *The journal of immunology*. 1992; 148: 124-128.
10. Hamamoto Filho PT, Fragoso G, Sciutto E, Fleury A. Inflammation in neurocysticercosis: clinical relevance and impact on treatment decisions. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 2021; 19(12): 1503-1518.
11. Carpio A, Romo M. The relationship between neurocysticercosis and epilepsy: an endless debate. *Arq Neuropsiquiatr.* 2014; 72(5):383-390
12. Verma A, Prasad KN, Cheekatla SS, Nyati KK, Paliwal VK, Gupta RK. 2011. Immune response in symptomatic and asymptomatic neurocysticercosis. *Med. Microbiol. Immunol* 200: 255-261.
13. Sáenz B, Fleury A, Chavarría A, Hernández M, Crispin JC, Vargas-Rojas MI, et al. Neurocysticercosis: local and systemic immune-inflammatory features related to severity. *Med. Microbiol. Immunol.* 2012; 201: 73-80.
14. Alvarez JI, Colegial CH, Castaño CA, Trujillo J, Teale JM, Restrepo BI. 2002. The human nervous tissue in proximity to granulomatous lesions induced by *Taenia solium* metacestodes displays an active response. *J Neuroimmun* 127:139-144.
15. Takayanagui OM, Odashima NS. Clinical aspects of neurocysticercosis. *Parasitol. Int.* 2006; 55 Suppl:S111-5.
16. Moyano LM, Saito M, Montano SM, Gonzalez G, Olaya S, Ayvar V, González I, Larrauri L, Tsang VC, Llanos F, Rodríguez S, Gonzalez AE, Gilman RH, Garcia HH. 2014. Neurocysticercosis as a cause of

- epilepsy and seizures in two community-based studies in a cysticercosis-endemic region in Peru. *Plos Negl. Trop. Dis.* 8(2): e2692.
17. Garcia HH, Gonzalez AE, Tsang VCW, O'Neal SE, Llanos-Zavala F, Gonzalv3ez G, et al. Elimination of *Taenia solium* transmission in northern Peru. *N. Engl. J. Med.* 2016; 374: 2335-44.
 18. Allan JC, Vasquez-Tohom M, Fletes C, Torres-Alvarez R, Lopez-Virula G, Yurrita P, et al. Mass chemotherapy for intestinal *Taenia solium* infection: effect on prevalence in humans and pigs. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1997; 91: 595-8.
 19. Garcia HH, Gonzalez AE, Gilman RH, Moulton LH, Verastegui M, Rodriguez S, et al. Combined human and porcine mass chemotherapy for the control of *T. solium*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006; 74: 850-5.
 20. Assana E, Kyngdon CT, Gauci CG, Geerts S, Dorny P, De Deken R, et al. Elimination of *Taenia solium* transmission to pigs in a field trial of the TSOL18 vaccine in Cameroon. *Int. J. Parasitol.* 2010; 40: 515-9.
 21. Mwidunda SA, Carabin H, Matuja WBM, Winkler AS, Ngowi HA. A school based cluster randomised health education intervention trial for improving knowledge and attitudes related to *Taenia solium* cysticercosis and taeniasis in Mbulu district, northern Tanzania. *PLoS One.* 2015; 10: e0118541
 22. Fleury A, Carrillo-Mezo R, Flisser A, Sciutto E, Corona T. Subarachnoid basal neurocysticercosis: a focus on the most severe form of the disease. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2011; 9(1):123-133

