



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA

**Detección de microRNAs predichos para *Taenia solium* en muestras del
parásito y sus hospederos**

Autor:

Ayme Winny Yupari Aguirre

Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología

Asesora:

Cristina Guerra Giraldez, PhD.

Laboratorio de Inmunopatología en Neurocisticercosis

Lima, Perú

2017

Financiamiento:

La presente tesis se realizó en el marco del proyecto “Evaluación de miRNAs circulantes de *Taenia solium* en suero de cerdos para determinar neurocisticercosis activa” (SIDISI 64211), el cual se encuentra financiado por el PROGRAMA NACIONAL DE INNOVACIÓN PARA LA COMPETITIVIDAD Y PRODUCTIVIDAD (INNÓVATE PERÚ, Convenio N° 190-PNICP-PIAP-2015).

Agradecimientos:

A mis padres Maritza Aguirre y Luis Yupari por su apoyo incondicional a lo largo de mi carrera.

A Alonso Yupari, mi hermano, por la presión diaria para terminar mi tesis.

A la Dra. Cristina Guerra y a todos mis compañeros de laboratorio por su apoyo y enseñanzas a lo largo del desarrollo de la tesis.

Contenido

I. Introducción.....	1
1.1 <i>Taenia solium</i>	1
1.2 Neurocisticercosis	3
1.3 Epidemiología.....	4
1.4 Diagnóstico.....	6
1.5 miRNAs	7
1.5.1 Biogénesis.....	7
1.5.2 Uso de miRNAs como herramienta de diagnóstico y otras aplicaciones.....	8
1.5.3 miRNAs en enfermedades parasitarias	9
1.5.4 Método de detección de miRNAs.....	11
1.6 miRNAs predichos para <i>T. solium</i>	11
II. Hipótesis	12
III. Objetivos	12
3.1 General:.....	12
3.2 Específicos:	12
IV. Materiales y métodos	13
4.1 Secuencias predichas como miRNAs de <i>Taenia solium</i>	13
4.2 Flujograma de trabajo	13
4.3 Muestras	14
4.3.1 Quistes, proglótidos y sobrenadantes.....	14
4.3.2 Biopsias y suero	15
4.3 Extracción de RNA	17
4.3.1 Extracción de RNA de tejido	17
4.3.2 Extracción de RNA en suero y sobrenadante	18
4.4 Generación de cDNA	19
4.5 Determinación de miRNA por qPCR.....	19
4.6 Análisis de resultados y cuantificación de miRNAs.....	19
4.7 Electroforesis de miRNAs	20
V. Resultados.....	21

5.1 Cuantificación absoluta del número de copias de miRNAs en una muestra	21
5.2 Detección de miRNAs:.....	25
5.2.3 miRNAs de <i>T. solium</i> en el parásito	25
5.2.4 miRNAs de <i>T. solium</i> en muestras de cerebro de cerdo	26
5.2.5 miRNAs de <i>T. solium</i> en suero humano	28
5.2.6 Especificidad de stem-loop PCR para detección de miRNAs predichos para <i>T. solium</i>	28
VI. Discusión	31
VII. Conclusiones	36
VIII. Recomendaciones	37
IX. Referencias bibliográficas	37

Índice de figuras

Figura 1. (A) Morfología y (B) Ciclo de vida de <i>T. solium</i>	2
Figura 2. Distribución mundial de cisticercosis humana	5
Figura 3. Distribución de zonas endémicas de neurocisticercosis en el Perú	5
Figura 4. Mecanismo de síntesis y liberación de miRNAs.	8
Figura 5. Descripción del stem-loop RT-PCR.....	11
Figura 6. Diseño experimental para evaluar la expresión de los posibles miRNAs de <i>T. solium</i>	13
Figura 7. Curvas estándar de secuencias sintéticas correspondientes a miRNAs maduros de <i>T. solium</i>	25
Figura 8. Cuantificación de miRNAs predichos para <i>T. solium</i> en proglótidos, quistes y sobrenadante.....	26
Figura 9. Cuantificación de los miRNAs Tso-1 – Tso-5 en sobrenadante de cultivo de quistes vesiculares, racemosos y medio de cultivo RPMI	26
Figura 10. Cuantificación de miRNAs de tejido de cerebro de cerdo y suero de humano con NCC.....	28
Figura 11. Evaluación del producto de qPCR de las sondas (A) Tso-1, (B) Tso-2 (C) Tso-3, (D) Tso-4 (E) Tso-5 en muestras de tejido cerebral porcino y suero de humano sano e infectado.....	31

Índice de tablas

Tabla 1. Distribución de las 15 muestras de cerebro de cerdo con neurocisticercosis .	16
Tabla 2. Descripción de las muestras de suero humano y condición de los pacientes..	17
Tabla 3. Descripción de las muestras usadas en la electroforesis.....	21
Tabla 4. Eficiencia de la curva estándar a partir de la fórmula planteada en el MIQE ..	23
Tabla 5. Cuantificación de miRNAs de <i>T. solium</i> (Tso-1 – Tso-3) en biopsias de cerebro de cerdo infectado con quistes de <i>T. solium</i>	27

Resumen

La neurocisticercosis ocurre cuando uno o más metacéstodes (cisticercos o quistes) de *Taenia solium* se alojan en el sistema nervioso central. Los quistes son protegidos por la barrera hematoencefálica mientras está intacta y tienen la capacidad de modular la respuesta inmune del hospedero mediante mecanismos poco conocidos. El desarrollo de métodos de diagnóstico más sensibles y específicos, así como el tratamiento precisan mayor conocimiento sobre la interacción entre el parásito y el hospedero. Los microRNAs (miRNAs) son RNAs no codantes de 20-23 nucleótidos que regulan la expresión de RNA mensajeros. Debido a la estabilidad que presentan en fluidos o tejidos y la facilidad de ser detectados por métodos cuantitativos como qPCR, los miRNAs son objeto de estudio como biomarcadores de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas o cáncer. Se han reportado miRNAs de parásitos, como *Schistosoma japonicum*, que afectan procesos inmunológicos del hospedero para asegurar su supervivencia. A partir de predicciones *in silico* presentes en la base de datos de miRNAs, miRNEST, se sintetizaron sondas de qPCR para detectar las seis secuencias de miRNAs que serían propios de *T. solium*, denominados Tso-1 - Tso-6. Estas seis sondas fueron probadas en dos estadios del parásito, sobrenadante de cultivo de quistes, muestras de cerebro de cerdos naturalmente infectados con quistes de *T. solium* y suero de humano con neurocisticercosis. Los miRNAs Tso-1 y Tso-3, Tso-4 y Tso-5 fueron detectados en el parásito y son liberados por *T. solium* a tejido pericístico y a suero. Estos cuatro miRNAs también fueron detectados en muestras de cerdo y humano sano, sugiriendo que actúan de forma inespecífica, uniéndose a secuencias de RNAs pequeños muy parecidas o son miRNAs homólogos permitiendo pensar que parásitos y hospederos comparten moléculas modulatorias.

Palabras clave: Neurocisticercosis, Taenia solium, microRNAs, qPCR

Abstract

Neurocysticercosis is the infection of the central nervous system by cystic larvae of *Taenia solium*. These cysts are protected by the undamaged blood brain barrier and they are able to modulate the host's immune response by unknown mechanisms. The development of more sensitive and specific diagnostic methods, as well as the treatment, need more information about parasite-host interaction. miRNAs are small non-coding RNAs of 20-23 nucleotides that regulate mRNA expression. Because of their stability in tissue and fluids, and their easy detection by qualitative methods like qPCR, miRNAs are currently being explored as potential biomarkers for cardiovascular affections, neurodegenerative diseases and cancer. Parasite miRNAs have been identified, like in *Schistosoma japonicum*, where they alter immunologic processes of the host to survive. Using in silico predictions available in the miRNAs database miRNEST, six probes were developed to identify six miRNA sequences identified as *T. solium* miRNAs, denominated Tso-1 - Tso-6. These six probes were evaluated in two parasite stages, cyst supernatants, brain samples from pigs naturally infected with *T. solium* cysts and serum of patients with neurocysticercosis. Tso-1, Tso-3, Tso-4 and Tso-5 were detected in the parasite samples and they were shown to be released by *T. solium* into pig pericystic tissue and human serum. These four miRNAs were also detected in samples from healthy pigs and humans, meaning that they act in an unspecific way, maybe pairing with similar RNA sequences or there are homologous miRNAs, leading us to think that parasites and hosts share modulatory molecules.

Keywords: Neurocysticercosis, Taenia solium, miRNAs, qPCR

I. Introducción

1.1 *Taenia solium*

Taenia solium es un platelminto parásito que tiene como hospederos al cerdo y al humano, siendo este último su único hospedero definitivo. El cuerpo del parásito adulto posee una cabeza o escólex, un cuello y un estróbilo (Figura 1A). El escólex contiene cuatro ventosas con las cuales se ancla a la mucosa del intestino hospedero. Además, se encuentra armado por dos coronas de ganchos por encima de una protuberancia llamada rostelo (1). Bajo el escólex se ubica el cuello donde se van desarrollando los proglótidos (1). El conjunto de proglótidos forman el estróbilo (2). Los proglótidos cercanos al cuello se denominan inmaduros debido a que poseen un aparato reproductor indiferenciado. Por otro lado, se denominan proglótidos maduros a los que se encuentran distantes del cuello (2).

Luego de dos meses de infección, los proglótidos se desprenden del intestino y son excretados por vía fecal (3). Estos segmentos albergan miles de huevos de tamaño microscópico, con embriones llamados oncósferas (3). Dentro del huevo, las oncósferas pueden permanecer viables en vegetación, suelo y agua por largo tiempo, hasta ser ingeridos por alguno de los hospederos intermedios (4). Al liberarse las oncósferas en el organismo del cerdo, atraviesan las paredes del intestino y van al torrente sanguíneo, de este modo, pueden alojarse en distintas partes del cuerpo como músculo, ojo, corazón, cerebro, entre otros (3). En estos órganos se desarrolla el estadio larval del parásito, llamado quiste o cisticerco.

La teniasis ocurre solo en el hombre, cuando se alimenta de carne mal cocinada de cerdo con cisticercos (Figura 1B). La larva ingerida evagina (saca la cabeza) en el intestino y el escólex se ancla a la mucosa intestinal donde el parásito desarrolla hasta su forma adulta (4). La teniasis es prácticamente asintomática,

aunque a veces produce malestar estomacal leve (dolor estomacal, diarrea y náuseas) (5).

La cisticercosis es adquirida por contaminación fecal-oral con huevos microscópicos de *T. solium* (3)(6). El humano, al igual que el cerdo, es un hospedero intermedio, por lo que también puede desarrollar cisticercosis. Una deficiente higiene de alimentos o personal y un mal manejo de los residuos fecales propician la infección con cisticercos, sobre todo cuando se convive con un portador del parásito adulto (2).

