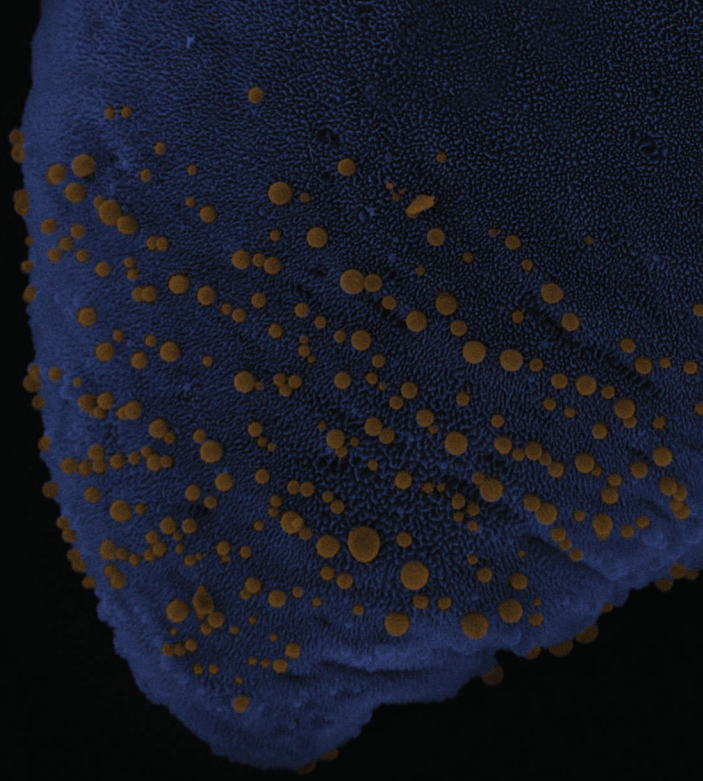
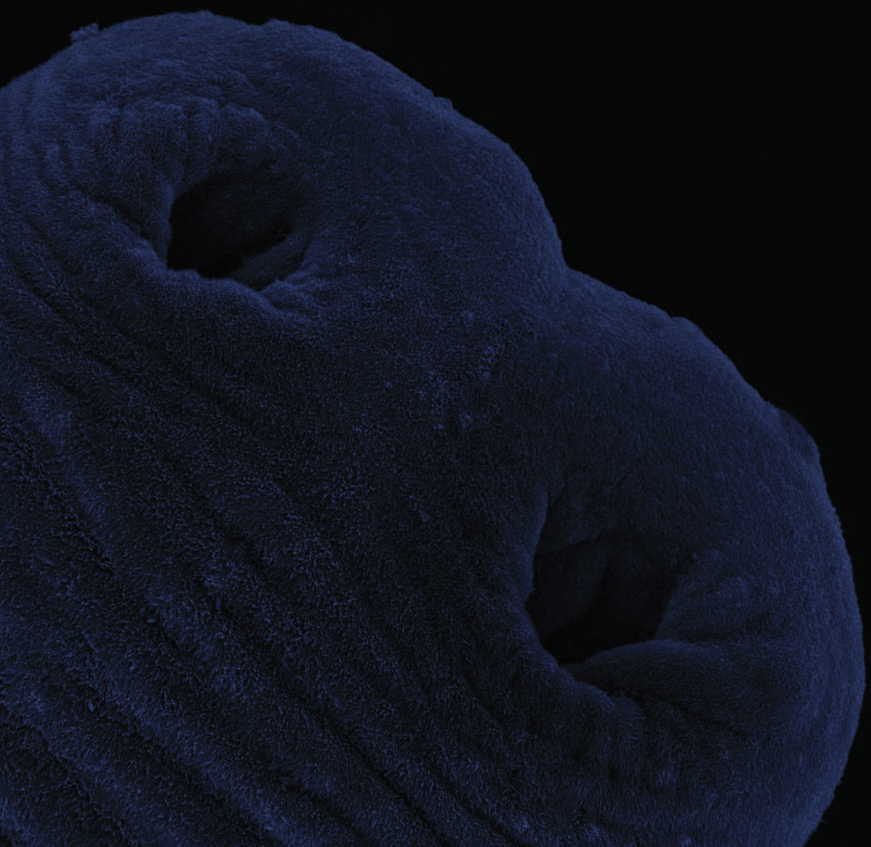


ESTUDIO DE ENZIMAS HISTONAS DEACETILASAS DE CESTODOS Y SU EVALUACIÓN COMO POTENCIALES BLANCOS FARMACOLÓGICOS EN ENFERMEDADES PARASITARIAS DESATENDIDAS

HUGO ROLANDO VACA



UNSAM

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOTECNOLÓGICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN

TRABAJO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

DOCTOR EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

ESTUDIO DE ENZIMAS HISTONAS DEACETILASAS DE CESTODOS Y SU EVALUACIÓN COMO POTENCIALES BLANCOS FARMACOLÓGICOS EN ENFERMEDADES PARASITARIAS DESATENDIDAS

AUTOR: HUGO ROLANDO VACA

DIRECTORA: MARA CECILIA ROSENZVIT

CO-DIRECTOR: FEDERICO CAMICIA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA MÉDICA

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

2020

A mis madres, Ángela y Ana, y mi perrita Lola

Un científico en su laboratorio no es un simple técnico: también es un niño que se enfrenta a fenómenos naturales que lo impresionan como si fueran cuentos de hadas.

-Maria Salomea Skłodowska-Curie

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a mis formadores Mara y Federico por todo lo aprendido y los buenos momentos compartidos durante esta etapa de mi formación profesional. En especial agradezco a Mara, por haber depositado en mí su confianza y permitirme formar parte de su equipo en el Laboratorio de Biología Molecular de Hidatidosis (BMHid).