23. Trelles, J.O., Roca, E. and Ravens, R. Estudios sobre neurocisticercosis. I. Sobre la fina estructura de la membrana vesicular quística y racemosa – Deducciones patológicas. *Rev. Neuro Psiquiatría*. 1952; 15, 1-35.
24. Das RR, Tekulve KJ, Agarwal A, Tormoehlen LM. Racemose Neurocysticercosis. *Semin Neurol*. 2012; 32: 550-556.
25. Nash TE, O'Connell EM, Hammound DA, Wetzler L, Ware JM, Mahanty S. Natural history of treated subarachnoid neurocysticercosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2020; 102(1): 78-89.
26. Escobar A, Weidenheim KM. The pathology of neurocysticercosis. In: Singh G, Prabhakar S. *Taenia solium Cysticercosis from basic to clinical science*. NY, USA: CABI Publishing; 2002.
27. Brehm K. Echinococcus multilocularis as an experimental model in stem cell research and molecular host-parasite interaction. *Parasitology*. 2010; 137: 537-555.
28. Toledo A, Cruz C, Fragoso G, Laclette JP, Merchant T, Hernandez M, et al. In vitro culture of Taenia crassiceps larval cells and cyst regeneration after injection into mice. *J. Parasitol.* 1997; 83: 189-193.
29. Brehm K, Koziol U. Echinococcus-Host Interactions at Cellular and Molecular Levels. *Adv. Parasitol.* 2017; 95: 147-212.
30. Schubert A, Koziol U, Cailliau K, Vanderstraete M, Dissous C, Brehm K. Targeting Echinococcus multilocularis stem cells by inhibition of the Polo-like kinase EmPLK1. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(6): e2870

31. Koziol U, Rauschendorfer T, Zanon Rodríguez L, Krohne G, Brehm K. The unique stem cell system of the immortal larva of the human parasite *Echinococcus multilocularis*. *Evodevo*. 2014; 5(1):10.
32. Koziol U, Radio S, Smircich P, Zarowiecki M, Fernández C, Brehm K. A novel terminal-repeat retrotransposon in miniature (TRIM) is massively expressed in *Echinococcus multilocularis* stem cells. *Genome Biol Evol*. 2015; 7(8):2136-53.
33. Robinson P, White AC, Lewis DE, Thornby J, David E, Weinstock J. Sequential expression of the neuropeptides substance P and somastostatin in granulomas associated with murine cysticercosis. *Infect. Immun*. 2002; 70(8): 4534-4538.
34. Orrego MA, Cangalaya C, Nash TE, Guerra-Giraldez C. Identification of proliferating cells in *Taenia solium* cysts (Article in Spanish). *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública*. 2014; 31: 717-721.
35. Gonzales AE, Bustos JA, Jimenez JA, Rodriguez ML, Ramirez MG, Gilman RH, et al. Efficacy of diverse antiparasitic treatments for cysticercosis in the pig model. *Am.J.Trop.Med.Hyg*. 2012; 87 (2): 292-296.
36. Logan-Klumper FJ, De Silva N, Boehme U, Rogers MB, Velarde G, McQuillan JA, et al. GeneDB—an annotation database for pathogens. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40 (Database issue): D98-108.
37. Solana J. RNA in situ hybridization on planarian paraffin sections. *Methods Mol. Biol*. 2018; 1774: 393-404.

38. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT) method. *Methods*. 2001; 25(4): 402-8.
39. Spiliotis M, Brehm K. Axenic in vitro cultivation of *Echinococcus multilocularis* metacestode vesicles and the generation of primary cell cultures. *Methods in molecular biology*. 2009; 470: 245-262.
40. Paredes A, Sáenz P, Marzal MW, Orrego MA, Castillo Y, Rivera A, et al. Anti-*Taenia solium* monoclonal antibodies for the detection of parasite antigens in body fluids from patients with neurocysticercosis. *Exp.Parasitol*. 2016; 166: 37-43.
41. Rossi L, Salvetti A, Batistoni R, Deri P, Gremigni V. Planarians, a tale of stem cells. *Cell Mol. Life Sci*. 2008; 65(1): 16-23.
42. Rodriguez S, Dorny P, Tsang VC, Pretell EJ, Brandt J, Lescano AG, et al. Detection of *Taenia solium* antigens and anti-*T.solium* antibodies in paired serum and cerebrospinal fluid samples from patients with intraparenchymal or extraparenchymal neurocysticercosis. *J.Infect.Dis*. 2009; 199(9): 1345-52.
43. Escobedo G, Romano MC, Morales-Montor J. Differential in vitro effects of insulin on *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* cysticerci. *J.Helminthol*. 2009; 83(4): 403-12.
44. Zenker FA. Ueber den *Cysticercus racemosus* des Gehirns. *Beitr Anat Embryolo J Henle Festg*. 1882: 119-140.