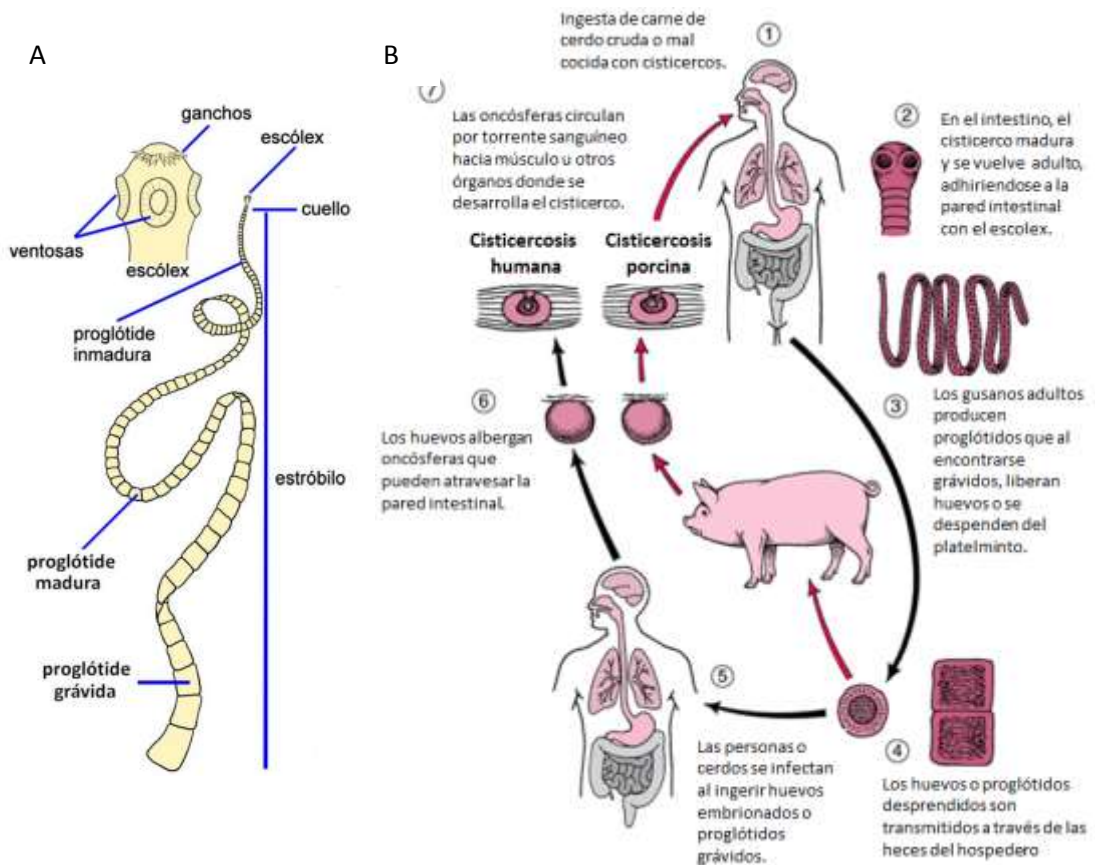


Figura 1. (A) Morfología y (B) Ciclo de vida de *T. solium*. (García I. 2009, Merck Sharp & Dohme Corp)

1.2 Neurocisticercosis

La neurocisticercosis (NCC) ocurre cuando uno o más cisticercos se alojan en el sistema nervioso central (SNC). Según la zona donde se alojen los quistes la NCC puede ser parenquimatosa o extraparenquimal, siendo la primera la más frecuente (7). La NCC parenquimatosa se caracteriza por la presencia de quistes en los hemisferios cerebrales (8). La forma extraparenquimal es la más agresiva y se caracteriza por quistes poliglobulados que se desarrollan y proliferan descontroladamente en forma de racimo de uvas, por lo que se conocen como “quistes racemosos” (9).

Los quistes presentes en SNC son protegidos por la barrera hematoencefálica y tienen la capacidad de modular la respuesta inmune del hospedero, permaneciendo así por varios años (3). Cuando el parásito degenera de forma natural o por la administración de antihelmínticos, puede despertar una fuerte respuesta inflamatoria por parte del hospedero. Esta respuesta desencadena los principales síntomas de la patología, como convulsiones, hipertensión intracraneal, epilepsia, entre otros (10).

Los síntomas varían según el número, tamaño y localización de los quistes (6). La inflamación progresiva alrededor del cisticerco genera la formación de un granuloma, con infiltración de eosinófilos y apoptosis de linfocitos T CD3+ (10,11). Los mecanismos por los cuales *T. solium* regula la respuesta inmune del hospedero no son conocidos, por lo que han surgido varias hipótesis. Se propuso, por ejemplo, que el parásito mimetizaba proteínas del hospedero para asegurar su supervivencia (11).

Existen estudios donde se relaciona la secreción de antígenos por parte del parásito con la producción de citoquinas del hospedero (12). Por otro lado, también se propuso la existencia de un “factor metacéstode” de naturaleza RNA, secretado por el parásito para suprimir la proliferación de linfocitos (13). Este “factor metacéstode” fue probado en ratones con implantación

subcutánea de quistes de *T. solium* y se observó una reducción de la inflamación alrededor del quiste (14).

1.3 Epidemiología

La NCC es la parasitosis del SNC más común en América Latina, África y Asia (4) (Figura 2). La NCC afecta a países en desarrollo donde existe crianza de cerdos en granjas comunitarias al aire libre (15). Esto es muy común en zonas rurales donde los cerdos se infectan con *T. solium* porque tienen contacto con las heces humanas. Sin embargo, la NCC no es exclusiva de zonas rurales ya que existe una creciente preocupación por la higiene de los vendedores de carne (15). Buenas medidas sanitarias, sobre todo en temas de crianza de animales y control sanitario de carnes son clave para prevenir la transmisión de *T. solium* (5,15). Por otro lado, el diagnóstico de la NCC es complicado en zonas rurales debido a que no se cuenta con la infraestructura y herramientas necesarias, dificultando también el tratamiento de los pacientes (15). Tanto el diagnóstico como el tratamiento de la NCC son puntos importantes para evitar la dispersión y el contagio de la enfermedad (15).

En países industrializados (Europa, Australia y Norteamérica), los casos de NCC son muy pocos y se deben a personas que llegan con el parásito desde países endémicos (5). En países en vías de desarrollo, en cambio, el parásito está presente en las diferentes etapas de su ciclo de vida. Es muy común en estos países debido a la crianza libre del cerdo. La NCC es una de las causas más comunes de epilepsia en África (5). En países como Burundi y República Democrática del Congo, la NCC y la epilepsia son consideradas problemas de salud pública (5). En Asia se encuentra *T. solium* en los países más poblados, tales como China, Indonesia, India y Vietnam. En China, las pequeñas carnicerías no tienen una inspección rigurosa sobre sus productos, por lo que los casos de cisticercosis y taeniasis van en aumento, sobre todo en provincias

1.4 Diagnóstico

El diagnóstico de NCC está basado en neuroimágenes y se usa la serología como prueba confirmatoria (18). El diagnóstico por neuroimágenes consiste en tomografía axial computarizada (TAC) y resonancia magnética (RM) (18). Ambos métodos dan a conocer la morfología, localización del quiste, estadio del quiste e inflamación pericística (18). La TAC es capaz de detectar formas inactivas del quiste, en degeneración y activas, además es el único método que permite visualizar calcificaciones. Este método de diagnóstico está más al alcance del paciente en comparación con la RM, debido a su costo y disponibilidad (19). La RM muestra imágenes con mejor definición, por lo que detecta lesiones pequeñas (19).

El diagnóstico serológico consiste en una prueba de *western blot* con antígeno glicoproteico purificado que detecta anticuerpos del parásito (18,19). Esta prueba presenta una sensibilidad de 98% en pacientes con más de un quiste viable y no posee efecto cruzado con otras infecciones (18,19). La sensibilidad es mucho menor en LCR, pacientes con quiste intracraneal o quiste calcificado (18). Además, este método de detección no es exclusivo para NCC ya que se puede obtener un resultado positivo en cisticercosis muscular o subcutánea (18). En zonas endémicas se puede encontrar personas asintomáticas que poseen anticuerpos contra el parásito, lo cual podría deberse a una infección activa o a una exposición pasada y resuelta (18).

El diagnóstico por ELISA es utilizado cuando no es posible realizar un *western blot*. Esta prueba posee un 89% de sensibilidad y 93% de especificidad, debido a esto último es capaz de detectar NCC en líquido cefalorraquídeo (LCR) (18). El ELISA puede resultar negativo en casos de pocos quistes o de calcificaciones y puede tener una reacción cruzada con otras infecciones parasitarias (18). Los ensayos de ELISA son útiles para el monitoreo de la respuesta de pacientes al tratamiento, sobre todo en NCC subaracnoidea (18).

1.5 miRNAs

1.5.1 Biogénesis

Los miRNAs son RNAs pequeños (20-23 nucleótidos) no codantes que regulan la expresión de RNAs mensajeros (mRNAs); además son los RNAs pequeños más abundantes en tejido (20). Los genes de miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II y forman un miRNA primario (pri-miRNA) (20). Los pri-miRNAs poseen una estructura de tallo-horquilla, la cual es procesada por la RNAsa III Drosha para formar un pre-miRNA con forma de horquilla. El pre-miRNA es exportado al citosol, a través de un poro nuclear, con ayuda de la exportina 5. El pre-miRNA es modificado estructuralmente por Dicer, dando lugar a un RNA de doble cadena (21). Este se une a la proteína Argonauta y forman un pre-complejo RISC (RNA-induced silencing complex) (20). Inmediatamente después, una de las cadenas del RNA es liberada y queda un miRNA maduro formando el complejo RISC (Figura 4). El miRNA del complejo RISC se une a un RNA mensajero (mRNA) complementario generando la degradación o inhibiendo la traducción del mRNA (22). Los miRNAs tienen la facultad de mantenerse estables en fluidos corporales o tejido debido a que salen de las células dentro de exosomas, rodeados por grupos proteicos o lípidos de alta densidad los cuales evitan su degradación por ribonucleasas(22,23). Los miRNAs al ser liberados en exosomas pueden alcanzar células blanco distantes (22).

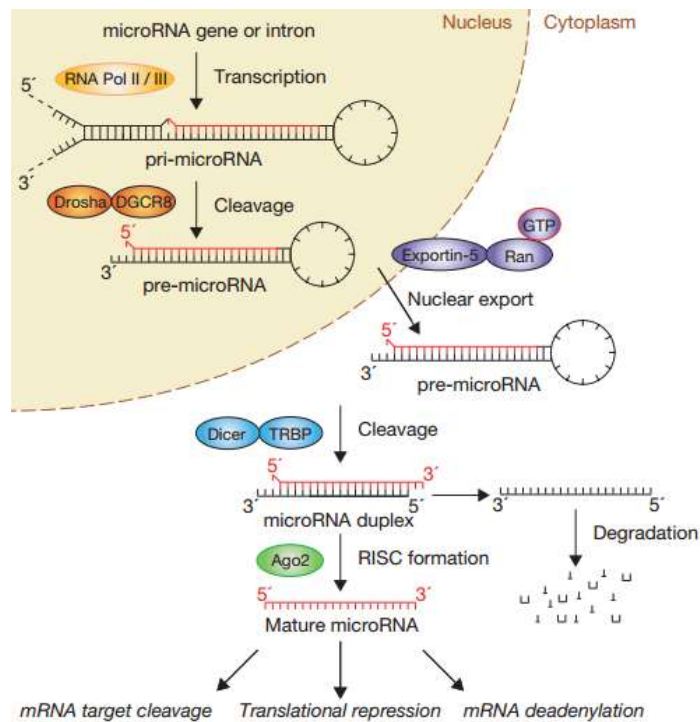


Figura 4. Mecanismo de síntesis y liberación de miRNAs. (Winter et al. 2009)

1.5.2 Uso de miRNAs como herramienta de diagnóstico y otras aplicaciones

Desde su descubrimiento a inicios del presente siglo (24), los miRNAs son objeto de estudio para el diseño de biomarcadores de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas o cáncer debido a la estabilidad que presentan en fluidos o tejidos y a la facilidad de ser detectados cuantitativamente por métodos como microarrays o PCR (23,25). Sin embargo, a pesar de la abundancia de trabajos en cáncer, por ejemplo, no se ha reportado la validación clínica de miRNAs como biomarcadores.

