



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

**Distribución de células germinativas y perfil
de expresión de genes asociados a
proliferación en quistes racemosos de *Taenia
solium***

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

MIGUEL ANGEL ORREGO SOLANO

LIMA - PERÚ

2017

Asesor:

Cristina Guerra Giraldez, PhD.

Jurado Calificador:

Presidente: Luis Aguilar Mendoza, PhD.

Vocal: Daniel Clark Leza, PhD.

Secretaria: Manuela Verástegui Pimentel, PhD.

Dedicatoria

A la memoria de mi padre, a toda mi familia, a mis hijos (María Fernanda y Miguel), a todos los compañeros del laboratorio por todo su apoyo durante la ejecución del proyecto. Deseo agradecer en especial al Dr Abraham Vaisberg por haber formado en mí el espíritu y vocación por la investigación, a mi asesora la Dra Cristina Guerra, quien con sus enseñanzas y consejos me ayudó en la realización del presente trabajo.

INDICE:

Resumen	1
Abstract	2
I. Introducción	3
II. Justificación	22
III. Hipótesis	22
IV. Objetivos	23
4.1 General	23
4.2 Específicos	23
V. Métodos	24
5.1 Diseño del estudio	24
5.2 Materiales	25
5.3 Metodología	28
VI. Resultados	39
VII. Discusión	60
VIII. Conclusiones	70
IX. Limitaciones	71

X.	Recomendaciones.....	72
XI.	Bibliografía.....	73
XII.	Anexo.....	85

Índice de Figuras:

Figura 1. Ubicación filogenética de <i>Taenia solium</i>	4
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	5
Figura 3. Prevalencia geográfica de <i>Taenia solium</i>	10
Figura 4. Histopatología de la cisticercosis.....	13
Figura 5. Macroscopía de la infección.....	16
Figura 6. Diagrama de flujo.....	24
Figura 7. Identificación <i>in situ</i> de células proliferativas en quistes musculares	40
Figura 8. Identificación <i>in situ</i> de células proliferativas en quistes evaginados	41
Figura 9. Descripción histológica del quiste racemoso.....	43
Figura 10. Células proliferativas en quiste racemoso y quiste vesicular.....	47
Figura 11. Observaciones histológicas de un escólex degenerado.....	48
Figura 12. Imágenes panorámicas de quiste racemoso y quiste vesicular.....	50
Figura 13. Inmunofluorescencia de la zona (A) del quiste racemoso.....	51
Figura 14. Inmunofluorescencia de la zona (B) del quiste racemoso.....	52
Figura 15. Magnificaciones de la zona (B) del quiste racemoso.....	53
Figura 16. Inmunofluorescencia de la zona (C) del quiste racemoso.....	54

Figura 17. Magnificación de la zona (C) de quiste racemoso.....	55
Figura.18. Inmunofluorescencia de la zona (D) de quiste vesicular	56
Figura 19. Sub expresión de cuatro genes asociados a proliferación en quistes racemosos.....	57
Figura 20. Sobre expresión de dos genes asociados a proliferación en quistes racemosos.....	58
Figura 21. Inmunofluorescencia de células aisladas de dos muestras de quiste racemoso.....	59

Índice de Tablas:

Tabla 1. Lista de cebadores.....	35
Tabla 2. Lectura histológica de muestras de quiste racemoso.....	44
Tabla 3. Valor promedio de CT de muestras de quiste racemoso.....	45

Resumen

La neurocisticercosis racemosa es una enfermedad causada por una forma anormal del metacéstode de *Taenia solium*. Los mecanismos de transformación de un quiste "vesicular" regular, no proliferativo, en una forma membranosa hiperproliferativa carente de escólex, o "quiste racemoso", son poco entendidos. Usando la bromodesoxiuridina para marcar células mitóticamente activas y un anticuerpo anti-OCT4 para marcar células totipotentes, hemos identificado células germinativas en la pared vesicular de los quistes racemosos; estas células se encuentran en mayor abundancia en estados iniciales de desarrollo de este particular tipo de quiste. Células germinativas aisladas de diferentes muestras de quiste racemoso presentan diferente proliferación y diferente etapa de diferenciación. En los quistes "vesiculares" normalmente estructurados, estas células están confinadas al cuello del escólex y son muy escasas en otras partes. La presencia y el nivel de expresión de genes asociados con la proliferación, homólogos a los reportados en neoblastos de planarias, fueron evaluados en ambas formas de quiste, racemosa y vesicular. Los niveles de expresión en los quistes racemosos presentan alteraciones con respecto a los quistes vesiculares. Estos resultados son congruentes con su crecimiento no controlado, similar a un tumor.

Abstract

Racemose neurocysticercosis is a disease caused by an abnormal growth of the larval metacestode of *Taenia solium*. The mechanisms of transformation from a non proliferating viable “vesicular” cyst into a hyperproliferating membranous form lacking scolex are poorly understood. Using bromodesoxyuridine to label mitotically active cells and an anti-OCT-4 antibody to label totipotent cells, we identified germinative cells in the cyst wall of racemose cysts. These cells were more abundant in the earlier stages of development of this particular type of cyst. Germinative cells isolated from different samples of racemose cyst have different proliferative rates and different stages of differentiation. In normally structured, “vesicular” cysts, these cells are confined to the neck of the scolex, and are very scarce elsewhere. The presence and level of expression of genes associated with proliferation, homologous to those reported in planarian neoblasts, was tested in both cyst forms, racemose and vesicular. Expression levels in racemose cysts present alterations compared to vesicular cysts. These results are consistent with the uncontrolled tumor-like growth of racemose cysts.

I. Introducción

1.1 Origen y clasificación taxonómica

Los platelmintos son gusanos planos dorso-ventrales con simetría bilateral, usualmente hermafroditas que carecen de sistema respiratorio y circulatorio y presentan un sistema primitivo de protonefridios basado en células flamígeras. Los estudios filogenéticos de los años 80 y 90 (1) se basaban en características morfológicas y ecológicas; sin embargo, en las últimas décadas se incluye información molecular. 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). (Figura 1).

El agente causal de la cisticercosis, *Taenia solium*, es un parásito platelminto de la clase Cestoda, subclase Eucestoda, orden Cyclophyllidea y familia Taeniidae. Presenta un órgano de anclaje o escólex con cuatro ventosas y una corona de 22-32 ganchos (rostelo), y un estróbilo o cuerpo alargado y segmentado. Cada segmento desarrolla órganos sexuales que producen miles de huevecillos. Estos son liberados al medio ambiente a través del poro genital (2, 4, 5, 8).

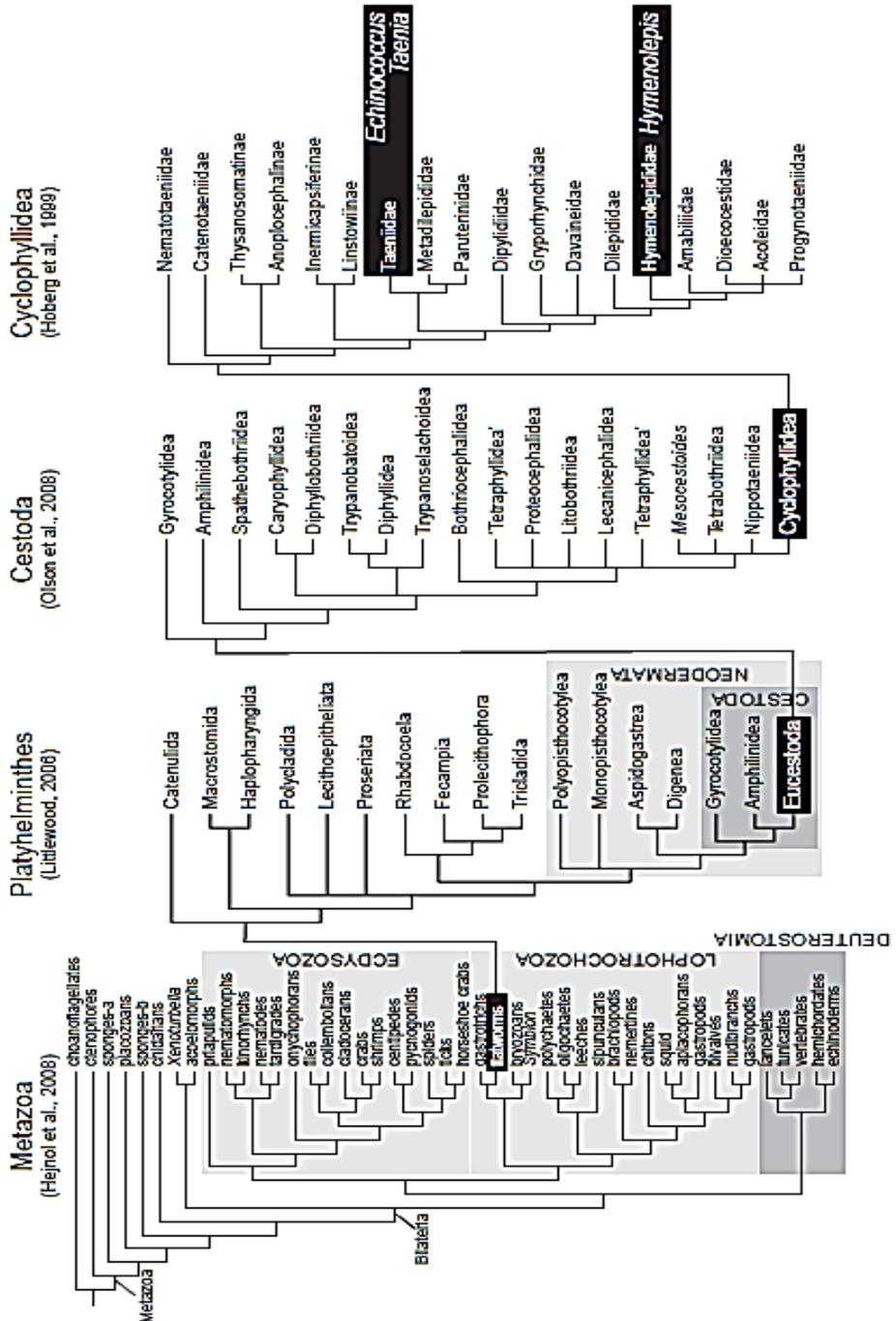


Figura 1: Ubicación filogenética de *Taenia solium*. Tomado de Olson et al. 2012 (2).

El ciclo de vida de *Taenia solium* incluye a dos hospederos mamíferos, el cerdo y el ser humano. El ser humano constituye el único hospedero definitivo, en cuyo intestino se desarrolla la forma adulta del parásito, infección conocida como teniasis. El ser humano constituye el más importante multiplicador, reservorio y diseminador del parásito, mientras que el cerdo porta los estadios larvales, quistes o cisticercos y actúa como hospedero intermediario. Accidentalmente el ser humano también puede infectarse con la forma larvaria, lo que interrumpe el ciclo biológico del parásito (4) (Figura 2). La baja especificidad de los cisticercos ha permitido desarrollar infecciones experimentales empleando diferentes especies con el objetivo de estudiar aspectos importantes en el ciclo biológico del parásito y la patología que desencadena en el hospedero (6, 7).

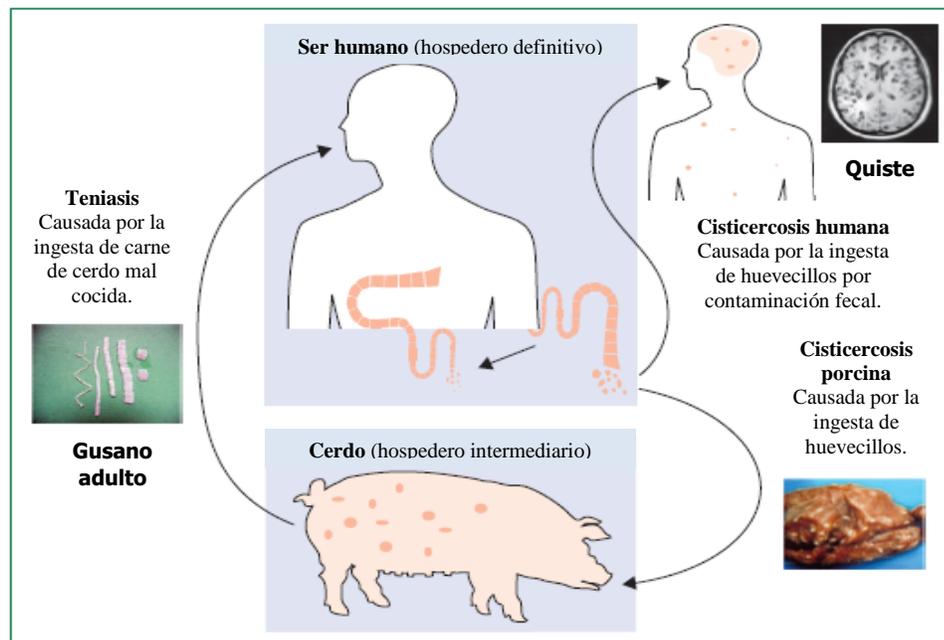


Figura 2: Ciclo de vida de *Taenia solium*. Tomado de Garcia et al.2014 (5).

1.3 Etapas en el desarrollo de *Taenia solium*

El ciclo de vida del parásito presenta seis etapas:

Huevo: Esta etapa es la responsable de la diseminación al medio ambiente. Los huevos de *T.solium* son microscópicos, de forma esférica, presentan una cáscara externa delicada, y en su interior se encuentra al embrión hexacanto u oncósfera cubierto por una membrana gruesa, opaca, parduzca denominada embrióforo. El embrióforo protege a la oncósfera de varias condiciones ambientales desfavorables pero es fácilmente eliminado en el intestino del hospedero intermediario por la acción de las enzimas y del pH ácido del sistema digestivo.

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

Post-oncósfera: Período comprendido entre la oncósfera y el cisticerco que se transcurre en el torrente sanguíneo y tejidos del hospedero intermediario. El parásito desarrolla a una forma vesicular llena de fluido y un escólex invaginado, sin órganos sexuales. Las post-oncósferas se encuentran rodeadas de células epiteliales procedentes de los pequeños vasos sanguíneos del hospedero.

Cisticerco: Vesícula que contiene el escólex invaginado y que se aloja en los tejidos del hospedero intermediario. Es de forma ovoide y la membrana está constituida de varias capas. La externa permite la absorción de nutrientes y excreción de metabolitos; presenta prolongaciones características denominadas microtrichas. En las capas internas se encuentran fibras musculares, fibras de colágeno, corpúsculos calcáreos, células llamadas citones, células flamígeras y ductos.

Preadulto: Etapa comprendida entre el cisticerco y el adulto. Cuando los cisticercos presentes en carne de cerdo mal cocida, invaden exitosamente al hospedero definitivo, el parásito evagina el escólex, se adhiere a la mucosa intestinal, pierde su pared vesicular y crece a partir del cuello hasta desarrollar al adulto. Este crecimiento toma aproximadamente dos meses.

Adulto: Etapa reproductiva del parásito. El parásito presenta escólex, cuello alargado y el estróbilo, constituido por 700-1000 segmentos o proglótidas. Estas pueden ser inmaduras, maduras o grávidas, según su tamaño, forma, desarrollo de órganos reproductivos y su contenido de huevecillos. *T.solium* es hermafrodita y se autofecunda, cada proglótida contiene ovarios. Cuando las proglótidas y huevecillos son liberados al ambiente e ingeridos por un hospedero intermediario, se cierra el ciclo (8).

1.4 Enfermedades causadas por *Taenia solium*

1.4.1 Teniasis

La teniasis, o infección con el parásito adulto, ocurre solo en el ser humano y en general, no causa síntomas (10). Luego de consumir carne de cerdo infectada con cisticercos y mal cocinada, la larva, alojada en el músculo del animal, evagina en el intestino delgado. El escólex del parásito se ancla fuertemente a la mucosa intestinal, y el estróbilo crece, como se ha descrito en la sección anterior (ver estadio adulto), hasta desarrollar al gusano adulto, que llega a alcanzar una longitud de 2-4 metros. Luego de dos meses de la infección, proglótidas maduras son eliminadas del extremo distal del intestino a través de las heces (4,8). Cada segmento o proglótida contiene aproximadamente 50-60 mil huevecillos (4,8). La teniasis causa muy poca inflamación en la zona de anclaje; no genera un daño perceptible al tejido intestinal. Dolor abdominal, distensión, diarrea o náuseas son algunos de los malestares atribuidos a la infección por tenia, aunque la mayoría de los pacientes no los presentan (10).

1.4.2 Cisticercosis

La cisticercosis es la infección con larvas de *Taenia solium* que se desarrollan a partir de huevecillos presentes en las heces de personas con teniasis. En áreas con pobres sistemas sanitarios, los cerdos tienen acceso a las heces humanas, también el ser humano puede infectarse al consumir alimentos o agua contaminada con heces, o autoinfectarse, si es portador del estadio adulto, por la vía fecal-oral. Una

vez ingeridos los huevecillos, estos eclosionan en el intestino (humano o porcino) por acción del ácido gástrico y fluidos intestinales, liberando el embrión hexacanto u oncósfera.

Este penetra la mucosa intestinal mediante la secreción de enzimas proteolíticas y alcanza el torrente sanguíneo, diseminándose a todo el organismo e infectando músculos y diversos órganos. Luego de 2-3 meses de la infección, el cisticerco se desarrolla en un tejido, como se describe en la sección anterior (ver estadio oncósfera) (4, 8). Las manifestaciones clínicas dependen del órgano infectado.

1.4.3 Neurocisticercosis

La neurocisticercosis (NCC) es el nombre que recibe la cisticercosis cuando las larvas infectan el tejido cerebral. Es la enfermedad parasitaria más frecuente (4) del sistema nervioso central (SNC) y es endémica de 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 de *T.solium* (Figura 3). La NCC se ha convertido en un problema de salud pública también en los países desarrollados debido a la migración de personas con teniasis desde áreas endémicas (5).

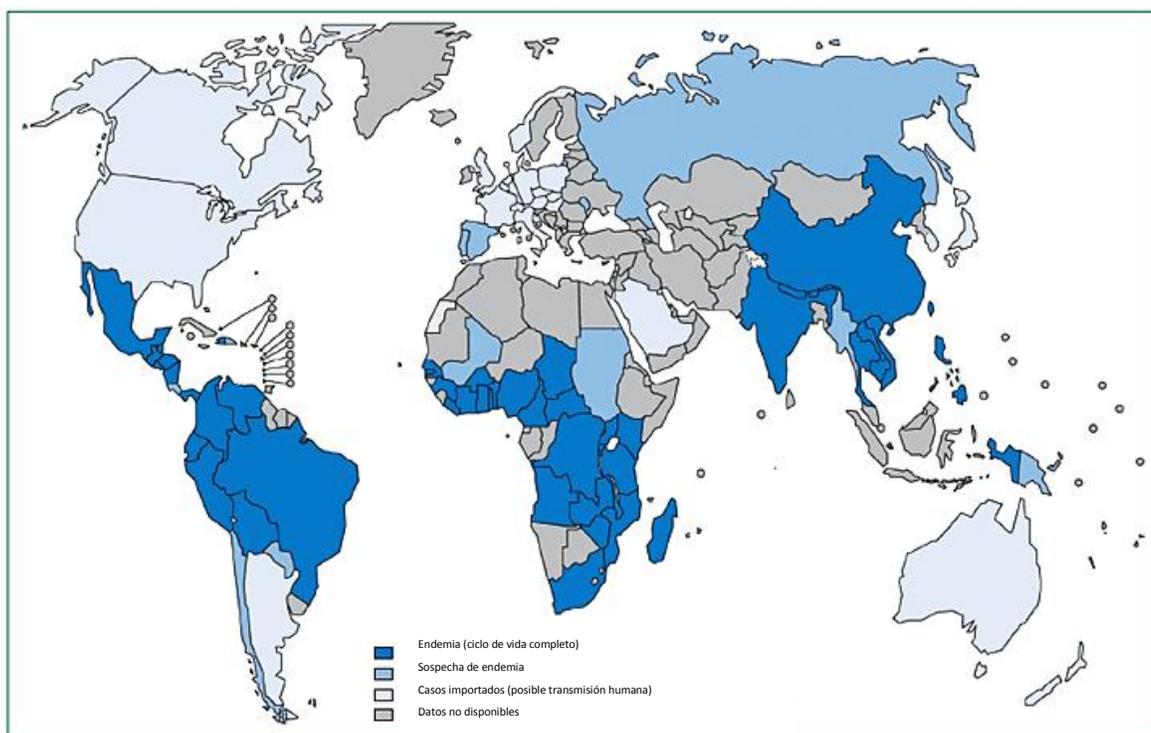


Figura 3: Prevalencia geográfica de *Taenia solium*. Tomado de Garcia et al.2014 (5).