45. Chung JY, Kho WG, Hwang SY, Je EY, Chung YT, Kim TS, et al. Molecular determination of the origin of acephalic cysticercus. *Parasitology*.2005; 130: 239-246.
46. Rabiela MT, Rivas A, Flisser A. Morphological types of *Taenia solium* cysticerci. *Parasitol. Today*. 1989; 5(11): 357-9.
47. Henneberg R. Die teirschen Parasiten des Zentralnervensystem. In: Bumke und Foerster's Handbuch der Neurlogie. Vierzehuten Band. Springer-Verlag, Berlin, Germany. 1936: 286-219.
48. Archambault V, Glover D. Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2009; 10: 265-275.
49. Schmucker S, Sumara I. Molecular dynamics of PLK1 during mitosis. *Mol. Cell. Oncol*. 2014; 1(2): e954507.
50. Cholewa BD, Liu X, Ahmad N. The role of polo-like kinase 1 in carcinogénesis: cause or consequence?. *Cancer Res*. 2013; 73(23): 6848-55.
51. Li H, Wang Y, Liu X. Plk1-dependent phosphorylation regulates functions of DNA topoisomerase II alpha in cell cycle progression. *J. Biol. Chem*. 2008; 283(10): 6209-21.
52. Wu ZQ, Liu X. Role for Plk1 phosphorylation of Hbo1 in regulation of replication licensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008; 105(6): 1919-24.
53. Wikgren BJ. Studies on the mitotic activity in plerocercoids of *Diphyllobothrium latum* L. (Cestoda). 1964; 27(2): 1-33

54. Bolla RI, Roberts LS. Developmental physiology of cestodes. IX. Cytological characteristics of germinative region of *Hymenolepis diminuta*. *J.Parasitol.* 1971; 57(2): 267-77.
55. Willms K, Merchant MT, Gomez M, Robert L. *Taenia solium*: germinal cell precursors in tapeworms grown in hamster intestine. *Arch. Med. Res.* 2001; 32: 1-7.
56. Valkounova J, Zdárská Z, Slais J. Histochemistry of the racemose form of *Cysticercus cellulosae*. *Folia Parasitol. (Praha).* 1992; 39(3):207-26.
57. Nash TE, Singh G, White AC, Rajshekhar V, Loeb JA, Proano JV, et al. Treatment of neurocysticercosis: current status and future research needs. *Neurology.* 2006; 67:1120-1127.
58. Garcia E, Ordoñez G, Sotelo J. Antigens from *Taenia crassiceps* cysticerci used in complement fixation, enzyme-linked immunosorbent assay, and western blot (immunoblot) for diagnosis of neurocysticercosis. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33(12): 3324-5.
59. Arruda GC, da Silva ADT, Quagliato EMAB, Maretti MA, Rossi CL. Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens for the serodiagnosis of neurocysticercosis. *Trop. Med. Int. Health.* 2005; 10(10): 1005-12.
60. Steegmaier M, Hoffmann M, Baum A, Lénárt P, Petronczki M, Krssák M, et al. BI 2536, a potent and selective inhibitor of polo-like kinase 1, inhibits tumor growth in vivo. *Current Biology.* 2007; 17: 316-322.