El 70% de miRNAs se albergan en el cerebro, por lo que son objeto de estudio para entender mecanismos moleculares de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, donde en LCR se encuentra una expresión 2.2 veces mayor de miR-29a en comparación con individuos sanos (26). miR-29a podría ser utilizado como un biomarcador para Alzheimer, ya que su detección por qPCR tiene 89% de sensibilidad y 70% de especificidad.

La cuantificación y comparación de expresión de siete miRNAs (miR-10b, miR-21, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c y miR-125b) permiten diferenciar entre cáncer cerebral metastásico y glioblastoma, pudiendo ser útiles para el monitoreo y la respuesta al tratamiento de este último (27).

Los miRNAs cumplen una función importante en la regulación de distintos procesos celulares, por lo que son estudiados también como posibles blancos terapéuticos (28). El cáncer de mama triple negativo, llamado así por la ausencia de receptores de estrógeno, progesterona y HER2, es un tipo de cáncer agresivo de tratamiento limitado (29). La inhibición de miR-34a reportada en este tipo de cáncer se relaciona a la proliferación descontrolada de las líneas celulares afectadas, proceso que se revierte con la transfección de miR-34a, recuperando la propiedad antitumoral de las células al silenciar el proto oncogen cSRC (30).

Por último, los miRNAs están siendo estudiados en reprogramación celular, esta poderosa aplicación es evidente en la obtención de células madre pluripotentes inducidas a partir de adipocitos de ratón, específicamente tres miRNAs relacionados con la reprogramación celular (mir-200c, mir-302s y mir-369s) indujeron la expresión de genes propios de células madre (Oct4, Nanog, Sox2, etc) al incorporarse a los adipocitos. Este tipo de reprogramación fue probada en células adiposas humanas obteniendo los mismos resultados (31).

1.5.3 miRNAs en enfermedades parasitarias

Estudios recientes demuestran que miRNAs exógenos de plantas o animales circulan en suero o se encuentran en tejidos del hospedero y que estos son adquiridos por vía oral o por microorganismos hospederos del animal o planta (32). Existen evidencias de exosomas cargados con proteínas, fragmentos de RNA e incluso DNA genómico liberados por parásitos (33). Estos exosomas pueden fusionarse con la membrana de células hospederas generando una interacción hospedero-parásito (33). Debido a esto, se desarrollan diferentes

estudios de detección de miRNAs exógenos en individuos infectados por parásitos para utilizarlos como biomarcadores de la enfermedad y entender cómo afectan las funciones celulares de los hospederos (33–36)

Actualmente, se buscan asociaciones entre miRNAs de parásitos que afecten procesos inmunológicos del hospedero para asegurar su supervivencia. En infecciones con *Schistosoma japonicum*, se han encontrado tres miRNAs murinos (miR-122, miR-21 y miR-34a) cuya expresión se correlaciona con la respuesta inmune del hospedero (36). Además, dos miRNAs propios del parásito (sja-miR-277 y sja-miR-3479-3p) circulan por suero del hospedero, lo cual los hace candidatos a biomarcadores de la enfermedad (36). miR-21 se sobreexpresa durante la fibrosis hepática causada por *S. japonicum*, utilizando un vector virus adeno-asociado se bloqueó la expresión de miR-21, logrando atenuar la fibrosis (34). Este estudio demostró que una sobreexpresión de IL-13 y TGF β 1 activan la vía SMAD generando una elevada expresión de miR-21, que a su vez reprime SMAD7, el cual inhibe la señalización vía SMAD (34). El estudio antes mencionado demuestra que los miRNAs podrían no solo ser utilizados como biomarcadores, sino también en terapia génica para enfermedades infecciosas.

En pacientes con malaria existe una disminución en la expresión de los miRNAs del hospedero (a excepción de miR-451a y let-7b) presentes en glóbulos rojos infectados (GRi) y en exosomas secretados por GRi (35). Los exosomas contienen miRNAs adheridos a la proteína Ago2 formando un complejo RISK funcional que tiene como blanco GRi, macrófagos (induciendo inflamación) y células endoteliales (35). De esta forma se refleja la importancia de los miRNAs y su interacción parásito-hospedero para conocer la patología de la enfermedad.

1.5.4 Método de detección de miRNAs

El stem-loop RT-PCR es una técnica desarrollada para la detección de miRNAs maduros. Este método tiene una alta eficiencia y especificidad (37). El stem-loop RT-PCR consiste en dos pasos: PCR transcriptasa reversa (RT-PCR) y PCR cuantitativo (qPCR) (38). Durante el RT-PCR, el cebador “stem-loop” (SL) se une a la región 3' del miRNA maduro en seis nucleótidos, por lo que este cebador es específico para cada miRNA. El conjunto SL y miRNA es transformado en cDNA (37). El cDNA es cuantificado usando el método TaqMan de qPCR, que utiliza un cebador sentido, el cual se une a una porción del miRNA; cebador antisentido, que se une a una porción del SL, la cual es común entre los seis miRNAs y una sonda TaqMan complementaria al miRNA de interés. Esta sonda TaqMan tiene un fluoróforo Fam y un quencher no fluorescente con un Minor Groove Binder (MGB) a los extremos 3' y 5' respectivamente (37).

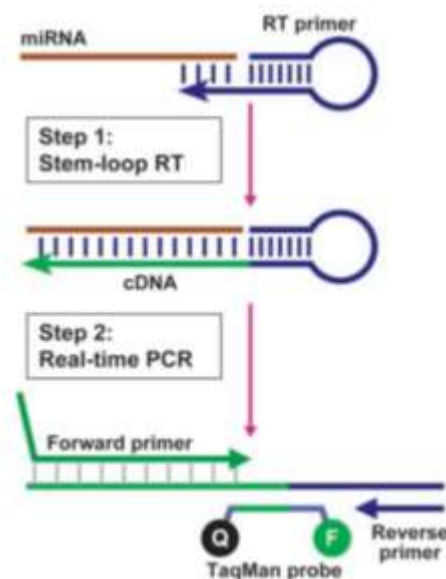


Figura 5. Descripción del stem-loop RT-PCR. (Chen et al. 2005)

1.6 miRNAs predichos para *T. solium*

miRNEST 2.0 es una base de datos de miRNAs disponible en la web, la cual presenta información de posibles miRNAs de plantas, animales y virus (39). Estos miRNAs son obtenidos a partir de predicciones *in silico* y secuenciación de

secuencias expresadas, EST. Solo el 40% de las secuencias de miRNAs presentes en miRNEST se encuentran validadas por experimentación (39). Seis secuencias de miRNAs que serían propias de *T. solium* se encuentran disponibles en miRNEST 2.0. En esta investigación se propone la detección de estos seis miRNAs de *T. solium*, denominados Tso-1, Tso-2, Tso-3, Tso-4, Tso-5 y Tso-6 en el parásito y sus hospederos humano y porcino. Esto último determinaría que los miRNAs de *T. solium* son secretados al organismo hospedero para regular la expresión de mRNAs y asegurar su supervivencia. A diferencia del último estudio sobre miRNAs de *T. solium* (40), en el que se reportan miRNAs conservados; este trabajo se centra en evaluar miRNAs que serían propios del parásito y cuantificar su expresión tanto en el parásito y sus hospederos.

II. **Hipótesis**

Los miRNAs predichos como expresados por *Taenia solium*, presentes en miRNEST, son detectables por qPCR en muestras del parásito y sus hospederos infectados.

III. **Objetivos**

3.1 General:

Determinar la presencia de miRNAs predichos para *Taenia solium* en muestras del parásito y de sus hospederos infectados.

3.2 Específicos:

Estandarizar los métodos de detección de miRNAs en los tipos de muestra a evaluar.

Evaluar y cuantificar seis miRNAs predichos para *T. solium* en quistes y proglótididos del parásito.

Evaluar y cuantificar los seis miRNAs de *T. solium* en sobrenadante de cultivo del parásito, muestras de tejido cerebral de cerdo infectado con quistes de *T. solium* y en suero de humano con neurocisticercosis.

IV. Materiales y métodos

4.1 Secuencias predichas como miRNAs de *Taenia solium*

Se trabajó en la detección de las seis secuencias predichas como miRNAs expresados por *T. solium* (Tso-1-Tso-6). Estas secuencias fueron identificadas y seleccionadas en colaboración con Michał Szcześniak (Universidad Adam Mickiewicz, Poznań, Polonia) a partir de secuenciación (EST de *T. solium*) y están disponibles en el repositorio miRNEST 2.0 (<http://rhesus.amu.edu.pl/>). Ninguna de las secuencias de este trabajo figura en miRBase, el mayor repositorio de secuencias de miRNAs (www.mirbase.org).

4.2 Flujograma de trabajo

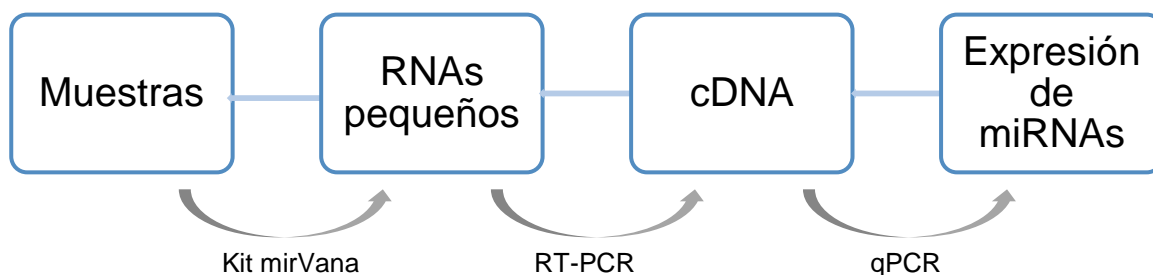


Figura 6. Diseño experimental para evaluar la expresión de los posibles miRNAs de *T. solium*

4.3 Muestras

4.3.1 Quistes, proglótidis y sobrenadantes

Las muestras de *T. solium* evaluadas fueron las siguientes:

- **Quiste vesicular:**
Se evaluaron tres quistes vesiculares provenientes de tejido muscular de un cerdo naturalmente infectado y sacrificado en Tumbes (donación de Ricardo Gamboa, Centro de Salud Global Tumbes). Los quistes fueron conservados en RNAlater (Qiagen) a -80°C.
- **Quiste racemoso**
Los quistes racemosos son trozos de membrana, remanentes del parásito colectados durante intervenciones quirúrgicas realizadas a pacientes con NCC racemosa por indicación de su médico tratante. Se utilizaron tres quistes racemosos para el estudio. Este material es donación del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas–Hospital Santo Toribio de Mogrovejo (Dr. Hugo García), autorizada por el Comité de Ética Institucional de la UPCH (SIDISI 63903). Los quistes fueron conservados en RNAlater (Qiagen) a -80°C.
- **Proglótidis**
Cinco proglótidis provenientes de muestra fecal de un teniásico, también identificado en Tumbes, fueron donados por el área de Inmunología y Cultivo Celular del Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Dra. M. Verástegui). Los proglótidis fueron conservados en RNAlater (Qiagen) a -80°C.
- **Sobrenadante de quistes vesiculares**
Se utilizaron también cinco sobrenadantes de cultivo de quistes vesiculares (1 sobrenadante de quistes evaginados, Se y 4 de quistes no

evaginados, Sq) extraídos de cinco cerdos distintos. Cada sobrenadante resultó del cultivo de entre 20 y 600 quistes por 24-48 horas en medio RPMI. El sobrenadante fue conservado a -20°C sin inhibidor de proteasas.

- Sobrenadante de quiste racemoso

Se evaluaron cinco sobrenadantes del cultivo de quistes racemosos, Sr. Cada sobrenadante resultó del cultivo de 24-48 horas, en medio RPMI. El sobrenadante fue conservado a -20°C sin inhibidor de proteasas.