Quiero agradecer a Anette por su invaluable apoyo durante esta etapa. Su gran dedicación, los extensivos debates con café y las ganas de transmitir sus conocimientos me han permitido llegar a este punto.

También quiero agradecer mis compas del BMHid (Mati, Euge, Nati, los Gabis y los Lucas) por todo lo compartido en estos años. Su compañerismo y disposición para trabajar en equipo permitieron crear un buen ambiente de trabajo y, aún cuando las dificultades nos invadieron, hemos podido siempre tirar para un mismo lado.

Las investigadoras del BMHid (Nati, Marce y LauKa) por su gran apoyo. Especialmente, quiero agradecer a Nati por haber sido una excelente guía laboral y personal. Por su inmensa generosidad y su disposición para ayudar en lo que necesitaba.

A toda la gente del Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPaM) por su apoyo, compañerismo y los buenos momentos compartidos. En especial a los Emilio´s, quienes siempre han estado siempre para brindar su ayuda.

Durante esta tesis he recibido ayuda de investigadoras/es que gentilmente nos han apoyado. No quiero más que agradecer por todo ello.

El Dr. Alejandro Nusblat, la Dra. Luján Cuesta y la gente de sus laboratorios, por darme la posibilidad de trabajar y aprender. Especialmente a Agustina, quién me acompaño en cada proceso y hemos sufrido cada resultado.

La Dra. Celina Elissondo y la gente de su laboratorio por recibirme en su laboratorio y toda la ayuda suministrada que permitió llevar adelante las microscopías electrónica de barrido.

Los Dres. Wolfgang Sippl y Manfred Jung por cedernos los compuestos empleados en esta tesis y su colaboración con el análisis de los experimentos. Al Dr. Christophe Romier por sus valiosas sugerencias.

La Dra. Vanina Campo y el Dr. Sergio Angel, quienes nos han cedido los anticuerpos que permitieron realizar los Western Blot.

En especial, me gustaría agradecer al Dr. Guilherme Oliveira por incentivarnos a investigar las Histonas deacetilasas y por sus valiosos consejos.

A la Universidad Nacional de San Martín (UNSAM), en especial a la comisión de doctorado y la secretaria de posgrado, y al Consejo Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Nada de esto hubiese sido posible sin mis madres Ángela y Ana. A ellas les agradezco enseñarme a soñar y a seguir mis convicciones. Por mostrarme, con su ejemplo, que con esfuerzo y dedicación todo es posible. Por darme libertad para elegir, la responsabilidad de hacerme cargo de mis elecciones y acompañarme en todo momento.

Agradezco también a mis hermanas/os, sobrinas/os y familiares por sus palabras de aliento y los consejos que cada uno, según su visión, me han dado. En especial a mi hermana Lucrecia y mis sobrinos Joaquín y Lucho, quienes han estado siempre a mi lado aguantando y acompañando durante todos los vaivenes por los que he pasado.

A mis amigos (Elías, Seba, Marcos y Lucy) por su apoyo y generosidad. Por acompañarme en las buenas y en las malas, por saber perdonar que a veces sea un poco colgado y seguir creciendo juntos. Por todas las aventuras compartidas e incentivarme siempre a seguir adelante. En especial a mi hermanita del alma Lucy, por todos estos años compartidos. Por nuestros apasionados debates que siempre terminan en risas.

A mi compañero Oscar, a quién debo agradecer la portada y varias imágenes en esta tesis. Pero especialmente le quiero agradecer por ayudarme a no aflojar, por su generosidad y por elegir transitar juntos el camino.

A todas esas personas maravillosas que la vida me ha presentado Brenda, Andy, Arley, Yuri y demás.

Por último, agradezco al *Big Bang*, esa maravillosa explosión hace más de 13 800 millones de años hizo posible que todas/os/es estemos aquí hoy.

A todas/os/es, ¡Gracias Totales!

ÍNDICE TEMÁTICO

ABREVIATURAS 7

RESUMEN 10

1. INTRODUCCIÓN 14

1.1. Las interacciones biológicas y el parasitismo 14

1.2. La parasitología 15

1.3. Los cestodos 15

1.3.1. Anatomía de los cestodos 16

1.3.1.1. Parásito adulto 16

1.3.1.2. Huevo y oncosfera 19

1.3.1.3. Metacestodo 20

1.4. Cestodos de relevancia en salud humana y medicina veterinaria 23

1.4.1. Parásitos del género *Echinococcus* 24

1.4.1.1. Ciclo de vida de los parásitos del género *Echinococcus* 24

1.4.1.2. Especies pertenecientes al complejo *Echinococcus granulosus sensu lato* 26

1.4.1.3. Distribución geográfica de la hidatidosis 27

1.4.1.4. Importancia de la hidatidosis quística en nuestra región 28

1.4.1.5. Diagnóstico y tratamiento de la hidatidosis 31

1.4.2. *Taenia solium* 33

1.4.2.1. Ciclo de vida de *Taenia solium* 33

1.4.2.2. Distribución geográfica de la teniasis/cisticercosis 35

1.4.2.3. Diagnóstico y tratamiento 36

1.5. Cestodos modelos 37

1.5.1. Ciclo de vida de *Mesocestoides corti* 37

1.6. Remodelación de la cromatina 39

1.6.1. Las Histonas deacetilasas 41

1.6.2. Inhibidores de las enzimas HDACs 42

HIPÓTESIS 44

OBJETIVO GENERAL 44

OBJETIVOS ESPECÍFICOS 44

2. MATERIALES Y MÉTODOS 46

2.1. Material Parasitario 46

2.1.1. *Echinococcus granulosus sensu lato* (*s.l.*) 46

2.1.2. *Mesocestoides corti* 46

2.1.3. Declaraciones Éticas 47

2.2. Identificación y análisis de genes codificantes de HDACs en cestodos 47

2.2.1. Identificación de genes codificantes de HDACs en los genomas de cestodos 47

2.2.2. Análisis filogenéticos de los genes codificantes de HDAC en cestodos 48

2.2.3. Análisis del porcentaje de identidad entre los genes de HDACs 49

2.2.4. Análisis de expresión transcripcional de los genes de HDACs en diferentes estadios de desarrollo de *Echinococcus* spp. 49