61. Loos JA, Dávila VA, Brehm K, Cumino AC. Metformin suppresses development of the *Echinococcus multilocularis* larval stage targeting the TOR pathway. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2020; ACC01808-19.
62. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014; 6(1):a009191.
63. Wang S, Luo X, Zhang S, Yin C, Dou Y, Cai X. Identification of putative insulin-like peptides and components of insulin signaling pathways in parasitic platyhelminths by the use of genome-wide screening. *FEBS J.* 2014; 281(3): 877-93.
64. Wang L, Liang P, Wei Y, Zhang S, Guo A, Liu G, et al. *Taenia solium* insulin receptors: promising candidates for cisticercosis treatment and prevention. *Acta Trop.* 2020; 209: 105552.
65. Benyoucef S, Surinya KH, Hadaschik D, Siddle K. Characterization of insulin/IGF hybrid receptors: contributions of the insulin receptor L2 and Fn1 domains and the alternatively spliced exon 11 sequence to ligand binding and receptor activation. *Biochem J.* 2007; 403(3): 603-13.
66. Sun XJ, Crimmins DL, Myers Jr MG, Miralpeix M, White MF. Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. *Mol Cell Bio.* 1993; 13(12): 7418-28.
67. Loos JA, Dávila VA, Rodrigues CR, Petrigh R, Zoppi JA, Crocenzi FA, et al. Metformin exhibits preventive and therapeutic efficacy against experimental cystic echinococcosis. *Plos Negl Trop Dis.* 2017; 11(2):e0005370.

68. Li L, Wang T, Hu M, Zhang Y, Chen H, Xu L. Metformin Overcomes Acquired Resistance to EGFR TKIs in EGFR-Mutant Lung Cancer via AMPK/ERK/NF- κ B Signaling Pathway. *Front Oncol.* 2020; 10: 1605.
69. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research.* 2002; 12(1): 9-18.
70. Cheng Z, Liu F, Li X, Dai M, Wu J, Guo X, et al. EGF-mediated EGFR/ERK signaling pathway promotes germinative cell proliferation in *Echinococcus multilocularis* that contributes to larval growth and development. *Plos. Negl. Trop. Dis.* 2017; 11(2):e0005418.
71. Guo YJ, Pan WW, Liu SB, Shen ZF, Xu Y, HU LL. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med.* 2020; 19(3): 1997-2007.
72. Hemer S, Konrad C, Spiliotis M, Koziol U, Schaack D, Förster S, et al. Host insulin stimulates *Echinococcus multilocularis* insulin signalling pathways and larval development. *BMC Biol.* 2014; 12:5.
73. Orrego, M.A., Verastegui, M.R., Vasquez, C.M., Koziol, U., Laclette, J.P., Garcia, H.H., Nash, T.E., Cysticercosis Working Group in Peru. 2021. Identification and culture of proliferative cells in abnormal *Taenia solium* larvae: Role in the development of racemose neurocysticercosis. *Plos Negl Trop Dis.* 15(3), e0009303.
74. Steelman LS, Abrams SL, Whelan J, Bertrand FE, Ludwig DE, Bäsecke J, et al. Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia. *Leukemia.* 2008; 22(4): 686-707.

75. Shi P, Liu W, Tala, Wang H, Li F, Zhang H, et al. Metformin suppresses triple-negative breast cancer stem cells by targeting KLF5 for degradation. *Cell Discov.* 2017; 3: 17010.
76. Tucker GT, Casey C, Phillips PJ, Connor H, Ward JD, Woods HF. Metformin kinetics in healthy subjects and in patients with diabetes mellitus. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1981; 12(2): 235-46.
77. Bailey CJ, Wilcock C, Scarpello JHB. Metformin and the intestine. *Diabetologia.* 2008; 51(8): 1552-3.
78. Proctor WR, Bourdet DL, Thakker DR. Mechanisms underlying saturable intestinal absorption of metformin. *Drug Metab. Dispos.* 2008; 36(8): 1650-8.
79. Spector R, Robert Snodgrass S, Johanson CE. A balanced view of the cerebrospinal fluid composition and functions: Focus on adult humans. *Exp. Neurol.* 2015; 273:57-68.
80. Ponka P. Cellular iron metabolism. *Kidney International.* 1999; 55, Suppl 69:S2-S11.
81. Brown RAM, Richardson KL, Kabir TD, Trinder D, Ganss R, Leedman PJ. Altered iron metabolism and impact in cancer biology, metastasis, and immunology. *Front. Oncol.* 2020; 10:476.
82. Bogdan AR, Miyazawa M, Hashimoto K, Tsuji Y. Regulators of iron homeostasis: new players in metabolism, cell death, and disease. *Trends Biochem. Sci.* 2016; 41(3): 274-286.
83. Dixon SJ, Stockwell. The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nat. Chem. Biol.* 2014; 10(1): 9-17.

