



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

LA INHIBICIÓN DE LA GAMMA
SECRETASA ALTERA LA EXPRESIÓN DE
GENES
DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN NOTCH
EN EL CISTICERCO DE *TAENIA SOLIUM*
Y REPRIME LA EVAGINACIÓN DEL
ESCÓLEX

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

JUAN BLUME LA TORRE

LIMA-PERÚ

2020

ASESORA:

Cristina Guerra Giraldez, PhD

JURADO DE TESIS:

Dr. Pablo Tsukayama Cisneros

Presidente

Dr. Daniel Clark Leza

Vocal

Mg. Carla Maria Gallo Lopez Aliaga

Secretario

Dedicatoria

Le dedico este trabajo a mi familia por todo su apoyo.

Agradecimientos

Le agradezco a mi familia por su apoyo incondicional en este camino y por ser un gran soporte.

Le agradezco a la Dra. Cristina Guerra por la oportunidad de formar parte de su equipo de laboratorio y por la retroalimentación y críticas constructivas que permitieron que pueda desarrollar los experimentos y la tesis con éxito.

Le agradezco a mis compañeros de laboratorio Renzo, Segundo, David, Valeria y Pamela, por el apoyo en los experimentos y por su amistad.

Le agradezco a mis amigos del colegio y amigos de la universidad por el ánimo que me dieron y dan para seguir avanzando y por los buenos momentos compartidos. Angela, Stefany y Luis gracias por el soporte brindado

Le agradezco al jurado de la tesis por sus críticas constructivas.

Financiamiento

Este trabajo se realizó con el apoyo del Fondo de entrenamiento NIH Fogarty: “Translational Research Development for Endemic Infectious Diseases of Amazonia”.

Grant number: 2D43TW007120-11A1



Índice:

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	1
INTRODUCCIÓN.....	1
ESTADO DEL ARTE	2
<i>Taenia solium</i> : Ciclo de vida e importancia en salud pública	2
Neurocisticercosis	3
Morfología y desarrollo de <i>T. solium</i>	4
<i>Células proliferativas en platelmintos</i>	6
<i>Modelos in vivo e in vitro</i>	7
Vía de señalización Notch	8
<i>Mecanismo “canónico” de la vía Notch</i>	10
<i>Gamma secretasa, sustratos e inhibidores</i>	11
<i>Comunicación célula-célula y formación de patrones</i>	12
Vía Notch en vertebrados e invertebrados	13
<i>Vía Notch en platelmintos</i>	15
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	17
MÉTODOS	18
Obtención, estabilización y selección de cisticercos de <i>T. solium</i>	18
Cultivo de cisticercos	19
<i>Soluciones y medio</i>	19
Condiciones de cultivo	20
Selección de genes y diseño de primers	20
Medición de la expresión relativa	21
<i>Extracción de ARN</i>	21
<i>Tratamiento con DNAsa I</i>	22
<i>Transcripción reversa</i>	22
<i>RT-qPCR</i>	22
<i>Eficiencia de la qPCR</i>	23
<i>Estabilidad de los genes de referencia</i>	23

Pruebas estadísticas	23
Aspectos éticos	23
RESULTADOS	24
DAPT inhibió la evaginación <i>in vitro</i> de <i>T. solium</i>	24
El ácido taurocólico al 0.1% y la tripsina al 0.1% indujeron la evaginación <i>in vitro</i> de los cisticercos...	25
DAPT afectó la expresión de genes Notch a nivel de transcritos	26
El ácido taurocólico indujo la expresión de genes Notch tras 24 horas	29
El tratamiento con DAPT no afecta la viabilidad de los cisticercos	30
DISCUSIÓN	31
El inhibidor DAPT impidió parcial o totalmente la evaginación de <i>T. solium</i>	31
El inhibidor afectó la expresión de genes relacionados con la vía Notch	32
La evaginación fue inducida con ácido taurocólico y tripsina	34
La expresión de genes <i>hes</i> podría estar asociada a eventos de desarrollo.....	35
No existe un modelo de maduración <i>in vitro</i> de <i>T. solium</i>	35
LIMITACIONES	36
DIRECCIÓN A FUTURO	37
CONCLUSIONES.....	39
BIBLIOGRAFÍA.....	40
ANEXOS.....	.

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Elementos de la vía de señalización Notch	9
Tabla 2. Reacción de RT-qPCR	22
Tabla 3. Porcentaje de evaginación luego de 48 y 120 horas	24
Tabla A1. Genes de <i>T. solium</i> homólogos a genes de <i>H. microstoma</i>	
Tabla A2. Primers diseñados para genes de <i>T. solium</i>	
Tabla A3. Eficiencia de qPCR por gen de interés y de referencia	
Tabla A4. Cuantificación de ARN total del Experimento 1	
Tabla A5. Cuantificación de ARN total del Experimento 2	
Tabla A6. Análisis por BestKeeper	
Tabla A7. Comparación de Δ Ct entre genes de referencia candidatos	
Figura 1. Ciclo de vida de <i>T. solium</i>	3
Figura 2. Filogenia actual de los cestodos	5
Figura 3. Vía de señalización Notch esquematizada	11
Figura 4. Procesos de inducción e inhibición lateral	13
Figura 5. Diseño de cultivo de cisticercos	18
Figura 6. Cisticercos tras 120 horas de cultivo bajo distintas condiciones	25
Figura 7. Cisticercos evaginados tras 120 h de cultivo en distintas condiciones	25
Figura 8. Registro diario de cisticercos que evaginaron el escólex	26
Figura 9. Expresión de los receptores <i>notch1</i> y <i>notch2</i>	27
Figura 10. Expresión de los receptores <i>delta1</i>	27
Figura 11. Expresión de los componentes de la gamma secretasa	28
Figura 12. Expresión del gen <i>sno</i>	28
Figura 13. Expresión de un gen de respuesta a la vía Notch, <i>hes2</i>	29
Figura 14. Expresión de la histona <i>h2b1</i>	29
Figura 15. Expresión de <i>notch1</i> y <i>hes2</i> tras inducción con ácido taurocólico	30
Figura 16. Longitud de gusanos evaginados tras tratamiento con DMSO y DAPT	30
Figura A1. Dominios conservados en proteínas Notch identificadas en <i>T. solium</i>	
Figura A2. Curvas de eficiencia en qPCR	
Figura A3. Gel de agarosa en TBE 1X para visualizar ARN total de <i>T. solium</i>	
Figura A4. Valores de Ct de los candidatos a genes de referencia	
Figura A5. Análisis por NormFinder	
Figura A6. Método comparativo de Δ Ct	
Figura A7. Análisis por geNorm	

Resumen

El cestodo *Taenia solium*, que causa la neurocisticercosis, infecta al ser humano como gusano plano intestinal o como larva cisticerco en tejido blandos como el cerebro. El estadio larval está invaginado y subdesarrollado en una vesícula de 10 a 15 mm, que puede encontrarse en carne de cerdo. Luego de que el humano consume el cisticerco, los jugos gástricos estimulan la evaginación de la “cabeza” o escólex, lo que da inicio a la metamorfosis hacia forma adulta. El gusano adulto puede llegar a medir 3 metros, formando cientos de proglótides. Estas maduran sexualmente y producen huevos que son eliminados en las heces y pueden contaminar la comida y agua. Cuando cerdos o humanos consumen estos huevos, permiten el desarrollo de larvas, cerrándose el ciclo vital del parásito.

La vía de señalización Notch está involucrada en procesos de desarrollo como la formación de patrones, la madurez sexual, el desarrollo neuronal. Dado que esta vía participa en la formación de patrones corporales y segmentación del cestodo *Hymenolepis microstoma*, se evaluó si la vía tiene un papel en la evaginación de *T. solium*. Grupos de cisticercos fueron cultivados en presencia de ácido taurocólico (AT), como un inductor de la evaginación, o DAPT, un inhibidor de la gamma secretasa, e indirectamente, de la vía de señalización. Después de 5 días, el 92% de los cisticercos tratados con ácido taurocólico habían evaginado el escólex; los gusanos inducidos mostraron mayor expresión del receptor *notch1*, medido por RT-qPCR. En otro experimento en el que se usó DAPT, este inhibió la evaginación del 93% de los cisticercos luego de 5 días en cultivo. La expresión de *notch1* mostró una tendencia a disminuir en presencia del inhibidor; mientras que la de *hes2*, un gen de respuesta a la vía, aumentó.

El inhibidor de gamma secretasa evitó la evaginación in vitro y alteró la expresión de genes de la vía de señalización Notch. Estos resultados sirven de base para buscar blancos útiles para prevenir el desarrollo de *T. solium* hacia su estado de madurez sexual, que es el diseminativo.

Palabras clave: *Taenia solium*, evaginación, vía de señalización Notch, DAPT

Abstract

The cestode *Taenia solium*, the causative agent of neurocysticercosis, can be an intestinal flatworm or a larval cyst that lodges in soft tissues like the brain. The cyst stage is an invaginated, underdeveloped worm inside a 10-15 mm vesicle. If a person ingests a cyst, present in infected pork meat, gastric juices stimulate the evagination of the “head” or scolex, initiating the metamorphoses into the adult form. The worm can grow up to 3 meters, forming proglottids. These mature sexually and produce eggs that are expelled in feces and can contaminate water sources and food. Eggs ingested by pigs or humans develop as cysts, closing the life cycle of the parasite.

The Notch pathway is involved in developmental processes such as tissue patterning, sexual maturation, and neural development. Since Notch genes participate in the body patterning and segmentation of the cestode *Hymenolepis microstoma*, we tested if this pathway had a role in the evagination of *T. solium*, as an initial and determining event in development. Groups of cysts were cultured in the presence of taurocholic acid (TA), to induce evagination, or DAPT, to inhibit the gamma secretase and indirectly Notch signaling. After five days, 92% of the cysts treated with TA had evaginated the scolex; the induced juvenile worms showed increased expression of the *notch1* receptor, measured by RT-qPCR. Conversely, 93% of the cysts treated with DAPT for five days failed to evaginate the scolex. Cysts cultivated in the inhibitor's presence had reduced mRNA level of *notch1* and increased mRNA level of the target gene *hes2*.

The gamma secretase inhibitor prevented in vitro evagination and changed the expression of genes from the Notch pathway. These results encourage the search for targets to arrest the development and sexual maturation of *T. solium* into the disseminative stage of the parasite.

Keywords: *Taenia solium*, evagination, Notch signaling pathway, DAPT

INTRODUCCIÓN

Taenia solium es un cestodo que posee un ciclo de vida complejo en el que parasita humanos y cerdos. En humanos se puede desarrollar el estadio adulto del parásito, un gusano intestinal, y en humanos y cerdos se desarrolla el estadio intermedio del parásito, una larva que se puede albergar como quiste en tejidos blandos (1,2). La biología del desarrollo de los cestodos se ha empezado a describir en *Hymenolepis microstoma* y *Echinococcus granulosus*; vías de señalización como Notch, Wnt y Hedgehog han sido estudiadas en especies de esta clase (3–5). La revelación de eventos esenciales para el establecimiento de *T. solium* en el intestino humano puede abrir posibilidades en la búsqueda de fármacos que prevengan el desarrollo del parásito adulto en el hospedero.

Las vías Notch, Wnt y Hedgehog, presentes en animales de distintos filos taxonómicos, participan en procesos evolutivamente conservados relacionados al desarrollo, como en el establecimiento del eje anteroposterior, la formación de segmentos (divisiones del ectodermo y mesodermo en artrópodos, anélidos y cordados) (6,7); en la reproducción sexual (oogénesis) (8) y asexual (gemación) (9); en el mantenimiento de poblaciones de células madre; y en el desarrollo neural (7).

Para el estudio de cestodos como *Echinococcus* y, más recientemente, *Hymenolepis*, se han utilizado herramientas como la secuenciación de ARN (RNA-seq) y la hibridación *in situ* de ARN. Estas técnicas han permitido describir la expresión diferencial de varios genes y cambios en la localización donde estos se expresan (3,10–12). Los genes de la vía Notch aparentan estar involucrados en varios procesos como la estrobilación (o segmentación), en el desarrollo de los sistemas nervioso y reproductivo, y en la embriogénesis de estos cestodos modelo (4). Es importante recalcar que estos reportes son escasos.

Con base en la cercanía filogenética, en el trabajo se hipotetizó que la expresión de genes de la vía Notch homólogos a los descritos en *H. microstoma* juega un papel importante en el desarrollo de *T. solium*

Dado que la vía Notch participa en varios procesos de desarrollo en especies de otros filos y en cestodos, es razonable postular que la expresión de los genes de esta vía esté involucrada en los procesos de estrobilación, mantenimiento de células proliferativas, desarrollo de ovarios, embriogénesis y mantenimiento del tejido muscular en *T. solium*.

ESTADO DEL ARTE

***Taenia solium*: Ciclo de vida e importancia en salud pública**

T. solium es un gusano plano (platelminto) que posee un ciclo de vida complejo, con humanos como hospederos primarios y cerdos como hospederos secundarios (Figura 1) (1,2,13,14). En el humano, puede causar una enfermedad denominada teniasis, la cual consiste en la infección con el estadio reproductivo o diseminativo del parásito, que es un gusano adulto instalado en el intestino delgado. Los segmentos o proglótides del gusano, que contienen cientos de miles de huevecillos microscópicos, son eliminados en las heces. En el cerdo y en el humano, ingerir huevos del parásito (contaminación vía fecal-oral) genera la cisticercosis, que involucra el desarrollo de la larva hacia la formación de un cisticerco. Los huevos ingeridos eclosionan y liberan oncósferas (también denominadas embriones o larvas hexacantos), que se adhieren a la pared del intestino, la atraviesan, y se distribuyen por vía sanguínea a los tejidos blandos. En los tejidos blandos, la oncósfera desarrolla una cavidad llena de fluido, formando una vesícula llamada cisticerco. En la pared interna de la vesícula se desarrolla un engrosamiento del tejido a partir del cual se forma el escólex (1,15).

En ambos hospederos, los cisticercos se pueden alojar en distintas localizaciones, según sean transportados por el torrente sanguíneo. Puede haber quistes subcutáneos, en tejido muscular, en los ojos, el corazón y el cerebro. Cuando ocurre esto último la enfermedad se denomina neurocisticercosis (1,2,13,14). El consumo humano de carne de cerdo mal cocida infectada con cisticercos resulta en teniasis cuando la larva da lugar al gusano adulto o tenia.

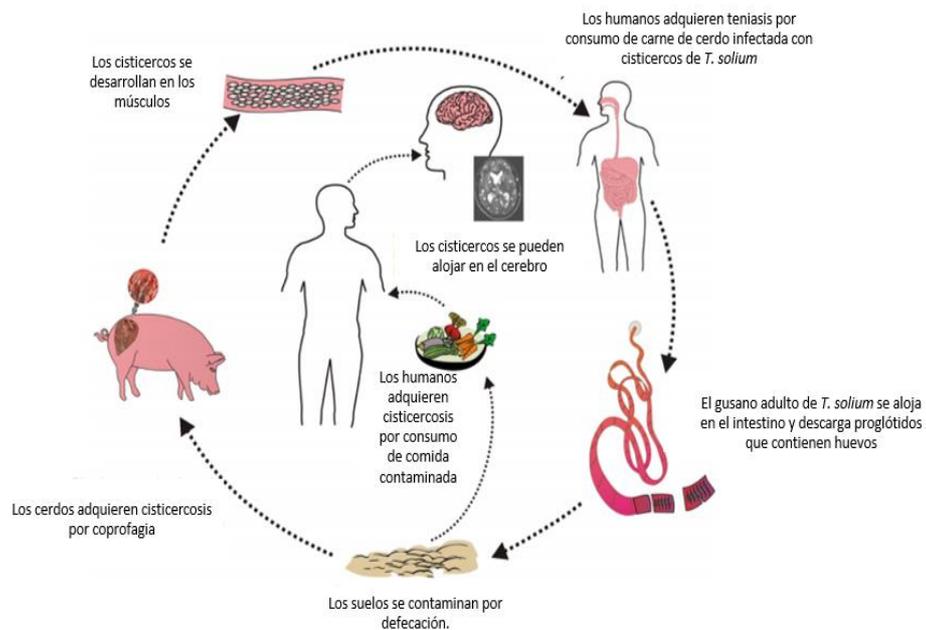


Figura 1. Ciclo de vida de *T. solium*. Adaptada de Singhi P & Gahlot A, 2016 (16).

La infección cerebral con cisticercos de *T. solium* es clasificada por la OMS como una de las enfermedades tropicales desatendidas ([WHO: Taeniasis/cysticercosis](#)); su prevención y su erradicación son posibles, pero dependen de medidas y políticas de sanidad y educación. En consecuencia, la enfermedad es endémica en las regiones menos desarrolladas de América Latina, Asia y África, y también es detectada en países desarrollados, por la creciente inmigración desde países en donde la enfermedad es endémica (1,2,13,14). La prevalencia de la infección por *T. solium* depende de la región; por ejemplo, la prevalencia de teniasis en las zonas rurales de África varía entre 2% y 10%, en Perú entre 24% y 37% y en India entre 6.5% y 28%. Con respecto a la prevalencia de infección con neurocisticercosis se encontró que en zonas endémicas de Perú y Honduras el 10-20% de la población mostró lesiones residuales en el cerebro (16). La información de la OMS, actualizada a diciembre 2018, clasifica al Perú como “país endémico” ([Global Health Observatory data repository](#)).

Neurocisticercosis

La neurocisticercosis se manifiesta con diferentes cuadros neurológicos y es una de las causas más frecuentes de epilepsia en los países menos desarrollados (1,2,13,14). Además, puede generar hipertensión intracraneal, hidrocefalia, deficiencias motoras e infartos (síntomas asociados con quistes subaracnoideos) (1,2,13,14). La diversidad de presentaciones depende de la ubicación de los quistes, su estado de viabilidad, y en gran parte, la inmunidad del individuo afectado (17). Por otro lado, no existe “gold standard” para el diagnóstico; es necesario combinar evidencia de datos clínicos, pruebas serológicas

y observación de imágenes del cerebro como tomografía computarizada y resonancia magnética (18,19).

El tratamiento de teniasis y cisticercosis se realiza con dos antihelmínticos, albendazol y praziquantel. El antihelmíntico de uso veterinario oxfendazol se está considerando también para uso clínico (20).

El uso de los antihelmínticos, cuya eficacia varía (21), debe ser monitoreado y requiere acompañarse con antiinflamatorios, generalmente corticosteroides como dexametasona, dado que su uso puede agravar algunos signos neurológicos por la inflamación ocasionada por la degeneración del parásito. Si los cisticercos están alojados en el espacio subaracnoideo, se debe recurrir a intervenciones quirúrgicas como la escisión neuroendoscópica (2,22).

El tratamiento de la neurocisticercosis puede ser por muchos años y debe adecuarse al paciente y sus síntomas. Esto es particularmente importante dado que en algunos casos, luego del tratamiento, los pacientes recaen después de una aparente resolución de la inflamación tras observación por neuroimágenes (22).

Morfología y desarrollo de *T. solium*

Todos los platelmintos son gusanos planos de simetría bilateral, no segmentados, acelomados, sin órganos circulatorios ni respiratorios y con una sola cavidad digestiva. Estudios filogenéticos de la década pasada han hecho obsoleta la clasificación tradicional que subdividía al filo Platelminthos en turbelarios, trematodos, monogeneos y cestodos. Actualmente, la clase Cestoda pertenece al grupo monofilético Rhabditophora, el cual incluye formas de vida libre, como las planarias (orden Tricladida), y parásitas. Los cestodos son parte del clado Neodermata, formado por parásitos; en este clado también se encuentra la clase Trematoda, a cuyo subgrupo Digenea pertenecen *Schistosoma* y *Fasciola* (Figura 2) (23,24).