2.3. Validación de las HDACs de cestodos como potenciales blancos farmacológicos 50

2.3.1. Soluciones stock 50

2.3.2. Ensayos de viabilidad empleados 50

2.3.2.1. Adaptación del ensayo de viabilidad por reducción de la resazurina para la determinación de la viabilidad parasitaria de *Mesocestoides corti* 50

2.3.2.2. Adaptación del ensayo de viabilidad por mediciones de motilidad para la determinación de la viabilidad parasitaria de *Mesocestoides corti* 53

2.3.3. Determinación del efecto del inhibidor de las HDACs “Tricostatina A” sobre la viabilidad parasitaria de *Mesocestoides corti* 54

2.3.4. Determinación del efecto del inhibidor de las HDACs “Tricostatina A” sobre la morfología parasitaria de *Mesocestoides corti* 56

2.3.5. Determinación del efecto del inhibidor de las HDACs “Tricostatina A” sobre los niveles de acetilación de proteínas de *Mesocestoides corti* 56

2.3.5.1. Muestras para Western blot 56

2.3.5.2. Ensayo de Western blot 57

2.3.6. Análisis estadísticos 58

2.4. Evaluación del efecto antihelmíntico de un alto número de inhibidores de HDACs 58

2.4.1. Soluciones Stock 58

2.4.2. Determinación del efecto antihelmíntico de los inhibidores de las HDACs y las Sirtuinas sobre la viabilidad parasitaria de *Mesocestoides corti* 61

2.4.3. Determinación del efecto de los inhibidores de HDACs y Sirtuinas sobre la morfología de *Mesocestoides corti* 61
2.4.4. Análisis estadístico 61

2.5. Caracterización del efecto farmacológico de los inhibidores seleccionandos de las enzimas HDACs y Sirtuinas 62
2.5.1. Determinación del efecto dosis-respuesta de los inhibidores seleccionados de las enzimas HDACs y Sirtuinas 62
2.5.2. Determinación de la reversibilidad del efecto antihelmíntico de los inhibidores seleccionados de las enzimas HDACs y Sirtuinas 63
2.5.3. Determinación del efecto de los inhibidores seleccionados de las enzimas HDACs y Sirtuinas sobre la ultraestructura de *Mesocestoides corti* 64
2.5.4. Determinación del efecto antihelmíntico de combinaciones de a pares de los compuestos seleccionados y el ABZ 64

2.6. Caracterización estructural de las HDACs como potenciales blancos farmacológicos 65
2.6.1. Clonado y secuenciación de la HDAC8 de *Echinococcus canadensis* G7 y *Mesocestoides corti* 65
2.6.2 Modelado por homología de las HDAC8 de *Echincoccus canadensis* G7 y *Mesocestoides corti* 66

3. RESULTADOS 69

3.1. Identificación y análisis de genes codificantes de enzimas HDACs en cestodos 69
3.1.1. Se identificaron varios genes codificantes de enzimas HDACs en los genomas de cestodos 69
3.1.2. El análisis filogenético reveló la presencia de varios miembros dentro de las HDACs de Clase I y II en parásitos cestodos 76
3.1.3. Las comparaciones entre las HDACs de cestodos y *Homo sapiens* proporcionaron información relevante a fin de definir candidatos a blancos farmacológicos 78
3.1.4. Los genes codificantes de HDACs se expresan en diferentes estadios del desarrollo en parásitos del género *Echinococcus* 80

3.2. Validación de las enzimas HDACs de cestodos como potenciales blancos farmacológicos 82
3.2.1. Adaptación del ensayo de viabilidad por reducción de la resazurina para la determinación de la viabilidad parasitaria de *Mesocestoides corti* 83
3.2.2. Adaptación del ensayo de viabilidad por mediciones de motilidad para la determinación de la viabilidad parasitaria de *Mesocestoides corti* 87
3.2.3. La inhibición de las enzimas HDACs afecta la viabilidad de *Mesocestoides corti* 90
3.2.4. La Tricostatina A produce alteraciones en la morfología parasitaria de *Mesocestoides corti* 93
3.2.5 La Tricostatina A inhibe fuertemente la desacetilación de proteínas en *Mesocestoides corti* 94

3.3. Evaluación del efecto antihelmíntico de un alto número de inhibidores de las enzimas HDACs 97

3.3.1. Evaluación del efecto antihelmíntico de inhibidores de las HDACs de Clase I sobre *Mesocestoides corti* 98

3.3.2. Evaluación del efecto antihelmíntico de inhibidores de las HDACs de Clase II sobre *Mesocestoides corti* 103

3.3.3. Evaluación del efecto antihelmíntico de inhibidores de las Sirtuinas (o HDACs de Clase III) sobre *Mesocestoides corti* 104

3.3.4. Controles empleados 107

3.3.5. Evaluación del efecto antihelmíntico de los compuestos derivados del 3-aminobenzohidroxamato (serie TH) sobre *Mesocestoides corti* 108

3.3.6. Evaluación del efecto antihelmíntico de los compuestos serie EG, TB, Pz y SD sobre *Mesocestoides corti* 114

3.4. Caracterización del efecto farmacológico de los inhibidores seleccionandos de las enzimas HDACs y Sirtuinas 118

3.4.1. Los compuestos seleccionados presentan un efecto antihelmíntico dependiente de la dosis 118

3.4.2. Los compuestos seleccionados presentan un efecto antihelmíntico irreversible 120

3.4.3. Los compuestos seleccionados alteran la morfología parasitaria a nivel ultra-estructural 122

3.4.4. El efecto antihelmíntico de los compuestos se potencia usando combinaciones de a pares 125

3.5. Caracterización estructural de las HDACs como potenciales blancos farmacológicos 129

3.5.1. Clonado y secuenciación de la HDAC8 de *Echinococcus canadensis G7* y *Mesocestoides corti* 130

3.5.2. Los genes EcaHDAC8 y McoHDAC8 tienen inserciones en sus secuencias que no están presentes en su ortólogo de *Homo sapiens* (HsaHDAC8) 133