En la NCC, los quistes tienen una forma de vesículas uniformemente redondas u ovaladas que varían en tamaño desde unos milímetros hasta 1-2 cm de diámetro (4, 5, 8). La localización más común son los hemisferios cerebrales, principalmente entre la unión de la materia gris con la blanca. Además se pueden hallar quistes en el cerebelo, ventrículos, espacio subaracnoideo, cisternas basales y columna vertebral (4). En cerdos naturalmente infectados, el rango de la carga parasitaria en el cerebro va desde uno a varios cientos (15).

La morfología de los quistes varía de acuerdo a su desarrollo e integridad. Quistes viables presentan una membrana translúcida en donde el escólex es visible como un pequeño nódulo de 2-3 mm. Cuando el quiste empieza a degenerar por causas naturales o por efecto de tratamiento, el fluido vesicular se vuelve opaco, denso y los bordes del quiste se tornan irregulares (4,8, 10).

1.5 Respuesta inmunológica e inflamación durante la NCC

Los cisticercos viables pueden o no despertar una respuesta inmunológica en el tejido circundante. En el cerebro, los cisticercos permanecen por largos periodos aislados y protegidos del sistema inmunológico por la barrera hematoencefálica (BHE). A la vez, es sabido que logran mecanismos de evasión mediante la secreción de antígenos capaces de, por ejemplo, inhibir la cascada del complemento por la paramiosina o antígeno B (11). Luego de un periodo estimado en varios años e incluso décadas (12), el parásito degenera y se puede producir un cuadro inflamatorio que incluye astrogliosis, activación y proliferación de la microglia, edema, degeneración neuronal e infiltrado de células inmunológicas periféricas, principalmente eosinófilos y macrófagos (13).

En conjunto, la inflamación puede dar lugar a convulsiones, que son el síntoma más común de la NCC (13,14). El cisticercos también causa síntomas debido al efecto de masa al ejercer presión sobre el tejido circundante o por obstruir el flujo del líquido cefalorraquídeo (LCR), pero los principales síntomas de la NCC son a

consecuencia de los procesos inflamatorios que resultan de la respuesta inmunológica del hospedero, cuya finalidad es erradicar al parásito.

Estudios inyectando el colorante vital azul de Evans (EB) aprovechan que este tinte se extravasa al tejido cerebral, tiñéndolo de azul, cuando aumenta la permeabilidad de la BHE. En el laboratorio de NCC de la Facultad de Ciencias de la UPCH se utilizó EB en cerdos naturalmente infectados y se halló que la coloración azul del tejido que rodeaba al parásito no solo indicaba disrupción de la BHE sino que servía para identificar zonas de inflamación. El número de quistes rodeados por tejido teñido de azul aumenta con la administración de tratamiento antihelmíntico, confirmando que el tratamiento exagera la respuesta inmunológica del hospedero y con ello la inflamación (15).

Trabajos posteriores desarrollados en el laboratorio de NCC, han permitido caracterizar parcialmente la respuesta inmunológica presente alrededor del cisticerco, tanto en músculos como en cerebros de cerdos infectados (Figura 4). El quiste contiene en su interior al escólex invaginado que prácticamente no tiene contacto con el tejido del hospedero (A, D); se aprecia en la zona de invaginación un poro de comunicación con la cavidad interna del cisticerco (B, E).

Este poro constituiría una zona de excreción y frente a ella se sitúa una reacción inflamatoria de células inmunológicas periféricas, principalmente eosinófilos (C, F). Estas zonas ricas en eosinófilos se asocian a zonas teñidas de azul (14).

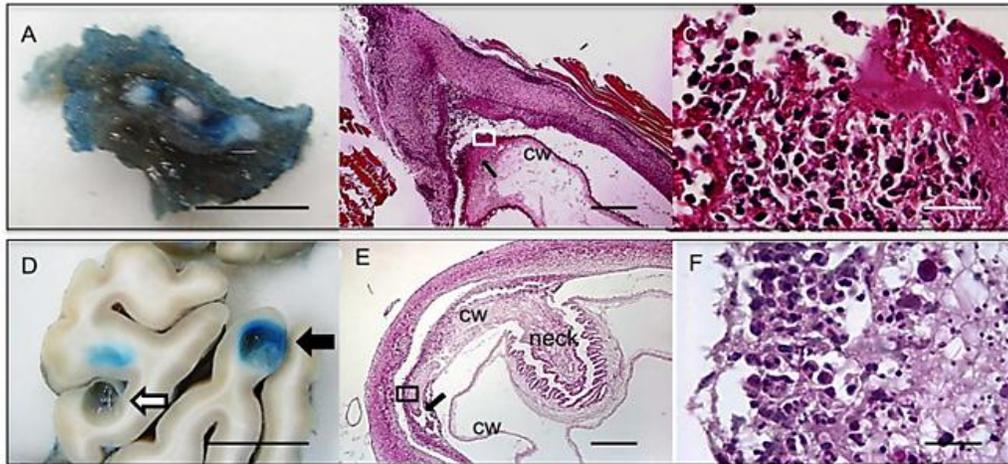


Figura 4: Histopatología de la cisticercosis. Respuesta inflamatoria alrededor de quistes musculares en cerdos naturalmente infectados (A-C). Respuesta inflamatoria alrededor de quistes cerebrales de cerdo infectado (D-F), en ambos casos se observa una alta cantidad de eosinofilos. Tomado de Marzal et al. 2014 (14).

1.6 Patología de la NCC

La NCC es en muchos casos asintomática, pero cuando los síntomas se presentan, la diversidad de manifestaciones clínicas se debe a la localización anatómica de las lesiones y a la carga parasitaria en el sistema nervioso, así como a la intensidad de la respuesta inmunológica; esto hace de la NCC una enfermedad pleomórfica (16, 17,18). La manifestación clínica más común son los cuadros de epilepsia, que ocurren en el 50-80% de los pacientes con quistes cerebrales parenquimales o calcificaciones pero es menos común en otras formas de NCC. La enfermedad también presenta hipertensión intracraneal, hidrocefalia o ambos en el 20-30 % de los casos (19, 20).

En el Perú existen zonas rurales donde se ha reportado que, en adultos, el 40% de los casos de epilepsia adquirida están asociados a NCC (21).

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 (19).

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 (19). Parásitos intraventriculares pueden bloquear el LCR o producir inflamación del endipima y plexos coroideos.

1.7 Neurocisticercosis racemosa

Además de la NCC producida por quistes vesiculares (NCC cística), puede ocurrir una forma menos común de NCC pero de mayor gravedad, cuando el cisticerco se desarrolla en la región subaracnoidea basal, en cisternas basales o la fisura de Silvio (22). Esta forma se caracteriza por un crecimiento aberrante, por gemación, que resulta en una larva anormal estéril de varios centímetros de diámetro, compuesta de múltiples vesículas interconectadas, formadas por una membrana translúcida, delicada y delgada. Como su apariencia se asemeja a la de un racimo de uvas recibe el nombre de quiste racemoso (23, 24).

El quiste racemoso está asociado a una intensa reacción inflamatoria, fibrosis y a un engrosamiento de la leptomeninge en el tronco del cerebro. La NCC racemosa es clínicamente más agresiva que la forma parenquimal y se observa en el 15-54% de los pacientes (26). Se asocia con la hidrocefalia, hipertensión intracraneal y meningitis. El cuadro resultante tiene una alta tasa de mortalidad de alrededor del 50% (22, 23).

Este quiste por lo general carece de un escólex o si el escólex está presente se encuentra degenerado. Se postula que a medida que el escólex degenera, la proliferación de la membrana y vesículas aumenta (24, 25). El tamaño de las membranas aumenta debido a que en las cisternas o espacio subaracnoideo no existen barreras del tejido parenquimal, el cual puede actuar para inducir la encapsulación del parásito como una respuesta del hospedero (24). El tamaño del quiste racemoso varía de 4 a 12 cm y se identifica por resonancia magnética (RM) como múltiples lesiones (24, 25, 26). (Figura 5).

En el quiste racemoso, el tegumento y células subtegumentarias son ricos en mucosubstancias ácidas y lípidos además muestra una alta actividad de fosfatasa ácida y básica y el parénquima de la membrana presenta altas concentraciones de glicógeno (25). A medida que la membrana envejece las concentraciones de proteínas, mucosubstancias ácidas y actividad enzimática decrecen y aparecen las primeras señales de autólisis (25).

La cadena de eventos que favorecen o determinan el desarrollo de un quiste racemoso, aún no ha sido descrita. El quiste racemoso solo puede ser obtenido luego de intervenir mediante cirugía 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 muestras es por lo tanto una limitante para estudiar los mecanismos de la interacción hospedero-parásito en la NCC racemosa.

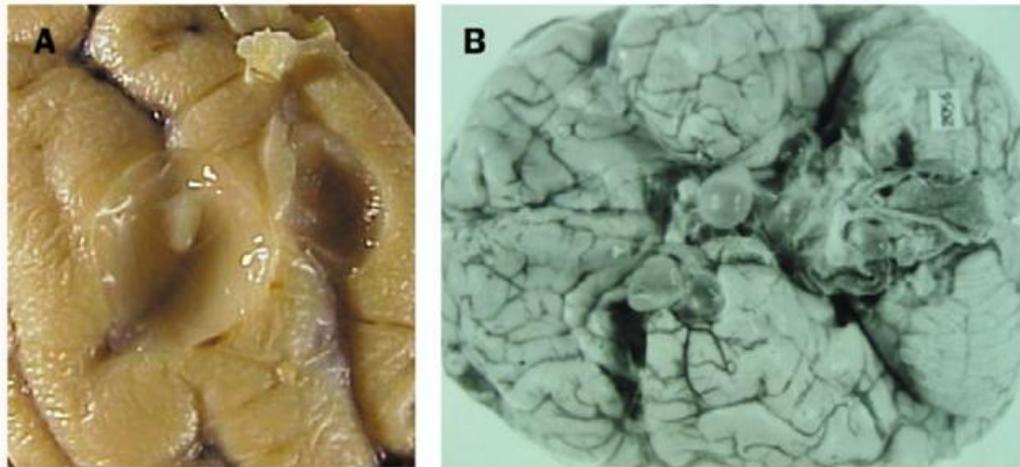


Figura 5: Macroscopía de la infección. Quiste viable de *Taenia solium* (A), quiste racemoso en la base del cerebro (B). Tomado de Garcia et al. 2003 (3).

1.8 Neoblastos o células germinativas.

Diferentes estudios dirigidos a entender la proliferación, regeneración y diferenciación en planarias de vida libre han demostrado la importancia de un grupo de células indiferenciadas totipotentes llamadas neoblastos, única población proliferativa en especies de la clase Turbellaria (27, 28). Planarias como *Dugesia japonica* y *Schmidtea mediterranea* muestran notables habilidades regenerativas, las cuales son dependientes de neoblastos (27, 28, 30). Aparte de su importante papel en la regeneración tisular, los neoblastos están implicados en la enorme plasticidad presente durante el desarrollo de las planarias (29, 30). Diversos trabajos emplean a los neoblastos como modelo para el estudio de células madre y sus aplicaciones en medicina regenerativa por sus propiedades proliferativas y de diferenciación (31).

Para la clase Cestoda, todos parásitos, se ha descrito una población de células madre indiferenciadas similares a los neoblastos y usualmente se les llama células germinativas (33). Las propiedades de las células germinativas son poco entendidas y su estudio se ve complicado porque su crecimiento y desarrollo están determinados por ciclos de vida complejos que incluyen a más de un hospedero. Sin embargo, en *Echinococcus multilocularis* y *Taenia crassiceps*, especies cuyos ciclos de vida incluyen un estadio larvario de alta proliferación, se han podido identificar células germinativas e incluso generar metacéstodes a partir de ellas, por ser células que pueden auto renovarse y diferenciarse a cualquier tipo de célula somática. (32, 33).

Pocos trabajos están dirigidos a identificar y estudiar la función de las células germinativas en los estadios de *T. solium* y a determinar qué función tienen estas células en el desarrollo del quiste racemoso descrito como aberrante y de crecimiento descontrolado similar a un tumor (24).

1.9 Genes asociados a proliferación en planarias

La proliferación y regeneración son procesos importantes dentro de la fisiología animal pero los mecanismos involucrados no se han caracterizado del todo. En líneas generales, el ciclo celular progresa a través de eventos altamente regulados por una combinación de moléculas estimuladoras y represoras (37). Los componentes o elementos de la maquinaria celular pueden responder a estímulos extracelulares favoreciendo eventos como la proliferación, diferenciación o apoptosis (37). Muchos estudios han demostrado que la activación inadecuada de elementos de acción positiva (estimuladores) o la inactivación de elementos de acción negativa (represores) pueden desencadenar eventos de proliferación descontrolada, que en el caso de mamíferos resultan en la formación de tejido de carácter tumoral (38, 39).

En planarias, los neoblastos responden a los daños a través de cambios en la proliferación, localización y expresión de genes (44, 45, 46, 49, 53, 54, 55). Las funciones de estos genes se pueden clasificar en tres grupos principales:

1.9.1 Genes supresores del ciclo celular

1.- Zinc fingers of cerebellum (ZIC): Son proteínas que actúan como supresores tumorales. En planarias sometidas a lesiones, *zic1* se expresa en zonas próximas a la lesión (44, 45). El dominio dedo de zinc de estas proteínas se une a “secuencias de unión a Gli” (GBS), efectores de la vía de señalización Hedgehog, para regular esta vía.

Por competencia, estas proteínas suprimen la actividad de Gli1 y Gli2, y de esta manera controlan la progresión del ciclo celular. Alteraciones en esta vía como consecuencia de bajos niveles de expresión de *zic1* y *zic 4* favorecen el desarrollo de diferentes formas de cáncer. (40, 41, 42, 43).

2.- Prohibitina: Constituye una familia de proteínas conservadas con diversas funciones y localizaciones subcelulares (46). La ausencia de prohibitina es letal para las planarias (46). Miembros de esta familia (Phb1 y Phb2) están involucrados en la regulación transcripcional, regulación del ciclo celular, señalización celular, apoptosis y funciones mitocondriales en planarias (46). Estas proteínas se unen con gran afinidad a la proteína supresora tumoral retinoblastoma (Rb), p107 y p130, y afectan la función de factores de transcripción de la familia E2F, los cuales incluyen activadores y supresores, modulando la progresión del ciclo celular (47). Prohibitina fue originalmente clonada en base a su capacidad de inhibir el crecimiento en fibroblastos de mamíferos y células HeLa (47) y luego se demostró que actúa bloqueando el pase entre las fases G1 y S (la fase de replicación del ADN) en el ciclo celular (47).

3.-El gen chromobox 1 sintetiza una proteína miembro del complejo represivo policomb 1 (48) que puede unirse a histonas y también es responsable de la interacción entre varias proteínas asociadas a cromatina. Chromobox 1 puede desempeñar un papel importante en el control epigenético de la cromatina y expresión de genes. El complejo 1 junto con el complejo represivo policomb 2 regulan la expresión de genes por condensación de la cromatina. Estos complejos proteicos actúan sobre la renovación de la población de células madre (49); enfermedades benignas como adenomas y neoplásicas como carcinomas están asociadas a una baja expresión de esta proteína (50).

1.9.2 Genes estimuladores de la proliferación

1.- Notum: Codifica una hidrolasa secretoria que modifica proteoglicanos heparan sulfato y regula negativamente la vía de señalización Wnt, que opera estabilizando la b-catenina en el citosol (51). La expresión de notum aumenta en las zonas de amputación de planarias sometidas a lesiones, lo que inhibe la vía Wnt y favorece la expresión de otras proteínas como Zic. En carcinoma hepático humano, altos niveles de b-catenina / TCF4 se correlacionan con altos niveles de la proteína notum (52, 53).

2.- La proteína Bruno presenta sitios de reconocimiento de RNA (rna recognition motifs, RRM). Miembros de esta familia de proteínas regulan el splicing alternativo y pueden estar involucrados en la edición del mRNA y de su traducción (54). En planarias, proteínas similares a Bruno (Bruno like) son

esenciales para el mantenimiento de la población de neoblastos; en su ausencia, los neoblastos pueden diferenciarse pero pierden la capacidad de generar más células madre en cada división, resultando en una pérdida gradual de esta población germinal (55, 56).

1.9.3 Genes asociados a diferenciación.

1.-THO son un grupo de proteínas conservadas que forman parte de complejos ribonucleoproteicos (RNP) importantes en la transcripción y exportación nuclear del RNA (57). Estudios en *Schmidtea mediterranea* han demostrado la sensibilidad de los neoblastos a la radiación- γ y la sub expresión de genes en neoblasto, entre ellos *THOC4*, en planarias irradiadas (27). El proceso de diferenciación en células madre intestinales de ratón y células epiteliales es dependiente de THO (58). Por otro lado, la subunidad 5 del complejo THO (THOC5) presenta varios sitios de fosforilación, cuyas funciones permanecen en estudio (59). Se conoce, sin embargo, que la tirosina 255 fosforilada está asociada al desarrollo de leucemias (59).

II. Justificación

Es claro que, en el cerebro, el quiste de *T.solium* está expuesto y responde a una serie de señales moleculares que provienen del hospedero y de sí mismo; sin embargo, la capacidad proliferativa y el desarrollo de los diversos estadios de *T.solium* aún no están bien descritos. La identificación y caracterización de las células germinativas de este parásito comparando quistes vesiculares y racemosos permitirá investigar el rol de este particular grupo de células en el desarrollo de la forma maligna hiperproliferativa del quiste de *T.solium*.

III. Hipótesis

Las células germinativas se encuentran en mayor abundancia en la forma racemosa del quiste de *Taenia solium* y su expresión genética se encuentra alterada en relación a las células germinativas de quistes vesiculares no proliferativos.

IV. Objetivos

4.1 General

- Identificar *in situ* células germinativas en quistes de *T. solium* (vesiculares y racemosos) y caracterizar ambos tipos de cisticerco en cuanto a la expresión de genes de proliferación descritos en platelmintos de vida libre.

4.2 Específicos

- Estandarizar condiciones de cultivo de quistes para la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU), como marcador de mitosis o proliferación.
- Identificar mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia células germinativas en quistes de *T. solium* inducidos a evaginación y en quistes racemosos (forma hiperproliferativa).
- Identificar mediante inmunofluorescencia la presencia de células madre totipotentes en quistes racemosos, empleando el marcador OCT-4.
- Determinar la expresión de genes asociados a proliferación en ambas formas de cisticerco mediante ensayos de PCR de transcripción reversa en tiempo real (RT-qPCR).
- Aislar células germinativas de quistes de *T. solium* y comprobar su capacidad mitótica y su naturaleza totipotente.

V. Métodos

5.1 Diseño del estudio

El presente trabajo constituye un estudio descriptivo, se analizaron y describieron las características a nivel histológico, celular y molecular en una colección de muestras de quistes vesiculares y racemosos obtenidos en un período de dos años.