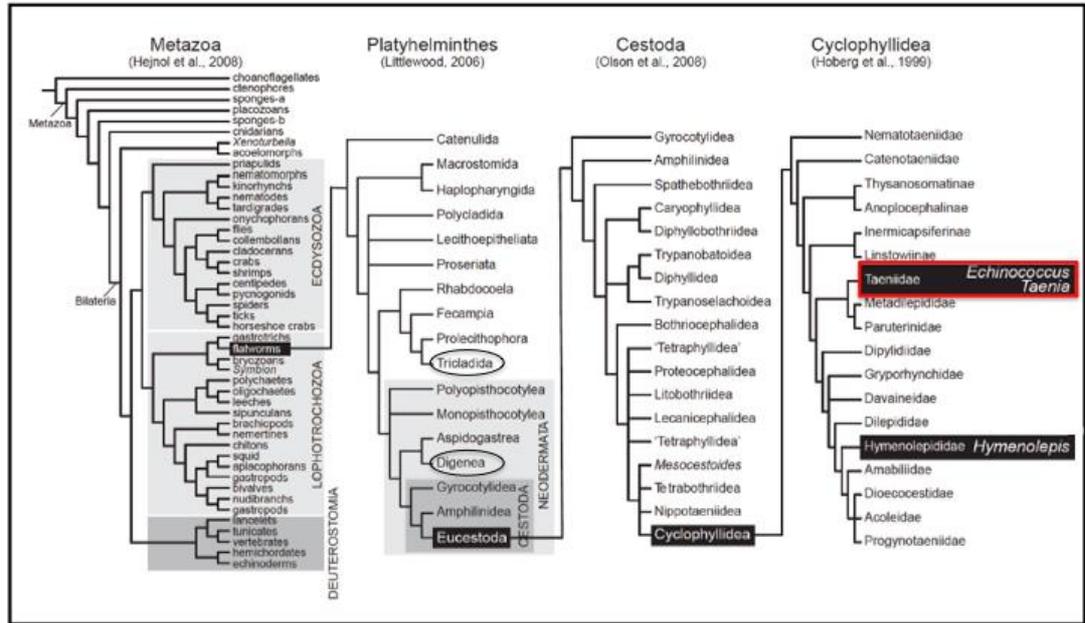


Figura 2. Filogenia actual de los cestodos. Se resaltan otros grupos taxonómicos citados. Adaptado de Jarero, 2018 (4).

El estadio adulto de *T. solium* es un gusano plano que posee, en lugar de cabeza, un órgano de 1 mm de diámetro llamado escólex, en cuya parte anterior o rostelo hay ganchos y botrios (órganos succionadores); un cuello que es la zona germinativa, y un cuerpo o estróbilo formado por cientos de proglótides en sucesión. Es un parásito hermafrodita; cada proglótide tiene sistemas reproductivos masculinos y femeninos. Las proglótides maduras contienen los huevos, producto de autofecundación (1,15). Cestodos de diferentes especies tienen características similares, aunque presentan diferencias morfológicas; por ejemplo, a diferencia de *T. solium*, *Hymenolepis diminuta* no posee ganchos en su escólex y en el estadio adulto puede medir alrededor de medio metro, mientras que *T. solium* mide entre 2 y 3 metros.

El cisticerco de *T. solium* puede medir de 5 a 15 mm de diámetro. Estas larvas, enquistadas en carne de cerdo, se activan en el intestino humano, cuando entran en contacto con las sales biliares, entre las que está el ácido taurocólico. El proceso incluye la evaginación del escólex, el cual se adhiere a la pared del intestino con sus ganchos y ventosas. En cuanto el parásito evagina y se adhiere a la pared intestinal, empieza la estrobilación. Los nervios y tejido muscular transversal se desarrollan, delimitando las proglótides (1,13,15).

La estructura de los tejidos de cestodos como *H. diminuta*, trematodos como *Schistosoma mansoni* y planarias como *Schmidtea mediterranea* se ha observado utilizando varios marcadores celulares. Los músculos se han visualizado usando faloidina; el sistema nervioso, con anticuerpos anti-sinapsina y anti-tubulina acetilada (25–27). Sin embargo,

aún no se ha logrado realizar una tinción de parásito completo en *T. solium* dado su tamaño. Por otro lado, la tinción del escólex y el cuello es posible y aún se encuentra en estandarización en el laboratorio de proliferación celular y regeneración (LID 218, Facultad de Ciencias y Filosofía de la UPCH).

Células proliferativas en platelmintos

Las planarias, platelmintos de vida libre con grandes capacidades de regeneración, son un modelo animal de laboratorio ampliamente utilizado (28,29). Estos organismos tienen una población de células proliferativas llamadas neoblastos. Dentro de esta población de células hay subpoblaciones compuestas de células madre, que son células que tienen el potencial de dividirse y diferenciarse en todos los tipos de células que se encuentran en un organismo. Estas células han sido abundantemente descritas y caracterizadas en planarias, por ejemplo, en *S. mediterránea* (30,31).

Diferentes experimentos muestran que los neoblastos otorgan a las planarias la capacidad regenerativa que las caracteriza; se hacen experimentos en los que se trasplantan secciones de planarias sin irradiar a planarias irradiadas con rayos gamma, para demostrar que se puede recuperar la capacidad regenerativa de estas tras la amputación o daño de alguna sección (32). Posteriormente, se han descrito subclases de neoblastos, denominados sigma, zeta y gamma, donde el subtipo sigma es pluripotente, zeta se puede diferenciar en epidermis y gamma en varios tipos de tejido; además se ha establecido que los neoblastos expresan genes piwi (33,34). En los últimos años, con acceso a técnicas de secuenciación de ARN, se han definido las poblaciones de células de acuerdo a los genes que expresan. Entre ellas, las células que además expresan tetraspanina corresponden a un subtipo de células que al ser trasplantadas pueden estimular la regeneración total de una planaria irradiada (30).

Algunos cestodos con los que se han hecho observaciones *in vitro* son *Mesocestoides*, *Echinococcus* e *Hymenolepis*. En *M. corti* se observaron células proliferativas en el cuello y escólex del gusano (35). Además, tras inducir la evaginación, se observó que las células se acumulan periódicamente en las proglótides (36). En *E. multilocularis* y *E. granulosus* se demostró la presencia de células proliferativas, sobre todo en la cápsula del estadio larval y en el protoescólex (37). Las células proliferativas se han aislado de la capa germinal de ambos cestodos, y tras mantenerlas como cultivos primarios se han establecido líneas celulares (37–40). En *H. diminuta* se demostró la presencia de células en división marcadas con el análogo de timidina F-ara-Edu en el cuello del gusano (12).

Nuestro grupo de investigación identificó células proliferativas casi exclusivamente en la base del escólex del cisticerco de *T. solium*, y describió su aumento en el cuello luego de la evaginación *in vitro*; esto se realizó utilizando marcaje con bromodesoxiuridina (BrdU), un

análogo de la timidina (41). Además, detectamos células proliferativas en la pared vesicular del cisticerco subaracnoideo “racemoso” (42), una forma aberrante hiperproliferativa, de metabolismo aparentemente más activo, que causa la forma más grave de neurocisticercosis (43,44).

Modelos in vivo e in vitro

El trabajo experimental con platelmintos parásitos es más complejo porque precisa modelos *in vitro* que abarquen su ciclo de vida completo, y que sea independiente de la presencia del hospedero o que este pueda mantenerse en el laboratorio. *H. diminuta* y *H. microstoma* son considerados modelos para todas las cestodiasis, y su ciclo de vida completo se reproduce experimentalmente; los parásitos que alcanzan el estadio adulto generan huevecillos funcionales (12,45). La forma adulta de *M. corti* puede mantenerse en su hospedero roedor y la larva llega a segmentar *in vitro*, por lo que también se usa frecuentemente para estudiar el desarrollo en cestodos (46–49).

Se han infectado ratones y hamsters con huevecillos o cisticercos del género *Taenia* y estos se han podido desarrollar hasta formar metacestodos o gusanos segmentados, respectivamente (50,51). Se han cultivado huevecillos *in vitro* para estudiar su desarrollo, y se ha alcanzado hasta un estadio postoncosferal; en *T. saginata* a partir de huevecillos se obtuvieron metacestodos infecciosos, con escólex y cuello (52). Sin embargo, a diferencia de *Hymenolepis*, en *T. solium* no se han podido desarrollar gusanos adultos luego de la evaginación.

El cultivo de larvas se ha usado para diferentes objetivos (estudios de transcriptómica, proteómica e inmunológicos) en *T. crassiceps*, *T. solium*, *H. microstoma*, *H. diminuta*, *M. corti* y *E. granulosus* (3,12,53,54), y en el caso de *E. multilocularis* se ha generado una línea celular a partir de las células proliferativas indiferenciadas similares a los neoblastos de las planarias (37).

La evaginación y la estrobilación de los cestodos pueden inducirse *in vitro*; algunos de los compuestos utilizados para la inducción son la bilis o el ácido taurocólico (una sal biliar), y la tripsina, proteasa naturalmente presente en el intestino (55–59). Además de los compuestos mencionados, las hormonas progesterona y gonadotropina coriónica también pueden inducir la evaginación y desarrollo de *T. solium* (60,61).

Vía de señalización Notch

Los morfógenos son moléculas que producen señales dentro de un tejido que lo llevan a diferenciarse y a generar patrones morfológicos. Entre los morfógenos más estudiados están los de las vías Notch, Hedgehog, Wnt y los productos de genes *Hox*.

La vía de señalización Notch está altamente conservada en el reino animal, y participa en proliferación y controlando diversos eventos de diferenciación (o “programación”) celular a nivel transcripcional, durante el desarrollo embrionario y en organismos adultos (7,62–65). La vía se descubrió por trabajos en *Drosophila* y *C. elegans*, pero su papel en la formación y expansión de tumores ha hecho que se investigue mucho más en este contexto (66), incluso considerándola como blanco terapéutico (67,68).

La vía de señalización Notch es una ruta pleiotrópica y sus efectos dependen mucho del tejido en el que se activa (64). Por otro lado, sus funciones en cuanto a la formación de patrones pueden variar incluso dentro de animales del mismo filo; por ejemplo, la vía puede estar asociada o no a eventos de formación de segmentos (7).

Los elementos identificados en diferentes filos (mamíferos, nemátodos y platelmintos) se listan en la Tabla 1. Entre las diferencias conocidas, por ejemplo, está que en *H. sapiens* el receptor Notch tiene 4 homólogos, a comparación de los dos receptores del platelminto *H. microstoma*; en este, además, no se ha identificado un gen homólogo al del activador Mastermind. A pesar de las diferencias, el mecanismo canónico de la vía de señalización se mantiene.

Tabla 1. Elementos de la vía de señalización Notch en especies de distintos filos (4,69,70).

	<i>Homo sapiens</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Hymenolepis microstoma</i>
Ligandos DSL (Delta/Serrate/Lag-2)	Delta like (DLL): DLL1, DLL3, DLL4	lag-2, apx-1, arg-1, dsl-1	Delta1 a Delta6
	Jagged1, Jagged 2		Serrate
Receptores	Notch1 a Notch4	Lin-12, Glp-1	Notch1, Notch2
Proteasa (Gamma secretasa)	Presenilin 1, Presenilin 2	Sel12, Hop1	Presenilin
	Presenilin enhancer 2 (Pen-2)	Pen-2	Pen-2
	Anterior Pharynx defective 1: Aph1A y Aph1B	Aph-1	Aph-1
	Nicastrin	Aph-2	Nicastrin
Metaloproteasas	ADAM10	Sup-17	Kuzbanian
	Tace, ADAM17	Adm4	Tace
Moduladores	O-fucosyltransferase 1 (Ofut)	Pofut-1	Ofut
	Sanpodo (Spdo)	----	Spdo
	Numb, NumbL	Numb-1a, Numb-1b	Numb
	Notchless1 (Nle-1)	Nle	Nle
Factor de transcripción CSL (CBF1/Su(H)/Lag-1)	RBPJ, RBPSUHL	Lag-1	Su(H)
Complejo activador	Mastermind like transcriptional coactivator (MAML): MAML1-MAML3	Sel-8	-----
Complejo represor	Strawberry Notch (Sno)	Let-765	Sno
	SMARTER (SMRT)	----	SMRT
	Hairless	----	----
	Groucho	Unc-37	Groucho
Genes de respuesta a Notch (efectores)	Hairy enhancer of split (Hes, bHLH transcription factor): Hes1,Hes5. Hes related family with YRPW motif like (Hey): HeyL, Hey1, Hey2.	Lin-22, Ref-1, hlh- 25, hlh-26, hlh-27, hlh-28, hlh-29	Hes1, Hes2, Hes3
	PTRCRa (pre T cell antigen receptor alpha)	----	----

Mecanismo “canónico” de la vía Notch

La vía se activa por el contacto célula-célula cuando ligandos de tipo Delta, Jagged o Serrate (Lag en *C. elegans*), que son proteínas transmembrana, interactúan con el receptor transmembrana Notch (Figura 3 ①). La activación del receptor resulta en una serie de proteólisis mediadas por una metaloproteasa denominada “A Disintegrin and metalloproteinase” (ADAM), que corta la región extracelular del receptor (Figura 3 ②), y por la gamma secretasa (GS), que corta la sección intracelular del receptor cerca de la región transmembrana, lo que libera el dominio intracelular del receptor (NICD – Notch Intracellular Domain) (Figura 3 ③). Luego de que NICD es translocado al núcleo, su interacción con complejos de proteínas activa la expresión de genes. Los complejos de proteínas nucleares con los que interactúa NICD comprenden un complejo transcripcional (color naranja en la Figura 3) llamado CSL (por los nombres específicos en mamíferos, *Drosophila* y *C. elegans* que se ven en la Tabla 1) y un complejo activador (color verde) que incluye remodeladores de cromatina. En ausencia de NICD, CSL está unido a un complejo represor (en azul en la figura) (Figura 3 ④). Cuando NICD se trasloca al núcleo, compite con el complejo represor, el cual se disocia de CSL. Con la adición del complejo activador, se activa la expresión de genes “efectores Notch”, principalmente la familia de represores transcripcionales Hes (*Hairy/Enhancer of split proteins*) (Figura 3 ⑤⑥) De esta forma, la vía puede actuar en la represión de eventos, lo cual depende de varios factores: genes blanco, tejido, y momento o estadio en el cual se activa el receptor (62,64). Además de las proteínas mencionadas, Strawberry Notch (gen *sno*), otra proteína no muy estudiada, parece involucrada en la modulación de la vía dado que interactúa con Su(H), parte del complejo CSL (62,71). Los estudios funcionales sobre la vía Notch utilizan inhibidores de gamma secretasa (IGS) (8,9,72–76), ARN de interferencia (72,77) y organismos con mutaciones en los genes de interés (73,75).

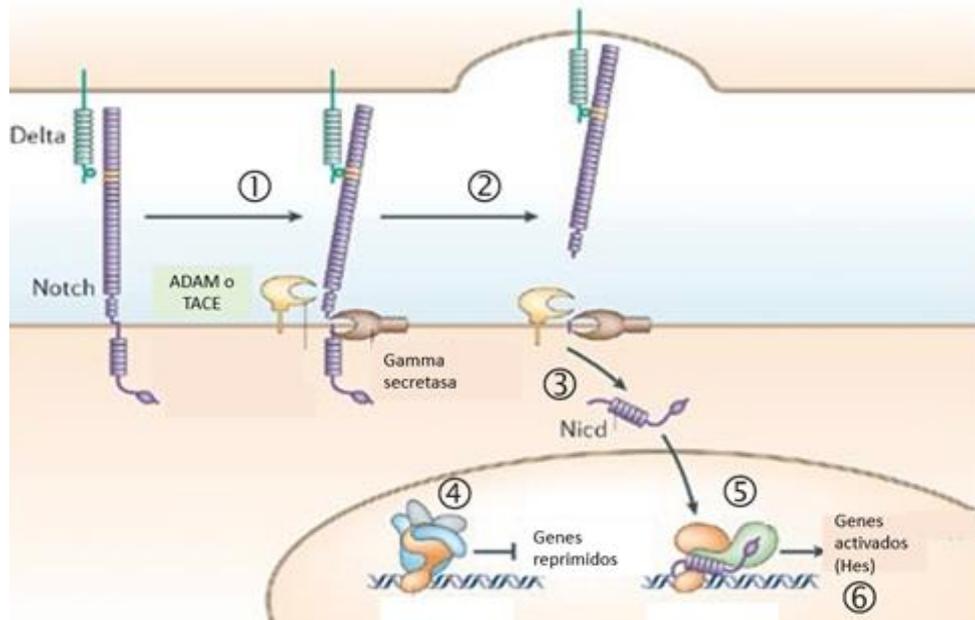


Figura 3. Vía de señalización Notch esquematizada. Imagen modificada de Bray et al, 2006 (62).

Gamma secretasa, sustratos e inhibidores

La particularidad de la vía es que su activación, luego de la unión del ligando, implica que el receptor sea procesado por la GS y se genere un factor nuclear, el fragmento NICD. La GS es un heterotetrámero de cuatro proteínas transmembrana, entre las cuales la presenilina tiene el sitio activo. El mecanismo de activación de la enzima requiere que Pen-2 (Presenilin enhancer) procese la presenilina en dos fragmentos, cada uno con uno de los dos aspartatos que forman el sitio activo. Los otros dos componentes son la nicastrina, que modula el acceso de los sustratos dependiendo del tamaño de sus dominios, y Aph (Anterior pharynx defective), de papel no definido aún (78,79).

La GS funciona como una proteasa intramembrana que, además de proteolisar el dominio intracelular del receptor Notch, tiene otras proteínas blanco, incluidas la proteína precursora beta amiloide (APP) y la N-cadherina, y más de 100 otros sustratos menos caracterizados. Esta diversidad de blancos se debe a que no reconoce una secuencia definida de aminoácidos (80,81). En humanos y otros mamíferos, el funcionamiento de la GS es complejo porque existen dos homólogos de presenilina y dos de Aph, lo que lleva a que se ensamblen cuatro complejos de distinta localización o afinidad por el sustrato. Por ejemplo, la N-cadherina solo es proteolisada por la presenilina 1, mientras que APP puede ser proteolisada por presenilina 1 y 2 (79,80).

Los IGS son del tipo no competitivo. El mecanismo de inhibición involucra la estabilización de un complejo cerrado (tenso). El más empleado, DAPT (N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina t-butil ester), es una molécula hidrófoba que se

internaliza en la membrana y reduce la flexibilidad de la presenilina, interfiriendo con su interacción con la región transmembrana del receptor. Otros IGS son análogos al estado de transición de la enzima y funcionan a concentraciones menores (78,79).

Por la diversidad de sustratos de la GS, su inactivación suele tener un efecto sobre varios procesos biológicos. Esto ha dificultado el uso de IGS como inhibidores terapéuticos, por ejemplo contra el corte de APP y la acumulación de beta amiloide en la enfermedad de Alzheimer, porque los candidatos generan efectos colaterales al desequilibrar la vía Notch, y con ello la proliferación y la diferenciación de varios tipos celulares (67,82). Además, la producción de beta amiloide se puede ver favorecida a menos que la dosis de DAPT sea alta; para inhibir el corte de APP se requiere mayor concentración de DAPT que la que inhibe el corte de los receptores Notch. Los potenciales efectos secundarios están relacionados a toxicidad gastrointestinal y defecto en el desarrollo de células T (79,83). A pesar de ello, el uso de DAPT no se ha descartado para el tratamiento de tipos de cánceres que sí están relacionados a mutaciones en la vía Notch (84,85).

Además de DAPT, se están probando inhibidores como MRK-560, que tiene mayor selectividad por presenilina 1. Estos inhibidores favorecieron la supervivencia de ratones con implantes de tejido de pacientes con leucemia linfoblástica de células T (con corte mutante, oncogénico, de Notch) sin generar daños asociados a la inhibición generalizada de GS (86).

Comunicación célula-célula y formación de patrones

La vía de señalización Notch participa en una amplia variedad de eventos de diferenciación celular y se inicia con un contacto célula-célula. El mecanismo descrito arriba puede resultar en activación o inhibición lateral (Figura 4) (63,87). Por ejemplo, cuando una célula que expresa el ligando Delta interactúa con una célula que expresa el receptor Notch, se expresan en esta última genes *hes* y se reprime la expresión de genes proneurales (88). Estos eventos en la neurogénesis se describen especialmente en vertebrados (89) e insectos (90).

Las proteínas de la familia Hes son factores de transcripción represores que tienen un dominio bHLH (basic-helix-loop-helix) con el que interactúan con el ADN (sobre elementos "N box": CACNAG) y con otros represores HLH con los que forman homodímeros o heterodímeros; un dominio "Orange", que regula la selección de proteínas con las que forman heterodímeros, y generalmente un patrón de cuatro aminoácidos en el extremo carboxilo que les permite reclutar correpresores (91). La expresión de las proteínas Hes es oscilatoria porque se autorreprimen. El efecto de las proteínas Hes como represores pasivos (secuestran proteínas activadoras) o represores activos (forman heterodímeros con represores) depende del contexto (tejido y momento) en el que actúan.