3.5.3. Los modelos estructurales para las EcaHDAC8 y McoHDAC8 presentan la estructura canónica de las enzimas HDACs 135

3.5.4. Los modelos estructurales de EcaHDAC8 y McoHDAC8 presentan particularidades estructurales 140

3.5.5. Los residuos implicados en la unión al inhibidor de las HDACs “Tricostatina A” se encuentran conservados en EcaHDAC8 y McoHDAC8 141

4. DISCUSIÓN 144

5. CONCLUSIONES 152

6. PERSPECTIVAS 155

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 158

8. ANEXOS 169

A1. Medios y soluciones tampón 169

A1.1. Medio Mco-RPMI 1640 169

A1.2. Solución Tampón RIPA 169

A1.3. Soluciones para SDS-PAGE 170

A1.3.1. Solución Tampón de Corrida 170

A1.3.2. Solución Tampón de Transferencia 170

A1.3.3. Solución Tampón de Carga 171

A1.3.4. Solución Acrilamida/Bisacrilamida (30:0,9) 171

A1.3.5. Solución Tampón *STACKING* (500 mL de solución TRIS- HCl 0,5 M pH 6,8) 171

A1.3.6. Solución Tampón *RUNNING* (500 mL de solución TRIS-HCl 1,5 M pH 8,8) 172

A1.3.7. Gel de poliacrilamida al 15% 172

A1.4. Soluciones para Western Blot 172

A1.4.1. Solución Tampón TBS 172

A1.4.2. Solución Tampón TBS-T (Solución salina Tris, 0,1 % Tween 20) 173

A1.4.3. Solución Tampón TBS-T leche (Solución salina Tris, 0,1 % Tween 20 y 5% p/v leche) 173

A1.5. Soluciones para ECL 173

A1.6. Solución Tampón Fosfato 0,1M pH 7,2 174

A2.Secuencias 174

A2.1. Secuencia de la HDAC8 de *Echinococcus canadensis* G7 (EcaHDAC8) en nucleótidos y aminoácidos 174

A2.2. Secuencia de la HDAC8 de *Mesocestoides corti* (McoHDAC8) en nucleótidos y aminoácidos 175

A3. Comparación de los genes de HDACs identificados en los genomas disponibles para *Echinococcus granulosus sensu stricto* G1, que mostraron ortología con la HDAC6 y HDAC10 de *Homo sapiens* 176

A3.1. Alineamiento de secuencias de los genes EGR_07178.1 y EgrG_000970800 176

A3.2. Alineamiento de secuencias de los genes EGR_07180.1 y EgrG_000970900 176

A3.3. Alineamiento de secuencias de los genes EGR_07180.1 y EgrG_000971000 177

A4. Comparación de los genes de HDACs identificados en los genomas disponibles para *Taenia asiatica*, que mostraron ortología con la HDAC6 y HDAC10 de *Homo sapiens* 177

A4.1. Alineamiento de secuencias de los genes TASs00024g03791m00001 TASK_0000403001 177

A4.2. Alineamiento de secuencias de los genes TASs00024g03791m00001 y TASK_0000403101 178

A4.2. Alineamiento de secuencias de los genes TASs00024g03791m00001 y TASK_0000403201 178

A5. Genes codificantes de enzimas Sirtuinas (o HDACs de Clase III) en *Echinococcus granulosus sensu stricto G1 y Echinococcus multilocularis* 179

A6. PCR **180**

A6.1. PCR para amplificar los genes EcaHDAC8 y McoHDAC8 180

A6.2. PCR de colonia 181

ABREVIATURAS

HMDS	Hexametildisilazano
4wCW	Metacestodos pequeños de 4 semanas de cultivo *in vitro*
aa	Aminoácidos
ABZ	Albendazol
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	ARN interferente
BioProyect ID	Códigos de identificación de los genomas de acuerdo a la WormBase ParaSite
CDS	del inglés, *Coding Sequence*
CEGMA	Del inglés, *The Core Eukaryotic Genes Mapping Approach*
CW	Capa germinal indicada como pared hidatídica
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
ETDs	Enfermedades Tropicales Desatendidas
EtOH	Etanol
FDA	del inglés, *U.S.A. Food and Drug Administration*
gr	gramo
Gen ID	Códigos de identificación de los genes de acuerdo a la WormBase ParaSite
HDACi	Inhibidores de las enzimas HDACs
HDACs	Enzimas Histonas deasetilasas
h	Horas
IC_{25}	Concentración inhibitoria 25%
IC_{50}	Concentración inhibitoria media
IC_{90}	Concentración inhibitoria 90%
IEP	Índice de efecto proporcional
IMR	Índice de motilidad relativa
L	Litro
m	Metro
M	Molar
MEB	Microscopia electrónica de barrido
min	Minutos
N50	Estadístico N50
NCC	Neurocisticercosis
OMS	Organización Mundial de la Salud
Onc	Oncosferas
Onc Act	Oncosferas activadas
PAIR	Punción, aspiración, inyección y reaspiración
PDB	del inglés, *Protein Data Bank*
RPMI	Medio *Roswell Park Memorial Institute*

PSC	Protoescólices
PZQ	Paziquantel
QSAR	del inglés, *Quantitative structure-activity relationship*
RMSD	del inglés, *Root Mean Square Deviation*
RNAseq	Secuenciación de ARN
RPKM	del inglés, *Reads per kilo base per million mapped reads*
seg	Segundos
SIRTs	Enzimas Sirtuina
SNC	Sistema nervioso central
TSA	Triscostatina A
TTy	Tetratiridios