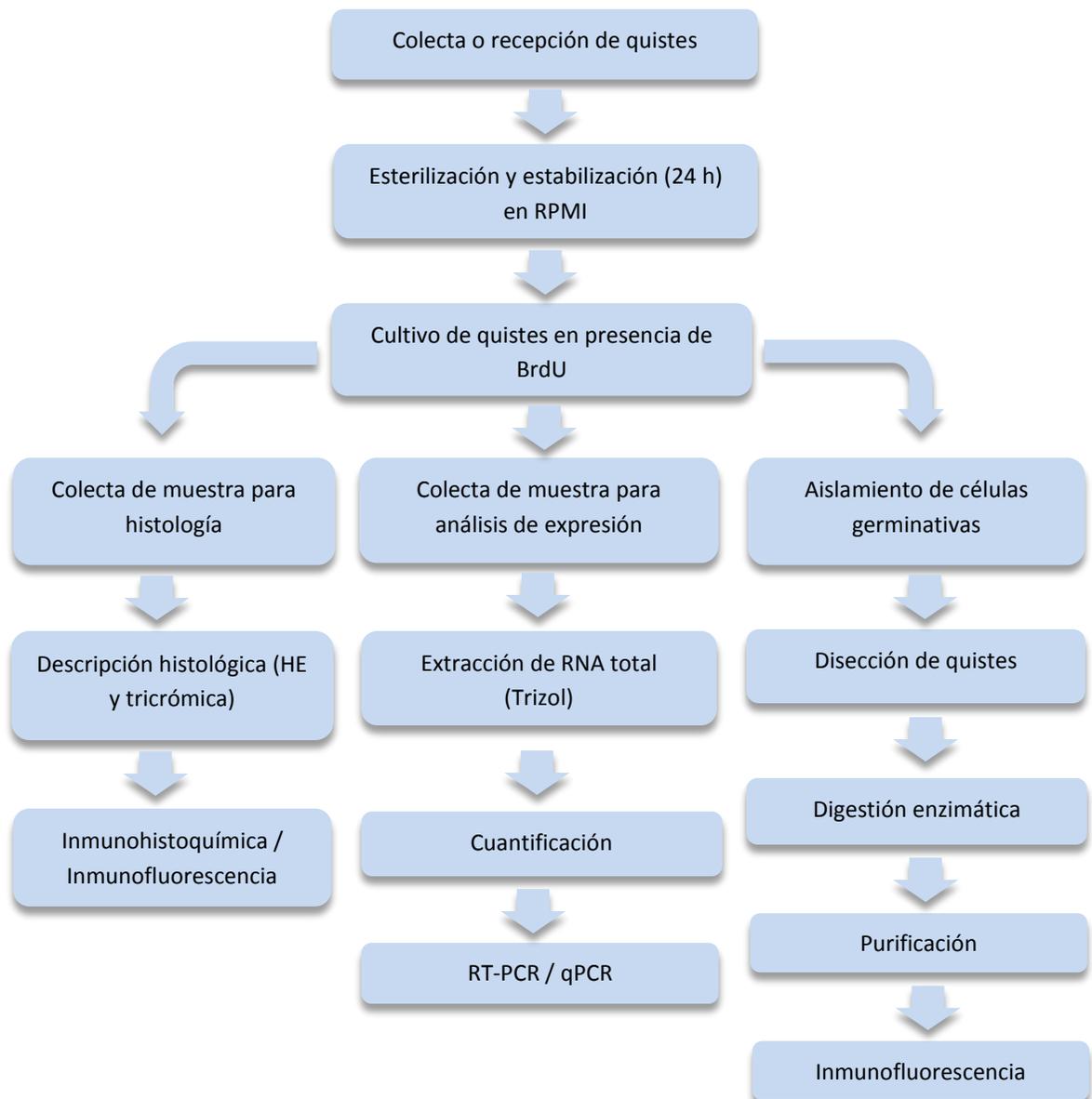


Figura 6: Diagrama de flujo que muestra los pasos realizados en el presente trabajo.

5.2 Materiales

5.2.1 Colecta de quistes vesiculares

Las muestras de quistes se obtuvieron a partir de cerdos naturalmente infectados provenientes de zonas endémicas del Perú. La condición de infección se determinó por la presencia de quistes en lengua y se confirmó por inmunoblot. El sacrificio de los animales se realizó con el apoyo de un equipo de veterinarios de la UNMSM empleando una dosis letal de pentobarbital sódico (Halatal, Montana S.A, Perú). Los quistes fueron extraídos del musculo esquelético y transportados al laboratorio en buffer fosfato (PBS) pH 7.4 (Gibco-Invitrogen, Gaithersburg, MD) suplementado con antibióticos: penicilina 200 UI/ml y gentamicina 100 ug/ml (PBS-pg). Todos los procedimientos se realizaron cumpliendo los protocolos aprobados por el Comité de Ética para Animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (SIDISI 62392) (14, 15).

5.2.2 Colecta de quistes racemosos

Los quistes racemosos fueron proporcionados por la Unidad de Cisticercosis del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas; se obtuvieron mediante cirugía de rutina a pacientes con NCC racemosa confirmada mediante tomografía axial computarizada (TAC). Los remanentes de quistes fueron colectados y

transportados al laboratorio en buffer fosfato (PBS; pH 7.4), a temperatura ambiente.

Los protocolos para el uso de los remanentes de quistes racemosos fueron aprobados por el Comité de Ética Institucional de la UPCH (SIDISI 63903).

5.2.3 Esterilización de los quistes

Los quistes colectados fueron sometidos a tres lavados de 5 minutos a temperatura ambiente, fuera de campana, con PBS-pg. Luego los quistes fueron trasvasados a un frasco estéril y llevados a cabina de flujo laminar.

Se retiró la solución de lavado y los quistes fueron sometidos a tres lavados de 1 hora a 37°C con PBS-pg. Finalmente, los quistes fueron trasvasados a un frasco de cultivo de 25 ml y lavados con medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) suplementado con L-glutamina (2 mM) y antibióticos; luego fueron incubados para su estabilización toda la noche a 37°C (63).

5.2.4 Inducción de evaginación en quistes vesiculares

Entre los estadios del cisticerco y el adulto, *T. solium* se desarrolla mediante el crecimiento de una región germinativa localizada en el cuello justo debajo del escólex, que contiene células madre mitóticamente activas poco estudiadas (63).

En el laboratorio, la adición de bilis porcina diluida al 50% en medio RPMI a quistes vesiculares induce la proliferación de la región germinativa del escólex.

5.2.5 Criterio de inclusión de las muestras

La condición de viabilidad de los parásitos para incluirlos en este trabajo se determinó por histología o por la calidad del ARN. Los criterios histológicos incluyeron: presencia de microtrichas en la superficie de la pared vesicular como principal indicador de viabilidad. Alteraciones tisulares como degeneración, calcificación o necrosis se consideraron como indicadores de no viabilidad. Los criterios de inclusión a nivel de expresión genética incluyeron: abundancia e integridad del ARN aislado y valores de CT obtenidos para cada gen evaluado por RT-qPCR.

El segundo criterio solo se aplicó a los quistes racemosos y consistió en determinar el tiempo de desarrollo del parásito. Se definieron dos categorías: desarrollo temprano, para las muestras con presencia de escólex y desarrollo avanzado, para las muestras carentes de escólex.

5.3 Metodología

5.3.1 Cultivo de quistes en presencia de BrdU como marcador de proliferación

Luego de estabilizados los quistes, se retiró el medio de cultivo y se agregó medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con L-glutamina, antibióticos y 5-bromo-2´deoxiuridina (BrdU, Sigma) 1 mM para incubarlos por 24 horas a 37°C (63).

5.3.2 Procesamiento de las muestras

Luego de 24 horas de incubación, las muestras fueron procesadas; aquellas muestras destinadas para análisis histológico fueron rápidamente fijadas en formalina (formaldehído al 37% en PBS) por 24-30 horas, luego deshidratadas en una batería de alcoholes de concentración (70%, 95% y 100%), por 30 minutos cada uno y finalmente, embebidas en parafina. Cortes seriados de 4 µm fueron colocados en láminas portaobjetos tratadas con una solución (1:10) de poli-L-lisina (Sigma) y se realizaron coloraciones de hematoxilina-eosina, así como tricrómica de Masson. Las láminas se observaron al microscopio de luz (Primo Star, Zeiss) y se tomaron fotografías empleando una cámara calibrada (AxioCam). Aquellas muestras destinadas a los estudios de expresión genética o extracción de RNA se almacenaron en RNAlater® (Qiagen) a -70 °C hasta el momento de su uso.

5.3.3 Inmunohistoquímica

Se realizó inmunohistoquímica para identificar *in situ* células proliferativas en muestras de tejido de quistes vesiculares, evaginados y racemosos, empleando un anticuerpo monoclonal anti-BrdU. Se procedió según protocolo estandarizado en el laboratorio (63), introduciendo pasos intermedios que permitieron amplificar la señal de la enzima empleada (peroxidasa).

1.-Desparafinación de las láminas: Se colocaron las muestras en estufa a 56°C por 20-30 minutos (o dejando desparafinar toda la noche a 40°C).

2.-Hidratación de las muestras: Se sumergieron las muestras en una batería de alcoholes de gradiente descendente usando el siguiente esquema: 10 minutos en xilol, después 5 minutos con cada uno de los siguientes alcoholes: 1) xilol, 2) etanol 100%, 3) etanol 95%, 4) etanol 70% y finalmente 5 minutos en agua destilada. Se lavaron las láminas dos veces con buffer fosfato pH 7.2 por 2 minutos cada vez.

3.-Rescate antigénico: Las láminas se sumergieron en una cubeta tipo Coplin con buffer citrato (citrato de sodio 10 mM, tween 20 0.05%, pH 6.0), la cual se calentó hasta 95-99°C por 45-60 minutos. Se retiraron las láminas para dejarlas enfriar por 20 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con buffer fosfato pH 7.2 de 2 minutos cada vez. Finalmente se trazaron círculos alrededor de las muestras empleando un lápiz hidrofóbico (ImmEdge, Vector, Burlingame, CA).

4.-Bloqueo de la peroxidasa endógena: Se preparó la solución de bloqueo en proporción 1:5 con peróxido de hidrógeno al 30% (DAKO) y buffer fosfato pH 7.2. Se adicionaron 150 µl de la solución de bloqueo para cada lámina y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos en cámara húmeda. Las láminas se lavaron tres veces con buffer fosfato pH 7.2 por 2 minutos cada vez.

5.-Bloqueo con suero normal de cabra: Se empleó una solución de bloqueo en buffer fosfato con suero de cabra al 2%, albumina sérica bovina (BSA) al 2% y Triton-X-100 al 0.1 %. Se añadieron 150 µl de la solución de bloqueo a cada lámina y se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos en cámara húmeda. Las láminas fueron lavadas tres veces con buffer fosfato pH 7.2 por 2 minutos cada vez.

6.-Incubación con el anticuerpo primario y control de isotipo: El anticuerpo monoclonal IgG anti-BrdU hecho en ratón (Sigma-Aldrich) fue diluido 1/2500 en buffer fosfato pH 7.2 en volúmenes suficientes para todas las muestras. El control de isotipo IgG se diluyó también en buffer fosfato pH 7.2. Se añadieron 150 µl del anticuerpo primario a cada lámina y el control de isotipo solamente a una lámina, y se dejaron en incubación toda la noche a 4°C en cámara húmeda.

7.-Incubación con el anticuerpo secundario biotinilado: Se preparó una solución de bloqueo en buffer fosfato pH 7.2, albúmina sérica bovina (BSA) al 2% y Triton-X-100 al 0.1%. Se diluyó el anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón hecho en cabra (Vector, Burlingame, CA) en una concentración final de 5 µg/ml, se mezcló suavemente por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos. Luego se añadieron 150 µl del sobrenadante, que contiene el

anticuerpo secundario biotinilado, a cada lámina y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos en cámara húmeda. Las láminas fueron lavadas tres veces con buffer fosfato pH 7.2 por 2 minutos cada vez.

8.-Adición del conjugado enzimático Streptavidina-HRP: El conjugado enzimático streptavidina-HRP (DAKO) no requiere preparación, se agregó una gota del reactivo a cada lámina y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos en cámara húmeda. Las láminas fueron lavadas tres veces con buffer fosfato pH 7.2 por 2 minutos cada vez.

9.-Adición del sustrato DAB: Se preparó la solución de sustrato diaminobencidina DAB (DAKO) en volúmenes suficientes para todas las muestras. Se emplearon 25 µl de reactivo DAB por cada mililitro de buffer de dilución. Se agregaron 150 µl de sustrato DAB a cada lámina y se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos en cámara húmeda. Las láminas fueron lavadas tres veces con buffer fosfato pH 7.2 por 2 minutos cada vez.

10.-Coloración con hematoxilina de Meyer: La hematoxilina de Meyer (DAKO) se encuentra lista para usar; se agregó 150 µl del reactivo a cada lámina y se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente, luego se eliminó el exceso del colorante lavando con abundante agua destilada.

11.-Deshidratación de las muestras: Las muestras se sumergieron en una batería creciente de alcoholes usando el siguiente esquema: primero 5 minutos en agua destilada, luego 3 minutos en cada uno de los siguientes alcoholes: 1) etanol 70%, 2) etanol 95%, 3) etanol 100%, 4) xilol.

Finalmente, las láminas se montaron con Richard-Allan Scientific® Cytoseal XYL (Thermo Scientific) y se dejaron secar toda la noche.

5.3.4 Inmunofluorescencia indirecta

Debido a una señal de interferencia en los ensayos de inmunohistoquímica con anti-BrdU (ver Resultados, Fig 10, pág 48) se realizó inmunofluorescencia para la detectar de células proliferativas con el mismo marcador. Esta técnica permitió además emplear un segundo anticuerpo primario para la detectar OCT4, factor de transcripción usado como marcador de células totipotentes (71). Células proliferativas (positivas a BrdU) con reacción positiva a OCT-4 fueron caracterizadas como germinativas. Debido a la ausencia de escólex en la mayoría de las muestras de quistes racemosos, los ensayos de inmunofluorescencia se centraron en estudiar la presencia de células germinativas en la pared vesicular de los quistes racemosos y vesiculares.

Se procedió según protocolo estandarizado en el laboratorio. Se realizaron los pasos 1, 2, 3 y 5 descritos en la sección 5.3.3, luego se realizaron los siguientes pasos:

- 1.-Incubación con el 1er anticuerpo primario y control de isotipo: El anticuerpo monoclonal IgG anti-BrdU hecho en ratón (Sigma-Aldrich) fue diluido 1/500 en buffer fosfato pH 7.2 en volúmenes suficientes para todas las muestras. El control de isotipo IgG se diluyó de forma similar en buffer fosfato pH 7.2. Se añadieron

150 µl del anticuerpo primario a cada lámina y el control de isotipo solamente a una lámina y se dejaron en incubación toda la noche a 4°C en cámara húmeda.

2.-Incubación con el anticuerpo secundario conjugado: Se empleó el anticuerpo anti IgG de ratón hecho en cabra conjugado con Dylight (KPL, Gaithersburg, MD) y diluido 1/500 en buffer fosfato pH 7.2 en volúmenes suficientes. Luego se añadieron 150 µl a cada lámina y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos en cámara húmeda. Las láminas fueron lavadas tres veces con buffer fosfato pH 7.2 por 2 minutos cada vez.

3.-Incubación con el 2do anticuerpo primario: El anticuerpo policlonal anti-OCT4 hecho en conejo (Merck) fue diluido 1/200 en buffer fosfato pH 7.2 en volúmenes suficientes para todas las muestras. Luego se añadieron 150 µl del anticuerpo diluido a cada lámina y las láminas se incubaron toda la noche a 4°C en cámara húmeda.

4.-Incubación con el 2do anticuerpo secundario conjugado: Se empleó el anticuerpo anti IgG de conejo hecho en cabra conjugado con Alexa fluor 647 (ABcam) y diluido 1/500 en buffer fosfato pH 7.2 en volúmenes suficientes. Luego se añadieron 150 µl a cada lámina y se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos en cámara húmeda. Las láminas fueron lavadas tres veces con buffer fosfato pH 7.2 por 2 minutos cada vez.

Finalmente las láminas fueron montadas con solución Vectashield conteniendo 4' 6 diamino 2 fenilindol (DAPI) (Vector Laboratories), marcador fluorescente que se une a regiones ricas en adenina y timina del ADN, y se sellaron los bordes de

los cubreobjetos con esmalte. Las imágenes fueron captadas con microscopia confocal (Zeiss, LSM880).

5.3.5 Extracción de ARN total

Para analizar los niveles de expresión de genes asociados a proliferación, se extrajo el ARN total de cada muestra empleando la técnica del fenol/cloroformo. Las muestras de los quistes fueron homogenizadas individualmente en TRIzol (Invitrogen) empleando un homogenizador Omni TH (Omni International, GA, USA). Se empleó 1 ml de solución de TRIzol para cada muestra; luego de la homogenización se incubaron a temperaturas de 15-30°C por 5 min para permitir la completa disociación de complejos nucleoproteicos. Luego se agregó 0.2 ml de cloroformo a cada muestra, y se agitaron vigorosamente por 15 seg. Después de incubar por 2-3 min entre 15-30°C, se centrifugaron a no más de 12,000g por 15 min a 2-8 °C. Después de la centrifugación el ARN permanece exclusivamente en la fase superior incolora o fase acuosa. Para precipitar el ARN la fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo y se agregó 0.5 ml de alcohol isopropílico, se incubaron las muestras a 15-30°C por 10 min y se centrifugaron a no más de 12,000g por 10 min a 2-8°C. Luego se lavó el pellet con etanol al 75% y se centrifugó a no más de 7,500g por 5 min a 2-8°C. El pellet se dejó secar para eliminar los restos de alcohol y se suspendió en 50 µl de agua libre de RNasas.

5.3.6 Diseño de cebadores

Se desarrollaron cebadores empleando el software Primer Premier 6.0 para evaluar seis genes asociados a proliferación en planarias, cuyas secuencias se identificaron en el genoma de *T. solium*: *Ts-zic*, *Ts-bruno*, *Ts-notum*, *Ts-prohibitin*, *Ts-chromobox*, *Ts-tho-c*. Para los ensayos de qPCR se realizó una normalización empleando el gen endógeno GAPDH (Tabla 1). Las secuencias de los genes se obtuvieron del servidor: <http://www.genedb.org/Homepage/Tsolium> (60).

Gen	Ubicación (pb)	Cebador sentido 5'→3'	Cebador antisentido 5'→3'	Amplicón (pb)
Ts-prohibitina TsM_00081 2300	355-467	TAC GAC GAG CGA GTT CTT CC	CGA ATC AGC AGC GAC ACT TG	113
Ts-bruno3 TsM_00003 8700	415-528	GCC ACA CCA TCT ACC AGT AAT G	TGG ACA AGC ACT CTC AAC CT	114
Ts-Zic TsM_00064 3500	393-537	ACT CTG GTA TCG GTA CAA TG	CAA GAA GTG GTA AGT CTC ATC	145
Ts-notum TsM_00093 0800	594-743	CGGTGTGATGCTGAA CATTGAT	GCG TAG GTC GGA TGA TTG AGA	150
Ts-cromobox1 TsM_00115 7300	284-386	CAG TGC CAT CTT CGG AAC CA	TTC GCA TCT GAC TCC TGT GAA	103
Ts-Tho5 TsM_00033 6400	903-1023	GCC GCA GCA TAG GAA TGA TT	CGT TCG CAT AAG CCA AGT GA	121
Ts-gapdh TsM_00005 6400	227-373	TCC AAG AGA TGA ATG CCA ATG C	CAG AAG GAG CCG AGA TGA TGA	147

Tabla 1: Lista de cebadores diseñados para el presente estudio.

5.3.7 qPCR para quistes racemosos y vesiculares

El perfil de expresión de los genes seleccionados se determinó mediante PCR en tiempo real. Para generar cDNA se empleó el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Se usó el ARN total en concentración de 50 ng/ μ l y se siguieron las recomendaciones de la casa comercial. Para la reacción de la transcriptasa reversa se emplearon 25°C por 10 min, 37°C por 120 min, 85°C por 5 min, 4°C ∞ . Luego se realizó PCR en tiempo real en reacciones de 10 μ l con el siguiente esquema: SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) 2X, cebador sentido (100 pM), cebador antisentido (100 pM), 1 μ l de cDNA generado. Se ejecutó un protocolo de 40 ciclos (2 min a 50°C, 10 min a 95°C, 15 seg a 95 °C y 1 min a 60°C) en placas de 96 pozos usando la plataforma Pikoreal 96 (Thermo scientific). Se registraron los valores de CT obtenidos y se realizó una cuantificación relativa usando el método de Livak ($2^{-\Delta\Delta CT}$) (61).