En la inducción lateral, la célula que expresa el ligando induce la activación de una célula que expresa el receptor Notch. La activación resulta en la expresión de genes que codifican al ligando, de modo que la célula que recibió la señal va a poder transmitirla también. (63,92).

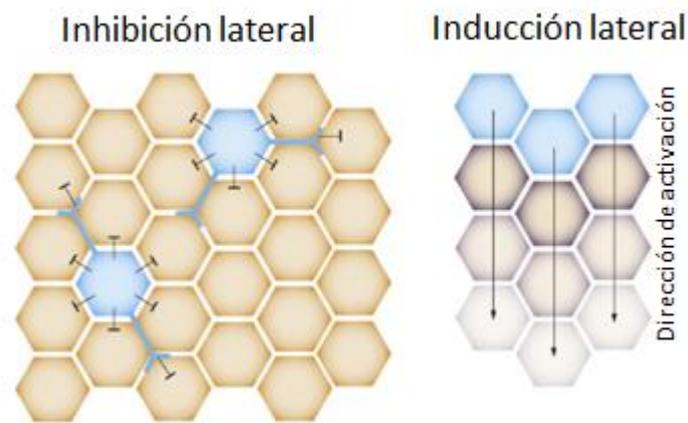


Figura 4. Representación esquemática de los procesos de inducción e inhibición lateral. Modificado de Sjöqvist M et al, 2017 (63).

La inhibición e inducción lateral dan lugar a la formación de patrones tisulares. Por un lado, pueden originarse patrones de bandas de tejido diferenciado a lo largo de un organismo (segmentos), cuando las células inducen a células contiguas a que tomen un destino celular equivalente. Por otro lado, la distribución de células rodeadas de otras que tienen un destino diferente se daría por inhibición lateral (7,63).

La formación de segmentos o somitas está relacionada a la activación y desactivación periódica de genes. Este proceso de prendido y apagado puede determinar 1) la formación de segmentos en un organismo o 2) El periodo con el que los segmentos se forman. Para ese proceso existen genes que pueden funcionar como osciladores moleculares (por ejemplo, *hes*), dado que se pueden activar o desactivar de forma periódica (7,91).

La vía también está relacionada a otros procesos como el mantenimiento de poblaciones celulares o al proceso contrario de la diferenciación hacia distintos tipos celulares. En el ejemplo mencionado de desarrollo neural, el receptor Notch inhibe la neurogénesis, manteniendo poblaciones de células madre neurales, células progenitoras indiferenciadas (93).

Vía Notch en vertebrados e invertebrados

La vía Notch participa en varios procesos de desarrollo. Sin embargo, estos procesos no son los mismos aún entre especies del mismo filo. Varios estudios utilizan ARN de interferencia, modelos animales modificados o el uso de moléculas pequeñas (por ejemplo,

el IGS, DAPT) para demostrar funcionalmente si la vía Notch está involucrada con algún proceso de desarrollo.

En vertebrados, los genes Notch están involucrados en la formación de patrones tisulares, como la formación de somitas, que pueden dar lugar a vértebras, costillas, arcos neurales. Entre los modelos estudiados destacan *Mus musculus* (ratón) y *Danio rerio* (pez cebra). En ambos se ha interferido con la función normal de la vía de varias maneras, por ejemplo, con ARN interferencia, el uso de inhibidores y la generación de organismos mutantes (49–51).

En *D. rerio*, el uso del inhibidor DAPT causó que los somitas se formasen con un periodo desfasado en comparación con los peces no tratados (94); y en otro experimento, la inhibición causada por un análogo a DAPT impidió que la aleta caudal se regenerase luego de un corte, al disminuir la población de células en división (95). Por otro lado, en embriones de *M. musculus*, DAPT inhibió por completo la formación de somitas. Además, interferir con la vía Notch afectó negativamente la neurogénesis (63,73).

La vía Notch actúa también en la formación de patrones en artrópodos (los más estudiados son los insectos); sin embargo, los elementos de la vía no necesariamente son indispensables en eventos similares (7,72,77,96,97). Por ejemplo, en *Periplaneta americana* (cucaracha), los patrones de expresión se dan en segmentos a lo largo del eje del cuerpo; el uso de DAPT y de ARNi permitió observar patrones aberrantes (48). En cambio, la segmentación del cuerpo de *Drosophila melanogaster*, está controlado por genes llamados “paired ruled genes”. Los genes Notch se han visto relacionados a la división del mesodermo y a la formación de patrones tisulares en las alas o a la formación de segmentos en las patas (7,97).

En el cnidario *Hydra vulgaris*, experimentos con el inhibidor DAPT interfirieron con la separación de las yemas, formadas asexualmente. El análisis de expresión de ARN *in situ* mostró una reducción de expresión del gen *hes* en el límite entre la yema y el cuerpo de las hidras, donde se acumula normalmente (76).

En especies de equinodermos, erizos de mar y ofiuros, se utilizó DAPT para evaluar si la vía Notch tiene efectos sobre procesos regenerativos. En el ofiuro *Ophioderma brevispina* el inhibidor interfiere con la regeneración normal de los brazos (98). En el erizo de mar *Lytechinus variegatus*, el inhibidor interfiere en la regeneración de las espinas y los pies ambulacrales; la utilización del inhibidor, además, generó una disminución en la expresión de genes blanco de la vía *hey*, *hes* y *gataC*. Las zonas regenerativas de ambos equinodermos poseen células que expresan marcadores de células madre (99).

Vía Notch en platelmintos

La vía Notch ha sido estudiada en planarias usando el modelo *S. mediterranea*, pero la literatura no es abundante. El 2016, en su tesis de doctorado para la Universidad de Utah, S. A. Elliott identificó homólogos a los genes de todos los elementos de la vía y realizó experimentos por ARNi, irradiación con rayos gamma y amputación (100). Otras técnicas como el “sorting” de las células en base a su subtipo (células madres vs. diferenciadas), permitieron evaluar la expresión de genes en distintas poblaciones.

Algunos de los genes analizados en *S. mediterranea* fueron los genes de respuesta a Notch (*hesl-1*, *hesl-2* y *hesl-3*), el factor de transcripción *su(h)*, los receptores (*notch1* y *notch2*) y ligandos (*delta2-6* y *serrate*). Los patrones de expresión de todos los genes son variados. Por ejemplo, el gen *notch1* tiene un patrón de expresión en células discretas enriquecido en la parte anterior del gusano, en una subpoblación de neuronas, faringe y protonefridas, mientras que la expresión de *notch2* se distribuye a lo largo del epitelio. Los genes de la familia *Hes* también se expresan en patrones discretos en la mesénquima y otros tejidos(100).

Los fenotipos causados por el ARNi de alguno de los genes podían ser compartidos. Por ejemplo, los animales a los que se les hizo ARNi de los genes *su(h)* y *notch1* presentaron pérdida de pigmentación en los ojos e hiperpigmentación en la zona ventral del gusano. La expresión del gen *delta-2* es afectada por el silenciamiento del gen *notch1*; su propio silenciamiento resulta en un fenotipo de pérdida de pigmentación en los ojos (100).

Otros grupos de investigación han evaluado la expresión de genes de la vía Notch en *S. mediterranea*, obteniendo resultados complementarios a los mencionados. Por ejemplo, la expresión de un gen homólogo a *delta* se da en células epidermales a lo largo del cuerpo durante las primeras 12 horas; posteriormente, deja de expresarse en la zona de la herida (101). En otro estudio, tras silenciar el gen *hesl-3* se observó que el sistema nervioso central se regeneró con patrones anormales, defectuosos; además, los fotorreceptores se regeneraron solo ectópicamente o se desarrollaba un solo ojo (102), resultados congruentes con lo que luego reportó Elliott.

La expresión de genes de la vía Notch se ha asociado a otras formas de regulación. Por ejemplo, la expresión de *notch2* podría estar regulada por el microARN *mir-124* (conservado en animales y conocido por regular la neurogénesis). Los primeros datos indican que el silenciamiento de ese microARN favorece el aumento de la expresión de *notch 2* en planarias y que *notch2* se coexpresa con *mir-124* en la periferia del cerebro. La regulación de la expresión de estos genes puede ser importante en la regeneración de tejidos cefálicos, ópticos y de la línea media del gusano (103).

En el trematodo *S. mansoni*, se reportó la expresión de genes de la vía Notch en varios estadios de vida del parásito. Además, el uso del inhibidor DAPT redujo la expresión de

hes. Se observó que el inhibidor afectaba el desarrollo del parásito, por ejemplo, disminuyó la oogénesis del parásito adulto y el desarrollo de los huevos *in vitro* (8).

En el cestodo *E. granulosus*, *notch* se expresa en todos los estadios de vida; el mayor nivel de expresión se da en microquistes cultivados *in vitro* y en la capa germinal de quistes hidatídicos obtenidos de ovejas infectadas (104). Por otro lado, en *H. microstoma*, también cestodo, se han descrito los genes de las vías Notch, Hedgehog y Wnt, y se ha estudiado su expresión y localización. El gen *notch1* se expresa en un patrón en forma de anillos en el estadio adulto, por lo que se sugiere que cumple un papel en la formación de proglótides (estrobilación). Genes de otras vías, como *Wnt1*, *Wnt11* y *Sfl*, también participan en la definición de las zonas en las que empieza la estrobilación. Además de expresarse en este proceso, los genes *notch* también se expresan en los órganos reproductivos del parásito (5). El trabajo se encuentra en una tesis doctoral presentada el 2018 en University College London, y aunque reporta la presencia de todos los elementos de la vía Notch, no se conocen aún los genes que son regulados por proteínas Hes.

En los últimos dos años han aumentado los reportes sobre desarrollo en cestodos, en base a *Hymenolepis*, *Mesocestoides* y *Echinococcus*. Un estudio de transcriptómica en *Hymenolepis* comparó distintas estructuras del estadio adulto (cabeza, cuello, proglótides) y larval. Se describieron los cambios de expresión de distintos genes homeobox, de las vías Notch, Wnt y Hedgehog y TGF beta. Con respecto a la vía Delta-Notch, se encontró que la expresión genética se encuentra enriquecida en las larvas y en los escólices y cuellos de los parásitos adultos (3). Por otro lado, se hicieron ensayos de regeneración *in vitro* del parásito y un análisis del transcriptoma, y se describió que hay genes cuya expresión está enriquecida y otros con expresión disminuida en la zona anterior del parásito adulto (12).

HIPÓTESIS

Dado que algunos de los genes de la vía de señalización Delta-Notch parecen estar relacionados a la formación del cuerpo o estróbilo (que consiste en pseudosegmentos) de gusanos cestodos, se propone que los homólogos de la vía de señalización son regulados durante el proceso de evaginación *in vitro* de cisticercos de *T. solium*.

OBJETIVOS

Objetivo general

1. Caracterizar la participación de la vía de señalización Delta-Notch en el proceso de evaginación *in vitro* de *T. solium*.

Objetivos específicos

1. Implementar un protocolo de evaginación *in vitro*, espontánea e inducida, de cisticercos de *T. solium*.
2. Realizar un ensayo de inhibición del desarrollo de *T. solium* durante la evaginación, usando el inhibidor de la vía Delta-Notch, DAPT.
3. Realizar un análisis cuantitativo de expresión, mediante PCR de transcripción reversa en tiempo real (RT-qPCR), de genes de la vía de señalización Delta-Notch.

MÉTODOS

En el trabajo se midió la expresión de mensajeros de los componentes de la vía de señalización Notch en cisticercos (quistes) de *T. solium* sin evaginar y evaginados. Se incluyó un ensayo con el inhibidor indirecto de la vía Notch, DAPT, para evaluar su efecto a nivel fenotípico y de expresión de genes. Además, se evaluó el efecto de distintos inductores de la evaginación en los cisticercos. En la Figura 5 se muestran el diseño del trabajo con los tratamientos empleados. Se realizaron tres experimentos con cisticercos provenientes de dos cerdos.

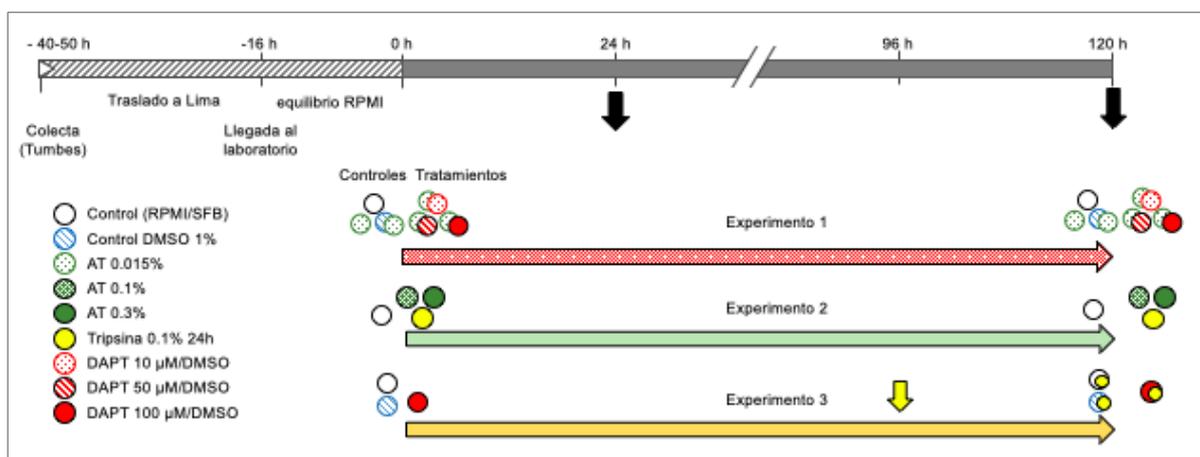


Figura 5. Experimentos de cultivo de cisticercos en diferentes condiciones de inducción de evaginación e inhibición de la gamma secretasa. La línea de tiempo superior es común a los tres experimentos; los tratamientos se iniciaron en el tiempo 0. Las flechas negras señalan los puntos de toma de muestra para extraer RNA y hacer mediciones o fotografías; los porcentajes de evaginación se registraron cada 24 h. Los círculos representan los componentes del medio de cultivo; se aprecian los grupos de trabajo, con controles a la izquierda y tratamientos a la derecha. La flecha amarilla en el Experimento 3 indica el punto en el que se agregó tripsina a todos los grupos (AT, ácido taurocólico; DAPT, N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-L-alanil]- S-fenilglicina t-butil ester).

Obtención, estabilización y selección de cisticercos de *T. solium*

Sacrificio, colecta y traslado: Dos cerdos infectados fueron capturados y sacrificados en Tumbes (R. Gamboa, Centro de Salud Global Tumbes) en dos momentos diferentes (5 de abril y 18 de octubre del 2019). Primero fueron anestesiados con ketamina (10 mg/kg) y xilasina (2 mg/kg) por vía intramuscular, y luego sacrificados con pentobarbital sódico (100-125 mg/kg) administrado por vía intravenosa. Tras la necropsia, los quistes de *T. solium* fueron extraídos del tejido muscular, colocados en PBS pH 7,2 con antibióticos (gentamicina/benzilpenicilina), y enviados en encomienda a Lima por vía terrestre, a temperatura ambiente. El traslado tardó entre 1 y 2 días.

Lavado y cultivo: En el laboratorio, los quistes fueron lavados 4 veces por 15 minutos con PBS/antibióticos (ver abajo). Luego fueron estabilizados por 16 horas a 37°C y CO₂ al 5% en medio RPMI suplementado, que contiene antibióticos y un antifúngico (ver abajo).

Tras la estabilización se seleccionaron quistes en buen estado (traslúcidos, no coloidales) y que no estaban evaginando. La observación fue directa, sin microscopios. Se dispensaron 5 quistes por pozo, en 2 mL de RPMI suplementado, agregando los componentes que se indican en la Figura 5. El medio se cambió cada 24 horas. Un grupo de control o tratamiento consistió en tres pocillos (n=15, salvo que se indique lo contrario).

Unidad experimental: Los cisticercos se obtuvieron a partir de dos cerdos naturalmente infectados con *T. solium*. La unidad experimental es un cisticerco sin evaginar o evaginado.

Cultivo de cisticercos

Soluciones y medio

- RPMI suplementado: RPMI 1640 (Gibco, Thermofisher Scientific, Waltham, MA), esterilizado por filtración, al que se agregaron 2 g/L de NaHCO₃, L-glutamina 0.2 mM, piruvato de sodio 1 mM, suero fetal bovino al 10%, aminoácidos no esenciales 0.01 mM, beta-mercaptoetanol 1.6 µM, HEPES 25mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 0.25 µg/ml de anfotericina B. pH final: 7.4.
- PBS con antibióticos y antifúngicos: 8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 1.44g/L Na₂HPO₄, 0.24 g/L KH₂PO₄, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomina y 0.25 µg/ml anfotericina B. pH final: 7.2. La solución se esteriliza por autoclave.

Inductores de la evaginación:

- Ácido taurocólico (AT) de bilis de buey (Taurocholic acid sodium salt hydrate from ox bile, Sigma T0750). Contiene 15% de ácido taurocólico. Por un error en el rótulo del envase, que indicaba el número de catálogo T4009, correspondiente a un producto puro, la concentración real usada en el experimento 1 fue de 0.015% en lugar de 0.1%.
- Ácido taurocólico (Taurocholic acid sodium salt hydrate, Sigma, T4009). Puro al 97%. Se utilizó en el experimento 2 a una concentración de 0.1%.
- Tripsina (Trypsin from porcine pancreas lyophilized powder, Sigma, T4799). Fue utilizada en los experimentos 2 y 3 a una concentración de 0.1% en medio sin suero fetal bovino.

Inhibidor del complejo gamma secretasa:

- DAPT (N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina t-butil ester; D5942, Sigma). Puro al 98%. Fue utilizado en los experimentos 1 y 3 a concentraciones de 10 μ M, 50 μ M y 100 μ M. Se preparó un stock de DAPT a 10 mg/ml diluido en DMSO.

Condiciones de cultivo

Según la disponibilidad de cerdos infectados, se realizaron tres experimentos (Figura 5): un ensayo del inhibidor con cisticercos obtenidos de un primer cerdo, y cuando se obtuvo un segundo cerdo se añadieron un ensayo de estandarización del inductor de evaginación y un ensayo con el inhibidor en su mayor concentración.

Experimento 1: Ensayo utilizando el inhibidor DAPT a tres concentraciones en presencia del inductor AT 0.015%. El objetivo fue observar si el inhibidor tenía un efecto sobre cisticercos incubados con inductor, ya fuera contrarrestando la evaginación (apreciable a simple vista), o generando algún cambio a nivel celular o de generación de determinados transcritos.

Experimento 2: Estandarización del uso de inductores de evaginación. Se utilizaron dos protocolos para inducir la evaginación. Uno con AT constante al 0.1% o 0.3%, y otro con tripsina al 0.1% por 24 horas. El grupo control, sin inducir, se mantuvo por 96 horas y se utilizó también en el experimento 3.

Experimento 3: Se cultivaron cisticercos por 96 horas en presencia de DAPT a la máxima concentración y luego se agregó tripsina para comprobar que el inhibidor no afectó la viabilidad de los cisticercos observando su capacidad para evaginar el escólex y su motilidad. Además, se midió la longitud de los escólices evaginados para evaluar cambios en el tamaño. Un control fue el mismo del experimento 2, y también se hizo un grupo con DMSO 1%.