RESUMEN

RESUMEN

Los cestodos son platelmintos que se encuentran distribuidos mundialmente en diferentes ecosistemas; logrando parasitar casi todas las especies de vertebrados, incluido el ser humano. Entre las enfermedades que producen, la equinococosis y la cisticercosis -causadas por *Echinococcus* spp. y *Taenia solium* respectivamente- se encuentran entre las 17 Enfermedades Tropicales Desatendidas (ETDs) priorizadas por la Organización Mundial de la Salud. Actualmente, las únicas drogas aprobadas para su tratamiento farmacológico son los benzimidazoles, como el albendazol (ABZ), y el praziquantel. Estos compuestos no son bien tolerados y/o resultan inefectivos en muchos casos. Por otra parte, la resistencia a los antihelmínticos resulta en una complicación frecuente en las terapias farmacológicas basadas en una única droga. Por estos motivos, la búsqueda racional de nuevos blancos farmacológicos y de nuevas drogas resulta imperativa. Los cestodos tienen ciclos de vida complejos por lo que deben adaptarse a diferentes entornos a lo largo de sus ciclos de vida. La notable plasticidad fenotípica que presentan involucra un complejo sistema de control de la expresión génica, que posiblemente esté asociado con cambios en la estructura de la cromatina. Las enzimas Histonas deacetilasas (HDACs) influyen de manera directa sobre la estructura de la cromatina, regulando la transcripción de genes, así como otros procesos celulares. Estas enzimas han sido validadas ampliamente como blancos farmacológicos en enfermedades como el cáncer, diabetes, desórdenes autoinmunes y neurológicos y, en los últimos años, en enfermedades parasitarias como la esquistosomiasis, leishmaniasis, Chagas y malaria; entre otras. En la actualidad, la información sobre las HDACs en cestodos y su rol en el desarrollo parasitario es sumamente limitada. En este trabajo de tesis doctoral se propuso caracterizar las HDACs de cestodos y determinar su potencial como blancos farmacológicos.

Empleando las bases de datos de genomas parasitarios se mostró el repertorio completo de genes codificantes de HDACs en cestodos. Se identificaron entre 6-7 genes codificantes de HDACs en varios miembros de los géneros *Echinococcus*, *Taenia*, *Hymenolepis* y *Mesocestoides*. Estos genes fueron clasificados dentro de las HDACs de clases I y II y se demostró su expresión a nivel transcripcional en diferentes estadios de desarrollo de parásitos del género *Echinococcus*. Particularmente, las HDAC8s de cestodos mostraron bajos porcentajes de identidad con su ortólogo en *Homo sapiens* y expresión en estadios de desarrollo asociados con altos niveles de proliferación y diferenciación celular; constituyendo, de esta manera, potenciales blancos farmacológicos selectivos. Por otro lado, se validaron las HDACs como potenciales blancos

farmacológicos en cestodos evaluando el efecto del inhibidor de las HDACs de clases I y II, Tricostatina A (TSA), sobre la viabilidad del estadio larval (tetratiridio) del modelo de laboratorio de cestodos *Mesocestoides corti*. La inhibición de las HDACs produjo una disminución significativa de la viabilidad parasitaria, determinada mediante medidas de motilidad y actividad metabólica; así como, alteraciones en el tegumento y en la morfología general. TSA produjo además un aumento en los niveles de acetilación de las proteínas totales, incluyendo la Histona H4, determinado mediante Western Blot semi-cuantitativo. Estos resultados sugieren que las HDACs de cestodos serían funcionales y podrían desempeñar un papel importante en la supervivencia y el desarrollo de *M. corti.*

Para identificar compuestos con alto potencial antihelmíntico, se determinó el perfil de actividad antihelmíntica de un total de 33 compuestos, distribuidos entre inhibidores de HDACs de las clases I, II y III (o Sirtuinas). Varios de estos compuestos produjeron una disminución de la viabilidad parasitaria, así como alteraciones en el tegumento y la morfología general de *M. corti*. Particularmente, los inhibidores: entinostat, TH65, TH92 y Mz25 mostraron un potente efecto antihelmíntico; produciendo una disminución de la viabilidad parasitaria dependiente tanto de la dosis como del tiempo de tratamiento y con actividades superiores a las observadas para TSA y la droga antihelmíntica ABZ. El efecto observado para estos compuestos no se revirtió al ser removidos del medio de cultivo, sugiriendo que su efecto es irreversible. Se demostró además que estos compuestos presentan un efecto potenciador (o sinergia de potenciación) cuando son empleados en combinaciones binarias, entre ellos y con ABZ. Por último, las observaciones realizadas por microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido mostraron alteraciones en el tegumento y en la morfología de los parásitos tratados.

Por otra parte, se confirmaron las secuencias nucleotídicas completas de las HDAC8s de *Echinococcus canadensis* G7 (EcaHDAC8) y de *M. corti* (McoHDAC8). Los modelos de estructura tridimensional para estas proteínas mostraron características estructurales particulares que las diferencian de la HDAC8 de *H. sapiens*. Estas características son similares a las reportadas para la HDAC8 de *Schistosoma mansoni*; las cuales permitieron el diseño de inhibidores selectivos contra esta proteína, tales como TH65 y TH92. Estos resultados sugieren que las HDAC8s de cestodos representan promisorios blancos farmacológicos en la búsqueda racional de nuevos compuestos con capacidad antihelmíntica.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo proporcionan la base para nuevos estudios sobre la actividad y estructura de las HDACs en cestodos, así como también para el descubrimiento de nuevas alternativas de tratamiento para ETDs causadas por estos parásitos.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

En este trabajo se propone estudiar las enzimas Histonas deacetilasas (HDACs), como potenciales blancos farmacológicos en la búsqueda de nuevas opciones de tratamiento contra enfermedades tropicales desatendidas (ETD) causadas por cestodos. En esta sección se presenta la información básica en relación a los cestodos, prestando particular atención a especies de importancia en medicina veterinaria y salud humana pertenecientes a los géneros *Echinococcus*, *Taenia* y *Mesocestoides*. Asimismo, se abordan diferentes aspectos vinculados a las HDACs, principalmente en relación a su potencial como blancos farmacológicos.