84. MacKenzie EL, Iwasaki K, Tsuji Y. Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanism to health implications. *Antioxid. Redox. Signal.* 2008; 10: 997-1030.
85. Knovich MA, Storey JA, Coffman LG, Torti SV. Ferritin for the clinician. *Blood Rev.* 2009; 23(3): 95-104.
86. Suryo Rahmanto Y, Bal S, Loh KH, Yu Y, Richardson DR. Melanotransferrin: search for a function. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012; 1820(3): 237-43.
87. Nordlund P, Reichard P. Ribonucleotide reductase. *Annu. Rev. Biochem.* 2006; 75: 681-706.
88. Torrents E. Ribonucleotide reductases: essential enzymes for bacterial life. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2014; 4: 52.
89. Greene BL, Kang G, Cui C, Bennati M, Nocera DG, Drennan CL, et al. Ribonucleotide reductases: structure, chemistry, and metabolism suggest new therapeutic targets. *Annu. Rev. Biochem.* 2020; 89: 45-75.
90. Lane DJ, Merlot AM, Huang ML, Bae DH, Jansson PJ, Sahni S, et al. Cellular iron uptake, trafficking and metabolism: key molecules and mechanisms and their roles in disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 2015; 1853: 1130-44.
91. Puig S, Ramos-Alonso L, Romero AM, Martínez-Pastor MT. The elemental role of iron in DNA synthesis and repair. *Metallomics.* 2017; 9: 1483-500.
92. Illescas O, Carrero JC, Bobes RJ, Flisser A, Rosas G, Lacleite JP. Molecular characterization, functional expression, tissue localization and

- protective potential of a *Taenia solium* fatty acid-binding protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2012; 186: 117-125.
93. Rodríguez-Contreras D, Skelly PJ, Landa A, Shoemaker CB, Laclette JP. Molecular and functional characterization and tissue localization of 2 glucose transporter homologues (TGTP1 and TGTP2) from the tapeworm *Taenia solium*. *Parasitology.* 1998; 117: 579-588.
94. Navarrete-Perea J, Toledano-Magaña Y, De la Torre P, Sciutto E, Bobes RJ, Soberón X, et al. Role of porcine serum haptoglobin in the host-parasite relationship of *Taenia solium* cysticercosis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2016; 207(2): 61-67.
95. Orrego MA, Verastegui MR, Vasquez CM, Garcia HH, Nash TE. Proliferative cells in racemose neurocysticercosis have an active MAPK signaling pathway and respond to metformin treatment. *Int. J. Parasitol.* 2022; S0020-7519(22)00016-9
96. Donfrancesco A, Deb G, Dominici C, Pileggi D, Castello MA, Helson L. Effects of a single course of deferoxamine in neuroblastoma patients. *Cancer Res.* 1990; 50: 4929-30.

Anexos

1. Artículo publicado en la revista PLOS Neglected Tropical Diseases:
 - **Orrego MA, Verastegui MR**, Vasquez CM, Koziol U, Laclette JP, **Garcia HH**, Nash TE; Cysticercosis Working Group in Peru. Identification and culture of proliferative cells in abnormal *Taenia solium* larvae: Role in the development of racemose neurocysticercosis. PLOS Negl. Trop. Dis. 2021. 22; 15(3): e0009303.

2. Artículo publicado en la revista International Journal for Parasitology:
 - **Orrego MA, Verastegui MR**, Vasquez CM, **Garcia HH**, Nash TE. Proliferative cells in racemose neurocysticercosis have an active MAPK signaling pathway and respond to metformin treatment. Int. J. Parasitol. 2022; S0020-7519(22)00016-9

3. Artículo publicado en la revista Molecular and Biochemical Parasitology:
 - **Orrego MA**, Vasquez CM, Togneri K, Laclette JP, **Garcia HH**, Nash TE. Increased iron uptake in the bladder wall of racemose cysts of *Taenia solium*. 2022; 251: 111496.