Selección de genes y diseño de primers

Para conocer el comportamiento de la vía Notch a nivel de síntesis de ARNm, se estudiaron genes de los elementos de la vía según fueron identificados en el genoma de *T. solium* ensamblado en la Universidad Nacional Autónoma de México (acceso PRJNA170813 en el repositorio [Wormbase ParaSite](#), originalmente depositado en [GeneDB](#), que contiene los genomas de patógenos que están anotándose y que se actualiza regularmente (105):

- *delta1* (ligando)
- *notch1*, *notch2* (receptores)
- *presenilina* y *nicastrina* (componentes del complejo γ -secretasa)

- *hes2* (efector; blanco primario de la vía)
- *su(h)* (coactivador)
- *strawberry notch* (modulador que interactúa con Su(H) y recluta al correpresor SMRTER (71))

El flujo de trabajo fue el siguiente:

- Primero se buscaron los elementos de la vía Notch (como palabras clave) en el genoma de *T. solium* presente en GeneDB y se descargaron las secuencias en formato FASTA. Algunos de los modelos de los genes estaban identificados (10); los que no lo estaban tenían un nombre genérico en base a sus dominios.
- Luego, se empleó “Basic Local Alignment Search Tool” ([BLAST](#)) (National Center for Biotechnology Information, NCBI) para comparar las secuencias de *T. solium* con secuencias de *H. microstoma* (disponibles en [WormBase ParaSite](#)), en el que se ha hecho el primer estudio de la vía de señalización por Notch en cestodos (3,4). Las proteínas se consideran homólogas cuando su identidad es superior al 25% en regiones de alineamiento de al menos 100 aminoácidos (Anexo I, Tabla A1).
- Como no todos los modelos están curados y pueden presentar errores en la información del gen, la identificación de las secuencias se reforzó con un análisis de dominios conservados de las proteínas resultantes. Los dominios se encontraron con [Interpro](#) del European Bioinformatics Institute (EBI) y con la base [Conserved Domain Database](#) (CDD, NCBI). Los modelos de los genes presentaron similitudes en los dominios reportados para proteínas de la vía Notch (Anexo I, Figura A1), como ocurre con los genes de *H. microstoma* (4). Algunos de los genes resultan en proteínas que presentan diferencias en ciertos dominios, por ejemplo, Su(H) tiene un dominio PDZ y Delta 1 carece de la región transmembrana. A futuro se mejorará la anotación en las bases de datos.
- Se utilizó el software [Primer3](#) para diseñar los cebadores, y su calidad se evaluó con el software [Oligo analyzer](#) (formación de estructuras secundarias, homodímeros y heterodímeros, etc.) Los cebadores para los genes identificados y para los candidatos a genes de referencia (Anexo I, Tabla A2) fueron sintetizados por la compañía IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA).

Medición de la expresión relativa

Extracción de ARN

Según correspondiera extraer ARN, de acuerdo al diseño, los quistes se guardaron en RNAlater (Invitrogen, Carlsbad, CA) a -20°C. Se extrajo ARN total a partir de lisados de quistes con TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA). La concentración de ARN obtenido se determinó por espectrofotometría a 260 nm con NanoDrop® (NanoDrop Products,

Wilmington, DE), evaluando la calidad con la relación de absorbancias 260/280, y la integridad del ARN obtenido con un gel de agarosa en buffer TBE 1X. El Anexo II, Tablas A4 y A5, muestran los resultados de la extracción de ARN. En el mismo anexo, la Figura A3 muestra geles de agarosa usados para evaluar la integridad del ARN.

Tratamiento con DNAsa I

Se agregaron 2 U de DNAsa I (Turbo DNA free kit, Invitrogen, Carlsbad, CA) por cada 10 µg de ARN de quiste de cualquier condición en una reacción de 50 µL, que se incubó a 37°C por 30 min. El ARN se extrajo nuevamente con el protocolo estándar de trizol.

Transcripción reversa

El ADNc se generó a partir de 100 ng de ARN total mediante transcripción reversa con el kit High Capacity Reverse Transcription cDNA kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) para finalmente guardarse a 4° C hasta su uso.

RT-qPCR

Se prepararon reacciones como indica la Tabla 2, usando el kit PowerUP SYBR Green master mix (A25741, Applied Biosystems, Foster City, CA) con el siguiente protocolo de ciclado: 50°C por 2 min, 95°C por 2 min; 40 veces a 95°C por 15 seg y 60°C por 30 seg (PikoReal Real Time PCR system, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Este es el protocolo estándar para cebadores con temperatura de hibridación mayor o igual a 60°C, indicado en la guía de usuario ([Thermo PowerUp](#)). Los genes evaluados en el Experimento 1 fueron los siguientes: *gapdh1*, *beta actina 2*, *h2b1*, *cox1* y *delta1*, *notch1*, *notch2*, *sno*, *presenilina*, *nicastrina*, *hes2*. Los genes evaluados en el Experimento 2 fueron *cox1*, *delta 1* y *notch1*.

Tabla 2. Reacción de RT-qPCR

Componente (Concentración)	Volumen	Concentración final
PowerUP SYBR Green master mix (2X)	5 µL	1X
Cebadores “Forward” y “Reverse” (2,5 µM cada uno)	2 µL	0,5 µM /cebador
H ₂ O grado PCR	2 µL	-
Volumen total de la mezcla	9 µL	-
100 ng ADNc	1 µL	10 ng/µL
Volumen total de la reacción	10 µL	-

Eficiencia de la qPCR

Se realizaron diluciones seriadas del ADNc de los quistes de *T. solium*, a partir de ARN de pureza comprobada (sin ADN genómico, buen ratio A260:280). Se realizaron curvas estándar de los todos los cebadores, y se calculó y graficó la eficiencia de la PCR (ver Anexo I, Tabla A3 y Figura A2).

Estabilidad de los genes de referencia

Los candidatos a genes de referencia fueron los de la enzima glucolítica gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*), la enzima mitocondrial citocromo oxidasa 1 (*cox-1*), la proteína estructural beta-actina (*b-actin2*) y una histona (*h2b1*). La estabilidad de expresión de los genes candidatos se probó en seis condiciones, las mismas del Experimento 1. El Anexo III muestra todos los análisis de estabilidad.

Se usaron 4 programas:

- geNorm (<http://medgen.ugent.br/~jvdesomp/genorm>)
- NormFinder (<http://moma.dk/normfinder-software>)
- Bestkeeper (<http://www.gene-quantification.de/bestkeeper.html>)
- método comparativo de ΔCt (106).

Pruebas estadísticas

Se usaron pruebas no paramétricas, U de Mann Whitney para comparar dos grupos de muestras o Kruskal Wallis para comparar tres o más grupos independientes. Se tomó el valor de $p < 0,05$ para considerar una diferencia estadísticamente significativa.

Aspectos éticos

El presente trabajo está inscrito con registro SIDISI 103796 y fue exonerado de revisión por la Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología (DUICT) de la UPCH. Está vinculado al proyecto amplio SIDISI 102861 ("Caracterización de procesos biológicos de la larva de *Taenia solium* "), el cual regula el sacrificio de cerdos infectados bajo sedación para coleccionar larvas de *T. solium* y fue aprobado por el Comité Institucional de Ética Animal (CIEA) de la UPCH.

RESULTADOS

Los cisticercos de *T. solium* fueron cultivados en presencia de inductores de la evaginación como el ácido taurocólico y la tripsina, además de distintas concentraciones de DAPT, el inhibidor indirecto de la vía de señalización Notch. Luego, la expresión de varios genes relacionados a la vía Notch fue evaluada por RT-qPCR.

DAPT inhibió la evaginación *in vitro* de *T. solium*

La eficiencia de siete de los ocho pares de cebadores para los genes identificados en *T. solium* estuvo entre 90 y 110%; el gen *su(h)* requerirá nuevo diseño (ver Anexo I).

En el experimento 1 se trataron los cisticercos con el inductor de la evaginación y con el inhibidor DAPT con el fin de determinar si el inhibidor tiene algún efecto sobre la evaginación de los cisticercos.

El AT al 0.015% no funcionó para inducir la evaginación por encontrarse más diluido de lo pensado. Sin embargo, a las 120 h los cisticercos habían evaginado parcialmente el escólex y cuello (Figura 6); el 73% de los cisticercos en el control de solo medio evaginó, comparado con el 60% de cisticercos evaginados en presencia de AT 0.015 % (Tabla 3).

Tras 120 h, el uso del inhibidor DAPT 100 μ M se asoció claramente con un menor número de parásitos que evaginaron el escólex. Solo un cisticercos evaginó entre los 15 del grupo, comparado con 11 que lo hicieron en el grupo control y con los 12 de 14 que evaginaron en el grupo tratado con AT 0.015% y DMSO 1%. (Tabla 3). Menores concentraciones de DAPT tuvieron menor efecto inhibitorio, y el grupo con 10 μ M no parece haber sufrido inhibición, pues evaginaron tantos cisticercos como en los grupos control.

Tabla 3. Porcentaje de evaginación luego de 48 y 120 horas en cultivo con RPMI, AT 0.015% y tres concentraciones del inhibidor DAPT. Datos del Experimento 1.

Condición	Evaginados/total 48 h	Evaginados/total 120 h
Control (RPMI)	0/15 (0%)	11/15 (73%)
AT 0.015%	2/15 (13%)	9/15 (60%)
AT 0.015%, DMSO 1%	0/15 (0%)	12/14 (80%)
AT 0.015%, DAPT 10 μ M	2/15 (13%)	11/15 (73%)
AT 0.015%, DAPT 50 μ M	0/15 (0%)	7/15 (47%)
AT 0.015%, DAPT 100 μ M	0/15 (0%)	1/15 (7%)

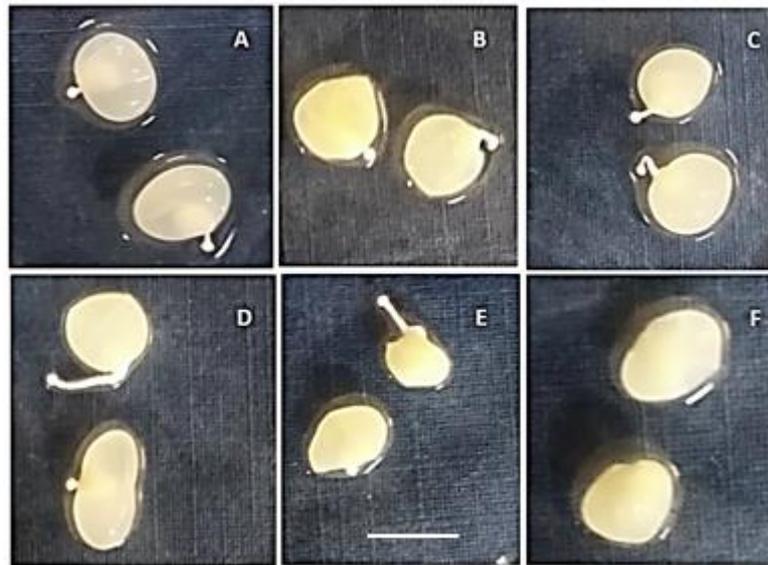


Figura 6: Cisticercos tras 120 horas de cultivo bajo distintas condiciones. A: Control (RPMI). B: AT 0.015%. C: DMSO 1%. D: DAPT 10 μ M. E: DAPT 50 μ M. F: DAPT 100 μ M. Datos del Experimento 1. Barra: 10 mm

El ácido taucólico al 0.1% y la tripsina al 0.1% indujeron la evaginación *in vitro* de los cisticercos

La evaginación fue diferente en el experimento 1 (inhibición) y el experimento 2 (inducción). Los cisticercos cultivados con AT 0.015% en el experimento 1 solo alcanzaron una evaginación parcial tras 120 h, con la salida del escólex, mas no del cuello ni el estróbilo (el cual en este estadio es incipiente, en todo caso). En cambio, en el experimento 2 los grupos tratados con AT 0.1% mostraron evaginación total tras 120 h; se apreció fuera de la vesícula el escólex, el cuello y proglótides inmaduras (Figura 7). Se registró diariamente el número de cisticercos que evaginaron el escólex en los diferentes grupos (Figura 8); al día 5 (120 h) la mayoría de cisticercos había evaginado el escólex, con o sin inductor.



Figura 7: Cisticercos evaginados tras 120 h de cultivo en distintas condiciones. Izquierda: 0.1% Tripsina. Centro: AT 0.1%. Derecha: AT 0.3%. Datos del Experimento 2. Barra: 5 mm

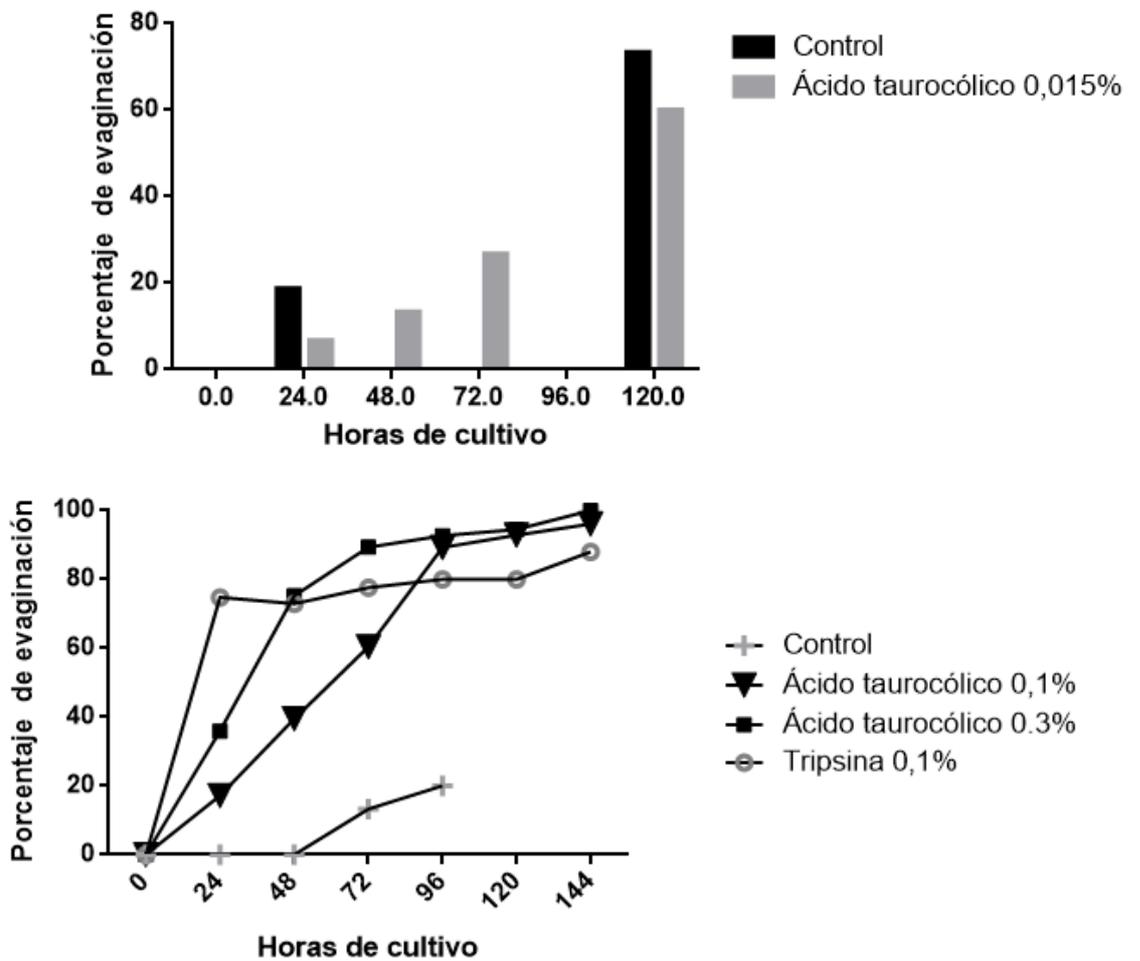


Figura 8. Registro diario de cisticercos que evaginaron el escólex espontáneamente y en presencia de inductores. Arriba: datos del experimento 1; (porcentaje de evaginación en el grupo de tratamiento). Abajo: datos del Experimento 2 (porcentaje acumulado).

DAPT afectó la expresión de genes Notch a nivel de transcritos

La eficiencia de todos los cebadores estuvo entre 90 y 110% (ver Anexo I). La expresión de genes se midió usando como gen de referencia al gen de citocromo oxidasa (Cox-1), que resultó ser el más estable entre los genes propuestos para este fin (ver Anexo III).

Los resultados de abundancia de transcritos obtenidos por RT-qPCR con las muestras del Experimento 1 se presentan como valores de expresión relativa (eje y en las gráficas de las figuras 9 a 15) en función de los resultados del grupo control.

Los genes de los receptores Notch no siguen un patrón claro de aumento o disminución significativos en respuesta al inhibidor con respecto al vehículo DMSO. Sin embargo, para *notch1* se observa la tendencia aumento de la expresión con las concentraciones de 10 y 50 μM de DAPT y una disminución en presencia de la mayor concentración de DAPT (100 μM) (Figura 9).

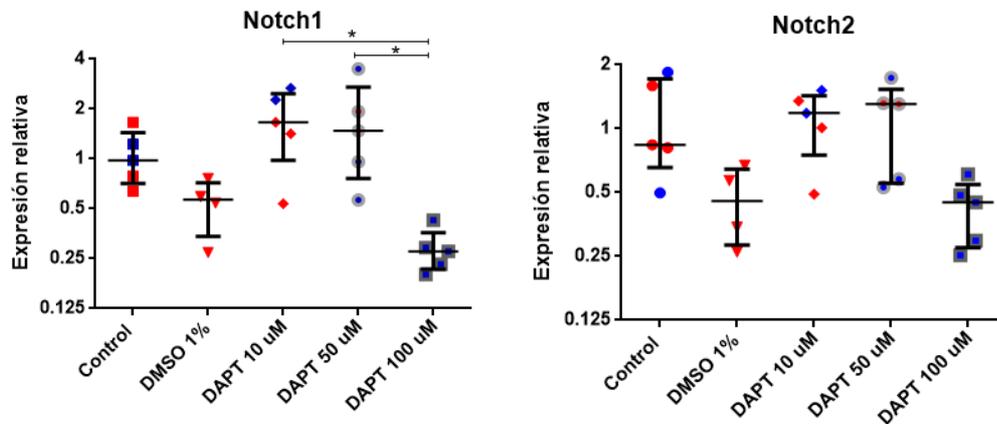


Figura 9. Expresión de los receptores Notch1 y Notch2 en ensayos con el inhibidor DAPT tras 120 horas en cultivo (con AT a 0.015%). Los puntos azules corresponden a cisticercos no evaginados y los naranjas a cisticercos evaginados. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. Datos del Experimento 1.

La expresión del ligando *delta1* tuvo un patrón de aumento que se observa si se compara el control con DMSO y DAPT 50 μM . Con 100 μM el aumento es menor y no es significativo (Figura 10).

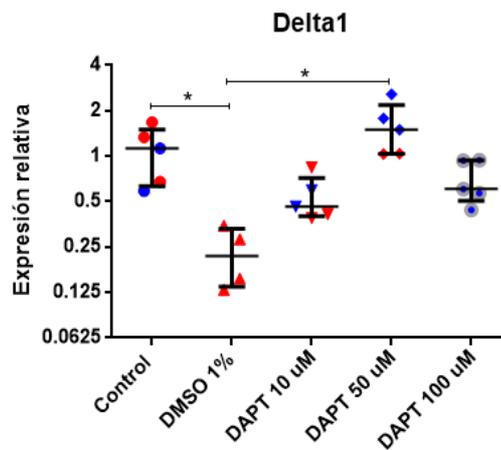


Figura 10. Expresión del ligando, *delta1*, en ensayos con el inhibidor DAPT tras 120 horas en cultivo (con AT a 0.015%). Los puntos azules corresponden a cisticercos no evaginados y los naranjas a cisticercos evaginados. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. Datos del Experimento 1.

La expresión de *presenilina* y *nicastrina*, genes que codifican proteínas que forman parte del complejo GS, tiende a aumentar con DAPT entre 10 y 50 μM . Sin embargo, la

expresión disminuye con el inhibidor a 100 μM , aunque esto no ocurre respecto al vehículo. Esto también sucedió con el gen *sno* (Figuras 11 y 12).

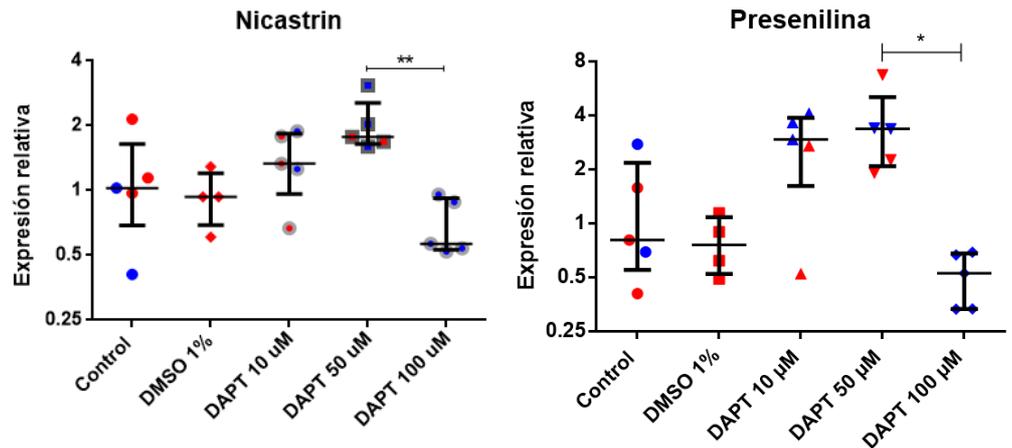


Figura 11. Expresión de los genes de componentes de la gamma secretasa en ensayos con el inhibidor DAPT tras 120 horas en cultivo (con AT a 0.015%). Los puntos azules corresponden a cisticercos no evaginados y los naranjas a cisticercos evaginados. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. Datos del Experimento 1.