4.3.2 Biopsias y suero

Con el objetivo de averiguar si los miRNAs eran liberados a nivel local por el parásito, se trabajó con muestras de tejido cerebral porcino pericísticas. En el caso del hospedero humano no podemos trabajar con muestras de tejido cerebral, por lo que pasamos a evaluar los miRNAs en sangre. Además, esta información también nos serviría para saber si estos miRNAs podrían ser utilizados en el diagnóstico de la NCC. Las muestras correspondientes a hospederos de *T. solium* fueron:

- Cerdo

Se trabajó con muestras extraídas de 16 cerdos naturalmente infectados con *T. solium* provenientes de Huancayo, Perú, utilizados en el proyecto “Efecto de tratamientos con un antihelmíntico y antiinflamatorios sobre la permeabilidad vascular en cerebro de cerdos naturalmente infectados con *Taenia solium*” (SIDISI 62392). Este proyecto cuenta con aprobación del Comité Institucional de Ética para el uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Las muestras que se usaron (Tabla 1) son cápsulas que rodean al quiste (tejido pericístico); consisten en tejido cerebral con colágeno y eventual infiltrado inflamatorio.

Tabla 1. Distribución de las 15 muestras de cerebro de cerdo con neurocisticercosis

Condición de los cerdos	Tipo de tejido cerebral		
	Infectado	Control	Total
Sanos	0	10	10
Infectados	5	0	5
Total	5	10	15

- Humano

Las muestras de suero de pacientes con neurocisticercosis fueron donación del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas–Hospital Santo Toribio de Mogrovejo (Dr. Hugo García). Estos sueros forman parte del “Repositorio de sueros y material genético de pacientes con Neurocisticercosis”, con código SIDISI 67079, y cuentan con la aprobación del Comité Institucional de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas. Esta aprobación ética es abierta para investigación no específica de protocolo. Los sueros se entregaron al laboratorio sin más indicación que algunas pertenecían a pacientes con neurocisticercosis; por lo que se trabajó en ciego. Algunos detalles sobre la historia clínica de los pacientes pudieron conocerse después (Tabla 2). Se utilizaron también cinco muestras de suero donadas por voluntarios sanos. Todas las muestras de suero se almacenaron a -80°C.

Tabla 2. Descripción de las muestras de suero humano y condición de los pacientes

Muestra	Cód	WB	ELISA	Observaciones
H21176622	H2	Positivo	Sin datos	Presentó 111 quistes
MXVPF9477414	MX	Positivo	Positivo	Presentó hidrocefalia en el 2013 y operado.
JLLEM9452015	JL	Positivo	Positivo	En el 2013 tuvo cisticercosis subaracnoidea.
VXQEF9648634	VX	Positivo	Negativo	Posee múltiples quistes y calcificaciones parenquimales
HXGCF9475922	HX	Positivo	Positivo	Historia clínica no disponible

4.4 Extracción de RNA

Ciertos estudios demuestran que existen diferencias en la cantidad de RNAs pequeños recuperados según el método de extracción, por lo que es importante escoger la metodología adecuada para no obtener datos erróneos al realizar la cuantificación de miRNAs (41–43). A diferencia del Trizol, una de las soluciones más utilizadas para extracción de RNA total, el kit Mag MAX *mirVana* Total RNA Isolation (Thermo Fisher Scientific) permite recuperar RNAs pequeños que se pierden al utilizar Trizol como método de extracción de RNA (43). Debido a esto se utilizó el protocolo especificado en el kit *mirVana* para la extracción de RNA pequeños.

4.4.1 Extracción de RNA de tejido

Para homogeneizar el tejido se usaron 100 μ L de la solución *Lysis Binding Mix* proporcionada por el kit. Se colocaron 100 μ L del producto del homogeneizado en uno de los 96 pocillos que contiene la placa y esta se puso en agitación en un *shaker* (Bellco glass, Inc.) por 5 minutos. Se agregaron 100 μ L de isopropanol y se sometió la placa a agitación por 2 minutos. Luego, se añadieron 20 μ L de *Binding Beads Mix* a cada muestra y se agitó por 5 minutos. Se colocó la placa

de 96 pocillos sobre una superficie magnética (Magnetic Stand-96, Sigma Aldrich) para aspirar y descartar el sobrenadante. Los *beads* se lavaron y secaron dos veces con soluciones de lavado del kit para después añadir 50 µL de la solución TURBO Dnasa. Luego de 15 minutos de agitación, se agregaron 50 µL de *Rebinding Buffer* y 100 µL de isopropanol, para después volver a lavar y secar los *beads* dos veces más. Se agregaron 50 µL de *Elution Buffer* previamente calentado a 37°C. Este se extrajo y los *beads* quedaron adheridos a la placa.

4.4.2 Extracción de RNA en suero y sobrenadante

Se agregaron 100µL de muestra a cada pocillo de la placa que se iba a usar. Se agregaron 50 µL de *Proteinase K Digestion Mix* a cada muestra y se agitó por 5 minutos. Luego de 30 minutos de incubación a 65°C, se agregaron 100 µL de *Lysis Binding Mix* y 20 µL de *RNA Binding Beads*. La placa fue sometida a agitación durante 7 minutos para luego añadir 270 µL de isopropanol. La placa fue colocada en una superficie magnética con el objetivo de mantener los *beads* al fondo de los pocillos para poder aspirar y descartar la solución. Los *beads* fueron lavados dos veces con 150 µL de soluciones de lavado proporcionadas por el kit y secados por agitación de la placa sin cubierta durante 5 minutos. Se colocaron 50 µL de TURBO DNasa (20U/uL) a cada pocillo para luego agitar la placa por 15 minutos. 50 µL de *Rebinding Buffer* y 100 µL de isopropanol se añadieron a cada muestra. Luego de 5 minutos de agitación, se lavaron y secaron los *beads* para añadir 50 µL de *Elution Buffer*, precalentado a 65°C, a cada pocillo. La placa fue colocada a 65°C por 3 minutos y finalmente, con la ayuda del soporte magnético, se absorbió y guardó el RNA contenido en el *Elution Buffer*.

Las muestras se almacenan a -80° C. La concentración y calidad del RNA se evaluó en NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific). Se trabajó con una concentración de 1-10 ng/µL de RNA para el RT-PCR.

4.5 Generación de cDNA

Se trabajó con el kit *Taqman Micro RNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Se preparó un *master mix* de 7 μl , junto con 3 μl del cebador stem-loop, el cual se diseñó específicamente para cada miRNA (Carmelle Norice-Tra, MD PhD, NIH), y 5 μl de RNA de 1-10 ng/ μl para un volumen final de reacción de 15 μL . Cada cebador stem loop, o SL, permite generar mayor especificidad para discriminar miRNAs similares (44). Los correspondientes a tres de las seis secuencias se han probado ya en el laboratorio de Neurocisticercosis (Oscar Sevillano, tesis de Licenciatura en Biología 2017, Facultad de Ciencias y Filosofía, UPCH). Se empleó el termociclador MJ PTC-100 programado a 16°C por 30 minutos, paso que permite la unión del cebador SL al miRNA. Luego, a 42°C por 30 minutos formando una cadena lineal de toda la secuencia y 85°C por 5 minutos para activar la enzima. Por último, 4°C por 5 minutos para conservar los productos de la reacción. Las muestras de cDNA se almacenaron a -20°C hasta su uso.

4.6 Determinación de miRNA por qPCR

Las muestras fueron evaluadas por duplicado en reacciones de 20 μl . Se empleó 1 μl de sonda marcada con un fluoróforo Fam (específico para cada miRNA), 1 μl de cebador sentido, 1 μl de cebador antisentido universal, 1.33 μl de cDNA generado con el cebador SL, 10 μl de *Taqman Universal PCR Master Mix II (2X)* y 5.67 μl de agua libre de nucleasas. Se usó un ciclador Piko Real (Thermo Fisher Scientific) programado con las siguientes condiciones: 50°C por 2 minutos y 95°C por 10 minutos para activar la enzima; y 40 ciclos de denaturación a 95°C por 15 segundos e hibridación/extensión a 60°C por 1 minuto.

4.7 Análisis de resultados y cuantificación de miRNAs

Debido a que al momento de hacer el trabajo (y de redactar esta tesis) no existen estudios de miRNAs propios de *T. solium*, no se conocen miRNAs que se

expresen de forma constitutiva en el parásito que puedan servir como gen normalizador en la reacción de qPCR. Incluso, el artículo más reciente sobre miRNAs de *T. solium* y *T. crassiceps* (40) tampoco posee este dato, pues no incluye una medición exacta de los miRNAs predichos. Por esto, se optó por hacer cuantificaciones absolutas: se realizaron curvas estándar a partir de secuencias sintéticas de diluciones 1/10 de cada uno de los miRNA maduros y por extrapolación se obtuvo el número de copias de miRNA de la muestra a partir del CT obtenido por qPCR y la ecuación de la recta.

4.8 Electroforesis de miRNAs

Con el propósito de comprobar que la metodología usada amplifica solo la secuencia de miRNA objetivo se realizó un gel de agarosa 3%. Este gel contenía 4,2 gr de agarosa disueltos en 140 mL de TBE 1X y se utilizó GelRed (Biotium) para identificar las bandas de DNA. Se utilizó un *Ladder* de 50pb (Fermentas) y *Loading Buffer* 6X. Cada pocillo del gel fue cargado con 20 µl de producto de qPCR de las muestras escogidas (Tabla 4) y 4 µl de *Loading Buffer*. Se utilizaron muestras de cerdo y humano sano e infectado, además de un control positivo (miRNA sintético con 10^5 copias) y un control negativo (Master Mix del qPCR sin muestra).

Tabla 3. Descripción de las muestras usadas en la electroforesis

miRNA	Muestra	Características
Tso-1, Tso-3, Tso-4 y Tso-5	EB7-3	Tejido cerebral cerdo infectado
	EB6-6	Tejido cerebral cerdo sano
	NCC5	Suero humano infectado
	Ma	Suero humano sano
Tso-2	PQ	Pool quistes (Q1, Q2 y Q3)

V. Resultados

5.1 Cuantificación absoluta del número de copias de miRNAs en una muestra

El nivel de expresión de miRNAs de *T. solium* es desconocido. Debido a esto se realizaron diluciones 1/10 de cada miRNA maduro sintético para averiguar el rango en el cual el número de copias que era detectado por qPCR era lineal. Para elaborar la curva estándar, se hicieron dos diluciones de 1/10, en el rango de 10^3 - 10^{10} copias por 1.33 μ l; la figura 6 muestra las dos curvas estándar y la curva promedio con su fórmula. Valores debajo de 10^3 no presentaron linealidad por lo que no se trabajó con eso. Durante la RT-PCR, 6 nucleótidos del miRNA sintético se unen a un stem-loop (cebador SL), también sintético. Toda esta secuencia de RNA de 71 nt es transformada en cDNA por acción de la transcriptasa reversa del kit. Debido a esto, el número total de copias en la reacción depende de las copias de miRNA sintético o del stem-loop, como dato conocido para la curva.

$$\text{Peso de 1 copia} = \frac{\text{Peso molecular}}{n^{\circ} \text{Avogadro}}$$

$$\#Copias \text{ total (liofilizado)} = \frac{\text{Peso total (liofilizado)}}{\text{Peso de 1 copia}}$$

$$\#Copias / \mu\text{l} = \frac{\#Copias \text{ total (liofilizado de miRNA o stem - loop)}}{\text{Volumen resuspendido}}$$

Copias miRNA sintético:

$$\begin{aligned} \#Copias / 5 \mu\text{l} \\ = \frac{\#Copias \text{ total}}{\text{Volumen resuspendido} / 5} \end{aligned}$$

El número de copias del miRNA sintético es menor que las copias del stem-loop. Debido a esto, el número de copias total (miRNA + stem-loop) equivale al número de copias del miRNA sintético.