5.3.8 Análisis estadístico

Se comparó la expresión de genes entre quistes vesiculares y racemosos mediante pruebas no paramétricas de Mann-Whitney empleando el software Prism versión 6 (Graphpad, San Diego, CA). Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

5.3.9 Aislamiento de células germinativas

Para aislar las células germinativas a partir de membranas de quistes racemosos de *T.solium* se empleó el protocolo publicado por Toledo en 1997 (32). Las muestras de membrana se cortaron en pequeños fragmentos con un bisturí. Estas fueron cultivadas a 27 y 37°C por 7 días en frascos de cultivo de 25 cm² con 5 ml de medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal (10%), piruvato de sodio (1mM), aminoácidos no esenciales (0.01 mM), glutamina (0.2 %), mercaptoetanol (1.6 μM), buffer HEPES (25 mM), penicilina (100 U/ml), streptomycin (100 μg/ml) y anfotericina B (0.25 μg/ml; todos de la marca Gibco-Invitrogen) y NaHCO₃ (2 g/L). Luego los fragmentos se digirieron por 15 min con tripsina-EDTA (1%) (Gibco) a temperatura ambiente y en agitación constante. El producto de la digestión fue colectado y centrifugado a 800g por 10 min. Finalmente el pellet fue suspendido en medio de cultivo fresco y cultivado a 27 y 37°C. Las observaciones al microscopio se realizaron diariamente.

Para los ensayos de inmunofluorescencia, los cultivos fueron suspendidos por agitación, las células fueron sembradas en cámaras de cultivo de 8 pozos (Nunc Lab-Tek Chamber Slide System) y se agregó medio de cultivo con 5-bromo-2´deoxiuridina (BrdU, Sigma) 1 mM, y se incubó a 27 y 37°C.

Luego se procedió según protocolo estandarizado en el laboratorio:

- 1.-Fijación de las células: Se aspiró el medio de cultivo cuidadosamente y las células fueron cubiertas agregando 300 μl de metanol (100%) helado en cada

pozo. Las cámaras se mantuvieron a -20°C por 15 min luego se aspiró el metanol y se lavó cada pozo tres veces con buffer fosfato pH 7.2 por 5 minutos cada vez.

2.-Bloqueo con suero normal de cabra: Se preparó la solución de bloqueo como se indica en la sección 5.3.3 (pág 30). Se adicionaron 150 μl de la solución de bloqueo a cada pozo. Las cámaras se incubaron a temperatura ambiente por 1 hora. Los pozos fueron lavados 3 veces con buffer fosfato pH 7.2 por 2 minutos cada vez.

Se procedió a realizar los pasos 1-4 de la sección 5.3.4 (págs 32, 33).

Finalmente se retiraron las divisiones de las cámaras de cultivo y las láminas se montaron con solución Vectashield conteniendo DAPI (Vector Laboratories) y se sellaron los bordes de los cubreobjetos con esmalte. Las imágenes fueron captadas con microscopia confocal (Zeiss, LSM880).

VI. Resultados

6.1 Identificación *in situ* de células proliferativas en quistes vesiculares y quistes evaginados.

El uso de BrdU para marcar células en división se estandarizó empleando 80 quistes musculares de cerdos naturalmente infectados, los cuales fueron cultivados en presencia de diferentes concentraciones de BrdU (1mM, 2.5 mM y 5 mM) y por diferentes tiempos (24, 48, 72, 96 y 120 horas). Los quistes fueron distribuidos en placas de 12 pozos a razón de 4-5 quistes por pozo, cada uno con 2 ml de medio RPMI suplementado. Se seleccionaron 3 muestras por cada condición para realizar las tinciones y observaciones histológicas. El quiste tiene un diámetro aproximado de 1-1.5 cm y espesor variable. La pared vesicular no es regularmente esférica, sino que presenta regiones de engrosamiento, aplanadas y amplias en superficie denominados mamelones, también presenta una superficie ciliar (microtrichas) muy visible en el material fresco y el escólex invaginado. A 24 horas de incubación con BrdU 1mM se pudo observar células positivas restringidas al cuello del escólex y en la pared vesicular del parásito están prácticamente ausentes (Fig7).

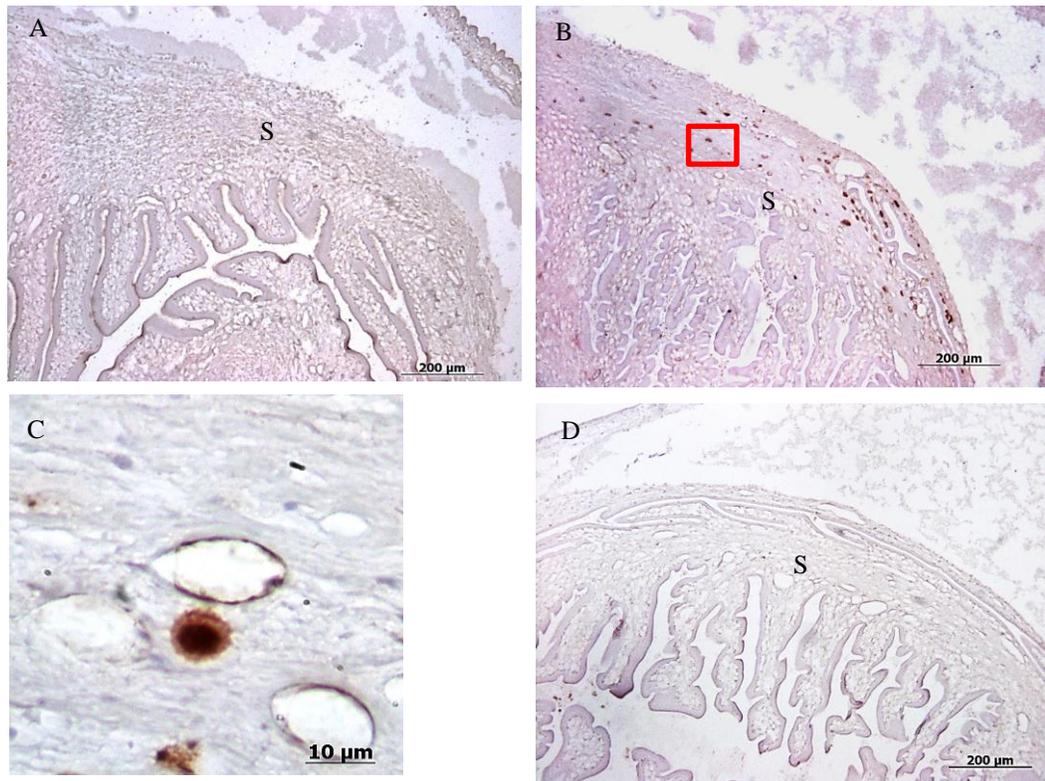


Fig7: Identificación *in situ* de células proliferativas en quistes musculares. Inmunohistoquímica empleando un anticuerpo monoclonal anti-BrdU en una típica muestra de quiste muscular cultivada con BrdU (1 mM) por 24 horas revelando un número de células positivas a BrdU localizadas y confinadas en la región del cuello (B); magnificación (C); quiste cultivado con BrdU a las 0 horas (A); control negativo (D). A, B, D = 100X C = 400X S: escólex

En la figura 7A se muestra un quiste cultivado con BrdU 1mM a tiempo 0, no se observan células positivas. En 7B se ve un quiste tras 24 horas con BrdU 1mM, se observan células positivas distribuidas en el parénquima de la base del escólex; el cuadro rojo se muestra en 7C. En la magnificación se observa una célula positiva próxima a canalículos; la célula presenta un diámetro aproximado de 10 μm , núcleo prominente y poco citoplasma. La figura 7D muestra un quiste cultivado en ausencia de BrdU empleado como control negativo.

Para identificar abundantes células proliferativas en un proceso regular de la vida del parásito, se optó por inducir la evaginación del escólex *in vitro* empleando

bilis porcina (ver Materiales, pág 26). Los quistes inducidos se cultivaron con diferentes concentraciones de BrdU (2.5 mM y 5 mM) durante 1, 5, 12, 24, y 48 horas. Los quistes fueron distribuidos en placas de 12 pozos a razón de 3-4 quistes por pozo, en 2 ml de medio RPMI suplementado. Se observó que el número de células positivas aumentó luego de 1 hora de incubación con BrdU 2.5 mM y alcanzó una densidad máxima a las 24 horas. Las células positivas se localizaron en la región parenquimal de las zonas laterales del escólex (Fig 8).

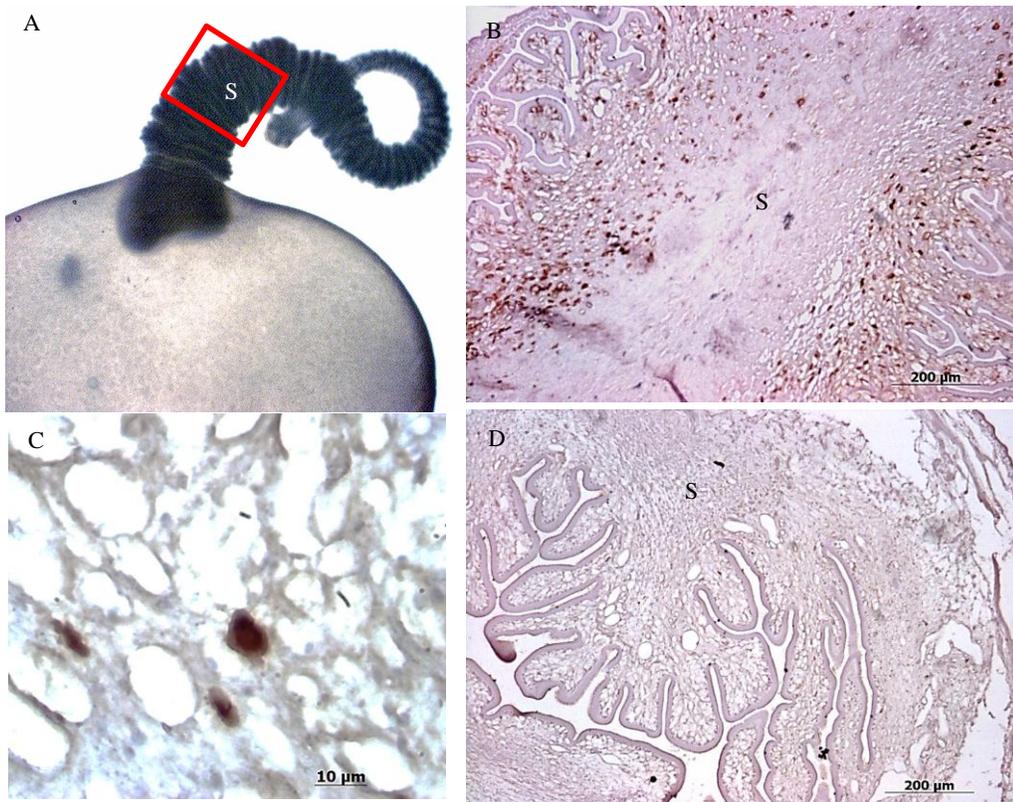


Fig8: Identificación *in situ* de células proliferativas en quistes evaginados. Quiste con el escólex evaginado (A). Inmunohistoquímica en muestras de quistes luego de 1 hora de inducida la evaginación y cultivados con BrdU 2.5 mM; se ve un gran número de células positivas a BrdU (B); magnificación del tejido del escólex evaginado(C); quiste evaginado a las 0 horas de ser cultivado con BrdU (D). B, D = 100X C = 400X S: escólex.

En la figura 8A, se observa un quiste vesicular 1 hora después de agregada la bilis para inducir la evaginación, el cuadro rojo señala el área observada mediante inmunohistoquímica. En la figura 8B, se observan abundantes células en proliferación en el parénquima del quiste. La figura 8C muestra tejido del escólex evaginado a mayor aumento, las células presentan las mismas características morfológicas que en la figura 7C. La figura 8D muestra un quiste cultivado con BrdU 2.5 mM colectado a tiempo 0

6.2 Lectura histológica de quistes racemosos y selección de muestras.

Las muestras de quistes racemosos revelan un panorama heterogéneo. Las Fig 9 es la foto de un quiste cuya morfología presenta zonas de buen estado, zonas en degeneración y zonas necróticas. Se muestran ampliaciones en 9A, 9B y 9C, que corresponden a los recuadros seleccionados. La figura 9A es una región de la pared vesicular que preserva integridad en todas las capas tisulares; se observa la presencia de las microtrichas en la superficie. En 9B se ve una región en degeneración; los componentes celulares de las diversas capas están ausentes o alterados. La figura 9C muestra una región con necrosis, caracterizada por la ausencia de núcleos en grandes porciones del tejido. Estas observaciones corroboran el detallado reporte histológico de un artículo nacional de 1952 (24), en el cual se describe al quiste racemoso como un mosaico que presenta zonas viables cercanas a regiones alteradas con diferentes grados de degeneración y necrosis.

Una colección de 27 muestras (22 quistes racemosos y 5 quistes vesiculares) se evaluó por histología y a nivel de expresión genética. Siguiendo los criterios de inclusión de viabilidad y tiempo de desarrollo, 9 muestras de quistes racemosos se eliminaron por no cumplir con ninguno de los criterios de inclusión, quedando 13 quistes racemosos y 5 quistes vesiculares para el estudio (Tabla 2 y 3). Con esta población de muestras se realizaron los siguientes ensayos.

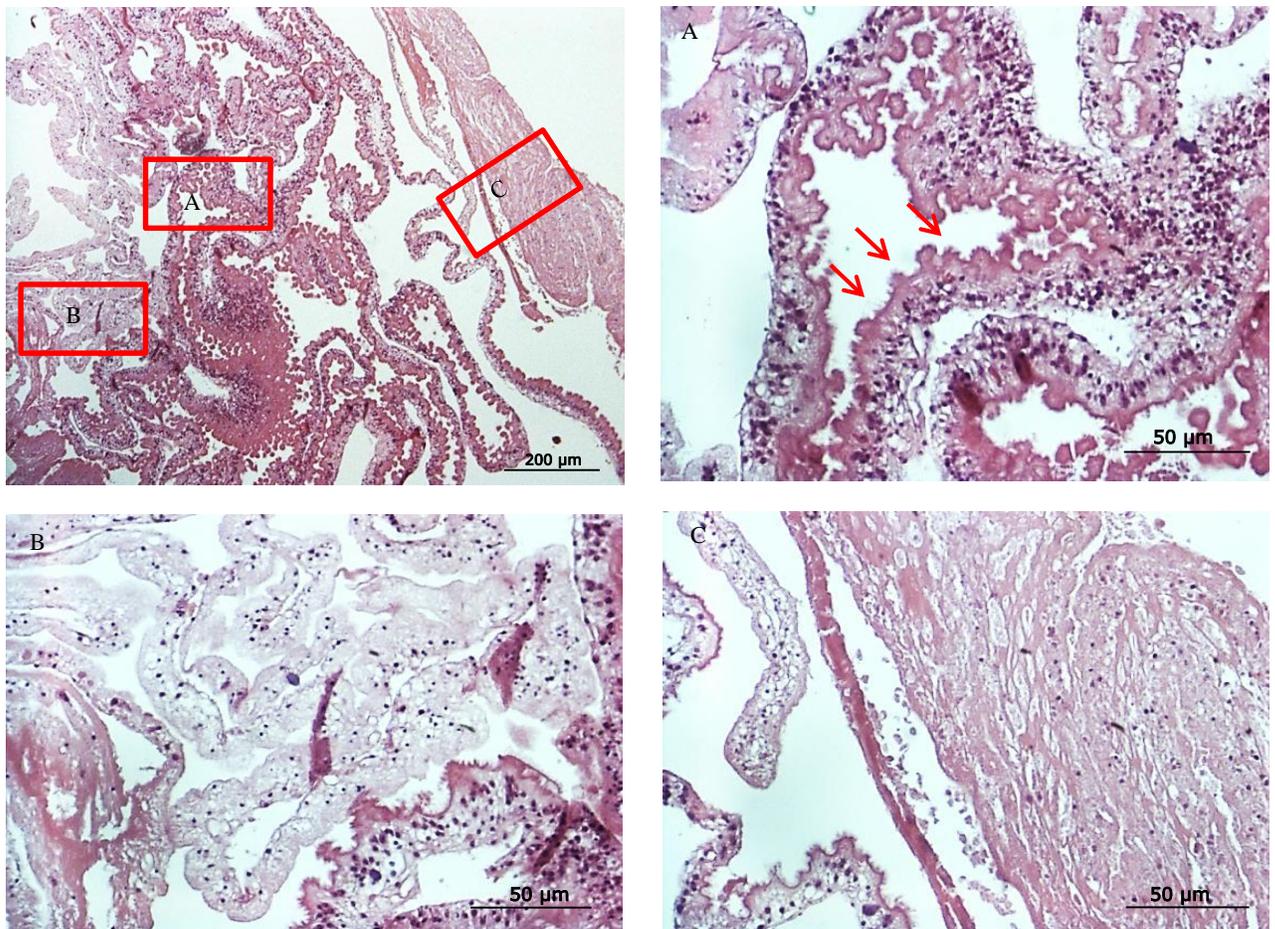


Fig 9: Descripción histológica de quiste racemoso. Tinción HE de una muestra representativa de quiste racemoso. Región con integridad en la pared vesicular, las flechas señalan las microtrichias presentes en la superficie del tegumento (A), región de la pared que presenta degeneración (B), región necrótica de la pared vesicular (C).

Muestra	Pared vesicular	Escólex	Calificación	Necrosis	Observaciones	Decisión
R1	La pared vesicular preserva organización tisular, se observan microtrichias.	Ausente.	No	No	El tegumento presenta regiones con mayor grado de daño o alteración, presencia de corpúsculos calcáreos, presencia de canalículos dilatados en todas las capas de la pared vesicular.	Muestra incluida
R2	El tegumento presenta microtrichias dañadas	Presente rodeado de tejido degenerado, con presencia de canalículos dilatados, la capa más externa está constituida por colágeno, tegumento del parásito presenta daño con presencia de corpúsculos calcáreos.	No	No	El tejido presenta zonas de degeneración, ausencia de corpúsculos calcáreos y presencia de canalículos dilatados en la región interna de la pared vesicular	Muestra eliminada
R3	El tegumento de la pared presenta daño, ausencia de microtrichias.	Escólex presenta y cubierto por una gruesa capa de tejido conectivo, el tegumento del escólex presenta microtrichias dañadas, se observa una gran cantidad de corpúsculos calcáreos.	Si	Si	El tejido de la pared presenta degeneración y se observan focos de necrosis, presencia de corpúsculos calcáreos de gran tamaño. Presencia de material refringente en los canalículos.	Muestra incluida
R4	Tegumento alterado o tortuoso con presencia de prolongaciones, zonas con presencia de microtrichias dañadas, el tejido presenta zonas con altos grados de degeneración.	Ausente	Si	No	Se observa una gran vesícula interna con núcleos de mineralización, presencia de corpúsculos calcáreos de gran tamaño, canalículos dilatados restringidos a la región interna.	Muestra incluida
R5	Pared vesicular gruesa, el tegumento presenta daño, zonas con presencia de microtrichias.	Ausente	Si	No	El tejido presenta zonas de degeneración tisular con canalículos dilatados, no se observan corpúsculos calcáreos. Presencia de células inmunes (linfocitos y macrófagos) en la superficie e interior del parásito.	Muestra eliminada
R8	Pared con alto grado de degeneración, pérdida de la organización tisular, ausencia de microtrichias.	Presente en cavidad interna, el tejido de las cavidades presenta pérdida de organización tisular con focos de mineralización (calcificación). Gran proporción de zonas necróticas no se observan núcleos.	Si	Si	Ausencia de corpúsculos calcáreos, se observa la presencia de material refringente.	Muestra incluida
R14	Pared vesicular con alto grado de degeneración, pérdida de la organización tisular, no se observa tegumento ni microtrichias.	Ausente	No	No	Corpúsculos calcáreos ausentes, canalículos dilatados.	Muestra incluida
R16	Pared vesicular con alto grado de daño, pérdida de la organización tisular, tegumento con daño y ausencia de microtrichias, no se observan núcleos.	Ausente	Si	No	Presencia de material refringente en los canalículos, presencia de zonas de mineralización (calcificación).	Muestra eliminada.
R18	Pared vesicular con presencia de microtrichias en el tegumento, superficie globular.	Ausente	No	No	Ausencia de corpúsculos calcáreos, presencia de canalículos dilatados en la región interna. Aparente viabilidad.	Muestra incluida.
R19	Pared vesicular con presencia de degeneración y ausencia de microtrichias.	Ausente	No	Si	Presencia de corpúsculos calcáreos y canalículos dilatados en todas las capas de la pared vesicular, se observa una zona de necrosis. La muestra fue colectada en formol.	Muestra eliminada
R20	Pared vesicular con ausencia de tegumento.	Ausente	No	Si	Se observan grandes regiones de necrosis con ausencia de núcleos, ausencia de corpúsculos calcáreos. Presencia de restos de tejido encefálico.	Muestra eliminada
R21	Pared vesicular con zonas que presentan microtrichias en el tegumento.	Ausente	No	Si	Regiones con necrosis, presencia de corpúsculos calcáreos y canalículos dilatados. Aparente viabilidad	Muestra incluida
R22	Pared vesicular con zonas del tegumento con daño y zonas con presencia de microtrichias.	Ausente	No	No	Ciertas zonas del tejido presentan degeneración. Se observan corpúsculos calcáreos y canalículos dilatados. Aparente viabilidad.	Muestra incluida

Tabla 2: Lectura histológica de muestras de quistes racemosos.