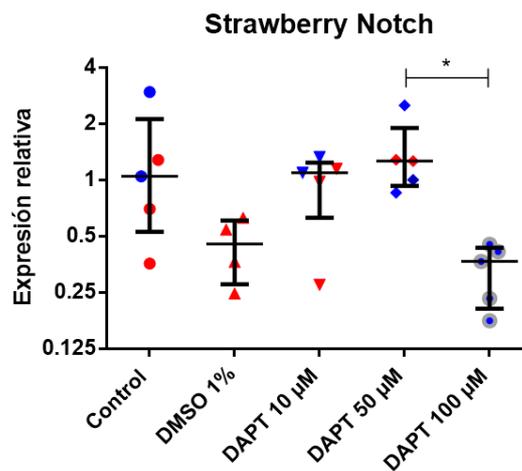


Figura 12. Expresión del gen *Sno* en ensayos con el inhibidor DAPT tras 120 horas en cultivo (con AT a 0.015%). Los puntos azules corresponden a cisticercos no evaginados y los naranjas a cisticercos evaginados. *, $P < 0.05$. Datos del Experimento 1.

La expresión del gen *hes2*, un gen de respuesta a la activación de la vía Notch, aumenta en presencia de la máxima concentración de inhibidor (Figura 13).

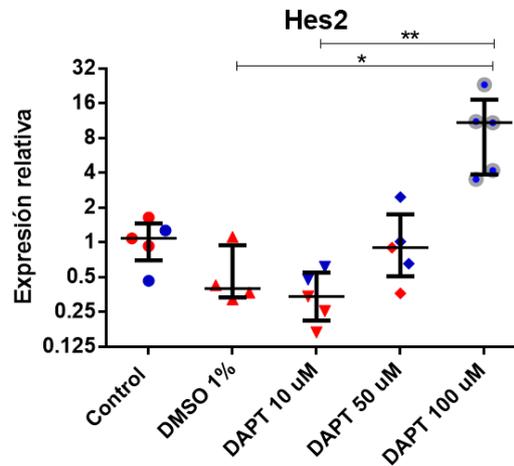


Figura 13. Expresión de un gen de respuesta a la vía Notch, *hes2*, en ensayos con el inhibidor DAPT tras 120 horas en cultivo (con AT a 0.015%). Los puntos azules corresponden a cisticercos no evaginados y los naranjas a cisticercos evaginados. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. Datos del Experimento 1.

Se observó la expresión de *histona h2b1* como candidata a gen de referencia, pero se encontró que su expresión no fue estable; tiene tendencia al aumento cuando la concentración del inhibidor es mayor (Figura 14).

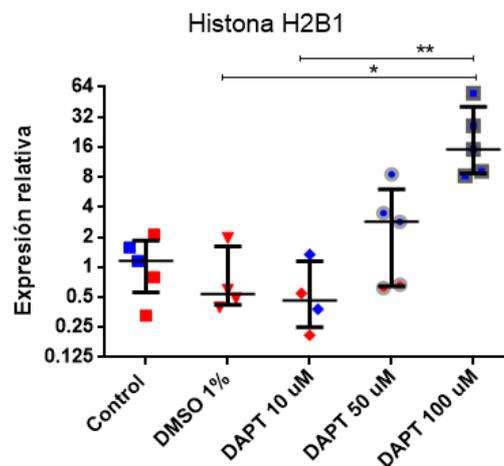


Figura 14. Expresión de la *histona h2b1* tras 120 horas en cultivo con el inhibidor DAPT. Los puntos azules corresponden a cisticercos no evaginados y los naranjas a cisticercos evaginados. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. Datos del Experimento 1.

El ácido taurocólico indujo la expresión de genes Notch tras 24 horas

Se hizo RT-qPCR de genes de la vía de señalización Notch luego de 24 y 120 h de añadir AT al 0.1% para inducir la evaginación de *T. solium*. Los genes *notch1* y *hes2* fueron

evaluados, al ser los genes cuya expresión tuvo tendencia a variar con el tratamiento con DAPT.

En presencia del inductor, la expresión de *notch1* tiende a aumentar desde las 24h, mientras que la expresión de *hes2* solo mostró un aumento a las 120 h (Figura 15).

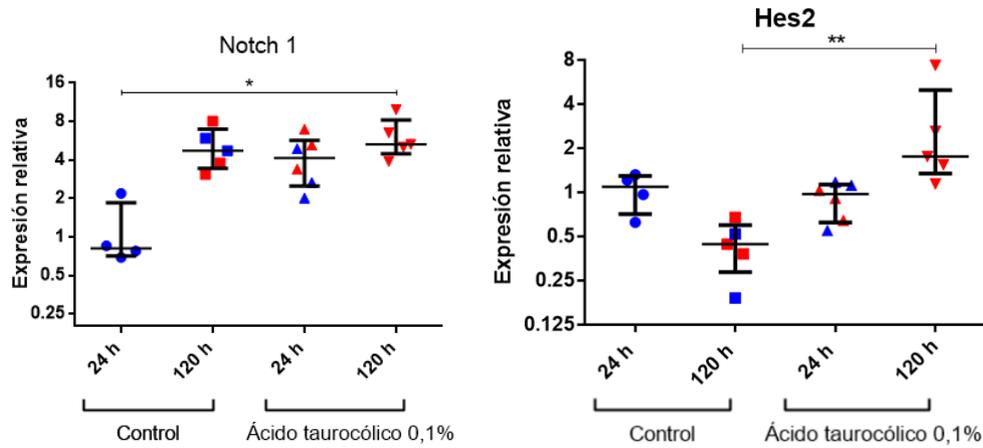


Figura 15. Expresión de genes de la vía Notch tras una inducción con ácido taurocólico al 0.1%. *, P <0.05; **, P<0.01. Los controles corresponden al experimento 1 y los tratamientos corresponden al experimento 2.

El tratamiento con DAPT no afecta la viabilidad de los cisticercos

La viabilidad de los cisticercos (o su capacidad para evaginar en respuesta a tripsina 0.1% por 24 horas) no fue afectada por DMSO 1% ni por 96 h de exposición a DAPT 100 μ M. La longitud de los gusanos evaginados tampoco varió con estos tratamientos (Figura 16).

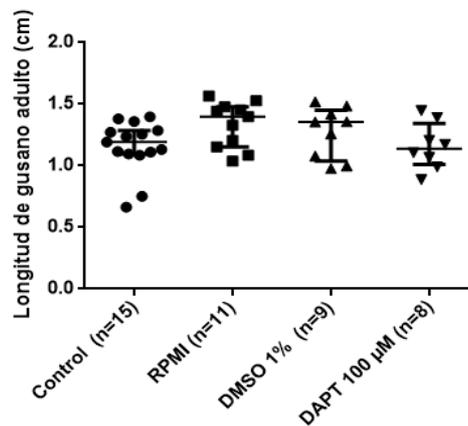


Figura 16. Longitud de gusanos evaginados tras tratamientos con: Control: 24 h con tripsina 0,1%. RPMI, DMSO 1% y DAPT 100 μ M: 96 h con estos medios y luego 24 h con tripsina 0,1%. Datos del Experimento 3.

DISCUSIÓN

El crecimiento de *T. solium* en el intestino humano empieza cuando el escólex del parásito evagina del cisticerco. Este primer evento permite al parásito usar sus ganchos y ventosas para adherirse al epitelio intestinal y formar proglótides a partir del cuello, las cuales maduran y generan huevecillos. El éxito del parásito para madurar y diseminarse depende del proceso de evaginación. Para conocer la participación de la vía de señalización Notch en la regulación celular de la evaginación, se estudió este evento *in vitro*, en presencia de un inhibidor de la vía. Los resultados sugieren que la vía Notch juega un papel en la evaginación de *T. solium*, y establecen algunos parámetros para cultivar cisticercos en próximos experimentos que conduzcan a caracterizar los procesos que controlan la metamorfosis y desarrollo de este parásito. El factor limitante para tales experimentos es la disponibilidad de cerdos infectados, para contar con cisticercos vivos en la cantidad y momentos adecuados.

El inhibidor DAPT impidió parcial o totalmente la evaginación de *T. solium*

Dado que la vía Notch está conservada en varias especies y se han identificado componentes de la GS en *H. microstoma* y homólogos en *T. solium*, se optó por experimentar con el uso de DAPT para inhibir la vía Notch como se ha hecho en varios grupos animales.

El uso del inhibidor tuvo un claro efecto negativo sobre la proporción de cisticercos que evaginó el escólex tras cinco días de cultivo, como se reporta en la tabla 3 y se observa en la figura 6F. En presencia de DAPT 100 μ M solo un cisticerco de 15 evaginó el escólex tras cinco días de cultivo, en comparación con 11/15 de un control y 12/14 de otro.

F. Jarero, en su tesis de doctorado (4), utilizó DAPT sobre el estadio larval de *H. microstoma* como parte del establecimiento del sistema modelo de este parásito en el laboratorio, incluyendo el desarrollo en hospedero insecto y mamífero. Para ello, microinyectó en el parásito DMSO y DAPT en varias concentraciones. Las concentraciones que se probaron de DAPT (50 a 100 μ M), en DMSO al 1%, no generaron cambios morfológicos apreciables (2). La misma estrategia fue utilizada con un inhibidor de la vía de señalización Wnt (IGW-3); los efectos observados fueron en el crecimiento y desarrollo a través de sus estadios de vida.

De la misma manera, para esta tesis se descartó un efecto negativo de DAPT sobre la viabilidad de los cisticercos de *T. solium*. Para ello se los colocó en DMSO 1% y DAPT 100 μ M por 96 h, para luego inducir la evaginación con tripsina al 0.1% por 24 h (figura 16). Con este experimento se pudo observar que los gusanos que evaginaron se movían, es decir, se mantenían viables a pesar de haber estado expuestos al inhibidor; su tamaño además no varió significativamente en relación con el grupo sin inhibidor ni DMSO. Sería

adecuado prolongar el tratamiento con DAPT hasta 120 horas, para observar si la inhibición observada en el experimento 1 es reproducible. Luego de ello, se induciría la evaginación y se evaluaría el efecto sobre el fenotipo de todos los grupos de tratamiento.

Por ahora, se sugiere que el inhibidor tiene algún efecto a nivel celular sobre los cisticercos. Para un reporte más preciso, hace falta describir el tejido del parásito, antes y después de los tratamientos, con experimentos de histología o tinciones de parásito completo con marcadores como anti sinapsina, que marca el tejido nervioso, y faloidina, para el tejido muscular. Los experimentos para marcar el parásito completo (“whole mount”) están en fase de implementación en el laboratorio; no hemos identificado antecedentes en la literatura. Esta ausencia puede deberse más a la disponibilidad de cisticercos vivos para los experimentos, que a la dificultad de las técnicas. Definitivamente, existe un interés creciente en la biología del desarrollo de cestodos, como lo evidencian los estudios de los últimos años en *Mesocestoides*, *Echinococcus* e *Hymenolepis*, incluyendo la generación de modelos de laboratorio y líneas celulares basadas en las células proliferativas (3–5,8,10–12,35,36,38–40).

El inhibidor afectó la expresión de genes relacionados con la vía Notch

La lógica del presente trabajo es que luego de la evaginación, o en simultáneo, se activan señales celulares que promueven el crecimiento del gusano tras el estadio “suspendido” de la forma vesicular o cisticerco (enquistado en la carne del hospedero secundario). Genes como *notch1*, en *H. microstoma*, se expresan a lo largo del gusano, y cabe recalcar que la expresión en la zona de transición del cuello a proglótides se da en patrón de segmentos (4), por lo que se sugiere que tendrían un papel en la diferenciación del tejido hacia proglótides y la inhibición de la vía resultaría en crecimiento aberrante.

Ante el tratamiento con DAPT 100 μ M por 120 horas en cultivo, la expresión de *notch1* tuvo una tendencia a disminuir, sin embargo, la disminución no fue significativa con respecto al vehículo (ver figura 9); por el contrario, la expresión de los genes *delta1* y *hes2* aumentó (ver figuras 10 y 13, respectivamente). En principio se hipotetizó que la expresión de *hes2* disminuiría, por ser blanco directo (primario) de la vía Notch, mientras que los otros componentes podrían ser regulados negativa o positivamente, dado que la vía funciona con mecanismos de inhibición e inducción.

Muchos reportes de ensayos in vitro sobre otros organismos demuestran que la expresión de ortólogos de Hes disminuye con el tratamiento con DAPT, como ensayos de expresión en un anélido (gusano segmentado verdadero, “superior”) (108). De la misma manera el inhibidor redujo la expresión localizada de *hes* y *notch1* en los límites entre el cuerpo y yema de *H. vulgaris* (76,95). También se ha empleado este inhibidor en cultivos de fibroblastos cardiacos de rata y cultivos en microfluídica con células endoteliales de venas de cordón umbilical humano (HUVEC), en los que disminuyó la expresión relativa de

genes homólogos a *hes* (109,110). Sin embargo, se debe tener en consideración la complejidad de trabajar con un animal en cultivo, como *T. solium*, en lugar de con un solo tipo de células.

El aumento de la expresión de *hes2* en presencia del inhibidor de la vía Notch fue opuesto a lo esperado; se puede interpretar que resultó de la acción positiva de otras vías puestas en marcha frente ante distintos estímulos, como concentración del inhibidor y la propia evaginación o no evaginación. De hecho, la vía Notch permite a las células responder a diferentes estímulos de su entorno a través de la interacción con numerosas rutas de señalización, incluyendo las vías Wnt, TGF beta y señalización acoplada a proteínas G (109), todas ellas recientemente asociadas a estrobilación en cestodos (110).

La familia de ligandos TGF beta (“transforming growth factor”), que inicia cascadas de señalización y regula procesos de desarrollo, proliferación y crecimiento en vertebrados e invertebrados, puede tener un “crosstalk” con la vía de señalización Notch. En cultivos de células de cáncer de ovario y de cáncer colorrectal se observó el “crosstalk” entre ambas vías y se determinó que poseen un ciclo de regulación positiva (113–115).

Los genes ortólogos de *hes* pueden ser regulados por la activación de otras vías de señalización de manera independiente. Por ejemplo, células HUVEC tratadas con suero fetal bovino, que aportaba ligandos BMP, mostraron un aumento en la expresión de *hey*, cuya expresión no disminuyó frente a DAPT. El uso de inhibidores del receptor tipo I de BMP (bone morphogenetic protein) permitió demostrar que estos genes son regulados por ligandos BMP presentes en el suero (116).

Otro factor de crecimiento de fibroblastos, FGF, podría también tener un efecto sobre la familia de genes *hes*. Por ejemplo, el tratamiento con FGF2 indujo la expresión del gen reportero en cultivos de células progenitoras de oligodendrocitos transfectadas con un vector de GFP con promotor de *hes5* (117).

Otro ejemplo involucra un modelo con embriones de ratón. En ese modelo se determinó que la vía Notch era esencial para la segmentación usando IGS y con ratones knockout carentes de genes de la vía. El patrón de expresión del gen *hes7* cambiaba en la zona rostral, mas no era eliminado en la zona caudal tras la inhibición. El uso de un inhibidor de la vía FGF inhibió la expresión del gen *hes7* en la zona caudal (73).

La expresión del gen *delta1* tuvo una tendencia al aumento (Figura 10) tras 120 h en presencia de DAPT 100 μ M, que podría relacionarse con lo que ocurre en *H. microstoma*, donde este gen se expresa en tejidos que se diferenciarán en tejido reproductivo masculino (4). La expresión del ligando podría indicar que a nivel del gusano no evaginado aún se están llevando a cabo eventos de diferenciación, y que *delta1* está regulado por una vía que no depende directamente de Notch. Por ejemplo, una posible ruta es la vía de señalización

FGF, que induce la expresión de genes proneurales que a su vez estimulan la expresión de *delta1* (118).

La expresión de otros genes como *notch2* (Figura 9) y los componentes de GS (Figura 11) no disminuyó frente a DAPT 100 μ M. En *Hymenolepis*, el gen *notch2* se expresa a lo largo de todo el gusano, y al igual que sucede con la *presenilina* y la *nicastrina*, su expresión no cambia dependiendo de la zona o estadio del gusano. Sin embargo, se observa que la zona del poro genital es la más marcada en experimentos de hibridación in situ de ARN para el gen *notch2*. Por otro lado, la expresión de *presenilina* y *nicastrina* no fue analizada por hibridación in situ, pero defectos en los genes que codifican la presenilina afectan la formación de somitas en *Mus musculus*, por lo que no se descarta su papel en la estrobilación. Se ha sugerido que estos genes no serían regulados por la vía Notch y que una posible ruta de regulación es la vía JNK (119,120).

La GS, además de proteolizar el dominio intracelular del receptor Notch, tiene otros sustratos. Tanto DAPT como otros IGS interfieren con muchos procesos de proteólisis, como los de la N-cadherina, APP y otras proteínas integrales que, a su vez, pueden actuar sobre algún blanco no identificado (80,81). Será interesante conocer en un futuro otras proteínas presentes en *T. solium* cuya proteólisis sea catalizada por GS para considerarlas como controles. Se podrían buscar en el genoma de *T. solium* homólogos de los sustratos cuya proteólisis haya sido reportada como blanco de inhibición por IGS. La proteólisis mediada por GS sobre proteínas como la N-cadherina podría tener un efecto sobre la señalización célula-célula. Por otro lado, el dominio intracelular de APP (AICD), se puede traslocar al núcleo y afectar la expresión de algunos genes; en un modelo en ratón se ha reportado que puede interactuar con la histona acetil transferasa (121).

La evaginación fue inducida con ácido taurocólico y tripsina

El AT está asociado a la evaginación por acción mecánica, dado que es un agente surfactante (42). El uso de ácido taurocólico entre 0.1% y 0.3% permitió que los cisticercos evaginaran paulatinamente hasta alcanzar un 95% de los individuos tras cinco días de exposición, recalcando que con 0,3% la evaginación se dio en menos tiempo (ver figuras 5 y 6).

Como parte de una tesis de licenciatura del laboratorio (D. Castañeda, por presentar), se midieron cisticercos tratados con 0.1% de AT por 24 horas y por 120 horas. Se observó que los cuerpos de los gusanos evaginados tras 120 h de cultivo son más largos. Tras solo 24 h, los parásitos evaginados midieron entre 1.06 mm y 4.58 mm, mientras que tras 120 h midieron entre 7.4 mm y 15.86 mm.

Los cambios fenotípicos asociados al tiempo en cultivo y a la inducción de la evaginación estuvieron relacionados con el aumento de expresión del gen *notch1*. Por otro lado, el aumento de expresión del gen *hes2* estuvo relacionado a la inducción de la evaginación con

AT por 120 h. A pesar de que el gen *notch1* se expresa a lo largo de *H. microstoma* cumpliendo distintas funciones, tiene un patrón de expresión en bandas en el cuello, y podría tener un papel en el control de la diferenciación del tejido del cuello hacia proglótides inmaduras y la formación de segmentos. La expresión de *hes2* en *H. microstoma* es baja y se mantiene a lo largo del cuerpo del gusano adulto (recuperado de ratones infectados por dos semanas) y en el estadio larval (recuperadas 5 días post infección de su hospedero); es probable que un aumento en la expresión de ese gen responda al momento de inducción al desarrollo.

Un gen de interés no estudiado en este trabajo es un ortólogo de *hes3*. En *H. microstoma* tiene una expresión alta en la zona media del gusano adulto (4), por lo que podría representar un buen marcador para seguir el crecimiento del parásito.