Copias stem-loop:

$$\begin{aligned} \#Copias / 3 \mu\text{l} \\ = \frac{\#Copias \text{ total}}{\text{Volumen resuspendido} / 3} \end{aligned}$$

El volumen total de la reacción es 15 μl durante la RT-PCR.

$$\#Copias / 15 \mu\text{l} = \frac{\#Copias \text{ total}}{\text{Volumen resuspendido} / 15}$$

Durante la qPCR, se utilizan 1,33 μl del producto de RT-PCR.

$$\#Copias / 1,33 \mu\text{l} = \frac{\#Copias \text{ total}}{\text{Volumen resuspendido} / 1,33}$$

Las diluciones se hicieron a partir de la fórmula:

$$C_1 (\#copias / 1,33 \mu\text{L}) \times V_1 = C_2 (10^{10}) \times V_2 (30 \mu\text{L})$$

Después de realizar la qPCR con las diluciones, se graficaron las curvas estándar (Figura 6) y se halló la eficiencia de cada una (Tabla 4) (45).

$$Eficiencia = \left(10^{-1/pendiente} - 1\right) \times 100$$

Tabla 4. Eficiencia de la curva estándar a partir de la fórmula planteada en el MIQE (45)

Curva estándar	Eficiencia (%)
Tso-1	96,19 %
Tso-2	95,57%
Tso-3	98,76%
Tso-4	91,17%
Tso-5	91,98%

Utilizando el protocolo establecido y disponible en web (38) para la detección de miRNAs por stem-loop RT-PCR solo se pudo realizar las curvas estándar para los miRNAs Tso-1 – Tso-5.

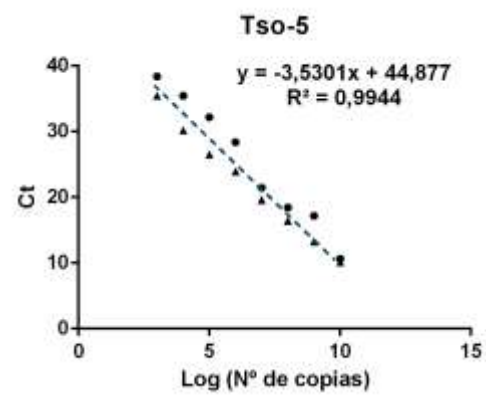
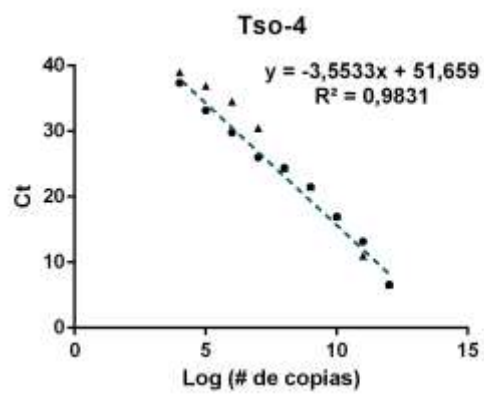
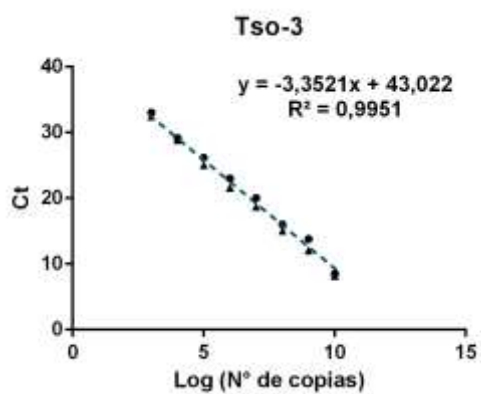
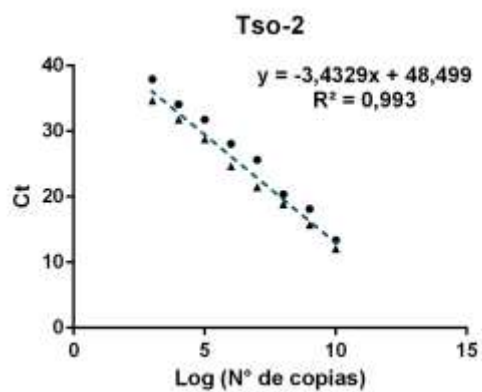
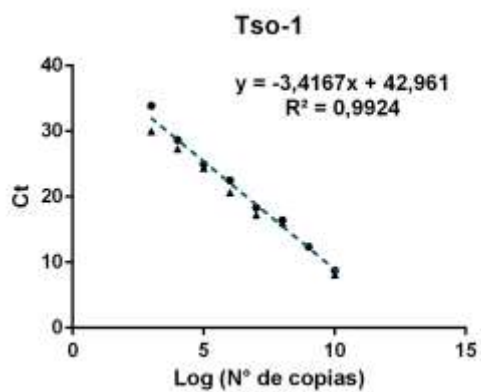


Figura 7. Curvas estándar de secuencias sintéticas correspondientes a miRNAs maduros de *T. solium*. Cada curva estándar posee dos determinaciones por punto.

5.2 Detección de miRNAs:

El RNA de las muestras se extrajo utilizando el kit mirVana (Thermo Fisher Scientific). La qPCR realizada es de cuantificación absoluta, por lo que, para asegurar la consistencia entre réplicas, en cada qPCR también se corren puntos de la curva estándar. Cada vez, se verificó que los valores de Ct de los tres puntos corridos fueran similares a los de la curva estándar para validar la prueba. La desviación estándar máxima calculada para Tso-1 fue de 0,96, Tso-2 fue 0,76, Tso-3 fue 1,16, Tso-4 0,83 y Tso-5 0,87.

5.2.3 miRNAs de *T. solium* en el parásito

Luego de estandarizar la metodología para la cuantificación de miRNAs a partir de curvas estándar, se evaluaron los miRNAs predichos para *T. solium* en dos estadios del parásito. Se evaluaron cinco proglótidos y tres quistes (vesiculares y racemosos) del parásito en representación del estadio adulto y larval, respectivamente. La figura 8 muestra el número de copias de cada miRNA calculado en cada muestra; las muestras de sobrenadante se comentan más abajo. Se observa la expresión de los miRNAs Tso-1, Tso-3, Tso-4 y Tso-5 en todas las muestras de proglótidos y quistes evaluadas, siendo el miRNA Tso-4 el que presenta mayor número de copias. Por el contrario, el miRNA Tso-2 no se detectó en ninguna de estas muestras.

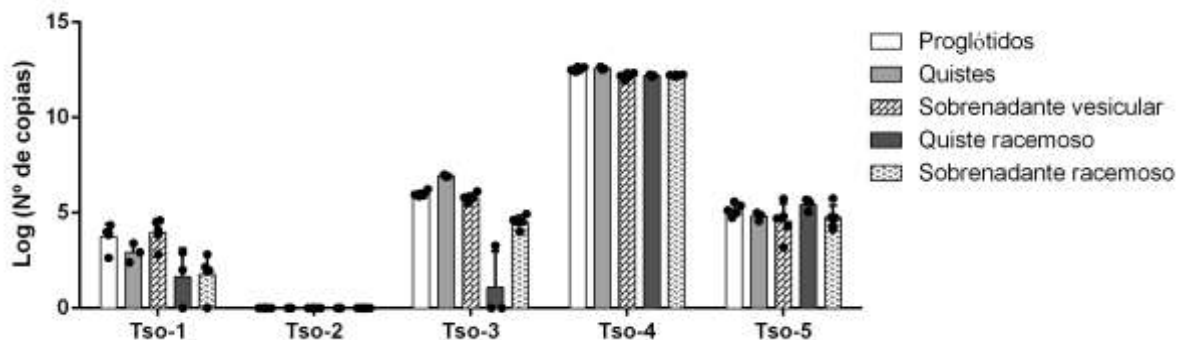


Figura 8. Cuantificación de miRNAs predichos para *T. solium* en proglótidis, quistes y sobrenadante.

Se realizó una cuantificación de los miRNAs predichos en sobrenadante de cultivo de quistes vesiculares, Sq (incluyendo el que provenía de un pool de quistes evaginados, Se) y racemosos, Sr, con el objetivo de averiguar si los miRNAs que se detectaron en estos estadios del parásito son secretados. Durante el qPCR se utilizó como control negativo medio de cultivo RPMI (Figura 9). Los resultados (Figura 8 y 9) muestran que los miRNAs Tso-1, Tso-3, Tso-4 y Tso-5 son liberados por los quistes en cultivo al medio. Sin embargo, el miRNA Tso-2 no es detectado en el sobrenadante.

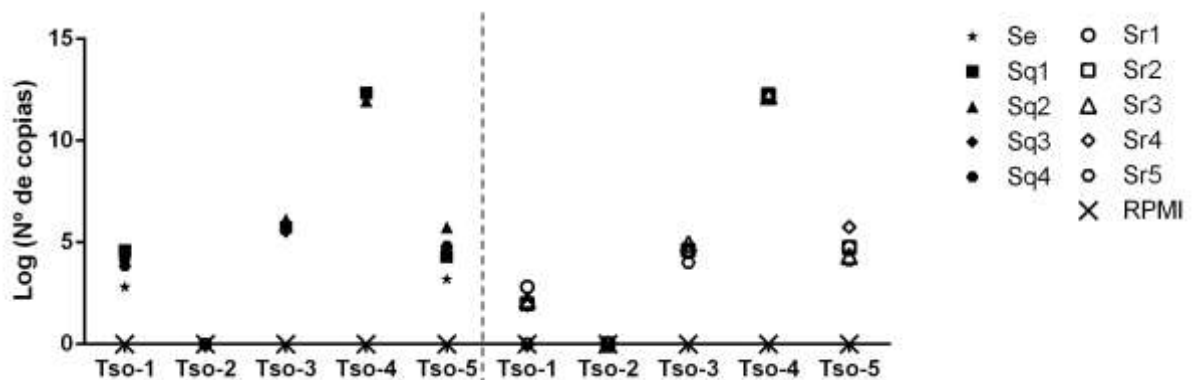


Figura 9. Cuantificación de los miRNAs Tso-1 – Tso-5 en sobrenadante de cultivo de quistes vesiculares, racemosos y medio de cultivo RPMI.

5.2.4 miRNAs de *T. solium* en muestras de cerebro de cerdo

Luego de comprobar que los miRNAs son liberados por el parásito, se quiso saber si estas secuencias cortas se encontraban en tejido contiguo al parásito. Para esto, se evaluó la expresión de los miRNAs predichos en muestras de tejido cerebral de cerdo con neurocisticercosis y cerdo sano. Las biopsias pertenecen a tejido pericístico, aunque, no todas las muestras son de tejido contiguo al parásito. Los resultados (Tabla 5, Figura 10) muestran la expresión de Tso-1 en dos de las cinco muestras de cerebro infectado y la mitad de las

muestras sanas. Tso-3 es detectado en todas las muestras analizadas, menos en una de cerdo sano. Tso-4 y Tso-5 se expresan en todas las muestras analizadas. Resumiendo, el miRNA Tso-2 sigue sin ser detectado, y Tso1, Tso3, Tso-4 y Tso-5 aunque en diferentes niveles entre sí, se detectaron en tejido cerebral, pero tanto en cerdos sanos como en infectados.