1.1. Las interacciones biológicas y el parasitismo

En la naturaleza conviven e interactúan entre sí organismos de diferentes especies con diferentes grados de dependencia. Dichas interacciones biológicas se conocen como simbiosis *lato sensu* y a sus integrantes como simbiontes. Históricamente se admiten, de acuerdo a la dependencia entre simbiontes, tres grados de simbiosis: el mutualismo, el comensalismo y el parasitismo (Berrecil Flores, 2014). En el caso del mutualismo, ambos simbiontes resultan beneficiados y existe una dependencia fisiológica mutua. Un ejemplo conocido de mutualismo lo constituyen las termitas y sus protozoos intestinales. Las termitas proporcionan el hábitat y la celulosa proveniente de la madera -la cual no son capaces de digerir- a sus protozoos intestinales. Los protozoos, por su parte, sí son capaces de hidrolizar la celulosa y ésta es usada tanto para su propio beneficio como también para el de las termitas. El comensalismo, por su parte, consiste en un fenómeno en el que uno de los simbiontes (denominado hospedador) brinda el hábitat y el alimento a sus simbiontes (denominados comensales) sin resultar dañado ni beneficiado. Al hospedador le resulta indistinto interactuar o no con sus comensales. Estos últimos, sin embargo, sí dependen fisiológicamente del hospedador. Ejemplos de comensales resultan ser ciertos protozoos que viven en el intestino del ser humano. Por último, en el parasitismo existe una relación en la cual uno de los simbiontes (denominado parásito) es fisiológicamente dependiente del otro (denominado hospedador). En estos casos, el hospedador puede verse perjudicado por dicha interacción biológica. Los microorganismos patógenos del ser humano constituyen ejemplos de parasitismo.

1.2. La parasitología

La parasitología es la rama de la biología que se encarga del estudio de la interacción biológica conocida como parasitismo. Es decir, el estudio de la relación entre parásitos y hospedadores, como así también, entre los simbiontes y el medio ambiente. Convencionalmente, se ocupa solo de los parásitos eucariotas como son los protozoos, helmintos (trematodos, cestodos, nematodos y monogéneos) y artrópodos. El resto de los organismos parásitos: virus, procariotas y hongos, tradicionalmente se consideran una materia propia de la microbiología.

1.3. Los cestodos

El phylum Platyhelminthes (o gusanos planos, más conocido como *flatworms* en inglés) es uno de los grupos más grandes de gusanos, con más de 20 000 especies, que incluye tanto organismos de vida libre como las planarias y también organismos exclusivamente parásitos pertenecientes a las Clases Trematoda, Monogenea y Cestoda (Collins, 2017). Los platelmintos se caracterizan por ser gusanos planos y acelomados, tener cuerpos bilateralmente simétricos, carentes de cutículas o capas protectoras, tener un bajo grado de cefalización, con un sistema nervioso centralizado simple y una capa germinal mesodérmica, carecer de conducto anal y usualmente hermafroditas (Collins, 2017; Moguel y col., 2015). Los miembros de las Clases Trematoda y Cestoda constituyen la mayor parte de los parásitos platelmintos de importancia médica.

En el presente trabajo de tesis doctoral nos enfocaremos en los organismos pertenecientes a la Clase Cestoda (los cestodos), en particular a los parásitos pertenecientes a los géneros *Echinococcus*, *Taenia* y *Mesocestoides*. Los cestodos, en su forma adulta, son gusanos planos con forma de cinta que pueden medir desde milímetros hasta varios metros y son exclusivamente endoparásitos (que viven dentro del cuerpo de su hospedador). Además, los parásitos pertenecientes a la Sub-Clase Eucestoda se localizan casi exclusivamente en el tubo digestivo de los hospedadores vertebrados. Existen, sin embargo, algunas excepciones en donde los parásitos se localizan en órganos y tejidos relacionados de igual manera con procesos digestivos, como pueden ser la vesícula biliar o los túbulos pancreáticos (Collins, 2017).

1.3.1. Anatomía de los cestodos

A continuación, se describirá brevemente la anatomía de los cestodos. Dichos organismos, atraviesan diferentes estadios de desarrollos a lo largo de sus ciclos de vida. Los estadios de desarrollo relevantes que se describirán serán los correspondientes a adultos, oncosfera y metacestodos.

1.3.1.1. Parásito adulto

El estadio de desarrollo correspondiente a parásitos adultos en cestodos es acelomado, con simetría bilateral, aplanado dorso-ventralmente, hermafrodita y segmentado. A cada uno de los segmentos se los denomina proglótidos (o proglótides). En los adultos se pueden diferenciar tres regiones o divisiones bien definidas y características: 1) **el escólex**, o extremo anterior del cuerpo; 2) **el cuello**, o región media, y 3) **el estróbilo**, o extremo posterior del cuerpo (Figura 1.1) (Thompson y McManus, 2001).

El escólex es un órgano de fijación, que en el caso de los cestodos del orden Cyclophillidea es de tipo acetabulado y posee los elementos de fijación al hospedador, como las ventosas (en número de cuatro) de forma y tamaño variables. Este tipo de escólex puede a su vez ser penetrativo o no penetrativo. Estos últimos, como su nombre lo indica, no penetran profundamente la mucosa intestinal del hospedador. Los escólex penetrativos, por su parte, permiten una fijación al hospedador más íntima dado que invaden las criptas de Lieberkühn en el intestino del hospedador. Este tipo de escólex usualmente posee, aparte de las ventosas, un róstelo; que es un órgano muscular evertible, de localización apical y con forma semiesférica, cilíndrica o cónica. En muchas especies el rostelo posee ganchos dispuestos en una o varias coronas que colaboran con la fijación del parásito a la mucosa de su hospedador.