La expresión de genes *hes* podría estar asociada a eventos de desarrollo

Los represores Hes funcionan como osciladores moleculares, es decir, su expresión se activa e inactiva cíclicamente. Se conoce que parte de esta regulación se debe a una auto retroalimentación (Hes1, en mamíferos, reprime su propia transcripción) (7,62,63,88). En *Drosophila* y en mamíferos, tal comportamiento oscilatorio favorece que las proteínas Hes regulen la formación de compartimentos (separación entre tejidos distintos) o el mantenimiento de poblaciones celulares indiferenciadas, especialmente durante la neurogénesis (7,62,64,93). En *H. microstoma*, estos genes podrían actuar en la diferenciación de otras poblaciones de células destinadas a formar tejido reproductivo (4).

Se pueden sugerir varias funciones de las proteínas Hes en *T. solium*, entre las cuales estarían el mantenimiento de poblaciones de células madre en la zona del cuello del parásito y la diferenciación de tejidos adyacentes a la zona del cuello hacia proglótides. Entre los blancos conocidos de Hes (blancos secundarios de Notch) en mamíferos e insectos se encuentran genes proneurales como *ascl1* y *neurog2* (62,88,122). Identificar genes blanco de Hes en cestodos contribuiría a afinar los diseños experimentales para continuar con la caracterización funcional de la vía en *T. solium*.

No existe un modelo de maduración *in vitro* de *T. solium*

Se han establecido condiciones de cultivo *in vitro* para seguir el desarrollo postoncosférico de *T. solium* (51) e incluso se ha logrado obtener cisticercos con escólex evaginado en *T. saginata* (52). Pero a diferencia de lo logrado en *H. microstoma* y *H. diminuta*, más allá de ensayos de evaginación *in vitro* con AT, bilis y hormonas como la progesterona (55,60,123), en *T. solium* no se ha logrado inducir estrobilación ni el desarrollo de proglótides maduras.

Compuestos como el suero fetal bovino (SFB), con el que se suplementa el medio de cultivo, contienen factores de crecimiento (como TGF beta, GGF, IGF, BMP, BFGF) (124) que son beneficiosos para la supervivencia de *T. solium* en cultivo, pero a la vez activan

varias rutas de señalización, por lo que interfieren en estudios de la naturaleza de esta tesis. Otros suplementos como TGF beta recombinante tienen un efecto positivo sobre la supervivencia de los parásitos, y en el caso de *T. crassiceps*, que se reproduce asexualmente, estimula el crecimiento y gemación. (125).

En base a estas observaciones, se plantea que para lograr un mayor desarrollo *in vitro* de *T. solium*, será necesario replicar algunas de las condiciones utilizadas para *H. microstoma* y *H. diminuta*. Entre ellas están el uso de medio bifásico inclinado (que evita incluir suplementos) e hipoxia. Se trataría de implementar un sistema que permitiera analizar el efecto de drogas como DAPT, no solo en la evaginación sino en el crecimiento y maduración del gusano *in vitro*.

Replicar el ciclo de vida completo de *T. solium in vitro* disminuiría las diferencias que pueden existir entre cisticercos. Por ejemplo, en la figura 16, comparando gusanos de 24 horas con gusanos de 120 horas, existe una tendencia al aumento de longitud del gusano; sin embargo, la comparación es difícil dado que los cisticercos colectados pueden pertenecer a distintos momentos de infección en el cerdo, lo que podría contribuir a la gran variabilidad en las medidas. Vale recalcar que otra ventaja de mejores cultivos *in vitro* de cisticercos es la posibilidad de modificar los medios según el objetivo del experimento. La administración de algún tratamiento *in vivo* tiene todas las dificultades logísticas del manejo de cerdos infectados.

Finalmente, con las condiciones actuales, se puede establecer un método para agrupar a los cisticercos en base a características físicas, y con ello hacer primero una caracterización sistemática de los eventos celulares y moleculares que acompañen los cambios morfológicos de la evaginación. Luego, se explorarían los elementos fundamentales para la evaginación que fueran específicos y exclusivos de *T. solium* (posiblemente por su estructura). Una aplicación atractiva es interrumpir la expresión de estos elementos, a nivel de transcrito o de proteína, sin daño del hospedero, para detener el ciclo vital del parásito y la contaminación de agua y alimentos con sus huevecillos.

LIMITACIONES

Las principales limitaciones del trabajo son la forma en que la unidad muestra es obtenida y las propiedades de la muestra.

La muestra es obtenida de un cerdo naturalmente infectado que debe ser adquirido de criadores informales. Es necesario que un grupo de veterinarios realice una búsqueda de criadores informales, examine a los cerdos y compruebe si están infectados. En muchas

ocasiones los cerdos presentan una carga parasitaria baja, lo cual no es óptimo para realizar los experimentos.

Una vez que se han obtenido en promedio 500 cisticercos por cerdo (o lo necesario según el diseño, cantidad de controles, individuos por grupo, etc.), todas las muestras deben ser procesadas y cultivadas en simultáneo: no pueden ser almacenadas para posterior uso porque no se conoce cómo suspender su desarrollo fuera de la carne del cerdo vivo. Esto limita las opciones respecto al diseño experimental: no se pueden repetir experimentos con facilidad. En el caso de este trabajo, se contó con cisticercos que fueron recolectados en Tumbes y transportados a Lima por vía terrestre, es decir, que parte de su desarrollo se inició sin control de condiciones.

DIRECCIÓN A FUTURO

Manejo de muestras

En relación a los experimentos realizados, se pueden plantear varias alternativas para obtener un mejor control sobre el manejo de los parásitos. Primero, el tiempo entre la extracción de cisticercos y su paso a cultivo debe ser reducido, lo que se puede lograr organizando la colecta de cisticercos en Lima. Esto implica el transporte y mantenimiento de cerdos infectados vivos. Segundo, los puntos considerados entre 0 y 120 horas también se deben integrar al análisis de expresión. Tercero, la evaginación parcial del escólex y el cuello debe ser caracterizada y reproducida. Finalmente, debe priorizarse entre experimentos la presencia de controles sin tratamiento.

Además de tener un mayor control sobre los puntos mencionados, es necesario plantear alternativas en cuanto a la muestra usada para analizar la expresión de los genes de interés. En base a los estudios en cestodos del género *Hymenolepis* se propone seccionar cada gusano en cabeza, cuello y proglótides. Esta aproximación es potencialmente más informativa respecto de lo que se diseñó en el trabajo con *T. solium*, con el cisticerco entero (antes y después de evaginar el escólex) como unidad de análisis, teniendo en cuenta que el cisticerco contiene una larva ya compleja, con un protoescólex listo para continuar su desarrollo una vez sea activado. De todas maneras, se alcanzó como objetivo la prueba de concepto sobre la participación de la vía Notch en la evaginación.

Estudios de expresión

A futuro, la técnica de RNA-seq podría utilizarse para obtener información global de los genes que son regulados en los cisticercos antes y después de la evaginación. El uso de RT-qPCR limita el análisis a pocos genes y no es costo-efectivo respecto a la información que

brinda. Un probable flujo que se podría utilizar es identificar primero genes candidatos mediante RNA-seq y validar luego su expresión con RT-qPCR.

El Single Cell RNA-seq, también podría ser utilizado para analizar poblaciones de células presentes en distintos tejidos del parásito. Por ejemplo, en planarias la técnica permitió identificar doce subtipos de neoblastos, dentro de los cuales un subtipo correspondía a células pluripotentes (30).

Por otro lado, las técnicas de localización *in situ* de ARN no han sido implementadas en *T. solium*; se buscaría optimizar tinciones, teniendo en cuenta que el tamaño del parásito es una limitante para el tratamiento. Varias de las estrategias de permeabilización aún tienen que ser optimizadas.

Estudios funcionales

Para evaluar el efecto de los inhibidores, aparte de utilizar qPCR, también se puede usar Western Blot para detectar la presencia de la región NICD como se ha realizado en varios estudios (126). Sin embargo, debe considerarse que este péptido es de vida muy corta (127).

Además, de manera complementaria se plantea el uso de otras técnicas para silenciar genes, por ejemplo, el uso de ARN de interferencia. En *Hymenolepis* y *Echinococcus* se han silenciado genes microinyectando ARN de doble hebra (128). Esto permitiría evaluar la influencia que puede tener un gen de interés de manera específica.

Bioinformática

Se debe realizar una búsqueda de ortólogos en *T. solium* de los elementos de la vía Notch no incluidos en este trabajo, en base a los genes reportados para *H. microstoma* y *S. mediterranea*. También se incluiría una búsqueda de blancos de GS y de genes *hes*.

Esto se puede lograr usando la herramienta BLAST disponible en las páginas del WormBase ParaSite. Los modelos que sean homólogos a los reportados en otras especies luego deben ser analizados para verificar la presencia de dominios característicos. Sin embargo, en algunas ocasiones los modelos deben ser curados, dado que pueden tener errores.

Otras vías de señalización

Genes relacionados a vías como Wnt, Hedgehog y los genes Hox son morfógenos que están relacionados a la formación de patrones y segmentos. Por ejemplo, en *H. microstoma* los patrones de expresión de varios genes (*sfl*, *wnt11*, *wnt1*) eran en forma de segmentos y delimitaban la parte anterior y posterior del parásito (4). A futuro será importante caracterizar las vías mencionadas en *T. solium*.

CONCLUSIONES

- El cultivo de cisticercos de *T. solium* con el inhibidor de la gamma secretasa, DAPT 100 μM , inhibió la evaginación del escólex, lo que sugiere que este proceso requiere de la activación de la vía Notch.
- La presencia del inhibidor alteró la expresión de genes de la vía de señalización Notch (*notch1* y *hes2*).

BIBLIOGRAFÍA

1. García HH, Gonzalez AE, Evans CAW, Gilman RH. *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet* (London, England). 2003 Aug;362(9383):547–56.
2. Garcia HH. Neurocysticercosis. Vol. 36, *Neurologic Clinics*. W.B. Saunders; 2018. p. 851–64.
3. Olson PD, Zarowiecki M, James K, Baillie A, Bartl G, Burchell P, et al. Genome-wide transcriptome profiling and spatial expression analyses identify signals and switches of development in tapeworms. *Evodevo*. BioMed Central; 2018;9:21.
4. Jarero F. Wnt, Hedgehog and Notch signalling in relation to tapeworm anteroposterior polarity and segmentation. Dr thesis, UCL (University Coll London) . UCL (University College London); 2018 Mar 28;
5. Koziol U, Jarero F, Olson PD, Brehm K. Comparative analysis of Wnt expression identifies a highly conserved developmental transition in flatworms. *BMC Biol*. 2016 Dec 4;14(1):10.
6. Hannibal RL, Patel NH. What is a segment? *Evodevo*. BioMed Central; 2013 Dec 17;4(1):35.
7. Liao B-K, Oates AC. Delta-Notch signalling in segmentation. *Arthropod Struct Dev*. Elsevier; 2017 May 1;46(3):429–47.
8. Magalhães LG, Morais ER, Machado CB, Gomes MS, Cabral FJ, Souza JM, et al. Uncovering Notch pathway in the parasitic flatworm *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res*. 2016 Oct 25;115(10):3951–61.
9. Münder S, Tischer S, Grundhuber M, Büchels N, Bruckmeier N, Eckert S, et al. Notch-signalling is required for head regeneration and tentacle patterning in *Hydra*. *Dev Biol*. 2013 Nov 1;383(1):146–57.
10. Tsai IJ, Zarowiecki M, Holroyd N, Garciarribio A, Sanchez-Flores A, Brooks KL, et al. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature*. Nature Publishing Group; 2013 Apr 13;496(7443):57–63.
11. Herz M, Brehm K. Evidence for densovirus integrations into tapeworm genomes. *Parasites and Vectors*. BioMed Central Ltd.; 2019 Nov 27;12(1):560.
12. Rozario T, Quinn EB, Wang J, Davis RE, Newmark PA. Region-specific regulation of stem cell-driven regeneration in tapeworms. *Elife*. eLife Sciences Publications Ltd; 2019 Sep 1;8.
13. Garcia HH, Del Brutto OH. Neurocysticercosis: updated concepts about an old disease. *Lancet Neurol*. 2005 Oct;4(10):653–61.
14. Garcia HH, Nash TE, Del Brutto OH. Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *Lancet Neurol*. 2014 Dec;13(12):1202–15.
15. Machado-Pinto J, Laborne L. Cestodes. In: *Tropical Dermatology: Second Edition*. Elsevier Inc.; 2016. p. 79–81.
16. Singhi P, GAHLOT A. Pediatric neurocysticercosis: current challenges and future prospects. *Pediatr Heal Med Ther*. Dove Medical Press Ltd.; 2016 Mar;7:5.
17. Prodjinotho UF, Lema J, Lacorcía M, Schmidt V, Vejzagic N, Sikasunge C, et al. Host immune responses during *Taenia solium* Neurocysticercosis infection and treatment. Vol. 14, *PLoS neglected tropical diseases*. NLM (Medline); 2020. p. e0008005.
18. Del Brutto OH, Nash TE, White AC, Rajshekhar V, Wilkins PP, Singh G, et al. Revised diagnostic criteria for neurocysticercosis. Vol. 372, *Journal of the Neurological Sciences*. Elsevier B.V.; 2017. p. 202–10.

19. Del Brutto OH. Twenty-five years of evolution of standard diagnostic criteria for neurocysticercosis. How have they impacted diagnosis and patient outcomes? Vol. 20, Expert Review of Neurotherapeutics. Taylor and Francis Ltd; 2020. p. 147–55.
20. Gonzalez AE, Codd EE, Horton J, Garcia HH, Gilman RH. Oxfendazole: a promising agent for the treatment and control of helminth infections in humans. Vol. 17, Expert Review of Anti-Infective Therapy. Taylor and Francis Ltd; 2019. p. 51–6.
21. Prevention C-C for DC and. CDC - Cysticercosis - Resources for Health Professionals. 2020;
22. Clinton White A, Fleury A. Optimal treatment for subarachnoid neurocysticercosis: Closer, but not there yet. Vol. 102, American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2020. p. 1–2.
23. Larsson K, Jondelius U. Phylogeny of Catenulida and support for Platyhelminthes. Org Divers Evol. Springer Verlag; 2008 Dec 20;8(5):378–87.
24. Egger B, Lapraz F, Tomiczek B, Müller S, Dessimoz C, Girstmair J, et al. A transcriptomic-phylogenomic analysis of the evolutionary relationships of flatworms. Curr Biol. Cell Press; 2015 May 18;25(10):1347–53.
25. Rozario T, Newmark PA. A confocal microscopy-based atlas of tissue architecture in the tapeworm *Hymenolepis diminuta*. Exp Parasitol. Academic Press; 2015 Nov 1;158:31–41.
26. Collins JJ, King RS, Cogswell A, Williams DL, Newmark PA. An Atlas for *Schistosoma mansoni* Organs and Life-Cycle Stages Using Cell Type-Specific Markers and Confocal Microscopy. Knight M, editor. PLoS Negl Trop Dis. Public Library of Science; 2011 Mar 8;5(3):e1009.
27. Chong T, Stary JM, Wang Y, Newmark PA. Molecular markers to characterize the hermaphroditic reproductive system of the planarian *Schmidtea mediterranea*. BMC Dev Biol. BioMed Central; 2011 Nov;11(1):69.
28. Reddien PW. The Cellular and Molecular Basis for Planarian Regeneration. Vol. 175, Cell. Cell Press; 2018. p. 327–45.
29. Ivankovic M, Haneckova R, Thommen A, Grohme MA, Vila-Farré M, Werner S, et al. Model systems for regeneration: Planarians. Dev. Company of Biologists Ltd; 2019;146(17).
30. Zeng A, Li H, Guo L, Gao X, McKinney S, Wang Y, et al. Prospectively Isolated Tetraspanin + Neoblasts Are Adult Pluripotent Stem Cells Underlying Planaria Regeneration. Cell. Cell Press; 2018 Jun 14;173(7):1593-1608.e20.
31. Newmark PA, Sánchez Alvarado A. Bromodeoxyuridine Specifically Labels the Regenerative Stem Cells of Planarians. Dev Biol. 2000 Apr 15;220(2):142–53.
32. Reddien PW, Alvarado AS. FUNDAMENTALS OF PLANARIAN REGENERATION. Annu Rev Cell Dev Biol. Annual Reviews; 2004 Nov 8;20(1):725–57.
33. Van Wolfswinkel JC, Wagner DE, Reddien PW. Single-cell analysis reveals functionally distinct classes within the planarian stem cell compartment. Cell Stem Cell. Cell Press; 2014 Sep 4;15(3):326–39.
34. Kim I V., Riedelbauch S, Kuhn CD. The piRNA pathway in planarian flatworms: New model, new insights. Biol Chem. De Gruyter; 2020;
35. Espinoza I, Galindo M, Bizarro CV, Ferreira HB, Zaha A, Galanti N. Early post-larval development of the endoparasitic platyhelminth *Mesocestoides corti*: Trypsin provokes reversible tegumental damage leading to serum-induced cell proliferation and growth. J Cell Physiol. 2005 Nov;205(2):211–7.

36. Koziol U, Domínguez MF, Marín M, Kun A, Castillo E. Stem cell proliferation during in vitro development of the model cestode *Mesocestoides corti* from larva to adult worm. *Front Zool.* 2010 Jul 13;7(1):22.
37. Koziol U, Rauschendorfer T, Zanon Rodríguez L, Krohne G, Brehm K. The unique stem cell system of the immortal larva of the human parasite *Echinococcus multilocularis*. *Evodevo.* BioMed Central; 2014 Mar;5(1):10.
38. Albani CM, Cumino AC, Elissondo MC, Denegri GM. Development of a cell line from *Echinococcus granulosus* germinal layer. *Acta Trop.* 2013 Oct 13;128(1):124–9.
39. Albani CM, Elissondo MC, Cumino AC, Chisari A, Denegri GM. Primary cell culture of *Echinococcus granulosus* developed from the cystic germinal layer: Biological and functional characterization. *Int J Parasitol.* 2010 Sep;40(11):1269–75.
40. Echeverría CI, Isolabella DM, Gonzalez EAP, Leonardelli A, Prada L, Perrone A, et al. Morphological and biological characterization of cell line developed from bovine *Echinococcus granulosus*. *Vitr Cell Dev Biol - Anim.* Springer; 2010 Oct 16;46(9):781–92.
41. Orrego-Solano MÁ, Cangalaya C, Nash TE, Guerra-Giraldez C. Identification of proliferating cells in *Taenia solium* cysts. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* NIH Public Access; 2014;31(4):702–6.
42. Orrego Solano MA. Distribución de células germinativas y perfil de expresión de genes asociados a proliferación en quistes racemosos de *Taenia solium*. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2017.
43. Mahale RR, Mehta A, Rangasetty S. Extraparenchymal (Racemose) Neurocysticercosis and Its Multitude Manifestations: A Comprehensive Review. *J Clin Neurol.* Korean Neurological Association; 2015 Jul;11(3):203–11.
44. Bickerstaff ER, Cloake PCP, Hughes B, Smith WT. The racemose form of cerebral cysticercosis. *Brain.* 1952 Mar;75(1):1–18.
45. Cunningham LJ, Olson PD. Description of *Hymenolepis microstoma* (Nottingham strain): A classical tapeworm model for research in the genomic era. *Parasites and Vectors.* BioMed Central; 2010;3(1):123.
46. Camargo de Lima J, Caracciolo ME, Lima LR, Lopes-Torres EJ, Ferreira HB. Morphological and ultrastructural features of *Mesocestoides corti* during in vitro differentiation from larva to adult worm. Vol. 26, *Clinical Microbiology and Infection.* Elsevier B.V.; 2020. p. 325–6.
47. Camargo de Lima J, Floriani MA, Debarba JA, Paludo GP, Monteiro KM, Moura H, et al. Dynamics of protein synthesis in the initial steps of strobilation in the model cestode parasite *Mesocestoides corti* (syn. *vogae*). *J Proteomics.* Elsevier B.V.; 2020 Sep 30;228:103939.
48. Markoski MM, Bizarro C V., Farias S, Espinoza I, Galanti N, Zaha A, et al. In vitro segmentation induction of *Mesocestoides corti* (cestoda) tetrathyridia. *J Parasitol.* 2003 Feb 1;89(1):27–34.
49. Koziol U, Domínguez MF, Marín M, Kun A, Castillo E. Stem cell proliferation during in vitro development of the model cestode *Mesocestoides corti* from larva to adult worm. *Front Zool.* 2010 Jul;7(1):22.
50. Chang SL, Nonaka N, Kamiya M, Kanai Y, Ooi HK, Chung WC, et al. Development of *Taenia saginata asiatica* metacestodes in SCID mice and its infectivity in human and alternative definitive hosts. *Parasitol Res.* Parasitol Res; 2005 May;96(2):95–101.
51. Chile N, Clark T, Arana Y, Ortega YR, Palma S, Mejia A, et al. In Vitro Study of *Taenia*