Muestra	Valores de Ct						Contraparte histológica	Decisión final
	Genes sub expresados				Genes sobre expresados			
	<i>prohibitina</i>	<i>zic4</i>	<i>Chromobox1</i>	<i>thoc5</i>	<i>notum</i>	<i>bruno3</i>		
R1	24.9	33.4	24.4	24.1	24.3	23.1	Si	Muestra incluida
R2	40	40	40	40	40	40	Si	Muestra eliminada
R3	35	35	33	35	35	35	Si	Muestra incluida
R4	21.8	30.7	19.6	23.8	27.3	23.4	Si	Muestra incluida
R6	25.3	31.8	31.7	28.1	24.4	23.3	No	Muestra incluida
R7	32	38	40	40	33	35.5	No	Muestra eliminada
R8	24.2	22.9	22.4	23.2	23.3	22.8	Si	Muestra incluida
R9	23.7	25.9	22.3	24.6	24.4	23.3	No	Muestra incluida
R10	35.7	33.5	33.1	36.1	33	36.2	No	Muestra eliminada
R11	26.3	23.8	24.7	24.4	24.8	24.2	No	Muestra incluida
R12	24.5	23	23.01	23.8	23.5	23.3	No	Muestra incluida
R13	24.5	25.2	23.1	26	25.6	25.1	No	Muestra incluida
R14	24.2	22.8	22.6	24	23.5	23.4	Si	Muestra incluida
R15	32	30	28.9	30.7	30.4	32.3	No	Muestra eliminada
R17	39	37	34.7	40	36	36.8	No	Muestra eliminada
R18	24.1	29	23.1	25	27.9	25.1	Si	Muestra incluida
R20	25.1	25.6	23.5	23.5	26.3	24.7	Si	Muestra eliminada
R21	21.2	27.9	20.1	22	26.7	23.2	Si	Muestra incluida
R22	23.5	28.2	22.1	23.5	27.5	22.7	Si	Muestra incluida

Tabla 3: Valor promedio de CT de los seis genes evaluados en las muestras de quistes racemosos.

6.3 Identificación *in situ* de células proliferativas en muestras de quistes racemosos.

La pared vesicular muestra un espesor irregular y variable; se distinguen tres capas: La primera (interna) fibrilar entrecruzada; la segunda (intermedia) delgada y pseudo epitelial, y finalmente la tercera (externa) cuticular, densa y amorfa. Se observaron variaciones en los elementos presentes en cada una de las tres capas. La región interna de la pared mostró un gran número de células positivas a BrdU (Fig 10).

En la figura 10A se aprecia la inmunohistoquímica con anti-BrdU de un quiste racemoso clasificado como de desarrollo temprano. Toda la muestra presenta gran reactividad. El cuadrado rojo delimita el área seleccionada para observaciones a mayor aumento. En la magnificación de la figura 10B la reactividad es fuerte e irregular, haciendo difícil identificar las células. La figura 10C muestra la imagen panorámica de una tinción tricrómica de Mayer en un corte consecutivo del mismo quiste racemoso; el cuadrado rojo delimita la misma área seleccionada. La figura 10D muestra la magnificación de esta área, las flechas señalan un material de color opaco y refringente presente en los canalículos que interfiere en la coloración del ensayo y conduce a sobrestimar el número de células positivas. Como comparación, la figura 10E es la imagen panorámica de un quiste vesicular; el cuadro rojo delimita el área seleccionada de la pared vesicular que se ve a mayor aumento en 10F. No se observa reactividad en la pared vesicular.

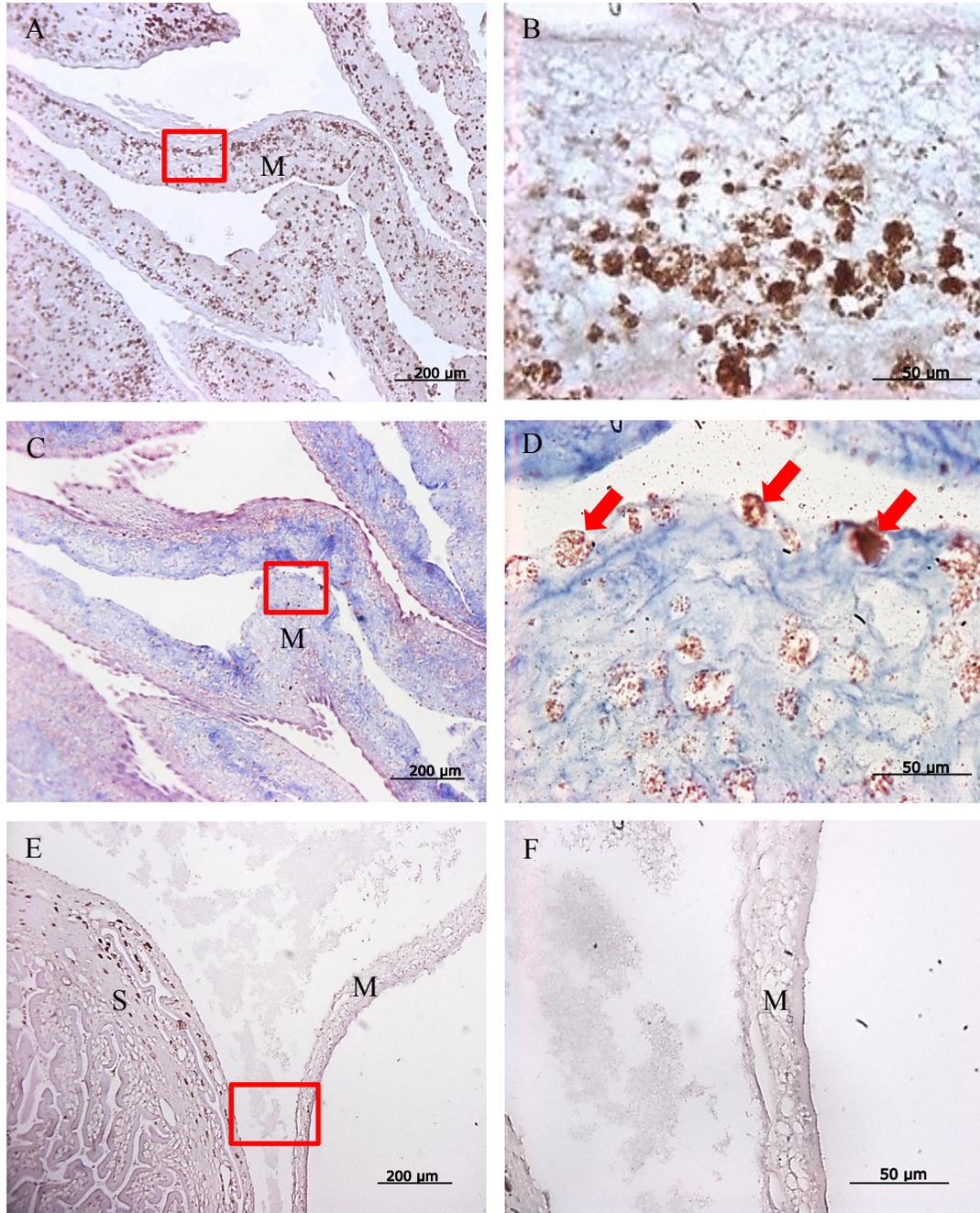


Fig 10: **Células proliferativas en quiste racemoso y quiste vesicular.** Inmunohistoquímica con anti-BrdU en un quiste racemoso (A y B). Tinción tricrómica de Masson en un corte consecutivo del mismo quiste racemoso (C y D) mostrando un precipitado en los canalículos (flechas en D). Inmunohistoquímica con anti-BrdU en un quiste vesicular (E y F) no se ve reactividad en la pared vesicular (F). S: escólex, M: membrana

De las 22 muestras de quistes racemosos evaluadas, tres presentaron escólex, ausente en las otras 19 muestras. Observaciones en el escólex degenerado revelaron la presencia de una gruesa capa de colágeno entremezclado con restos del cuello del parásito. En este, las diferentes capas de tejido del escólex pierden estructura y organización y se observaron pocas células positivas a BrdU (Fig 11).

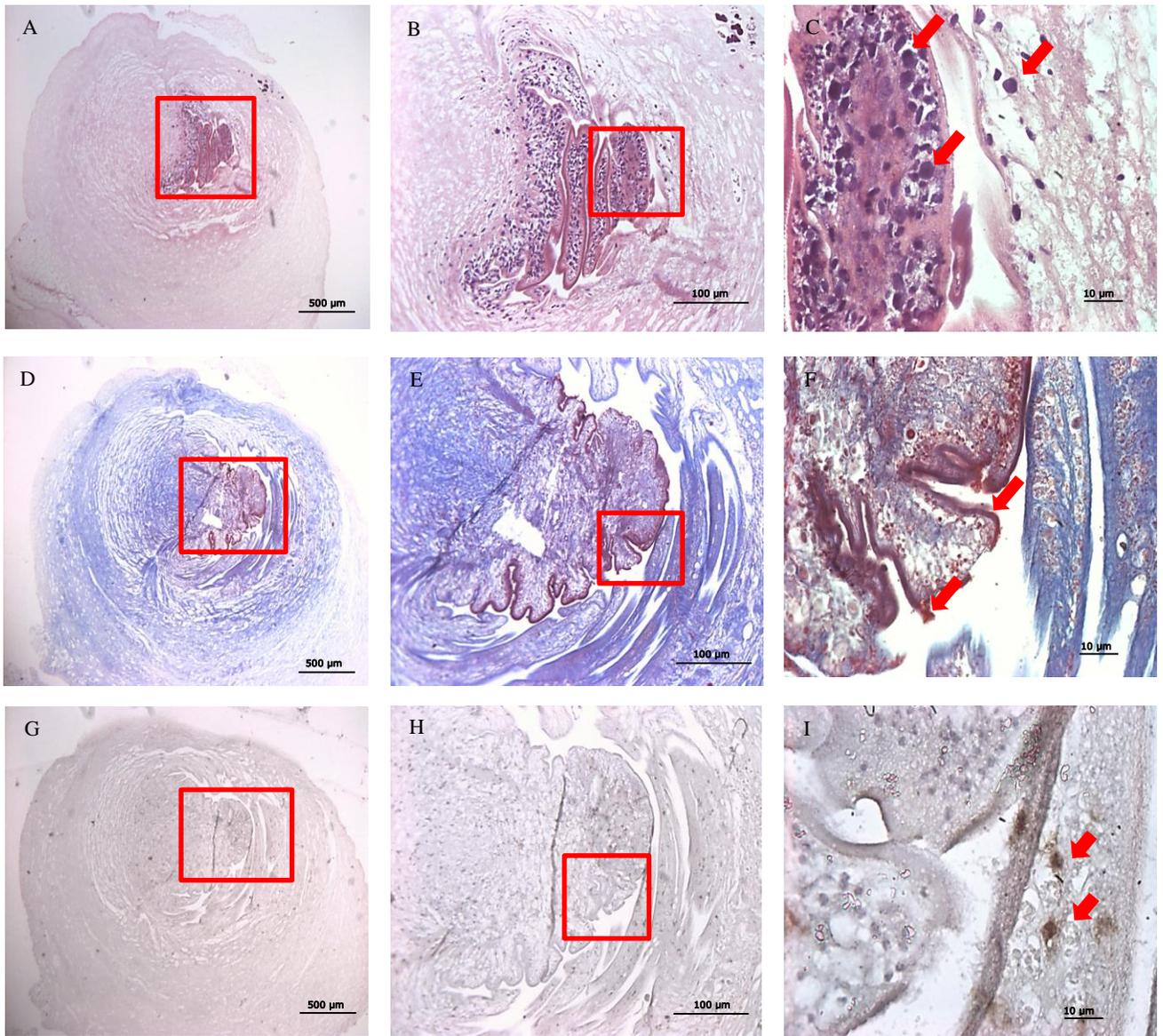


Fig 11: **Observaciones histológicas de un escólex degenerado:** Tinción HE de un escólex degenerado presente en una muestra de quiste racemoso (A, B, C); tinción tricrómica de Masson evidenciando la gruesa capa de colágeno que rodea al escólex (D, E, F); inmunohistoquímica empleando un anticuerpo monoclonal anti-BrdU mostrando pocas células reactivas (G, H, I) A, D, G = 40X B, E, H = 100X C, F, I = 400X

En la figura 11A se observa una vista panorámica del escólex degenerado teñido con HE; el cuadrado rojo delimita el área seleccionada observada a mayor aumento. A 100X (11B), se observa vestigios del escólex entremezclado con tejido conjuntivo y alteraciones en las diversas capas tisulares del escólex. A 400X (11C), se observa gran cantidad de corpúsculos calcáreos, señaladas por flechas. En un corte consecutivo de la misma muestra se usó tinción tricrómica de Masson. La coloración azul permite observar colágeno, que a 40X se aprecia como el mayor componente del tejido que envuelve al escólex (11D). A 100X se reconocen abundantes fibras de colágeno (11E). A mayor aumento, 400X, se señala el tegumento del escólex con flechas y se observa alteración en el sub tegumento y en la región interna (11F). La inmunohistoquímica con anti-BrdU se hizo en un corte consecutivo (11G-I). Solo a 400X, el mayor aumento, fue posible detectar unas pocas células positivas a BrdU (flechas).

6.4 Identificación *in situ* de células germinativas en muestras de quistes racemosos.

Para confirmar la presencia de células en mitosis en la pared vesicular del parásito y caracterizarlas como células germinativas, se realizó ensayos de inmunofluorescencia empleando dos anticuerpos: anti-BrdU y anti-OCT4. Se seleccionaron diferentes regiones de la pared de ambos tipos de quistes (racemoso y vesicular) (Fig 12).

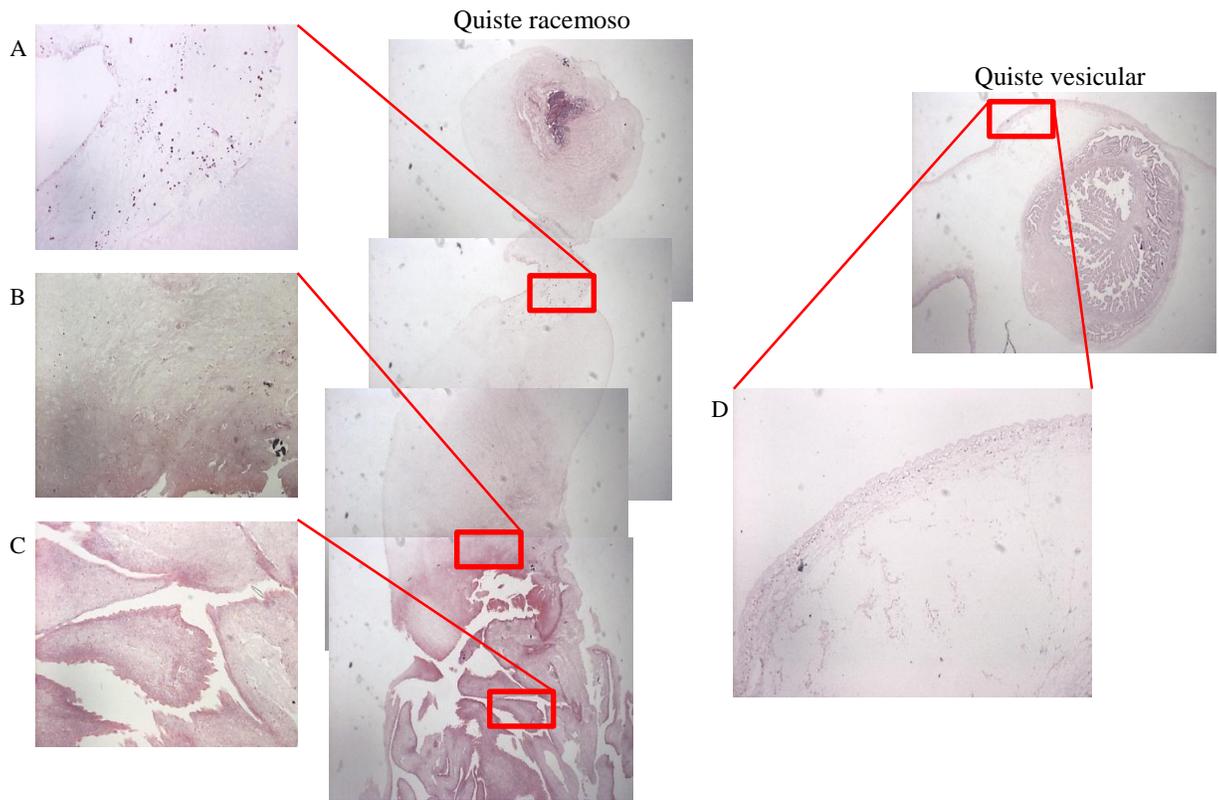


Fig 12: **Imágenes comparativas de quiste racemoso y vesicular**, resalta la gran diferencia de tamaño entre ambos tipos de quiste, los cuadros en rojo indican las áreas seleccionadas para las observaciones de inmunofluorescencia. (A-D). Imágenes captadas con estereoscopio.

Las figuras 12A-12C muestran tres áreas del quiste racemoso a diferentes distancias del escólex degenerado. La figura 12D muestra una zona de la pared del quiste vesicular seleccionada de forma aleatoria.

Las observaciones mediante microscopia confocal corroboran la presencia de células simultáneamente positivas a Dapi, OCT-4 y BrdU en el tejido de la pared vesicular del quiste racemoso (Fig 13-18).