El cuello es una pequeña región, inmediatamente posterior al escólex, estrecha, no segmentada y que contiene una zona germinativa (con células germinales) desde donde se originan las proglótides que forman el estróbilo.

El estróbilo representa la mayor parte del cuerpo, consiste en un tronco elongado, segmentado y formado por proglótides. Cabe destacar que, aunque se observan constricciones en el estróbilo que delimitan las proglótides, el interior posee un parénquima ininterrumpido y existen músculos longitudinales que atraviesan la totalidad del cuerpo del organismo. El grado de

maduración de las proglótides aumenta conforme las mismas se alejan del escólex. A medida que se van formando nuevas proglótides a partir del cuello, las más viejas se alejan del escólex, maduran, resultan inseminadas y se llenan de embriones. Cada proglótide constituye una unidad funcional dotada de sistema nervioso, aparato excretor y uno o dos aparatos reproductores (Reuter y Kreshchenko, 2004). Una vez que los individuos han alcanzado la madurez sexual se produce la fecundación. El útero grávido forma generalmente un saco ciego repleto de huevos, los que quedarán libres por maceración de las proglótides dentro del intestino del hospedador o en el medio ambiente. Por lo tanto, en el estróbilo pueden distinguirse proglótides inmaduras, maduras sexualmente y grávidas con huevos fértiles (Reuter y Kreshchenko, 2004). Los huevos se desarrollan dentro del útero del parásito hasta formar una oncosfera (o embrión hexacanto) con capacidad inmediatamente infectante al ser excretado por el hospedador (Thompson y McManus, 2001).

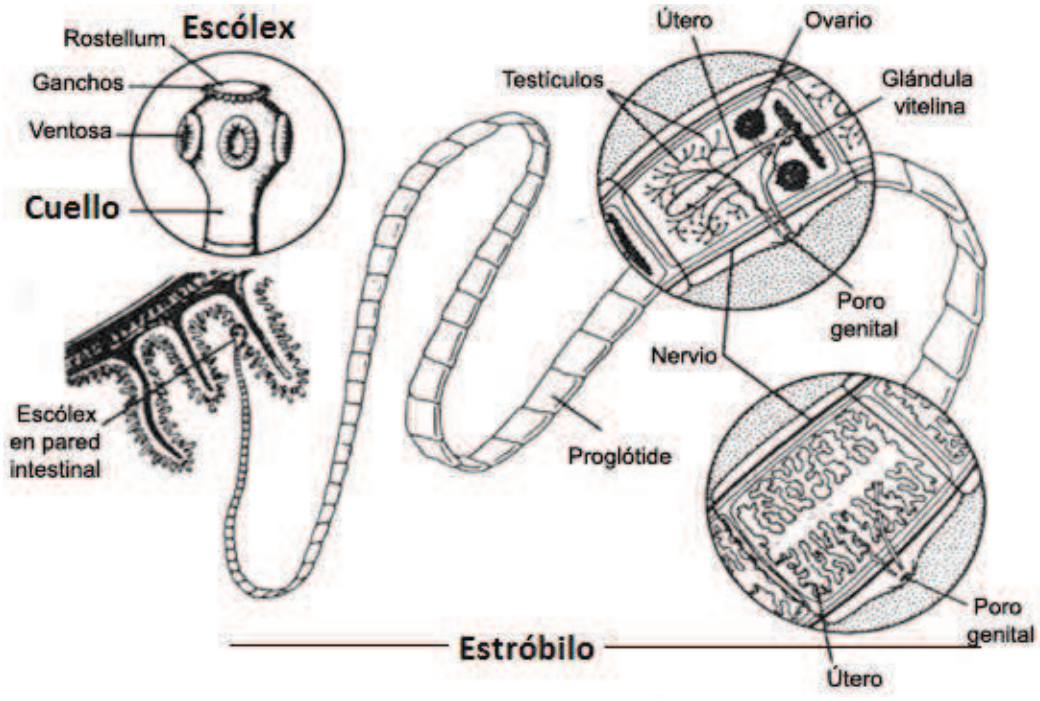


Figura 1.1. Estructura general de un cestodo adulto. Se muestra el esquema de un cestodo típico en el estadio de desarrollo correspondiente a parásito adulto. Se observan tres regiones claramente diferenciadas: el escólex, el cuello y el estróbilo. La imagen fue adaptada del proyecto ZOOWIKI, Universidad de Sevilla. (https://www.bioscripts.net/zoowiki/temas/6B.html)

El estadio adulto de los cestodos se ha adaptado para vivir en el intestino de sus hospedadores. Estos parásitos carecen de aparato digestivo, por lo que la pared de su cuerpo se ha adaptado para llevar a cabo las tareas de absorción de nutrientes y eliminación de desechos.

Dicha pared, denominada **tegumento**, es una superficie única que, además de las funciones mencionadas, protege al parásito del pH ácido y de las enzimas del hospedador (Bogitsh y col., 2013). El tegumento está constituido por dos zonas bien diferenciadas: una externa y una interna (Figura 1.2). La zona externa (o superficial) es una capa continua de citoplasma (sincicio), denominada citoplasma distal, delimitada externamente por la membrana plasmática e internamente por la lámina basal. El citoplasma distal contiene abundantes mitocondrias, gránulos y vesículas. Dichos gránulos y vesículas derivarían del aparato de Golgi ubicado en el citoplasma proximal y estarían involucrados en el mantenimiento de la glicocálix. Por otro lado, en la zona interna, denominada citoplasma proximal, se encuentra el citoplasma que contiene el núcleo de las células tegumentarias (llamado "citón") con forma de botella, en la cual se encuentran el aparato de Golgi y retículo endoplásmico y cuya reserva son lípidos y glucógeno. El citoplasma proximal y el distal se encuentran conectados mediante túbulos citoplasmáticos que atraviesan la lámina basal (Smyth y McManus, 1989).