- solium* Postoncospherical Form. PLoS Negl Trop Dis. Public Library of Science; 2016 Feb 10;10(2).
52. Palma S, Chile N, Carmen-Orozco RP, Trompeter G, Fishbeck K, Cooper V, et al. In vitro model of postoncosphere development, and in vivo infection abilities of *Taenia solium* and *Taenia saginata*. Dalton JP, editor. PLoS Negl Trop Dis. Public Library of Science; 2019 Mar 14;13(3):e0007261.
 53. Siles-Lucas M, Hemphill A. Cestode parasites: Application of in vivo and in vitro models for studies on the host-parasite relationship. Vol. 51, *Advances in Parasitology*. Academic Press; 2002. p. 133–230.
 54. Sulima A, Savijoki K, Bien J, Näreaho A, Salamatin R, Conn DB, et al. Comparative proteomic analysis of *Hymenolepis diminuta* cysticercoid and adult stages. *Front Microbiol*. Frontiers Media S.A.; 2018 Jan 15;8(JAN):2672.
 55. Campbell WC. The Efficacy of Surface-Active Agents in Stimulating the Evagination of *Cysticerci* In vitro. *J Parasitol*. Allen PressThe American Society of Parasitologists; 1963 Feb;49(1):81.
 56. Rabiela MT, Hornelas Y, García-Allan C, Rodríguez-del-Rosal E, Flisser A. Evagination of *Taenia solium* cysticerci: A histologic and electron microscopy study. *Arch Med Res*. 2000 Dec;31(6):605–7.
 57. Kawamoto F, Fujioka H, Kumada N. Studies on the post-larval development of cestodes of the genus *Mesocestoides*: Trypsin-induced development of *M. lineatus* in vitro. *Int J Parasitol*. Pergamon; 1986 Aug 1;16(4):333–40.
 58. Cervantes-Vazquez M, Correa D, Merchant M, Hicks JJ, Lac lette JP. Respiratory changes associated with the in vitro evagination of *Taenia solium* cysticerci. *J Parasitol*. 1990;76(1):108–12.
 59. Goodchild CG, Davis BO. *Hymenolepis microstoma* cysticercoid activation and excystation in vitro (Cestoda). *J Parasitol*. 1972;58(4):735–41.
 60. Escobedo G, Camacho-Arroyo I, Hernández-Hernández OT, Ostoa-Saloma P, García-Varela M, Morales-Montor J. Progesterone induces scolex evagination of the human parasite *taenia solium*: Evolutionary implications to the host-parasite relationship. *J Biomed Biotechnol*. Hindawi Publishing Corporation; 2010;2010.
 61. Díaz-Orea MA, de Aluja AS, de L'Erosa M, Gomez-Conde E, Castellanos Sánchez VO, Willms K, et al. Different Effects of Chorionic Gonadotropin on *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* Cysticerci Cultured In Vitro. *J Parasitol*. 2007 Dec;93(6):1518–20.
 62. Bray SJ. Notch signalling in context. Vol. 17, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group; 2016. p. 722–35.
 63. Sjöqvist M, Andersson ER. Do as I say, Not(ch) as I do: Lateral control of cell fate. Vol. 447, *Developmental Biology*. Elsevier Inc.; 2019. p. 58–70.
 64. Faló-Sanjuan J, Bray SJ. Decoding the Notch signal. *Dev Growth Differ*. Blackwell Publishing; 2020 Jan 30;62(1):4–14.
 65. Reichrath J, Reichrath S. A Snapshot of the Molecular Biology of Notch Signaling: Challenges and Promises. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer; 2020. p. 1–7.
 66. Meisel CT, Porcheri C, Mitsiadis TA. Cancer Stem Cells, Quo Vadis? The Notch Signaling Pathway in Tumor Initiation and Progression. Vol. 9, *Cells*. NLM (Medline); 2020.
 67. Groth C, Fortini ME. Therapeutic approaches to modulating Notch signaling: Current

- challenges and future prospects. Vol. 23, *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd; 2012. p. 465–72.
68. Lehal R, Zanic J, Vigolo M, Urech C, Frisimantas V, Zangger N, et al. Pharmacological disruption of the Notch transcription factor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A. National Academy of Sciences*; 2020 Jul 14;117(28):16292–301.
 69. Greenwald Iva KR. Notch signaling: genetics and structure [Internet]. [cited 2020 Oct 14]. Available from: http://www.wormbook.org/chapters/www_lin12Notch.2/notchsignaling.html
 70. KEGG PATHWAY: Notch signaling pathway - Homo sapiens (human) [Internet]. [cited 2020 Oct 14]. Available from: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04330
 71. Watanabe Y, Miyasaka KY, Kubo A, Kida YS, Nakagawa O, Hirate Y, et al. Notch and Hippo signaling converge on Strawberry Notch 1 (Sbno1) to synergistically activate Cdx2 during specification of the trophoderm. *Sci Rep. Nature Publishing Group*; 2017 Apr 12;7(1):1–17.
 72. Pueyo JI, Lanfear R, Couso JP. Ancestral Notch-mediated segmentation revealed in the cockroach *Periplaneta americana*. *Proc Natl Acad Sci U S A. National Academy of Sciences*; 2008 Oct 28;105(43):16614–9.
 73. Ferjentsik Z, Hayashi S, Dale JK, Bessho Y, Herreman A, De Strooper B, et al. Notch Is a Critical Component of the Mouse Somitogenesis Oscillator and Is Essential for the Formation of the Somites. Henry CA, editor. *PLoS Genet. Public Library of Science*; 2009 Sep 25;5(9):e1000662.
 74. Soza-Ried C, Ozturk E, Ish-Horowicz D, Lewis J. Pulses of Notch activation synchronise oscillating somite cells and entrain the zebrafish segmentation clock. *Development*. 2014 Apr 15;141(8):1780–8.
 75. Hamada H, Watanabe M, Lau HE, Nishida T, Hasegawa T, Parichy DM, et al. Involvement of Delta/Notch signaling in zebrafish adult pigment stripe patterning. *Dev. Company of Biologists*; 2014 Jan 15;141(2):318–24.
 76. Münder S, Käsbauer T, Prexl A, Aufschnaiter R, Zhang X, Towb P, et al. Notch signalling defines critical boundary during budding in *Hydra*. *Dev Biol*. 2010 Aug 1;344(1):331–45.
 77. Stollewerk A, Schoppmeier M, Damen WGM. Involvement of Notch and Delta genes in spider segmentation. *Nature. Nature*; 2003 Jun 19;423(6942):863–5.
 78. Wolfe MS. Structure and Function of the γ -Secretase Complex. *Biochemistry. American Chemical Society*; 2019 Jul 9;58(27):2953–66.
 79. Barthet G, Shioi J, Shao Z, Ren Y, Georgakopoulos A, Robakis NK. Inhibitors of γ -secretase stabilize the complex and differentially affect processing of amyloid precursor protein and other substrates. *FASEB J. Wiley*; 2011 Sep;25(9):2937–46.
 80. Hitzenberger M, Götz A, Menig S, Brunschweiler B, Zacharias M, Scharnagl C. The dynamics of γ -secretase and its substrates. Vol. 105, *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd; 2020. p. 86–101.
 81. Güner G, Lichtenthaler SF. The substrate repertoire of γ -secretase/presenilin. Vol. 105, *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd; 2020. p. 27–42.
 82. Wolfe MS. Unlocking truths of γ -secretase in Alzheimer’s disease: What is the translational potential? Vol. 9, *Future Neurology. Future Medicine Ltd.*; 2014. p. 419–29.
 83. Zhao J, Liu X, Xia W, Zhang Y, Wang C. Targeting Amyloidogenic Processing of APP in Alzheimer’s Disease. Vol. 13, *Frontiers in Molecular Neuroscience. Frontiers Media S.A.*;

2020.

84. Wan X, Liu C, Lin Y, Fu J, Lu G, Lu Z. pH sensitive peptide functionalized nanoparticles for co-delivery of erlotinib and DAPT to restrict the progress of triple negative breast cancer. *Drug Deliv.* Taylor and Francis Ltd; 2019 Jan 1;26(1):470–80.
85. Dai G, Deng S, Guo W, Yu L, Yang J, Zhou S, et al. Notch pathway inhibition using DAPT, a γ -secretase inhibitor (GSI), enhances the antitumor effect of cisplatin in resistant osteosarcoma. *Mol Carcinog.* John Wiley and Sons Inc.; 2019 Jan 1;58(1):3–18.
86. Habets RA, De Bock CE, Serneels L, Lodewijckx I, Verbeke D, Nittner D, et al. Safe targeting of T cell acute lymphoblastic leukemia by pathology-specific NOTCH inhibition. *Sci Transl Med.* American Association for the Advancement of Science; 2019 May 29;11(494):6246.
87. Fortini ME. Notch Signaling: The Core Pathway and Its Posttranslational Regulation. Vol. 16, *Developmental Cell.* Dev Cell; 2009. p. 633–47.
88. Kageyama R, Ohtsuka T, Kobayashi T. The Hes gene family: Repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. *Development.* The Company of Biologists Ltd; 2007 Apr 1;134(7):1243–51.
89. Moore R, Alexandre P. Delta-notch signaling: The long and the short of a neuron's influence on progenitor fates. *J Dev Biol.* J Dev Biol.; 2020;8(2):8.
90. Arefin B, Parvin F, Bahrapour S, Stadler CB, Thor S. Drosophila Neuroblast Selection Is Gated by Notch, Snail, SoxB, and EMT Gene Interplay. *Cell Rep.* Elsevier B.V.; 2019 Dec 10;29(11):3636–3651.e3.
91. Kobayashi T, Kageyama R. Expression dynamics and functions of hes factors in development and diseases. *Curr Top Dev Biol.* 2014;110:263–83.
92. Kiernan AE. Notch signaling during cell fate determination in the inner ear. *Semin Cell Dev Biol.* 2013 May;24(5):470–9.
93. Liu J, Sato C, Cerletti M, Wagers A. Notch Signaling in the Regulation of Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. *Curr Top Dev Biol.* 2010;92:367–409.
94. Özbudak EM, Lewis J. Notch Signalling Synchronizes the Zebrafish Segmentation Clock but Is Not Needed To Create Somite Boundaries. *PLoS Genet.* 2008;4(2):e15.
95. Münch J, González-Rajal A, de la Pompa JL. Notch regulates blastema proliferation and prevents differentiation during adult zebrafish fin regeneration. *Dev. Development;* 2013 Apr 1;140(7):1402–11.
96. Chipman AD, Akam M. The segmentation cascade in the centipede *Strigamia maritima*: Involvement of the Notch pathway and pair-rule gene homologues. *Dev Biol.* Academic Press; 2008 Jul 1;319(1):160–9.
97. Tapanes-Castillo A, Baylies MK. Notch signaling patterns *Drosophila* mesodermal segments by regulating the bHLH transcription factor twist. *Development.* The Company of Biologists Ltd; 2004 May 15;131(10):2359–72.
98. Mashanov V, Akiona J, Khoury M, Ferrier J, Reid R, Machado DJ, et al. Active Notch signaling is required for arm regeneration in a brittle star. Reh TA, editor. *PLoS One.* Public Library of Science; 2020 May 12;15(5):e0232981.
99. Reinardy HC, Emerson CE, Manley JM, Bodnar AG. Tissue regeneration and biomineralization in sea urchins: Role of Notch signaling and presence of stem cell markers. *PLoS One.* Public Library of Science; 2015 Aug 12;10(8).

100. Elliott SA. Studies of Conserved Cell-Cell Signaling Pathways in the Planarian, *Schmidtea mediterranea*. University of Utah; 2016.
101. Wenemoser D, Lapan SW, Wilkinson AW, Bell GW, Reddien PW. A molecular wound response program associated with regeneration initiation in planarians. *Genes Dev*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012 May 1;26(9):988–1002.
102. Cowles MW, Brown DDR, Nisperos S V., Stanley BN, Pearson BJ, Zayas RM. Genome-wide analysis of the bHLH gene family in planarians identifies factors required for adult neurogenesis and neuronal regeneration. *Dev. Development*; 2013 Dec 1;140(23):4691–702.
103. Sasidharan V, Marepally S, Elliott SA, Baid S, Lakshmanan V, Nayyar N, et al. The miR-124 family of microRNAs is crucial for regeneration of the brain and visual system in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Dev. Company of Biologists Ltd*; 2017;144(18):3211–23.
104. Dezaki ES, Yaghoobi MM, Taheri E, Almani PG, Tohidi F, Gottstein B, et al. Differential Expression of Hox and Notch Genes in Larval and Adult Stages of *Echinococcus granulosus*. *Korean J Parasitol*. 2016 Oct 31;54(5):653–8.
105. Manske M, Böhme U, Püthe C, Berriman M. GeneDB and wikidata [version 2; peer review: 2 approved]. *Wellcome Open Res*. F1000 Research Ltd; 2019;4.
106. Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol Biol*. BioMed Central; 2006;7:33.
107. Koziol U, Lalanne AI, Castillo E. Hox Genes in the Parasitic Platyhelminthes *Mesocostoides corti*, *Echinococcus multilocularis*, and *Schistosoma mansoni*: Evidence for a Reduced Hox Complement. *Biochem Genet*. 2009 Feb 22;47(1–2):100–16.
108. Rivera AS, Weisblat DA. Annelid Lophotrochozoa makes three: Notch/Hes signaling in annelid segmentation. *Dev Genes Evol*. *Dev Genes Evol*; 2009;219(1):37–43.
109. Tiemeijer LA, Frimat JP, Stassen OMJA, Bouten CVC, Sahlgren CM. Spatial patterning of the Notch ligand Dll4 controls endothelial sprouting in vitro. *Sci Rep*. Nature Publishing Group; 2018 Dec 1;8(1).
110. Zhao L, Xu Y, Tao L, Yang Y, Shen X, Li L, et al. Oxymatrine inhibits transforming growth factor β 1 (TGF- β 1)-induced cardiac fibroblast-to-myofibroblast transformation (FMT) by mediating the notch signaling pathway in vitro. *Med Sci Monit*. International Scientific Information, Inc.; 2018 Sep 9;24:6280–8.
111. LaFoya B, Munroe JA, Mia MM, Detweiler MA, Crow JJ, Wood T, et al. Notch: A multi-functional integrating system of microenvironmental signals. Vol. 418, *Developmental Biology*. Academic Press Inc.; 2016. p. 227–41.
112. Paludo GP, Thompson CE, Miyamoto KN, Guedes RLM, Zaha A, De Vasconcelos ATR, et al. Cestode strobilation: Prediction of developmental genes and pathways. *BMC Genomics*. BioMed Central; 2020 Jul 16;21(1).
113. Zhou J, Jain S, Azad AK, Xu X, Yu HC, Xu Z, et al. Notch and TGF β form a positive regulatory loop and regulate EMT in epithelial ovarian cancer cells. *Cell Signal*. Elsevier Inc.; 2016 Aug 1;28(8):838–49.
114. Roma J, Almazán-Moga A, Sánchez de Toledo J, Gallego S. *Notch*, *Wnt*, and *Hedgehog* Pathways in Rhabdomyosarcoma: From Single Pathways to an Integrated Network. *Sarcoma*. 2012;2012:1–7.
115. Luo K. Signaling cross talk between TGF- β /Smad and other signaling pathways. Vol. 9, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2017.

116. Wöltje K, Jabs M, Fischer A. Serum Induces transcription of Hey1 and Hey2 genes by Alk1 but not notch signaling in endothelial cells. *PLoS One*. Public Library of Science; 2015 Mar 23;10(3).
117. Zhou YX, Armstrong RC. Interaction of fibroblast growth factor 2 (FGF2) and notch signaling components in inhibition of oligodendrocyte progenitor (OP) differentiation. *Neurosci Lett*. NIH Public Access; 2007 Jun 21;421(1):27–32.
118. Akai J, Halley PA, Storey KG. FGF-dependent Notch signaling maintains the spinal cord stem zone. *Genes Dev*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2005 Dec 1;19(23):2877–87.
119. Lee S, Das HK. Inhibition of basal activity of c-jun-NH2-terminal kinase (JNK) represses the expression of presenilin-1 by a p53-dependent mechanism. *Brain Res*. Brain Res; 2008 May 1;1207:19–31.
120. Rahman M, Zhang Z, Mody AA, Su DM, Das HK. Intraperitoneal injection of JNK-specific inhibitor SP600125 inhibits the expression of presenilin-1 and Notch signaling in mouse brain without induction of apoptosis. *Brain Res*. 2012 Apr 11;1448:117–28.
121. Jurisch-Yaksi N, Sannerud R, Annaert W. A fast growing spectrum of biological functions of γ -secretase in development and disease. Vol. 1828, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. Elsevier B.V.; 2013. p. 2815–27.
122. Cheng YC, Chiang MC, Shih HY, Ma TL, Yeh TH, Huang YC, et al. The transcription factor hairy/E(spl)-related 2 induces proliferation of neural progenitors and regulates neurogenesis and gliogenesis. *Dev Biol*. Academic Press Inc.; 2015 Jan 1;397(1):116–28.
123. Rozario T, Quinn EB, Wang J, Davis RA, Newmark PA. Region-specific regulation of stem cell-driven regeneration in tapeworms. *bioRxiv*. Cold Spring Harbor Laboratory; 2018 Dec 13;495234.
124. Zheng X, Baker H, Hancock WS, Fawaz F, McCaman M, Pungor E. Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. Part IV. Application of proteomics to the manufacture of biological drugs. *Biotechnol Prog*. Biotechnol Prog; 2006 Sep;22(5):1294–300.
125. Adalid-Peralta L, Rosas G, Arce-Sillas A, Bobes RJ, Cárdenas G, Hernández M, et al. Effect of transforming growth factor- β upon taenia solium and taenia crassiceps cysticerci. *Sci Rep*. Nature Publishing Group; 2017 Dec 1;7(1).
126. Zhang H-M, Liu P, Jiang C, Jin X-Q, Liu R-N, Li S-Q, et al. Notch signaling inhibitor DAPT provides protection against acute craniocerebral injury. Boltze J, editor. *PLoS One*. Public Library of Science; 2018 Feb 15;13(2):e0193037.
127. Carrieri FA, Murray PJ, Ditsova D, Ferris MA, Davies P, Dale JK. CDK 1 and CDK 2 regulate NICD 1 turnover and the periodicity of the segmentation clock. *EMBO Rep*. EMBO; 2019 Jul;20(7).
128. Mousavi SM, Afsar A, Mohammadi MA, Mortezaei S, Faridi A, Sadeghi B, et al. Biological and morphological consequences of dsRNA-induced suppression of tetraspanin mRNA in developmental stages of *Echinococcus granulosus*. *Parasites and Vectors*. BioMed Central Ltd.; 2020 Apr 10;13(1).

ANEXOS

I Diseño de cebadores y evaluación de la eficiencia de la PCR

La Tabla A1 presenta números de acceso, cantidad de aminoácidos y porcentaje de identidad de los ocho genes de *T. solium* elegidos por su homología con los de *H. microstoma* (proyecto PRJEB124 en [WormBase ParaSite](#)). La identificación se corroboró con un [análisis de dominios conservados](#) (NCBI); Figura A1. Con Su(H) no se obtuvo buena amplificación.

Las secuencias correspondientes a estos genes sirvieron para diseñar cebadores (Tabla A2); su eficiencia en qPCR se aprecia en la Figura A2 y la Tabla A3.

Tabla A1. Modelos de genes de *T. solium* homólogos a genes de *H. microstoma*.