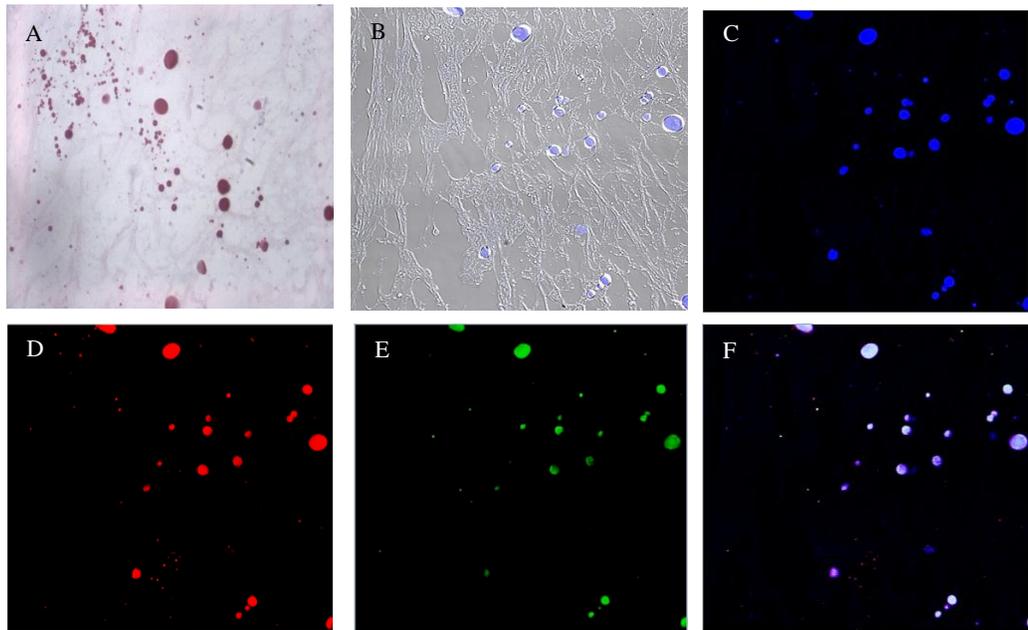


Fig 13: Inmunofluorescencia de la zona (A) del quiste racemoso. Tinción HE (A). Muestra observada a campo claro (B), tinción con Dapi (C). Marcaje empleando anticuerpo anti-Oct-4 (D). Marcaje empleando anticuerpo anti-BrdU (E). Superposición de imágenes (F). A = 400X B-F = 100 X, zoom 2

La figura 13 corresponde al panel A de la figura 12 vista por microscopia confocal. La figura 13A muestra la tinción HE del quiste racemoso, la más cercana al escólex vestigial. Se observan los núcleos de diversos tamaños distribuidos en el tejido. Los núcleos preservan la morfología ovoide regular.

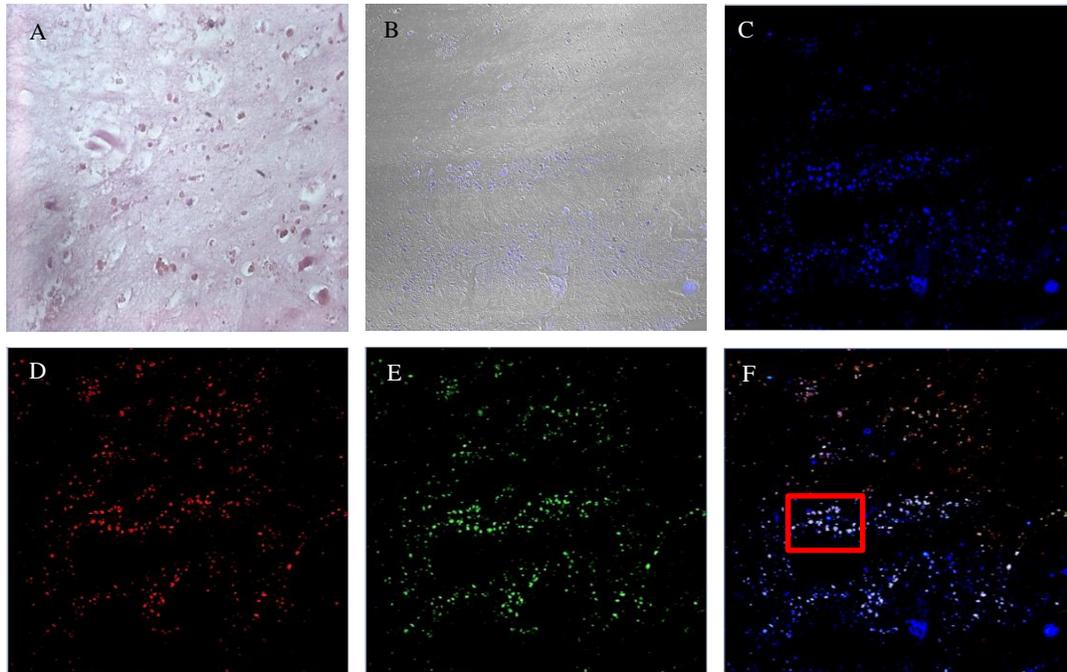


Fig 14: Inmunofluorescencia de la zona (B) del quiste racemoso. Tinción HE (A). Muestra observada a campo claro (B), tinción con Dapi (C). Marcaje empleando anticuerpo anti-Oct-4 (D). Marcaje empleando anticuerpo anti-BrdU (E). Superposición de imágenes (F). A = 400X B-F = 100 X, zoom 1

La figura 14 corresponde a la zona B de la figura 12 vista por microscopia confocal. La figura 14A muestra la tinción HE del quiste racemoso, correspondiente a una zona intermedia, el tejido muestra cierto grado de necrosis. Se observa un gran número de células positivas a los tres marcadores distribuidas en toda la pared vesicular. El cuadro rojo delimita el área seleccionada para observaciones a mayor aumento.

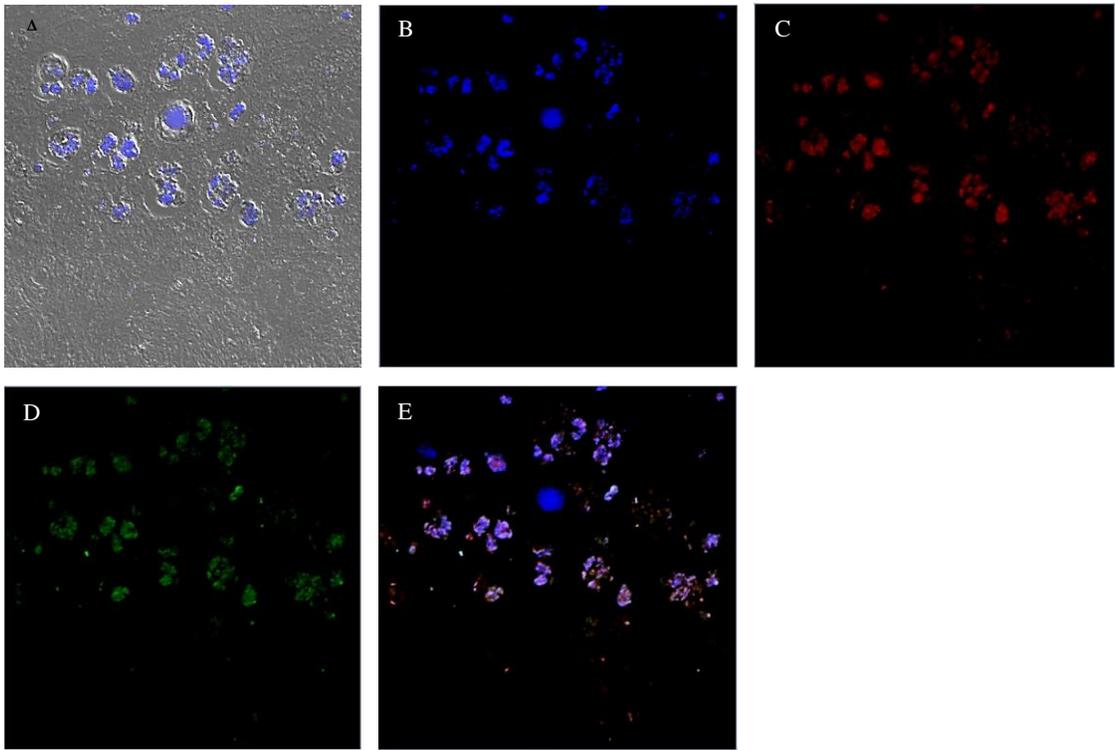


Fig 15: Magnificaciones de la zona (B) del quiste racemoso. Muestra observada a campo claro (A), tinción con Dapi (B). Marcaje empleando anticuerpo anti-Oct-4 (C). Marcaje empleando anticuerpo anti-BrdU (D). Superposición de imágenes (E). A-E = 200X, zoom 3.

La figura 15 muestra la magnificación del área seleccionada de la zona B del quiste racemoso. Las células positivas a los tres marcadores presentan diferentes tamaños. Estas presentan núcleos con alteraciones en la morfología con un borde de superficie irregular. Se observa en el centro una célula somática positiva solo a DAPI.

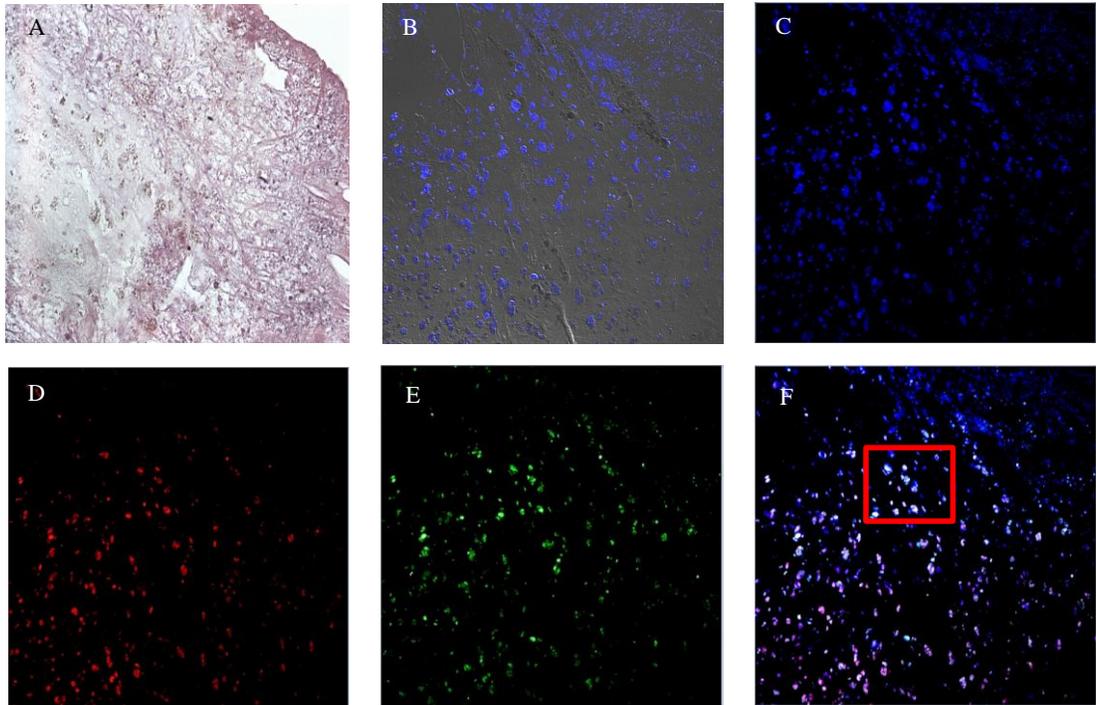


Fig 16: Inmunofluorescencia de la zona (C) del quiste racemoso. Tinción HyE (A). Muestra observada a campo claro (B), tinción con Dapi (C). Marcaje empleando anticuerpo anti-Oct-4 (D). Marcaje empleando anticuerpo anti-BrdU (E). Superposición de imágenes (F). A = 400X B-F = 200X, zoom 1.

La figura 16 corresponde a la zona C de la figura 12 vista a microscopia confocal. La figura 16A muestra la tinción HE del quiste racemoso correspondiente a la zona más alejada del escólex vestigial, se observa una mayor alteración en las estructuras de la membrana. Al igual que la figura 14, se observa un gran número de células positivas a los tres marcadores distribuidas en toda la pared vesicular. El cuadro rojo delimita el área seleccionada para observaciones a mayor aumento.

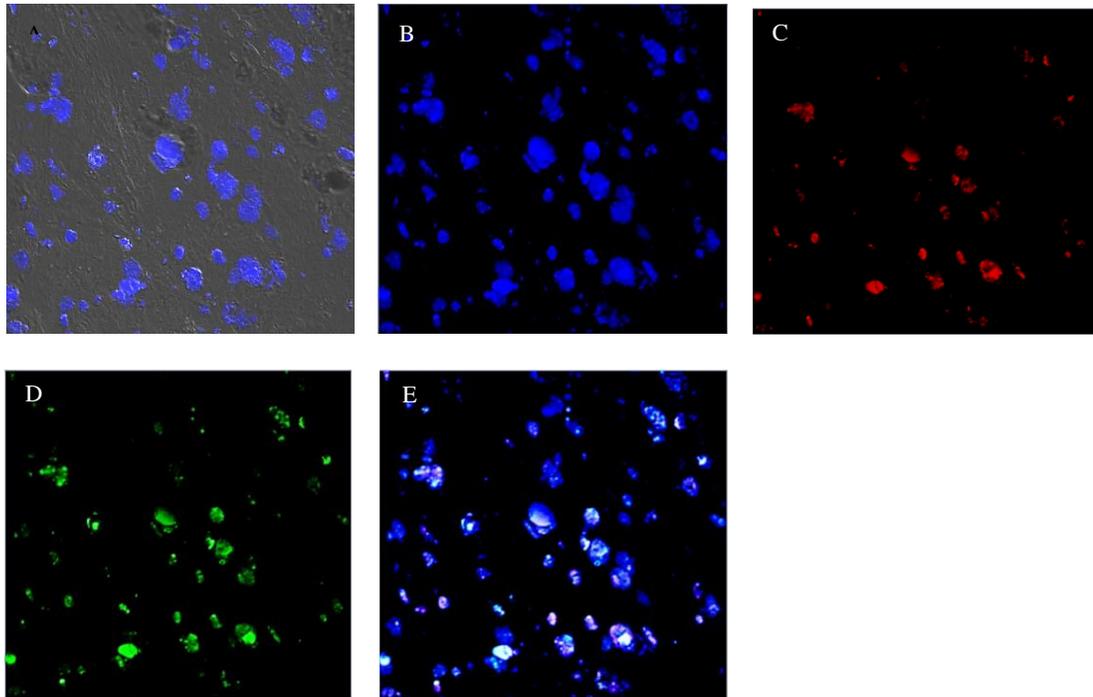


Fig17: Magnificación dela zona (C). Muestra observada a campo claro (A), tinción con Dapi (B). Marcaje empleando anticuerpo anti-Oct-4 (C). Marcaje empleando anticuerpo anti-BrdU (D). Superposición de imágenes (E). A-E = 200X, zoom 3.

La figura 17 muestra la magnificación del área seleccionada de la zona C del quiste racemoso. Se observa con mayor facilidad los cambios en la morfología de los núcleos en el grupo de células positivas a los tres marcadores. Se observa un mayor número de células somáticas positivas solo a DAPI.

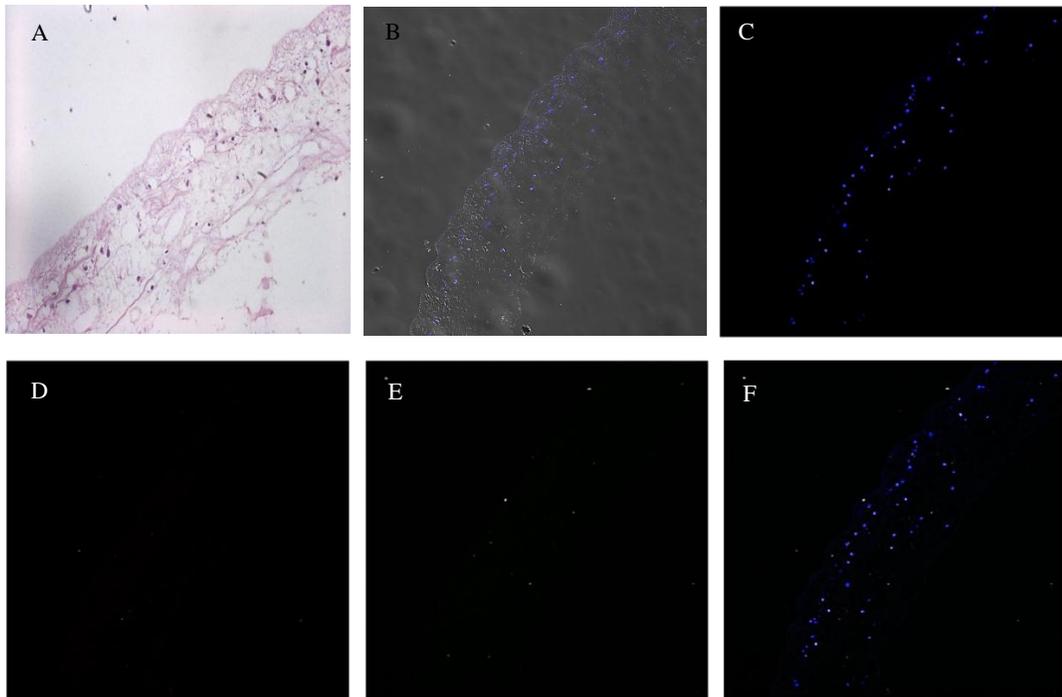


Fig 18: Inmunofluorescencia de la zona (D) de quiste vesicular. Tinción HyE (A). Muestra observada a campo claro (B), tinción con Dapi (C). Marcaje empleando anticuerpo anti-Oct-4 (D). Marcaje empleando anticuerpo anti-BrdU (E). Superposición de imágenes Imágenes (F). A = 400X B-F = 200X, zoom 1.

La figura 18 corresponde al panel D de la figura 12 vista a microscopia confocal. La figura 18A muestra la tinción HE del quiste vesicular, se observan los núcleos distribuidos a lo largo del tejido, la pared presenta integridad sin alteraciones, se observa la presencia de microtrichias en diversas zonas de la superficie. No se observan células positivas a BrdU (proliferativas) o a OCT-4 (totipotentes).

6.5 Niveles de expresión de genes asociados a proliferación

Los resultados de qPCR con ARN extraído de 5 quistes vesiculares y 13 quistes racemosos revelan diferencias significativas en los niveles de expresión en cinco de los seis genes evaluados. Se presentan dos patrones: primero, aquellos genes que muestran estar sub expresados en los quistes racemosos con respecto a vesiculares (entre paréntesis, en todos los casos, el valor de p de acuerdo a la prueba de dos colas de Mann-Whitney): *prohibitina* (p=0.0009), *zic4* (p=0.0002), *chromobox1* (p=0.0002) y sub unidad 5 del complejo Tho (*thoc5*) (p=0.0044) (Fig 19); y segundo, aquellos que mostraron estar sobre expresados en los quistes racemosos con respecto a vesiculares: *notum* (p=0.0338) y *bruno 3*, que a pesar de no tener diferencias significativas, muestra una tendencia a estar sobre expresado (Fig 20).

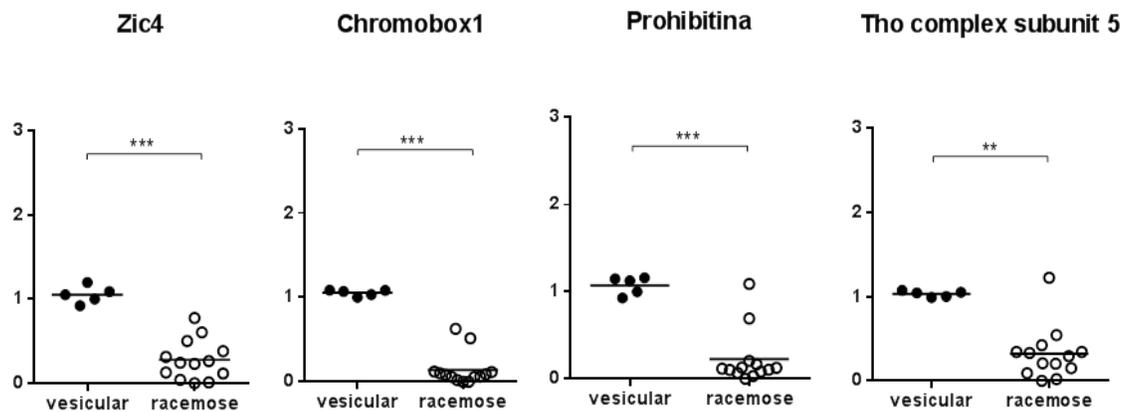


Fig 19: Sub expresión de cuatro genes asociados a proliferación en quistes racemosos: PCR cuantitativo para *T.solium* *prohibitina*, *zic4*, *chromobox1* y *thoc5* usando cDNA a partir de 500 ng de ARN total por muestra. Prueba de dos colas Mann-Whitney: p< 0.0002 para *zic4* y *chromobox1*; p< 0.0009 para *prohibitina*; p< 0.0044 para *thoc5*.