Tabla 5. Cuantificación de miRNAs de *T. solium* (Tso-1 – Tso-5) en biopsias de cerebro de cerdo infectado con quistes de *T. solium*

Muestra	Condición	Tso-1		Tso-2		Tso-3		Tso-4		Tso-5	
		Ct	Log(N° de copias)	Ct	Log(N° de copias)	Ct	Log(N° de copias)	Ct	Log(N° de copias)	Ct	Log(N° de copias)
023	Sano	0,00	0.00	0,00	0,00	24,08	5.38	8.14	12.25	30.99	3.93
018		30,35	2.97	0,00	0,00	20,97	6.36	9.11	11.97	31.58	3.77
11-5		32,07	2.44	0,00	0,00	20,29	6.50	8.33	12.20	33.13	3.33
11-6		34,76	1.60	0,00	0,00	21,40	6.17	8.13	12.25	33.36	3.26
11-7		30,49	2.94	0,00	0,00	20,5	6.43	8.44	12.16	32.57	3.49
6-6		27.19	3.20	0,00	0,00	21,18	6.23	8.12	12.25	33.03	3.36
6-7		0,00	0.00	0,00	0,00	0,00	0.00	9.13	11.97	35.27	2.72
6-8		0,00	0.00	0,00	0,00	26,64	4.63	8.93	12.03	34.53	2.93
6-10		0,00	0.00	0,00	0,00	19,65	6.68	7.46	12.44	32.43	3.52
6-11		0,00	0.00	0,00	0,00	20,5	6.43	8.45	12.16	33.74	3.15
7-1	Infectado (Alejado de quiste)	0,00	0.00	0,00	0,00	20,76	6.36	8.99	12.01	33.42	3.24
7-2	Infectado (Alejado de quiste)	0,00	0.00	0,00	0,00	22,13	5.95	9.07	11.99	34.77	2.86
7-3	Infectado (Cerca al quiste)	37,43	0.73	0,00	0,00	22,21	5.93	11.82	11.21	32.44	3.52
7-4	Infectado	34,25	1.41	0,00	0,00	23,50	5.55	8.47	12.15	34.09	3.06

	(Cerca al quiste)										
7-6	Infectado (Alejado de quiste)	0,00	0.00	0,00	0,00	22,83	5.75	9.30	11.92	34.61	2.91

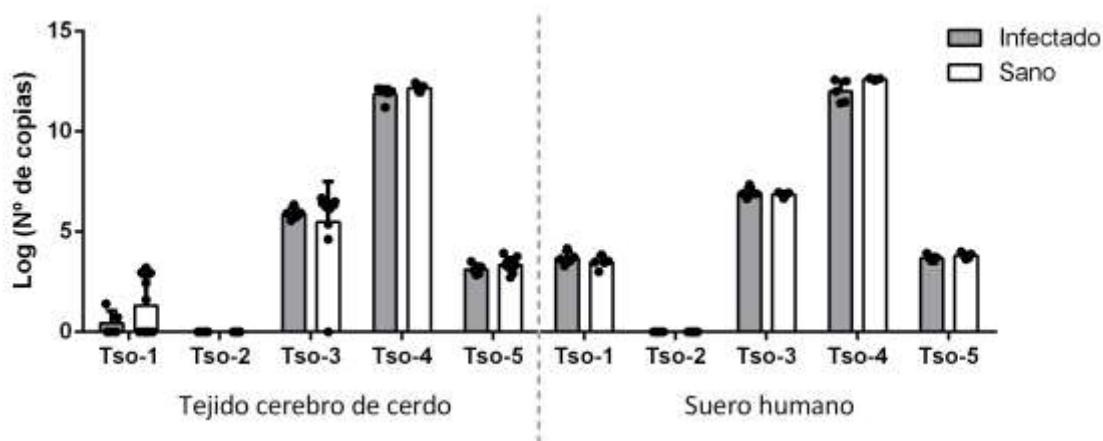


Figura 10. Cuantificación de miRNAs de tejido de cerebro de cerdo y suero de humano con NCC.

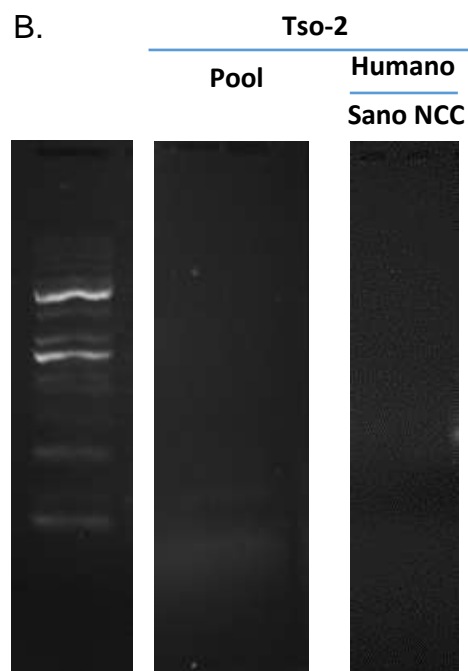
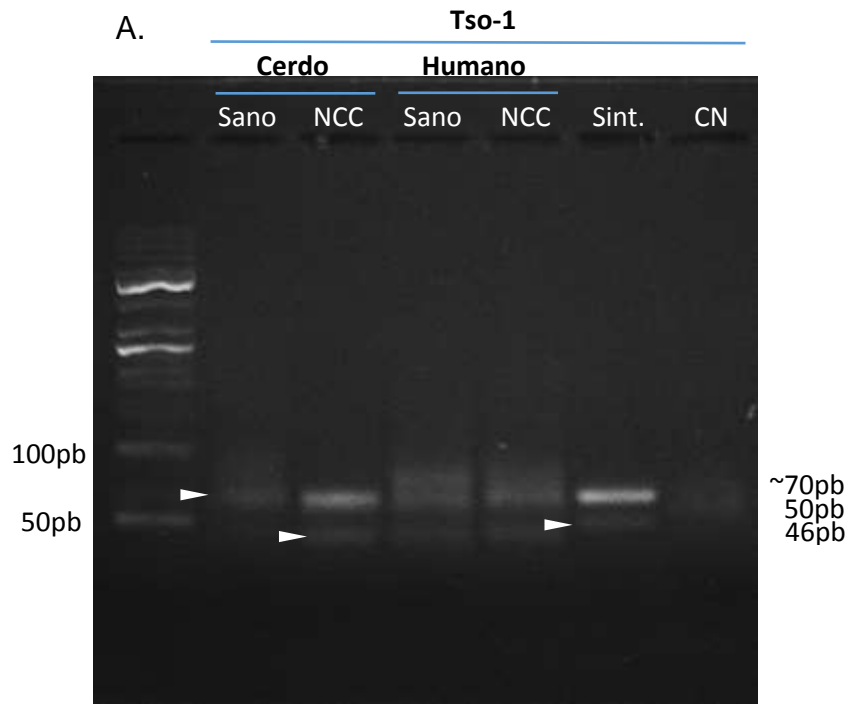
5.2.5 miRNAs de *T. solium* en suero humano

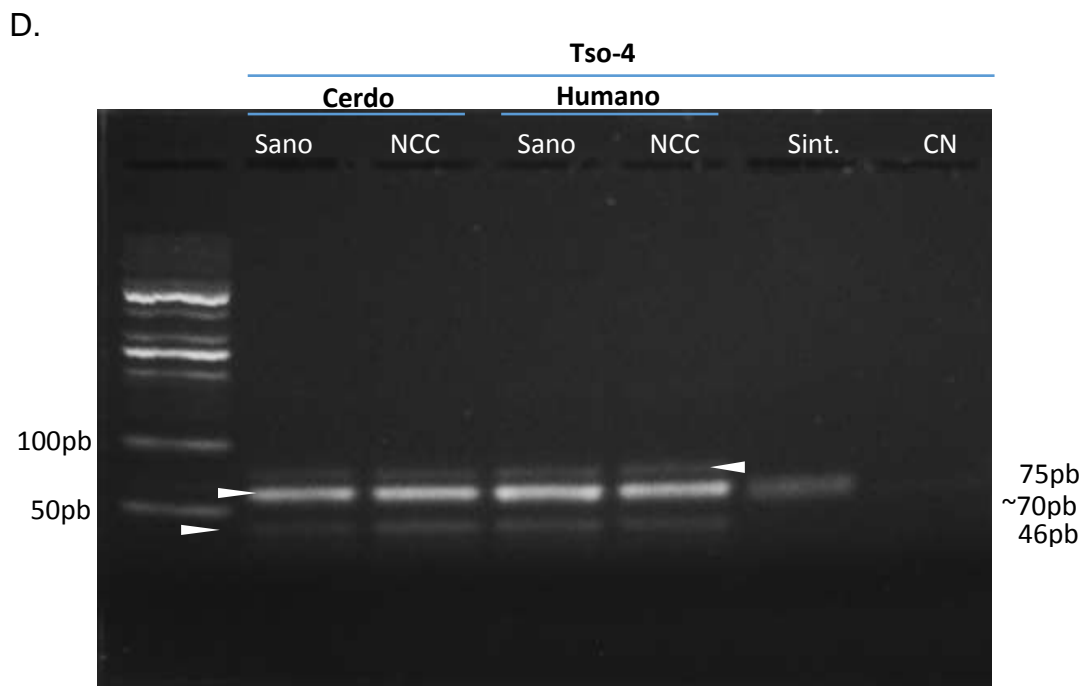
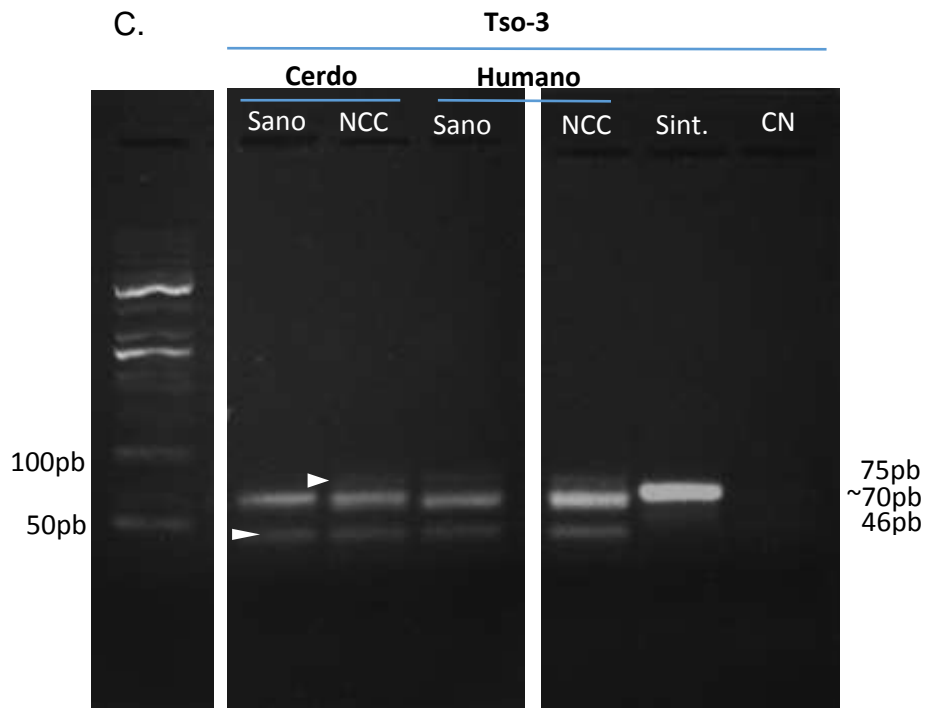
Los miRNAs predichos para *T. solium* fueron evaluados en muestras de suero humano tomadas de voluntarios sanos y de pacientes con diagnóstico de neurocisticercosis. Los resultados (Figura 10) indican que los miRNA Tso-1, Tso-3, Tso-4 y Tso-5 presenta el mismo nivel de expresión en ambos tipos de suero. Tso-2 no fue encontrado las muestras analizadas.