	Nombre	Número de acceso	Número de aminoácidos	Número de acceso	Número de aminoácidos	Porcentaje de identidad
Ligando	Delta1	HmN_000055700	774	TsM_001147200	411	68.15
Receptor	Notch1	HmN_000653600	2248	TsM_001107200	1616	58.65
	Notch2	HmN_000853800	1335	TsM_001189000	1283	70.44
Gamma secretase	Presenilin	HmN_000031500	520	TsM_000841900	490	58.92
	Nicastrin	HmN_000242800	677	TsM_000052500	412	59.47
Factor de transcripción	Su(H)	HmN_000214100	1047	TsM_000119200	1726	73.76
	Su(H)	HmN_000214100.1	1174		1726	64.72
Co represor	Strawberry	HmN_000629700	1655	TsM_000989000	1742	54.46
	Notch					
Efactor	Hes2	HmN_000343800	297	TsM_000675000	402	42.82

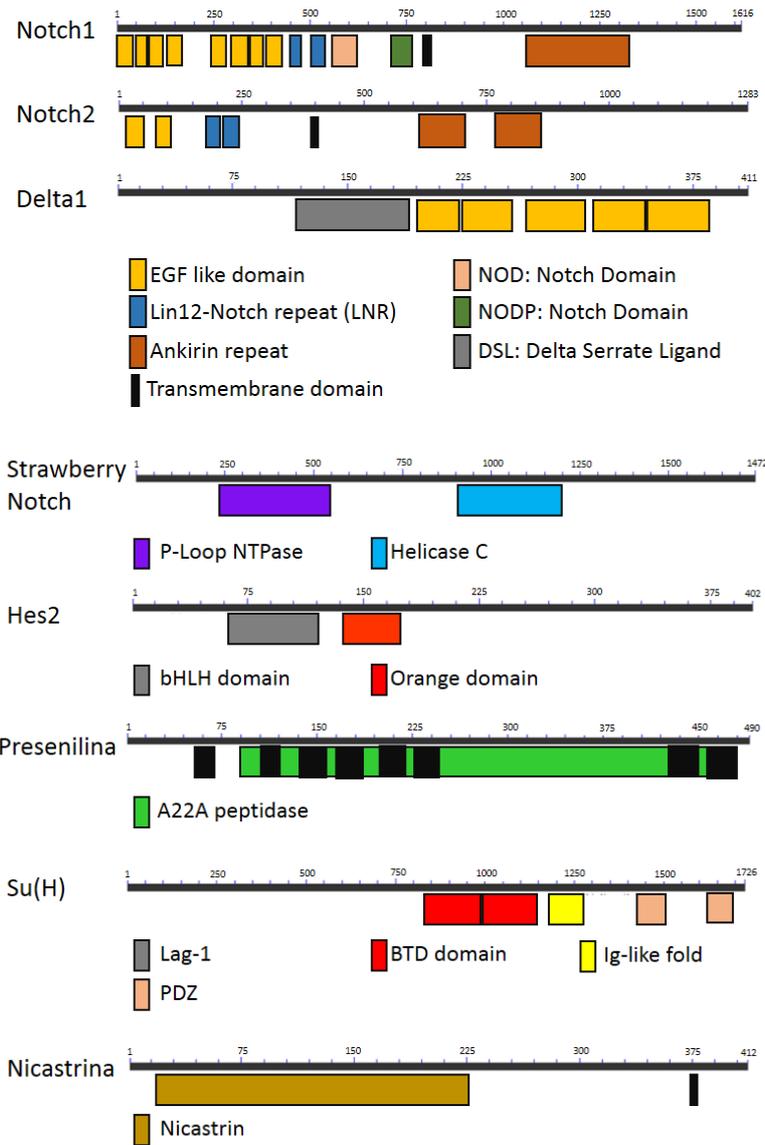


Figura A1. Dominios conservados en proteínas de la vía Notch identificadas en *T. solium*

Tabla A2. Cebadores (“forward”, F; “reverse”, R) diseñados para genes de la vía de señalización Notch y candidatos a genes de referencia en *T. solium*

Gen de interés		Cebadores (5' → 3')	Accession number (GeneDB)
<i>notch1</i>	F R	TCTCCCAACATCAACATTAC TTCCTCACAACTGAAGTGAC	TsM_001107200
<i>notch 2</i>	F R	CTGCATTTCGTCTCAACCTCTC TCCAGGCAGACATACGATTC	TsM_001188900
<i>delta 1</i>	F R	CTGCATTTCGTCTCAACCTCTC TCCAGGCAGACATACGATTC	TsM_001147200
<i>sno</i>	F R	CGACGACGACGATGATGATG TGTTTCGCTTCACACCACCAC	TsM_000989000
<i>presenilin</i>	F R	CTAACGATTTAAGCCTTG TG TTAGCGTTCTCTGACAGTTC	TsM_000841900
<i>nicastrin</i>	F R	TCATCGTTTGAAAGAGTGTC AGGAAGAAGAAGGATGTGAC	TsM_000052500
<i>hes2</i>	F R	CGTCCTGGCGGCATAATTC TGCATCCACCTGTGCTCATC	TsM_000675000
<i>su(h)</i>	F R	ACTGAGGTGCTGCTTGAGTG GAAGCCTCCTTCGTCAACAG	TsM_000119200
<i>gapdh</i>	F R	TCCAAGAGATGAATGCCAATGC CAGAAGGAGCCGAGATGATGA	TsM_000056400
<i>b-actin 2</i>	F R	GTGCGAGACATCAAGGAGAAG GGAAGCGTTCATTGCCAACT	TsM_001001400
<i>cox-1</i>	F R	CCGTTAGGAGGTGGTGATCC ACCCATAAAAGCCAAAAGCA	TsM_000401000
<i>histona h2b1</i>	F R	ATGATGAGGGATGGAAAGTG CCTTG TAGATGTAGGTAGCGTAG	TsM_000110200

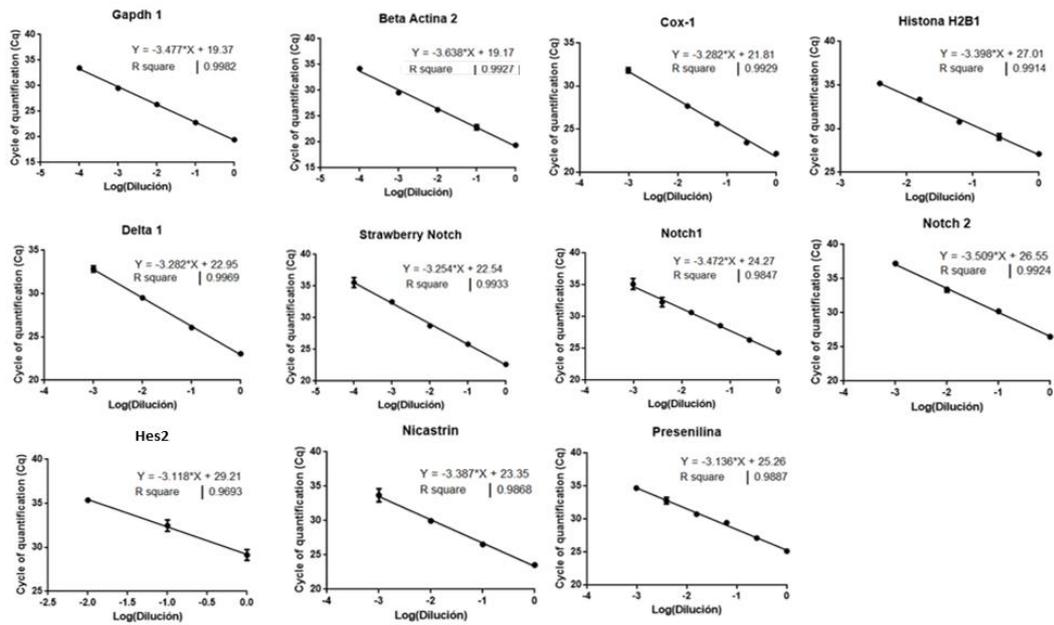


Figura A2. Curvas de eficiencia en qPCR. Se utilizaron diluciones seriadas de ADNc de *T. solium*.

Tabla A3. Eficiencia de qPCR por gen de interés y de referencia. Datos obtenidos de la figura A2.

Gen	Eficiencia de PCR (%)	Gen	Eficiencia de PCR (%)
<i>notch 1</i>	93,01	<i>gapdh</i>	94,17
<i>notch 2</i>	108,6	<i>b-actin 1</i>	90,60
<i>delta 1</i>	101,68	<i>cox-1</i>	101,77
<i>hes2</i>	109,26	<i>histona h2b1</i>	96,95
<i>sno</i>	102,91	<i>su(h)</i>	Baja expresión
<i>presenilin</i>	108,52	-----	-----
<i>nicastrin</i>	97,35	-----	-----

II. Cuantificación y visualización de ARN

Se presentan las concentraciones y calidad de las muestras (Tablas A4 y A5), así como un gel de agarosa (Figura A2).

Tabla A4. Cuantificación de ARN total del Experimento 1. El primer número del código representa las horas en cultivo. La letra representa el tratamiento. A: RPMI (Control). B: Ácido taucólico 0.015%. C: DMSO 1%. D: DAPT 10 μ M. E: DAPT 50 μ M. F: DAPT 100 μ M. El último número representa a la unidad experimental.

Código de la muestra	Concentración (ng/ μ L)	OD 260/280	OD 260/230
0A1	117.7	1.80	0.67
0A2	164.7	1.77	0.94
0A3	115.7	1.79	1.02
0A4	178.6	1.77	0.73
0A5	179.5	1.79	1.17
0A6	131.2	1.83	0.44
0A7	108.0	1.82	0.66
0A8	121.4	1.79	0.93
0A9	138.6	1.81	0.55
0A10	92.1	1.83	0.66
120A1	62.7	1.75	0.36
120A2	61.7	1.84	0.32
120A3	39.5	1.78	0.34
120A4	43.2	1.81	1.39
120A5	32.5	1.73	0.41
120B1	72.8	1.82	0.62
120B2	85.4	1.74	0.40
120B3	56.6	1.60	0.25
120B4	61.3	1.65	0.40

Código de la muestra	Concentración (ng/μL)	OD 260/280	OD 260/230
120B5	25.3	1.77	0.70
120C1	40.7	1.79	0.82
120C2	50.7	1.82	0.50
120C3	33.0	1.75	0.33
120C4	72.3	1.85	0.69
120D1	41.5	1.80	1.43
120D2	99.1	1.78	1.14
120D3	72.1	1.84	0.66
120D4	99.3	1.90	0.69
120D5	94.6	1.86	0.98
120E1	95.1	1.85	0.77
120E2	77.3	1.86	0.32
120E3	17.5	1.63	0.39
120E4	25.2	1.74	0.23
120E5	64.3	1.74	0.56
120F1	65.1	1.86	0.21
120F2	46.3	1.84	0.26
120F3	34.0	1.72	0.34
120F4	57.5	1.84	0.21
120F5	65.6	1.73	1.16

Tabla A5. Cuantificación de ARN total del Experimento 2. La extracción de ARN fue realizada por David Castañeda, para una tesis de licenciatura en Biología, por sustentar. ST: Sin tratamiento (RPMI, control, similar a “A” en la Tabla A4). AT: Tratado con ácido taurocólico al 0.1%. El primer número representa el número de horas en cultivo, el último número representa la unidad experimental.

Código de la muestra	Concentración (ng/ μ L)	OD 260/280	OD 260/230
ST24-1	64.0	1.74	0.81
ST24-2	103.8	1.7	0.48
ST24-3	60.4	1.74	0.58
ST24-4	48.6	1.77	0.93
ST24-5	42.0	1.74	0.87
AT24-1	132.0	1.77	1.37
AT24-2	84.5	1.79	0.87
AT24-3	158.3	1.83	0.73
AT24-4	99.2	1.81	1.04
AT24-5	93.6	1.77	0.86
AT24-6	85.6	1.79	1.03
AT120-1	48.1	1.73	0.9
AT120-2	102.9	1.77	1.35
AT120-3	76.6	1.77	1.05
AT120-4	59.6	1.79	0.89
AT120-5	73.4	1.76	1.12

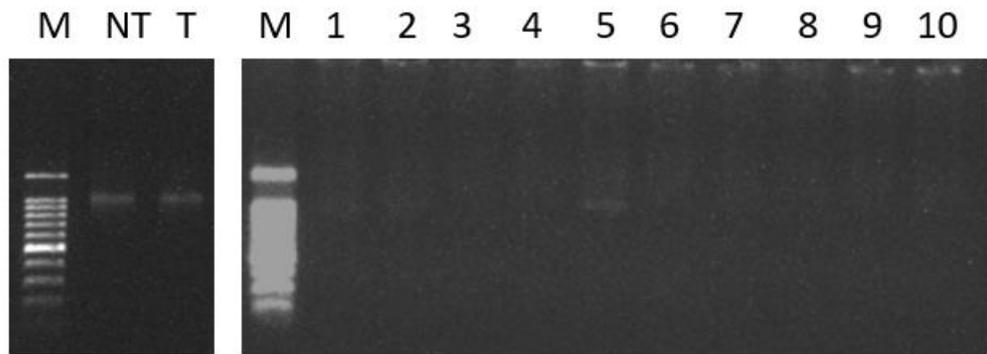


Figura A3. Gel de agarosa en TBE 1X para visualizar ARN total de *T. solium*. La imagen de la izquierda muestra un marcador de 100 pares de bases, NT: 250 ng de ARN extraído no tratado y T: 250 ng de ARN tratado con DNAsa I. En el gel de la derecha se muestran 100 ng de ARN total extraído de las muestras 0A1 a 0A10. Dado el rendimiento de la extracción, se optó por utilizar el ARN extraído directamente en las pruebas de RT-qPCR.

III Selección del gen de referencia

El primer paso fue obtener los valores de Ct de todos los genes candidatos, utilizando todas las muestras del Experimento 1 (Figura A3).

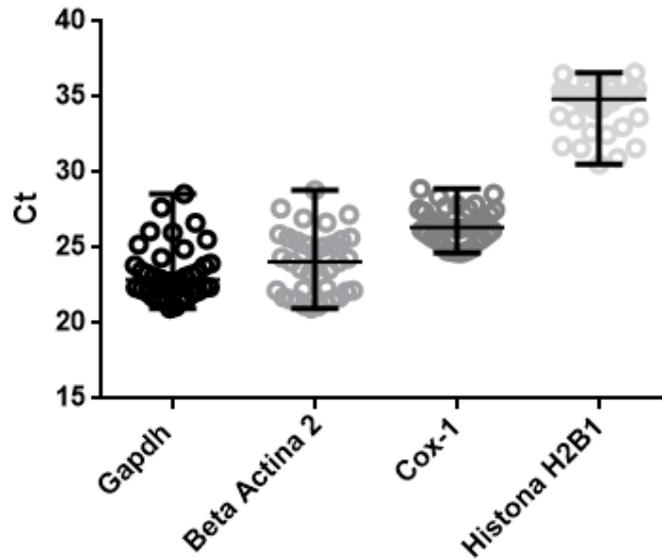


Figura A4. Valores de Ct de los candidatos a genes de referencia sobre todas las muestras. En cada gráfica se indican los percentiles 25, 50 y 75%.

Luego, se aplicó el análisis por Bestkeeper, que determina el mejor gen de referencia en función a la variación de la desviación promedio (SP), covarianza y poder de cada gen (Tabla A6). Según el programa el gen más adecuado como gen de referencia es Cox-1, dado que posee la menor desviación promedio.

Tabla A6. Análisis por BestKeeper.

	<i>gapdh</i>	<i>beta actina</i>	<i>cox-1</i>	<i>histona h2b1</i>
N^o	38	38	38	36
Media geométrica	23.31	23.84	26.42	34.35
Media aritmética	23.38	23.93	26.45	34.39
Valor mínimo	20.99	20.98	24.68	30.53
Valor máximo	28.58	28.83	28.90	36.62
Desv. promedio	1.38	1.74	0.90	1.30
Covarianza	5.91	7.27	3.40	3.77

NormFinder mide la estabilidad de expresión de genes (valor de estabilidad) en base a variaciones en el grupo y entre los grupos para cada gen (Figura A4). Los datos que muestran mayor estabilidad según este método también fueron los de Cox-1.

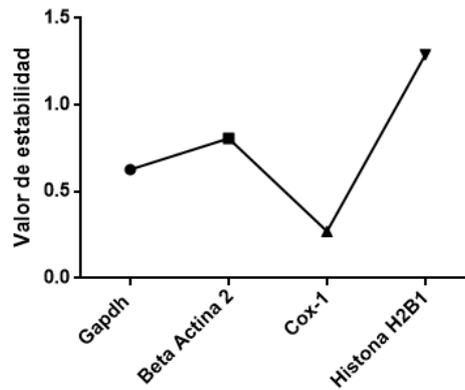


Figura A5. Análisis por NormFinder.

La comparación de ΔC_t descrita por Silver et al. (60) (Figura A5) consiste en formar todos los pares posibles y luego comparar la expresión relativa en cada par de genes para cada una de las muestras. Los datos que muestran menor dispersión en ΔC_t son los del gen *cox-1* (Tabla A7).

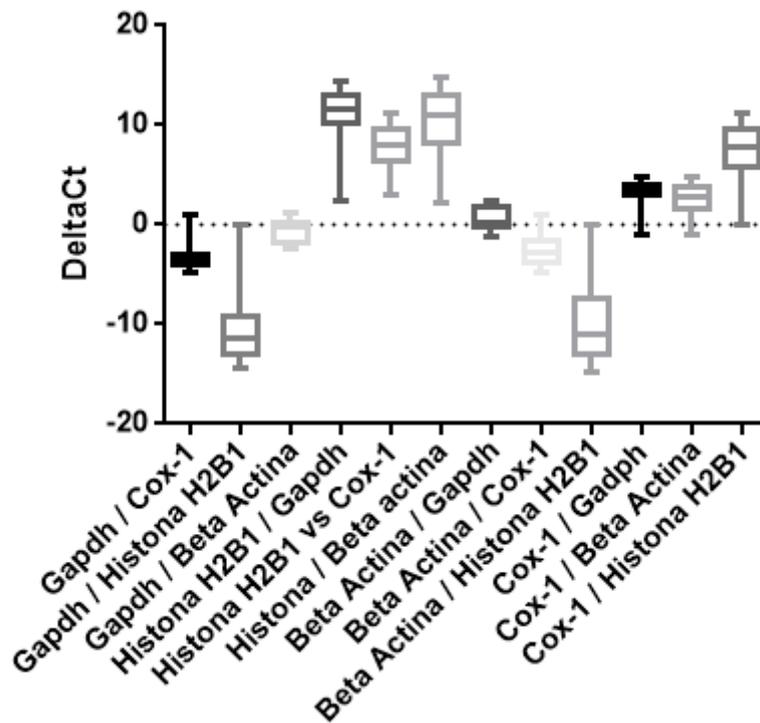


Figura A6. Método comparativo de ΔCt (60)

Tabla A7. Comparación de ΔCt entre genes de referencia candidatos

	Media ΔCt	DesvSt	DesvSt Media
<i>gapdh vs cox-1</i>	-3.07	1.29	2.05
<i>gadph vs histona h2b1</i>	-10.37	3.77	
<i>gadph vs beta actina</i>	-0.59	1.09	
<i>histona h2b1 vs gapdh</i>	10.93	2.94	2.75
<i>histona h2b1 vs cox-1</i>	7.88	2.01	
<i>histona h2b1 vs beta actina</i>	10.31	3.30	
<i>beta actina vs gapdh</i>	0.59	1.09	2.17
<i>beta actina vs cox-1</i>	-2.48	1.46	
<i>beta actina vs histona h2b1</i>	-9.78	3.96	
<i>cox-1 vs gapdh</i>	3.07	1.29	1.79
<i>cox-1 vs beta actina</i>	2.48	1.46	
<i>cox-1 vs histona h2b1</i>	7.88	2.63	

Por último, se utilizó el análisis por geNorm para calcular el promedio de los valores de estabilidad de expresión (M) para cada gen candidato. El gen con el menor valor de M fue Cox-1 (Figura A6).

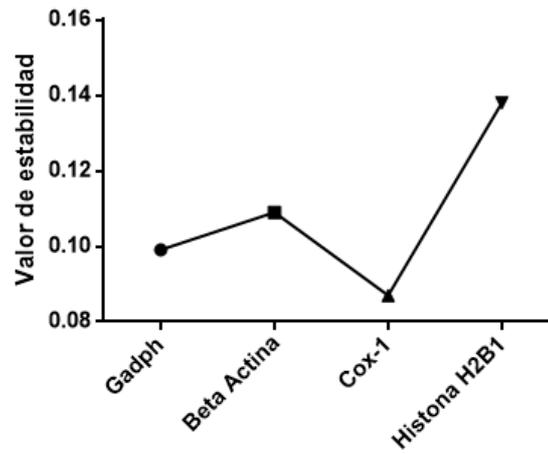


Figura A7. Análisis por geNorm