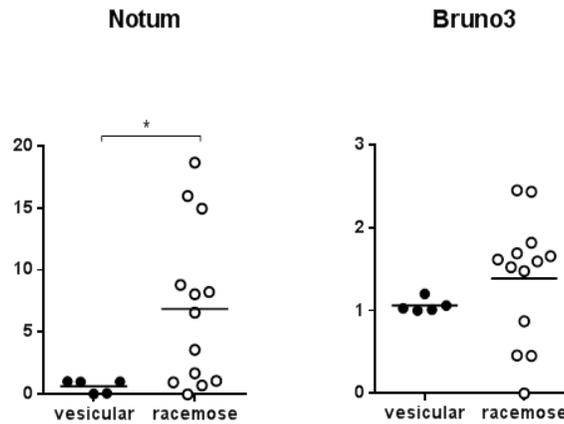


Fig 20: Sobre expresión de dos genes asociados a proliferación en quistes racemosos: PCR cuantitativo para *T.solum notum* y *bruno3* usando cDNA a partir de 500 ng de ARN total por muestra. Prueba de dos colas Mann-Whitney $p < 0.0338$ para *notum* y *bruno3* sin diferencias significativas.

6.6 Aislamiento y cultivo de células germinativas

Las células germinativas aisladas de diferentes muestras de quistes racemosos fueron empleadas en ensayos de inmunofluorescencia con anti-BrdU y anti-OCT4 para corroborar las observaciones realizadas en los tejidos. Las células en cultivo presentaron una tasa proliferativa heterogénea. Un grupo de células incubadas con BrdU 1mM por 24 h dio una fuerte reacción positiva empleando el anticuerpo anti-BrdU mientras que células aisladas de otras muestras de quistes racemosos requirieron mayores tiempos de incubación (1 semana) con BrdU 1 mM. La identidad totipotente de las células en cultivo también fue heterogénea; el cultivo proveniente del quiste racemoso R18 dio una reacción positiva empleando el anticuerpo anti-Oct4 mientras que otros fueron negativos (Figura 21).

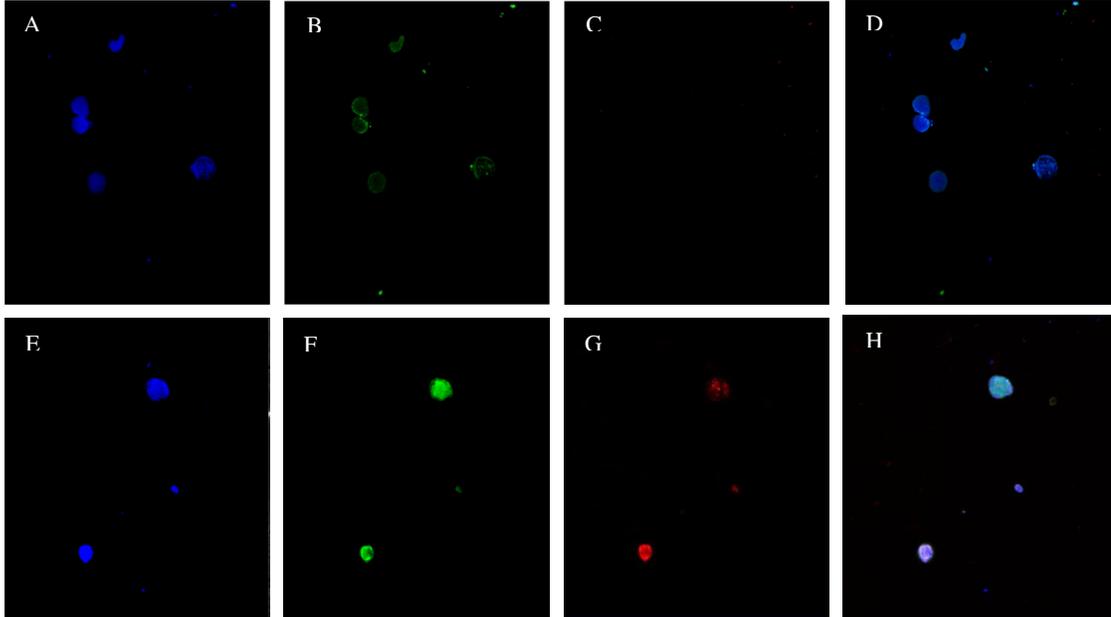


Fig 21: Inmunofluorescencia de células aisladas de dos muestras de quiste racemoso (R22 and R18). Tinción con Dapi (A, E). Marcaje empleando anticuerpo anti-BrdU (B, F). Marcaje empleando anticuerpo anti-Oct-4 (C, G). Superposición (D, H). A-H = 200X, zoom 2x

La figura 21 muestra cultivos provenientes de dos de quiste racemoso: (R22) incubados con BrdU 1mM por 1 semana y (R18) incubadas con BrdU 1 mM por 24 horas, teñidas con DAPI (Figs 21A y 21E), marcadas con el anticuerpo anti-BrdU (Figs 21B y 21F), marcadas con el anticuerpo anti-Oct-4 (Figs 21C y 21G) y la superposición de las imágenes (Figs 21D y 21H). Los cultivos obtenidos de la muestra R22 presentaron una proliferación más lenta y no constituyen células germinativas al ser negativas a OCT4, mientras que los cultivos obtenidos de la muestra R18 constituyen células germinativa (positivos a BrdU y a OCT4).

VII. Discusión

La proliferación y regeneración en planarias, platelmintos de vida libre, es dependiente de células proliferativas totipotentes denominadas neoblastos; platelmintos parásitos como *Echinococcus multilocularis* y *Taenia crassiceps*, ambos céstodos, presentan células similares llamadas células germinativas cuya función es poco estudiada (32, 33). Este trabajo ha permitido identificar por primera vez *in situ* células proliferativas en quistes vesiculares de *T. solium* mediante la incorporación de BrdU e inmunohistoquímica (63). Estudios en otras especies de céstodos han descrito una población de células madre indiferenciadas de alta proliferación conocidas como células germinativas (66, 67, 68). Las células germinativas poseen características morfológicas similares a los neoblastos presentes en planarias de vida libre (68) y al igual que ellos, constituyen una fuente para generar nuevas células (69). En el quiste vesicular de *T. solium*, las células proliferativas se localizan en el cuello del escólex y no se encuentran en la pared vesicular (Fig 7, 10). Estas células, identificadas por incorporar BrdU, presentaron una morfología similar a la descrita en los neoblastos de las planarias, con un núcleo prominente, poco citoplasma y un diámetro aproximado de 8-12 μm . La población de células proliferativas aumentó cuando se indujo la evaginación del quiste; en ese caso se observó una distribución por las zonas laterales de todo el parénquima del cuello, lo que revela su importante papel en el crecimiento y desarrollo, ya que desde el cuello se desarrolla todo el cuerpo o estróbilo del parásito adulto.

La evaginación inducida en quistes vesiculares constituye una proliferación organizada, obtenida en el laboratorio pero similar a lo que ocurriría en caso de que una persona ingiriese una larva o cisticerco viable, cuyo destino es adherirse y desarrollarse como gusano adulto.

La histología de las muestras racemosas reveló un panorama heterogéneo (Figura 9), en parte debido a diversos factores que no se pueden controlar por la naturaleza de la muestra, como administración de antihelmínticos, tiempo de la infección de los pacientes, entre otros. La morfología de mosaico del quiste racemoso ha sido documentada repetidamente en los escasos estudios disponibles que van más allá de reportes de casos clínicos (23, 24).

El quiste subaracnoideo o “racemoso” posee características histológicas únicas (24). Su pared es más gruesa y con mayor cantidad de colágeno que la del quiste vesicular; sin embargo, mantiene las mismas tres capas: tegumento, sub tegumento y región interna. En contraste a lo observado en el quiste vesicular, la pared vesicular del quiste racemoso mostró una gran cantidad de células mitóticamente activas, capacidad definida por la incorporación de BrdU, en la región interna (Figura 10). Esta observación sugiere que el crecimiento continuo y aberrante de la forma racemosa se debe a esta población especial de células. Las causas que desencadenan el crecimiento anormal del quiste aún son desconocidas; sin embargo, está reportado que este fenómeno ocurre luego de sufrir la

degeneración del escólex, convirtiéndose en una forma estéril incapaz de ejercer control sobre su proliferación (24).

Los quistes racemosos presentan células con proliferación continua (BrdU positivas) y varias de ellas son células madre totipotentes (OCT-4 positivas) (Figuras 13-17). La presencia de células germinativas (proliferativas y totipotentes) en la pared del parásito de la forma racemosa estaría estrechamente ligada al proceso de degeneración del escólex, evento crucial para desencadenar el crecimiento aberrante de la pared vesicular (24). Las observaciones de este trabajo permiten postular que la presencia de estas células estaría asociada a un periodo temprano en el desarrollo del quiste racemoso, el cual se considera una forma aberrante, de crecimiento descontrolado.

La identidad pluripotente de una célula está controlada por un grupo de factores de transcripción conformado por SOX2, NANOG y OCT-4 (71). OCT-4 es codificada por el gen Pou5f1, que regula la expresión de genes como Dppa4, Tdgf1, Oct4, Nanog y Lefty2, y controla las etapas iniciales de la embriogénesis en mamíferos (72, 73). Estudios en cáncer de próstata y de mama revelan una sobreexpresión de OCT-4 y se postulan mecanismos moleculares conservados que podrían explicar la reprogramación de células somáticas (74, 75).

OCT-4 ha sido empleado para caracterizar neoblastos aislados de la planaria *Girardia tigrina* (76); sin embargo, a pesar de estar anotado en el genoma de

T.solium, el presente estudio constituye la primera evaluación de OCT-4 en una especie de la clase céstode.

Una característica importante observada es la forma de los núcleos en las células positivas a BrdU y a OCT-4 del quiste racemoso. En el quiste vesicular, la forma de estos núcleos es elipsoide y regular, pero en el quiste racemoso se observa un contorno nuclear muy irregular (Figura 15), que se asemeja a la morfología descrita en diversos tipos de cáncer. (64). Estos cambios en la forma nuclear son típicos en diferentes tumores y son una herramienta para diagnosticar carcinomas de pulmón. Se postula que una disminución en las proteínas codificadas por los genes de laminina A/C contribuye a los cambios estructurales observados en casos de cáncer (65).

Independientemente de la razón de la proliferación, el presente estudio demuestra que las células proliferativas están aumentadas en número y están presentes en la pared del quiste racemoso, en un periodo inicial del desarrollo del quiste y en oposición a los quistes vesiculares. La proliferación anormal no es continua pero parece ser esencial, no solo para estas células, sino también para el desarrollo y crecimiento del quiste racemoso; esta afirmación se basa en la presencia de una mayor cantidad de células proliferativas en la muestra que presentó el escólex degenerado y en menor cantidad en el resto de las muestras observadas, que no tenían vestigios de escólex. Las muestras sin escólex requirieron mayores tiempos

de incubación para que fuera evidente la incorporación de BrdU posiblemente por presentar un metabolismo más lento.

Causas que podrían explicar la proliferación del quiste racemoso serían mutaciones en genes que controlan o regulan el ciclo celular, una inusual respuesta a factores del hospedero o una combinación de ambas. Es posible que los quistes localizados en los ventrículos, cisternas o espacio subaracnoideo no adquieran los mismos nutrientes que aquellos quistes localizados en el parénquima cerebral, que presentan la forma vesicular regular. El ambiente, extraparenquimal posiblemente adverso, podría inducir al quiste a degenerar y asimilar el escólex, lo que explicaría la presencia, en la pared, de células que normalmente se localizan en el cuello del escólex. Se requieren más estudios para identificar los factores involucrados en esta estrecha relación hospedero-parásito que favorecen el desarrollo del quiste racemoso.

La proliferación anormal puede ser causada por la sobreexpresión de genes que promueven el crecimiento o por pérdida de función, por la regulación negativa, de los genes que reprimen el crecimiento, como consecuencia de mutaciones o factores epigenéticos. Luego de haber identificado genes homólogos y específicos para *T.solium* de algunos genes importantes para las funciones proliferativas en neoblastos y regeneración en planarias, se realizó PCR en tiempo real utilizando cDNA de trece muestras diferentes de quistes racemosos y cinco quistes

vesiculares. Los niveles de expresión de cuatro genes de *T. solium* revelaron diferencias significativas entre las dos formas.

En comparación con los quistes vesiculares, cuatro genes (*prohibitina*, *zic-4*, *chromobox-1* y *THO5*) mostraron una regulación negativa en los quistes racemosos ($p < 0,0005$, prueba de dos colas de Mann Whitney U.), mientras que *bruno3* y *notum* mostraron una tendencia a la sobreexpresión.

Una revisión bibliográfica de las funciones descritas de los productos de los genes evaluados y alterados en los quistes racemosos en neoblastos de planarias y en diversos tipos de neoplasias humanas, proporciona un panorama general en el que se inhibe la represión del crecimiento, o también se puede observar una estimulación directa de la proliferación.

La *prohibitina* es esencial para controlar la progresión del ciclo celular en los neoblastos y también puede tener actividad supresora tumoral en seres humanos (46, 47). La baja expresión de *prohibitina* que encontramos en los quistes racemosos está en concordancia con el modelo de supresión, donde la ausencia de la proteína evita el control del ciclo celular y podría explicar el crecimiento anormal de este quiste.

De forma similar, la inhibición de *zic-1* en la planaria *S.mediterranea* sometida a lesiones estimuló la regeneración de la zona lesionada (44), lo cual es consistente

con el bajo nivel de *zic-4* observado en el quiste proliferante racemoso. Además, las proteínas *Zic* suprimen el crecimiento de tumores en tiroides humanos (40), pero su acción puede ser inactivada por hipermetilación en la región del promotor (41, 42, 43). Aunque el nivel de metilación en el promotor de este gen en el quiste racemoso es desconocido, los bajos niveles observados de *zic-4* estarían favoreciendo la proliferación en el quiste racemoso, al no controlar el crecimiento de sus células.

Otro factor epigenético, la proteína *Chromobox-1*, se une a las histonas metiladas e interactúa con la cromatina para condensarla y silenciar a los genes reguladores del desarrollo (48); una baja expresión está asociada a carcinoma humano (50). La baja expresión de *chromobox-1* en los quistes racemosos, comparada con los quistes vesiculares, es similar a lo reportado en varios tipos de cáncer, donde la ausencia de esta proteína significa la pérdida de un mecanismo que controla negativamente la proliferación.

Tho es un complejo de ribonucleoproteínas que funciona en la exportación de ARN nuclear (57); el mantenimiento y la diferenciación de las células madre intestinales de ratón son dependientes de *Tho* (58). La baja expresión de *Tho* que encontramos en los quistes racemosos con relación a los quistes vesiculares indicaría que, al igual que en leucemias (59), las células proliferativas presentes en alta densidad en el quiste racemoso pueden estar manifestando alteraciones

negativas en la diferenciación y que esta alteración también puede ser dependiente de Tho.

Finalmente, *notum* y *bruno3* presentaron una tendencia a estar sobreexpresados en los quistes racemosos y reflejarían la estimulación directa del crecimiento: la regulación positiva de *notum* en el quiste racemoso es consistente con altos niveles de la misma proteína cerca de sitios de amputación en *S.mediterranea* (53) y en casos de carcinoma hepatocelular humano (52).

Proteínas similares a Bruno participan en la auto-renovación de los neoblastos de planarias (54, 55), por lo que la regulación positiva de *bruno3* observada en los quistes racemosos indicaría la proliferación de este tipo de células madre.

Las observaciones histológicas del quiste racemoso revelan que la pared vesicular es muy heterogénea, algunas regiones presentan mayor o menor integridad del tejido (Figura 9) y las observaciones macroscópicas no permiten distinguir dicho nivel de integridad. La sección empleada para el aislamiento del ARN, elegida de forma aleatoria, puede haber presentado una mayor o menor proporción de células germinativas, a pesar de no tener la certeza de la cantidad de células germinativas presentes ni de la integridad de la sección, el hallazgo de diferencias estadísticamente significativas en genes homólogos reportados de importancia en neoblastos de planarias es congruente con la distribución de células germinativas observadas en los dos tipos de quiste. Por otro lado, encontrar sobreexpresión de algunos genes en quistes racemosos con relación a quistes vesiculares revela que

los tejidos analizados se encontraban activos; esto también se había hecho evidente por el consumo de medio de cultivo durante la fase de estabilización, posterior a la esterilización de la muestra llegada del quirófano.

El uso potencial de las células germinativas de *T.solium* ha llevado al laboratorio a realizar esfuerzos para poder establecer un cultivo en crecimiento sostenido que permita estudiar vías de señalización y evaluar nuevos fármacos, así como comprobar las diferencias observadas en los ensayos de qPCR. Las observaciones preliminares han permitido comprender aspectos biológicos importantes del parásito como diferencias en la tasa proliferativa y diferencias en la identidad totipotente de las células germinativas (Figura 21); sin embargo, aún se requiere más trabajos para establecer las condiciones adecuadas de cultivo, que provean nutrientes específicos, similares a los que el parásito encuentra en el cerebro humano.

Trabajos empleando vesículas de *Echinococcus multilocularis* han permitido desarrollar un sistema de cultivo que brinda condiciones para la regeneración del metacéstode (33, 34, 35); este sistema ha permitido estudiar diversas señales a nivel molecular entre el parásito y el hospedero (70). En contraste, los estudios de la forma racemosa del cisticerco de *T.solium* afrontan dos dificultades principales: la primera constituye la dificultad de conseguir el material biológico para mayores estudios, convirtiéndolo en un material limitante; y la segunda, no contar con un

sistema *in vitro* que proporcione las condiciones necesarias para ensayos de cultivo por largos periodos.

El desarrollo del metacéstode o quiste de los céstodes ocurre de manera organizada mediante un proceso denominado polaridad anterior/posterior (77). El quiste presenta una región terminal anterior constituida por el escólex y una región indiferenciada posterior (78). La expresión de marcadores moleculares involucrados en la polaridad de regiones específicas del cisticerco ha sido estudiada en dos especies de céstodes (78). Transcritos de la proteína Wnt4 mostraron sobreexpresión en quistes vesiculares de *T. solium* inducidos a evaginación (79). El estudio del proceso de polaridad en la forma racemosa constituye un tema atractivo para futuras investigaciones, las cuales brindarían mayor información sobre las alteraciones moleculares que favorecen el desarrollo de este tipo particular de quiste.

Este trabajo es el primero en demostrar la presencia de células germinativas en la pared vesicular del quiste racemoso. Concluimos que la presencia y el aumento en el número de estas células juegan un papel importante en el desarrollo y proliferación de esta forma aberrante y maligna de NCC. Además, proporcionamos un cuadro general de la expresión alterada de genes asociados a la proliferación.

VIII. Conclusiones

- El quiste vesicular presenta células proliferativas y estas se encuentran limitadas al cuello del escólex.
- La población de células proliferativas aumenta dramáticamente cuando el cisticerco o quiste evagina.
- El quiste subaracnoideo hiperproliferativo (“racemoso”) presenta, en etapas iniciales de desarrollo, una pared vesicular rica en células germinativas.
- Con respecto al quiste vesicular, el quiste racemoso presenta niveles de expresión alterados en genes asociados a proliferación.