5.2.6 Especificidad de stem-loop PCR para detección de miRNAs predichos para *T. solium*

El gel de agarosa (Figura 11) utilizado para comprobar que la metodología usada está detectando los miRNAs Tso-1, Tso-3, Tso-4 y Tso-5 mostró que se amplifica una banda de entre 69-71 pb, la cual es congruente con la banda esperada (71pb; 50pb del stem-loop y 21 del miRNA). Sin embargo, también

se observan bandas más pequeñas de 46 y 49 pb en las muestras evaluadas. Una banda marcada de 75pb se encuentra en las muestras evaluadas con Tso-4 y en las muestras humanas y de cerdo infectado evaluadas con la sonda Tso-3. Se buscó el miRNA Tso-2 en un pool de quistes sin éxito alguno.





fueron detectados en sobrenadante de cultivo de quistes racemosos y vesiculares de *T. solium* y no en medio que no contuvo quistes, con lo que se demostró que estos miRNAs son secretados por el parásito (Figura 8 y 9). Esto concuerda con estudios realizados en *Schistosoma japonicum*, un tremátodo, y *Heligmosomoides polygyrus*, nemátodo, entre otros gusanos parásitos, en cuyos sobrenadantes de cultivo se hallaron exosomas con miRNAs (46) e incluso la proteína Argonauta (47).

Estos cuatro miRNAs también fueron detectados consistentemente en muestras de tejido cerebral porcino y suero humano sin infección. Estos resultados no esperados indican que estos miRNAs son inespecíficos, lo cual no descarta que sean expresados por *T. solium*, sino que pueden ser miRNAs homólogos con alguno de cerdo o humano. Literatura reciente ha mostrado esta posibilidad: En *H. polygyrus* se identificaron tres miRNAs homólogos a miRNAs de su hospedero (roedor) en exosomas secretados por el parásito (47). Estos tres miRNAs estaban dentro de los miRNAs secretados más abundantes, lo cual permite pensar que hospederos y parásitos comparten moléculas modulatorias (47). En el nemátodo *Brugia malayi* se encontraron cinco miRNAs con secuencia idéntica a miRNAs humanos, sugiriendo que podrían manipular mecanismos del hospedero (48). Por otro lado, un estudio sobre miRNAs de *Schistosoma mansoni* en tejido y suero de ratón encontró por secuenciación 11 miRNAs del parásito en suero, 2 de estos fueron excluidos del análisis por poseer un alto parecido a RNAs de secuencia corta de ratón y podría ocurrir una hibridación cruzada (25). Además, en otro nemátodo, *Onchocerca volvulus*, se encontraron 13 miRNAs por secuenciación, de los cuales 3 eran muy parecidos a RNA ribosomal (rRNA) humano (49). Estos estudios llevan a pensar que la hibridación cruzada con algún RNA pequeño o una homología de miRNAs entre parásito y hospedero podrían explicar la detección de los miRNAs predichos para *T. solium* en muestras de sus hospederos naturales sanos. Otros estudios sugieren que una coinfección con algún otro parásito también podría ser una explicación para este resultado, lo cual resta valor a la aplicabilidad de estos cuatro miRNAs para detectar específicamente *T. solium* dado que no hay forma de asegurar que los miRNAs encontrados son propios del hospedero y no producto de otra infección (49).

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) es un programa disponible en web que permite encontrar similitud entre secuencias. Una forma de haber previsto que los miRNAs iban a ser encontrados en muestras de hospedero sano hubiera sido haciendo un análisis BLAST de los miRNAs maduros con el genoma hospedero. Al comienzo del trabajo no se consideró necesaria esta prueba debido a que un estudio previo en el laboratorio (Oscar Sevillano, tesis de Licenciatura 2017) había realizado un BLAST de la secuencia de pre-miRNAs con los genomas hospederos, obteniendo como resultado algunos alineamientos (Tso-1 – Tso-4) con *T. asiatica*, lo que pareció confirmar que serían específicos de helmintos. La secuencia Tso-6 fue la única que obtuvo alineamientos con primates, pero no se pudo estudiar en este trabajo por fallas técnicas, como se ha descrito.

Sin embargo, al realizar el análisis BLAST luego de haber evaluado las muestras y conocer los casos de otros parásitos, se encontró que Tso-1 posee un 95% de identidad con 10 secuencias de mRNAs y RNA no codante (ncRNA) humano, y 6 mRNAs de cerdo; Tso-2 tiene 95% de identidad con una secuencia de ncRNA humano y 100% de identidad con 40 mRNAs y un ncRNA de cerdo; Tso-3 presenta 100% de identidad con 11 secuencias de mRNA humano y 38 mRNAs y 2 ncRNA de cerdo; Tso-4 presenta 95% de identidad con dos mRNAs humanos y dos ncRNAs porcinos; por último, Tso-5 tiene 100% de identidad con dos mRNAs humanos y tres de cerdo. Se debe tener en cuenta que durante la extracción de RNA solo se obtuvieron RNAs pequeños, por lo que la metodología usada estaría detectando RNAs pequeños; además en los geles observamos bandas entre 70-75pb, esto quiere decir que estaríamos detectando una secuencia de entre 20-25pb. Sin embargo, las secuencias que arroja el BLAST son muy grandes, por lo que podríamos estar encontrando RNAs pequeños, sean miRNAs o no, aún no reportados. Dada la baja complejidad de las secuencias Tso1-Tso5, esta es la explicación más posible.

Se debe resaltar que en las muestras del parásito, sobrenadante, tejido y suero, el número de copias de Tso-4 es muchísimo mayor que lo detectado para los otros miRNAs. Una posible explicación para esto es que tenga una función regulatoria

muy importante. La predicción bioinformática de mRNAs blancos de este miRNA, por ejemplo genes relacionados a inmunidad, ciclo celular y apoptosis, apoya esta posibilidad (Oscar Sevillano, tesis de Licenciatura 2017).

Una muestra de quiste racemoso, tres de sobrenadante de quiste racemoso y dos de tejido cerebral de cerdo con NCC presentan una expresión de Tso-1 por debajo del límite de detección establecido por la curva estándar. Al evaluar una de las muestras de tejido cerebral por electroforesis, se puede ver claramente que el miRNA Tso-1 es detectado aunque se encuentre por debajo del límite de detección. En consecuencia, las muestras no se retiraron de las figuras 8 y 10.

Los geles de agarosa brindan información sobre los productos de qPCR detectados (Figura 11). Tso-1, Tso-3, Tso-4 y Tso-5 muestran dos bandas, una de aproximadamente 70pb y la otra de 46-49 pb. La banda de 70pb concuerda con el tamaño de secuencia esperado (71pb) para el complejo miRNA-stem loop. Además de estas dos bandas, los miRNAs Tso-3 y Tso-4 presentan una banda de 75 pb. Las bandas de 75 pb corresponderían a las de algún RNA pequeño muy parecido a las secuencias de los miRNAs predichos, ya que al parecer se une al stem loop y es amplificado durante el qPCR. Debido a su tamaño, las bandas de 46-49 pb podrían ser restos de stem-loop o dímeros.

El miRNA Tso-2 no fue detectado en las muestras de *T. solium* analizadas (Figura 8-10). Estudios sobre expresión de miRNAs en enfermedades gastrointestinales (50) muestran que existen miRNAs que pueden no estar presentes en tejido, pero sí en suero. Una investigación de miRNAs de *H. polygyrus* demostró que el 75% de miRNAs del parásito son liberados a través de exosomas (47). Sin embargo, Tso-2 tampoco fue detectado en las muestras de suero evaluadas. Por otro lado, existen miRNAs específicos para estadios del ciclo de vida del parásito, regulando la expresión de genes que dan las características de cada uno (51–53). Tso-2 podría ser un miRNA de expresión muy transitoria, específica para un estadio del parásito que no ha sido evaluado. Una alternativa es que Tso-2 podría encontrarse en un pequeño número de copias, no detectable por la metodología usada, es decir,

inferior a las 10^3 copias en 1,33 μ L. Finalmente, puesto que es una predicción *in silico*, esta secuencia podría no tratarse de un miRNA.

Parte importante de esta tesis es la estandarización de la metodología de detección de miRNAs. Existen varios trabajos que tienen como objetivo encontrar el método más adecuado para extraer RNAs pequeños (41–43). Los estudios señalan que el método de Trizol no es adecuado para extraer RNAs pequeños, dado que miRNAs con bajo contenido de GC se pierden durante la extracción (43,54). Algunas de las muestras evaluadas fueron sometidas a extracción de RNA utilizando Trizol y se encontró que su expresión variaba con respecto al número de copias encontrado utilizando el kit mirVana (Información no mostrada). Debido a estas evidencias se decidió que lo más adecuado sería trabajar con el kit mirVana para el aislamiento de RNAs pequeños. Por otro lado, el nivel de expresión de miRNAs de *T. solium* es desconocido; por este motivo, se buscó un rango para la curva estándar que incluyera el número de miRNAs que se encuentran en las muestras inicialmente evaluadas. El rango abarcado (10^3 - 10^{10} copias en 1,33 μ L) coincide con los datos obtenidos que se muestran en la Tabla 2. La eficiencia de la curva estándar es un indicador de precisión del experimento (45). La eficiencia máxima teórica es 100%, esto quiere decir que en cada ciclo de qPCR el producto de RT-PCR se duplica (45). Sin embargo, en la práctica la eficiencia óptima varía entre 90 y 105% (55). Un valor de eficiencia mayor que 100% indica un error de pipeteo al realizar las diluciones o presencia de inhibidores (55). El valor de r^2 de las curvas representa la linealidad de los puntos de la curva estándar (45). Esta linealidad asegura que la eficiencia es la misma para cada número de copias planteado en la curva estándar (55). El valor de r^2 para las cinco curvas es superior a 0,990 (Figura 7) por lo que la linealidad es óptima. El LOD (*Limit of detection*) es la concentración mínima a la cual el 95% de las muestras positivas es detectada (45). En este caso la concentración mínima detectada es 10^3 , siendo este el punto inferior de las curvas estándar realizadas. El valor de LOD es un factor limitante para la investigación, ya que si pudiéramos detectar un menor número de copias, tal vez podríamos cuantificar Tso-2 en las muestras estudiadas.

El estudio de miRNAs en parásitos es un campo poco explorado, pero con mucho potencial debido a las aplicaciones que podría tener el conocer estas moléculas modulatorias. Los resultados muestran la presencia de los miRNAs Tso-1, Tso-3, Tso-4 y Tso-5 en *T. solium* y su liberación al organismo hospedero con un propósito aún desconocido. Estos cuatro miRNAs son inespecíficos ya que fueron detectados en muestras de organismos sanos, esto podría deberse a homología o una hibridación cruzada con RNAs de secuencia corta. Estudios posteriores deberían poder resolver esta incógnita, además de conocer los blancos de estos miRNAs. Por otro lado, la manera más adecuada de identificar miRNA propios de *T. solium* sería por secuenciación de RNAs pequeños y un nuevo trabajo de predicción a nivel de todo el genoma. El trabajo más reciente de miRNAs de *T. crassiceps* (40) confirma la existencia de miRNAs en *T. solium* y que un grupo de estos se comparten con otros platelmintos parásitos de este género. Además, en estudios realizados en el laboratorio (Oscar Sevillano, tesis de Licenciatura 2017) se encuentran los miRNAs Tso-1 y Tso-3 en muestras de *Fasciola hepatica* y *Echinococcus granulosus* demostrando que helmintos comparten moléculas modulatorias. Por tanto, a pesar de no haber encontrado miRNAs exclusivos de *T. solium*, se debe resaltar la importancia de la estandarización del método de extracción y cuantificación de RNAs pequeños, ya que se ha consolidado una metodología para estudios posteriores en el campo de miRNAs en parásitos.