IX. Limitaciones

El presente trabajo presentó limitaciones que impiden conocer más sobre el comportamiento de las células germinativas y el desarrollo de la forma racemosa del quiste de *T.solium*:

- Las muestras empleadas provienen de diferentes hospederos, lo que podría representar un sesgo en los resultados; sin embargo, no existe reporte que describa el desarrollo de quistes racemosos en cerdos y no se dispuso de quistes vesiculares humanos.
- Las muestras no consistieron de quistes subaracnoideos hiperproliferativo (racemosos) completos, sino de remanentes de la pared vesicular obtenidas luego de intervención quirúrgica, aunque posiblemente representan la mayor parte del parasito extraído en la mayoría de casos
- No se contó con la información clínica completa de cada muestra, los datos relevantes que se desconocen son: imágenes de las resonancias que pudieron informar sobre la respuesta inflamatoria; tiempo de infección de cada paciente para inferir el tiempo de desarrollo del quiste racemoso; administración de antihelmínticos y otros medicamentos que pudieron afectar directamente la viabilidad de las muestras.
- Se presentaron dificultades en la colecta y envío de las muestras.
- Se presentaron problemas técnicos en el procesamiento de las muestras destinadas a las evaluaciones histológicas.

X. Recomendaciones

- Estandarizar los tiempos de incubación con BrdU para el quiste racemoso; cada muestra presenta diferentes tasas metabólicas y debe ser tratada como un caso particular.
- Evaluar factores o aditivos como: insulina, factor de crecimiento epidermal (EGF) y factor de crecimiento transformante (TGF beta) estudiados y evaluados en otras especies de parásitos como *Echinococcus multilocularis* (80), que otorguen mejores condiciones de cultivo tanto para las muestras de pared vesicular como para los aislados celulares.
- Evaluar importantes vías de señalización como la de Wnt, que permitirá tener un mejor panorama de lo que favorece el desarrollo de la forma hiperproliferativa del quiste de *T.solium*.

XI. Bibliografía

1. Ruppert EE, Barnes RD. Invertebrate zoology. 6th ed. Fort Worth: Saunders College Pub. 1994.
2. Olson PD, Zarowiecki M, Kiss F, Brehm K. 2012. Cestode genomics – progress and prospects for advancing basic and applied aspects of flatworm biology. *Parasite Immunology* 34: 130-150.
3. Bobes RJ, Fragoso G, Fleury A, García-Varela M, Sciutto E, Larralde C, Laclette JP. 2014. Evolution, molecular epidemiology and perspectives on the research of taeniid parasites with special emphasis on *Taenia solium*. *Infection, Genetics and Evolution* 23: 150-160.
4. García HH, Gonzalez AE, Evans CA, Gilman RH, Cysticercosis Working Group in Peru. 2003. *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet* 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. Verastegui MR, Mejia A, Clark T, Gavidia CM, Mamani J, Ccopa F, Angulo N, Chile N, Carmen R, Medina R, García HH, Rodriguez S, Ortega Y, Gilman RH. 2015. Novel rat model for neurocysticercosis using *Taenia solium*. *The American Journal of Pathology* 185(8): 2259-68.
7. Chowdhury N, Saleque A, Sood NK, Singla LD. 2014. Induced neurocysticercosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) produces clinical signs and lesions similar to natural disease in man. *Scientific World Journal* 2014:248049.

8. 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.
9. Nash TE, Singh G, White AC, Rajshekhar V, Loeb JA, Proano JV, Takayanagui OM, Gonzalez AE, Butman JA, DeGiorgio C, Del Brutto OH, Delgado-Escueta A, Evans CA, Gilman RH, Martinez SM, Medina MT, Pretell EJ, Teale J, Garcia HH. 2006. Treatment of neurocysticercosis: current status and future research needs. *Neurology* 67:1120-1127
10. Nash TE, Garcia HH. 2011. Diagnosis and treatment of neurocysticercosis. *Nature reviews Neurology* 7:584-594.
11. Laclette JP, Shoemaker CB, Richter D, Arcos L, Pante N, Cohen C, Bing D, Nicholson-Weller A. 1992. Paramyosin inhibits complement C1. *The journal of Immunology* 148:124-128.
12. Restrepo BI, Alvarez JI, Castaño JA, Arias LF, Restrepo M, Trujillo J, Colegial CH, Teale JM. 2001. Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile. *Infect. Immun.* 69(7): 4554-60.
13. Sikasunge CS, Johansen MV, Phiri IK, Willingham AL, Leifsson PS. 2009. The immune response in *Taenia solium* neurocysticercosis in pigs is associated with astrogliosis, axonal degeneration and altered blood-brain barrier permeability. *Vet. Parasitology.* 160(3-4): 242-50.

14. Marzal M, Guerra-Giraldez C, Paredes A, Cangalaya C, Rivera A, Gonzalez AE, Mahanty S, Garcia HH, Nash TE. 2014. Evans blue staining reveals vascular leakage associated with focal areas of host-parasite interaction in brains of pigs infected with *Taenia solium*. PLOS One.9(6): e97321.
15. Guerra-Giraldez C, Marzal M, Cangalaya C, Balboa D, Orrego MÁ, Paredes A, Gonzales-Gustavson E, Arroyo G, García HH, González AE, Mahanty S, Nash TE. 2013. Disruption of the blood-brain barrier in pigs naturally infected with *Taenia solium*, untreated and after anthelmintic treatment. Exp. Parasitology. 134(4): 443-6.
16. 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.
17. Sáenz B, Fleury A, Chavarría A, Hernández M, Crispin JC, Vargas-Rojas MI, Fragoso G, Sciutto E. 2012. Neurocysticercosis: local and systemic immune-inflammatory features related to severity. Med. Microbiol. Immunol. 201: 73-80.
18. 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.
19. Takayanagui OM, Odashima NS. 2006. Clinical aspects of neurocysticercosis. ParasitolInt 55 Suppl:S111-5.
20. Carpio A, Romo M. 2014. The relationship between neurocysticercosis and epilepsy: an endless debate. Arq Neuropsiquiatr 72(5):383-390

21. Moyano LM, Saito M, Montano SM, Gonzalvez 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 cisticercosis-endemic región in Peru. *Plos Negl. Trop. Dis.* 8(2): e2692.
22. Fleury A, Carrillo-Mezo R, Flisser A, Sciutto E, Corona T. 2011. Subarachnoid basal neurocysticercosis: focus on the most severe form of the disease. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 9(1):123-133
23. Bickerstaff, E.R., Cloake, P.C.P., Hughes, B. and Smith, W.T.1952. The racemose form of cerebral cysticercosis. *Brain.* 75, 1-18.
24. Trelles, J.O., Roca, E. and Ravens, R. 1952. Estudios sobre neurocysticercosis. I. Sobre la fina estructura de la membrana vesicular quística y racemosa – Deducciones patológicas. *Rev. Neuro Psiquiatría.* 15, 1-35.
25. Das RR, Tekulve KJ, Agarwal A, Tormoehlen LM. 2012. Racemose Neurocysticercosis. *SeminNeurol* 32: 550-556.
26. Mahale R, Mehta A, Rangasetty S. 2015. Extraparenchymal (Racemose) Neurocysticercosis and Its Multitude Manifestations: A comprehensive Review. *J ClinNeurol:* 11e13.
27. Eisenhoffer GT, Kang H, Sanchez Alvarado A. 2008. Molecular analysis of stem cells and their descendents during cell turnover and regeneration in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Cell Stem Cell* 3(3): 327-339.

28. Gremigni V, Miceli C, Puccinelli I. 1980. On the role of germ cells in planarian regeneration I.A karyological investigation. *J EmbryolExpMorphol* 55:53-63.
29. Slack JM. 1980. The source of cells for regeneration. *Nature*. 286(5775):760.
30. Rossi L, Salvetti A, Batistoni R, Deri P, Gremigni V. 2008. Planarians, a tale of stem cells. *Cell Mol Life Sci*. 65:16-23.
31. Wagner DE, Wang IE, Reddien PW. 2011. Clonogenic neoblast are pluripotent adult stem cells that underlie planarian regeneration. *Science* 332(6031): 811-816.
32. Toledo A, Cruz C, Fragoso G, Laclette JP, Merchant T, Hernandez M, Sciutto E.1997. In vitro culture of Taenia crassiceps larval cells and cyst regeneration after injection into mice.*J Parasitol*. 83(2):189-193
33. Brehn K. 2010. Echinococcus multilocularis as an experimental model in stem cell research and molecular host-parasite interaction.*Parasitology* 137:537-555.
34. Spiliotis M, Tappe D, Sesterhenn L, Brehm, K.2004. Long term in vitro cultivation of Echinococcus multilocularis metacestodes under axenic conditions.*Parasitol. Res*. 92, 430-432.
35. Spiliotis M, Lechner S, Tappe D, Scheller C, Krohne G, Brehm K. 2008a. Transient transfection of Echinococcus multilocularis primary cells and complete in vitro regeneration of metacestode vesicles.*Int J Parasitol*. 38(8-9):1025-1039.

36. Spiliotis M, Brehm K. 2008b. Axenic in vitro cultivation of *Echinococcus multilocularis* metacestode vesicles and the generation of primary cell cultures. In: Host-Pathogen Interactions Steffen Rupp, Kai Sohn eds. Humana Press, Totowa, NJ. P: 245-262.
37. Yang N, Sheridan AM. 2014. Cell cycle. Encyclopedia of Toxicology (third edition) Vol 1: 753-758.
38. Guerrero-Preston R, Michailidi C, Marchionni L, Pickering CR, Frederick MJ, Myers JN, Yegnasubramanian S, Hadar T, Noordhuis MG, Zizkova V, Fertig E, Agrawal N, Westra W, Koch W, Califano J, Velculescu VE, Sidransky D. 2014. Key tumor suppressor genes inactivated by “greater promoter” methylation and somatic mutations in head and neck cancer. *Epigenetics* 9:7, 1031-1046.
39. Huang R, Gu F, Kirma N, Ruan J, Chen C, Wang H, Liao Y, Chang C, Yu M, Pilrose JM, Thompson IM, Huang H, Huang TH, Lai H, Nephew KP. 2013. Comprehensive methylome analysis of ovarian tumors reveals hedgehog signaling pathway regulators as prognostic DNA methylation biomarkers. *Epigenetics* 8:6, 624-634.
40. Qiang W, Zhao Y, Yang Q, Liu W, Guan H, Lv S, Ji M, Shi B, Hou P. 2014. ZIC1 is a putative tumor suppressor in thyroid cancer by modulating major signaling pathways and transcription factor FOXO3a. *J Clin Endocrinol Metab* 99(7): E1163-E1172.
41. Chen X, Lin Z, Xue M, Si J, Chen S. 2015. Zic1 promoter hypermethylation in plasma DNA is a potential biomarker for gastric cancer and intraepithelial neoplasia. *PLoS ONE* 10(7): e0133906.

42. Wang Y, Jiang J, Ma H, Han J, Sun Z, Liu Z, Xu Z. 2014. Role of ZIC1 methylation in hepatocellular carcinoma and its clinical significance. *Tumor Biology* 35(8): 7429-33.
43. Kandimalla R, van Tilborg AA, Kompier LC, Stumpel DJ, Stam RW, Bangma CH, Zwarthoff EC. 2012. Genome-wide analysis of CpG island methylation in bladder cancer identified TBX2, TBX3, GATA2, and ZIC4 as pTa-Specific prognostic markers. *European Urology* 61:1245-1256.
44. Vasquez-Doorman C, Petersen CP. 2014. zic-1 Expression in Planarian Neoblasts after Injury Controls Anterior Pole Regeneration. *PLoS Genet.*10(7):e1004452.
45. Vogg MC, Owlarn S, Perez Rico YA, Xie J, Suzuki Y, Gentile L, Wu W, Bartscherer K. 2014. Stem cell-dependent formation of a functional anterior regeneration pole in planarians requires Zic and Forkhead transcription factors. *Developmental Biology*390: 136-148.
46. Rossi L, Bonuccelli L, Iacopetti P, Evangelista M, Ghezzani C, Tana L, Salvetti A. 2014. Prohibitin 2 regulates cell proliferation and mitochondrial cristae morphogenesis in planarian stem cells. *Stem Cell Rev and Rep.* 10(6): 871-87.
47. Wang S, Nath N, Adlam M, Chellappan S. 1999. Prohibitin, a potential tumor suppressor, interacts with RB and regulates E2F function. *Oncogene* 18:3501-3510.
48. MA R, Zhang Y, Sun T, Cheng B. 2014. Epigenetic regulation by polycomb group complexes: focus on roles of CBX proteins. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)* 15(5): 412-428

49. Klauke K, Radulovic V, Broekhuis M, Weersing E, Zwart E, Olthof S, Ritsema M, Bruggeman S, Wu X, Helin K, Bystrykh L, de Haan G. 2013. Polycomb Cbx family members mediate the balance between haematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *NatCellBiol* 15(4): 353-562.
50. Federico A, Pallante P, Bianco M, Ferraro A, Esposito F, Monti M, Cozzolino M, Keller S, Fedele M, Leone V, Troncone G, Chiariotti L, Pucci P, Fusco A. 2009. Chromobox protein homologue 7 protein, with decreased expression in human carcinomas positively regulates E-cadherin expression by interacting with the histone deacetylase 2 protein. *Cancer Res* 69(17): 7079-7087.
51. Kakugawa S, Langton PF, Zebisch M, Howell S, Chang T, Liu Y, Feizi T, Bineva G, O'Reilly N, Snijders AP, Jones EY, Vincent JP. 2015. Notum deacylates Wnts to suppress signaling activity. *Nature* 519(7542): 187-192.
52. Torisu Y, Watanabe A, Nonaka A, Midorikawa Y, Makuuchi M, Shimamura T, Sugimura H, Niida A, Akiyama T, Iwanari H, Kodama T, Zeniya M, Aburatani H. 2008. Human homolog of notum, overexpressed in hepatocellular carcinoma, is regulated transcriptionally by β -catenin/TCF. *Cancer Sci* 99(6): 1139-1146.
53. Petersen CP, Reddien PW. 2011. Polarized activation of notum at wounds inhibits Wnt signaling to promote planarian head regeneration. *Science* 332(6031): 852-855.
54. Guo T, Peters A, Newmark PA. 2006. A Bruno-like gene is required for stem cell maintenance in planarians. *Developmental Cell* 11:159-169.

55. Rouhana L, Shibata N, Nishimura O, Agata K. 2010. Different requirements for conserved post-transcriptional regulators in planarian regeneration and stem cell maintenance. *Developmental Biology* 341: 429-443.
56. Poulgiannis G, Ichimura K, Hamoudi RA, Luo F, Leung SY, Yuen ST, Harrison DJ, Wyllie AH, Arends MJ. 2010. Prognostic relevance of DNA copy number changes in colorectal cancer. *Journal of Pathology* 220: 338-347.
57. Tran DD, Koch A, Tamura T. 2014. THOC5, a member of the mRNA export complex: a novel link between mRNA export machinery and signal transduction pathways in cell proliferation and differentiation. *Cell Communication and Signalling* 12:3.
58. Pitzonka L, Wang X, Ullas S, Wolff DW, Wang Y, Goodrich DW. 2013. The THO ribonucleoprotein complex is required for stem cell homeostasis in the adult mouse small intestine. *Molecular and Cellular Biology* 33(17): 3505-3514.
59. Griaud F, Pierce A, Sanchez MBG, Scott M, Abraham SA, Holyoake TL, Tran DDH, Tamura T, Whetton AD. 2012. A pathway from leukaemogenic oncogenes and stem cell chemokines to RNA processing via THOC5. *Leukemia* 27(4): 932-40.
60. Logan-Klumper FJ, De Silva N, Boehme U, Rogers MB, Velarde G, McQuillan JA, Carver T, Aslett M, Olsen C, Subramanian S, Phan I, Farris C, Mitra S, Ramasamy G, Wang H, Tivey A, Jackson A, Houston R, Parkhill J, Holden M, Harb OS, Brunk BP, Myler PJ, Roos D, Carrington M, Smith DF, Hertz-Fowler C, Berriman M. 2012. GeneDB an annotation data base for pathogens. *NucleicAcidsResearch* 40, databaseissue: 98-108.

61. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT) method. *Methods* 25(4): 402-8.
62. Bateman A, Bennett HPJ. 1998. Granulins: the structure and function of an emerging family of growth factors. *Journal of Endocrinology* 158: 145-151.
63. Orrego MA, Cangalaya C, Nash TE, Guerra-Giraldez C. 2014. Identification of Proliferating cells in *Taenia solium* cysts. *Rev Peru Med Exp. Salud. Pública* 31(4): 717-721.
64. Zink D, Fischer AH, Nickerson JA. 2004. Nuclear structure in cancer cells. *Nature Reviews Cancer* 4(9):677-87.
65. Broers JL, Raymond Y, Rot MK, Kuijpers H, Wagenaar SS, Ramaekers FC. 1993. Nuclear A-type lamins are differentially expressed in human lung cancer subtypes. *Am J Pathol.* 143 (1): 211-20.
66. Gustafsson MKS. 1990. The cells of a cestode. *Diphyllobothrium dendriticum* as a model in cell biology. *Acta Acad. Abo. Ser. B50*: 13-44
67. Reuter M, Kreshchenko N. 2004. Flatworm asexual multiplication implicates stem cells and regeneration. *Can. J. Zool.* 82, 334-356.
68. Koziol U, Castillo E. 2011. Cell proliferation and differentiation in cestodes. In: Estevez A. (Ed) *Research in helminths*. Transworld Research Network, Kerala, India, pp 121-138.
69. Peter R, Gschwentner R, Schürmann W, Rieger RM, Ladurner P. 2004. The significance of stem cells in free-living flatworms: one common source for all cells in the adult. *J. Appli. Biomed.* 2: 51-35.

70. Konrad C, Kroner A, Spiliotis M, Zavala-Gongora R, Brehm K. 2003. Identification and molecular characterization of a gene encoding a member of the insulin receptor family in *Echinococcus multilocularis*. *Int. J. Parasitol.* 33: 301-312.
71. Scholer HR, Balling R, Hatzopoulos AK, Suzuki N, Gruss P. 1989. Octamer binding proteins confer transcriptional activity in early mouse embryogenesis. *EMBO J.* 8: 2551-7.
72. Yeom YI, Ha HS, Balling R, Scholer HR, Artzt K. 1991. Structure, expression and chromosomal location of the Oct-4 gene. *Mech. Dev.* 35: 171-179.
73. Sharov AA, Masui S, Sharova LV, Piao Y, Aiba K, Matoba R, Xin L, Niwa H, Ko MSH. 2008. Identification of Pou5f1, Sox2 and Nanog downstream target genes with statistical confidence by applying a novel algorithm to time course microarray and genome-wide chromatin immunoprecipitation data. *BMC genomics* 9:269.
74. Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, Weinberg RA. 2008. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat. Genet.*40: 499-507.
75. Hu T, Liu S, Breiter DR, Wang F, Tang Y, Sun S. Octamer 4 small interfering RNA results in cancer stem cell-like cell apoptosis. *Cancer Res.* 68: 6533-40.
76. Lopes KAR, de Campos Velho NMR, Pacheco-Soares C. 2015. Method of isolation and characterization of *Girardia tigrina* stem cells. *Biomedical Reports* 3: 163-166.

77. Minelli A. 2016. The tapeworm's elusive antero-posterior polarity. *BMC Biology* 14:17.
78. Koziol U, Jarero F, Olson PD, Brehm K. 2016. Comparative analysis of Wnt expression identifies a highly conserved developmental transition in flatworms. *BMC Biology* 14:10.
79. Hou J Luo X, Shuai W, Yin C, Zhang S, Zhu X, Dou Y, Cai X. 2014. Sequence analysis and molecular characterization of Wnt4 gene in metacestodes of *Taenia solium*. *Korean J Parasitol.* 52 (2): 163-168.
80. Brehm K, Koziol U. 2017. Echinococcus-Host Interactions at Cellular and Molecular Levels. *Adv Parasitol* 95: 147-212.

XII. Anexo

Publicación realizada con resultados preliminares del presente estudio.