VII. Conclusiones

Se construyeron curvas estándar para cuantificar cada uno de los cinco miRNAs de *T. solium* y estos fueron ensayados en muestras de *T. solium* y sus hospederos porcinos y humanos.

Tso-1, Tso-3, Tso-4 y Tso-5 se expresan en el estadio adulto y larval del parásito, y son secretados.

Cuatro miRNAs fueron detectados en abundancia en tejido cerebral de cerdo sano e infectado, así como en suero humano sano o de pacientes con NCC.

VIII. Recomendaciones

Conocer los blancos de estos miRNAs sería clave para entender el papel de estas pequeñas secuencias en la interacción parásito-hospedero.

Secuenciar RNAs de secuencia corta a partir de quistes de *T. solium* para conocer otros miRNAs del parásito y corroborar las secuencias de los miRNAs predichos evaluados.

IX. Referencias bibliográficas

1. García I, Benito M, Araújo M, Aguirre A, Polo I, Ana R, *et al.* Manual de laboratorio de Parasitología. 2009;2(5):1–36.
2. Larralde C, Aluja AS De. Cisticercosis. Guía para profesionales de la salud. 2006. 252 p.
3. García, Héctor H., Gonzalez, AE., Evans, CA., Gilman, RH., Cysticercosis Working Group in Peru. Europe PMC Funders Group. 2011;362(9383):547–56.
4. Garcia HH, Del Brutto OH. Taenia solium Cysticercosis. 2000;14(1):97–119.
5. Bouteille B. Épidémiologie de la cysticercose et de la neurocysticercose. Med Sante Trop. 2014;24:367–74.
6. Garcia HH, Del Brutto OH. Neurocysticercosis: Updated concepts about an old disease. Lancet Neurol. 2005;4(10):653–61.
7. Imirizaldu L, Miranda L, Urriza J, Quesada P. Neurocisticercosis . Una enfermedad emergente Neurocysticercosis . An emergent disease. 2004;27:201–10.
8. Mahale RR. Extraparenchymal (Racemose) Neurocysticercosis and Its Multitude Manifestations: A Comprehensive Review. 2015;11(3):203–11.
9. Sanchez-larsen A, Monteagudo M, Lozano-setien E. Neurocisticercosis racemosa subaracnoidea gigante y ventricular : a propósito de un caso. Rev Argent Microbiol. 2015;47(3):201–5.
10. Mahanty S, Orrego MA, Mayta H, Marzal M, Cangalaya C, Paredes A, *et al.* Post-treatment Vascular Leakage and Inflammatory Responses around Brain Cysts in Porcine Neurocysticercosis. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(3):1–18.

11. Sikasunge CS, Johansen M V., Phiri IK, Willingham AL, Leifsson PS. The immune response in *Taenia solium* neurocysticercosis in pigs is associated with astrogliosis, axonal degeneration and altered blood-brain barrier permeability. *Vet Parasitol.* 2009;160(3–4):242–50.
12. Tuero I, Palma S, Cabeza F, Saleemi S, Rodriguez S, Gonzales I, *et al.* A Comparative Study of Peripheral Immune Responses to *Taenia solium* in Individuals with Parenchymal and Subarachnoid Neurocysticercosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(10):1–15.
13. Tato P, Castro AM, Rodríguez D, Soto R, Arechavaleta F, Molinari JL. Suppression of murine lymphocyte proliferation induced by a small RNA purified from the *Taenia solium* metacestode. *Parasitol Res.* 1995;81(3):181–7.
14. Tato P, White AC, Willms K, Rodríguez D, Solano S, Sepúlveda J, *et al.* Immunosuppression and inhibition of inflammation in mice induced by a small *Taenia solium* RNA-peptide to implanted *T. solium* metacestodes. *Parasitol Res.* 1996;82(7):590–7.
15. World Health Organization. Working to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: First WHO Report on Neglected Tropical Diseases. 2010.
16. Garcia HH, Gonzalez AE, Rodriguez S, Gonzalez G. Epidemiología y Control de la Cisticercosis en el Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2010;27(4):592–7.
17. Bern C, Garcia HH, Evans C, Gonzalez AE, Tsang VCW, Gilman RH. Magnitude of the Disease Burden from Neurocysticercosis in a Developing Country. 1999;29(5):1203–9.
18. Garcia HH, Nash TE, Del Brutto OH. Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *Lancet Neurol [Internet].* 2014;13(12):1202–15.
19. Saavedra H, Gonzales I, Alvarado MA, Porras MA, Vargas V, Garcia HH, *et al.* Neurocysticercosis Diagnosis and Management in Peru. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública.* 2010;27(4):8–11.
20. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol [Internet].* 2014;15(8):509–24.
21. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity :

- microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol.* 2009;11(3):228–34.
22. Zhang J, Li S, Mi S, Li L. Exosome and Exosomal MicroRNA : Trafficking , Sorting , and Function. 2015;13:17–24.
 23. Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating MicroRNAs: Novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res.* 2012;110(3):483–95.
 24. Lagos-quintana M, Lagos-quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. 2012;853(2001).
 25. Hoy AM, Lundie RJ, Ivens A, Quintana JF, Nausch N, Forster T, *et al.* Parasite-Derived MicroRNAs in Host Serum As Novel Biomarkers of Helminth Infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(2).
 26. Stoicea N, Du A, Lakis DC, Tipton C, Arias-morales CE, Bergese SD. The MiRNA Journey from Theory to Practice as a CNS Biomarker. 2016;7(February):1–8.
 27. Teplyuk NM, Mollenhauer B, Gabriely G, Giese A, Kim E, Smolsky M, *et al.* MicroRNAs in cerebrospinal fluid identify glioblastoma and metastatic brain cancers and reflect disease activity. 2012;14(6):689–700.
 28. Yao S. MicroRNA biogenesis and their functions in regulating stem cell potency and differentiation. *Biol Proced Online.* 2016;1–10.
 29. Foulkes W, Smith I, Reis-Filho J. Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2010;
 30. Adams B, Vikram W, Cheng C, Inukai S, Booth C, Agarwal S, *et al.* miR-34a silences c-src to attenuate tumor growth in triple negative breast cancer. 2017;76(4):927–39.
 31. Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, Haraguchi N, Dewi DL, Kano Y, *et al.* Reprogramming of Mouse and Human Cells to Pluripotency Using Mature MicroRNAs. *Stem Cell.* 2011;8(6):633–8.
 32. Britton C, Winter AD, Gillan V, Devaney E. MicroRNAs of parasitic helminths - Identification, characterization and potential as drug targets. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist [Internet].* 2014;4(2):85–94.
 33. Cai P, Gobert GN, Mcmanus DP. MicroRNAs in Parasitic Helminthiases : Current

- Status and Future Perspectives. *Trends Parasitol.* 2015;32(1):71-86.
34. He X, Xie J, Zhang D, Su Q, Sai X, Bai R, *et al.* rAAV8-mediated inhibition of miRNA-21 protects mice against the lethal schistosome infection by repressing both IL-13 and TGF-B1 pathways. 2017;61(6):2008–17.
 35. Mantel P, Hjelmqvist D, Walch M, Kharoubi-hess S, Nilsson S, Ma S, *et al.* Infected erythrocyte-derived extracellular vesicles alter vascular function via regulatory Ago2-miRNA complexes in malaria. *Nature.* 2016;
 36. Cai P, Gobert GN, You H, Duke M, McManus DP. Circulating miRNAs: Potential novel biomarkers for hepatopathology progression and diagnosis of schistosomiasis japonica in two murine models. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(7):1–18.
 37. Melorose J, Perroy R, Careas S. No Title No Title. Vol. 1, Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015. 2015.
 38. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, *et al.* Real-time quantification of microRNAs by stem – loop RT – PCR. 2005;33(20):1–9.
 39. Maka I. miRNEST 2.0 : a database of plant and animal microRNAs. 2014;42(November 2013):74–7.
 40. Pérez MG, Macchiaroli N, Lichtenstein G, Conti G, Asurmendi S, Milone DH, *et al.* microRNA analysis of *Taenia crassiceps* cysticerci under praziquantel treatment and genome-wide identification of *Taenia solium* miRNAs. *Int J Parasitol.* 2017;
 41. Monleau M, Bonnel S, Gostan T, Blanchard D, Courgnaud V, Lecellier C-H. Comparison of different extraction techniques to profile microRNAs from human sera and peripheral blood mononuclear cells. *BMC Genomics [Internet].* 2014;15(1):395.
 42. Moret I, Sánchez-Izquierdo D, Borra MI, Tortosa L, Puche AN, Nos P, *et al.* Assessing an improved protocol for plasma microRNA extraction. *PLoS One.* 2013;8(12):1–10.
 43. McAlexander MA, Phillips MJ, Witwer KW. Comparison of methods for miRNA extraction from plasma and quantitative recovery of RNA from cerebrospinal fluid. *Front Genet.* 2013;4(MAY):1–8.
 44. Schmittgen T, Lee E, Jiang J, Sarkar A, Yang L, Elton T, *et al.* Real-time PCR

- quantification of precursor and mature microRNA. 2009;44(1):31–8.
45. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, *et al.* The MIQE Guidelines : M inimum I nformation for Publication of Q uantitative Real-Time PCR E xperiments SUMMARY : 2009;622:611–22.
 46. Zhu S, Wang S, Lin Y, Jiang P, Cui X, Wang X, *et al.* Release of extracellular vesicles containing small RNAs from the eggs of *Schistosoma japonicum*. *Parasit Vectors*. 2016;1–9.
 47. Buck AH, Coakley G, Simbari F, Mcsorley HJ, Quintana JF, Le T, *et al.* Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nat Commun*. 2014;5:1–11.
 48. Zamanian M, Fraser LM, Agbedanu PN, Harischandra H. Release of Small RNA-containing Exosome-like Vesicles from the Human Filarial Parasite *Brugia malayi*. 2015;1–23.
 49. Quintana JF, Makepeace BL, Babayan SA, Ivens A, Pfarr KM, Blaxter M, *et al.* Extracellular *Onchocerca* -derived small RNAs in host nodules and blood. 2015;1–11.
 50. Iborra M, Bernuzzi F, Correale C. Identification of serum and tissue micro-RNA expression profiles in different stages of inflammatory bowel disease. 2013;250–8.
 51. Basika T, Macchiaroli N, Cucher M, Espínola S, Kamenetzky L, Zaha A, *et al.* Identification and profiling of microRNAs in two developmental stages of the model cestode parasite *Mesocestoides corti*. *Mol Biochem Parasitol*. 2016;210(1-2):37-49.
 52. Macchiaroli N, Cucher M, Zarowiecki M, Maldonado L, Kamenetzky L, Rosenzvit MC. microRNA profiling in the zoonotic parasite *Echinococcus canadensis* using a high-throughput approach. 2015;1–17.
 53. Cucher M, Prada L, Mourglia-Ettlin G, Dematteis S, Camicia F, Asurmendi S, *et al.* Identification of *Echinococcus granulosus* microRNAs and their expression in different life cycle stages and parasite genotypes. *Int J Parasitol*. 2011;41(3–4):439–48.
 54. Kim YK, Yeo J, Kim B, Ha M, Kim VN. Short Structured RNAs with Low GC Content

Are Selectively Lost during Extraction from a Small Number of Cells. *Mol Cell*. 2012;46(6):893–5.

55. Bio-Rad Laboratories Inc. Real Time PCR Applications Guide. 2006.