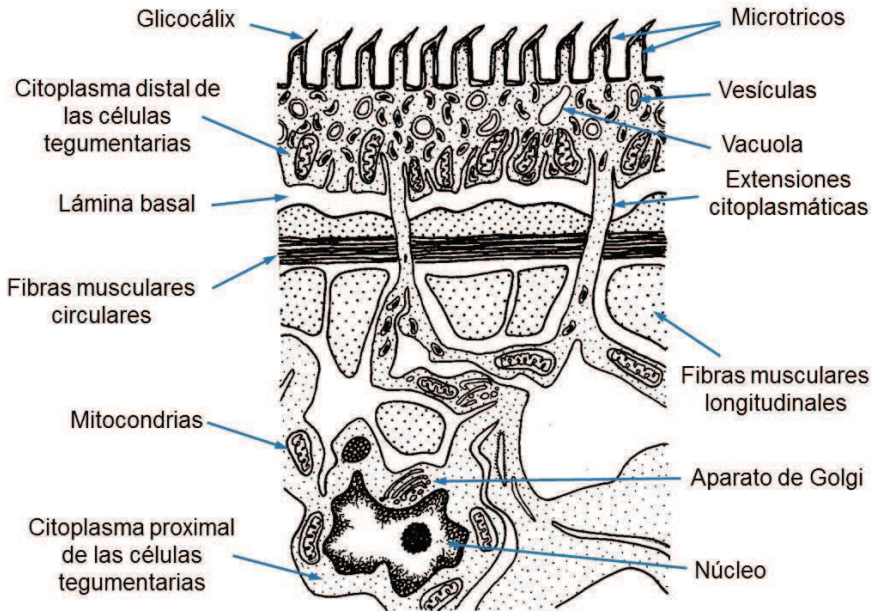


Figura 1.2. Esquema del tegumento de un cestodo adulto. El tegumento se compone de una zona más superficial, anucleada, que se conecta por extensiones citoplasmáticas al cuerpo de la célula tegumentaria en donde se localiza el núcleo y otras organelas. En la superficie del tegumento hay estructuras llamadas microtricos, las cuales a su vez se recubren de glicocálix. En el citoplasma distal existen también numerosos gránulos y vesículas, posiblemente de secreción. La Imagen fue adaptada del Banco de Recursos Educativos Multimedia de la Universidad de Ottawa, BIODIDAC (http://biodidac.bio.uottawa.ca/).

Una característica del tegumento de los cestodos es que su superficie externa cuenta con plegamientos llamados microtricos (o microtricas) que suelen compararse con las microvellosidades intestinales. Se ha propuesto que los microtricos no solo aumentarían la superficie de absorción del tegumento, sino que también servirían como estructuras adhesivas (para evitar que el parásito sea expulsado del tubo digestivo). Asimismo, sus extremos puntiagudos servirían para erosionar las células del hospedador, permitiendo una mayor disponibilidad de nutrientes para el parásito.

Como se mencionó más arriba, por fuera de la membrana apical del tegumento existe una capa de glicocálix, la cual está formada por mucopolisacáridos y glicoproteínas. En cestodos, la alta proporción de grupos acídicos que forman la glicocálix otorga una carga neta negativa a dicha superficie. Entre otras propiedades, la glicocálix tiene la capacidad de concentrar iones, tanto orgánicos como inorgánicos, que podrían servir para activar enzimas unidas a la membrana plasmática de los cestodos. Asimismo, el glicocálix tendría capacidad de unir sustancias con alto peso molecular, como enzimas del hospedador (Smyth y McManus, 1989).

1.3.1.2. Huevo y oncosfera

Los huevos de los cestodos tienen forma ovoide y un tamaño que ronda los 30-40 µm. Se caracterizan por tener una cápsula embrionaria muy fina que suele perderse al depositarse los huevos con las heces del hospedador. La ausencia de dicha protección se compensa mediante un engrosamiento del embrióforo, el cual está formado por bloques de queratina unidos por una sustancia cementante (Figura 1.3). Estas estructuras son las que le dan al huevo un aspecto estriado al observarlo al microscopio (Smyth y McManus, 2007). Cabe destacar que los huevos de *Echinococcus* spp. son altamente resistentes a diversos factores, pudiendo ser infectivos por largo tiempo si se encuentran en condiciones adecuadas de temperatura y humedad. En el interior del huevo se localiza el embrión denominado oncosfera (o embrión hexacanto). La estructura básica de la oncosfera consiste en un pequeño núcleo de células germinativas que darán origen al metacestodo, un par de glándulas de penetración, tres pares de ganchos accionados por un complejo sistema de músculos, un sistema nervioso primitivo y un fino epitelio que recubre todo lo antes mencionado; el cual posee también extensiones citoplasmáticas (Smyth y McManus, 2007). Se han propuesto diversas funciones para las glándulas de penetración. Entre otras, que sus secreciones podrían producir lisis de los tejidos del hospedador que protegerían a la oncosfera del ataque del sistema inmune del animal al que está invadiendo, así como también que podrían

asistir en la adhesión previa a la penetración del tejido. Sin embargo, aún no es claro el rol de estas glándulas en el proceso de penetración del intestino del hospedador intermediario (Smyth y McManus, 2007). En cuanto a los ganchos de este estadio de *Echinococcus* spp., se ha propuesto que los mismos podrían ayudar a romper los tejidos del hospedador, movilizados por la acción de los músculos presentes en la oncosfera (Holcman y Heath, 1997). Una vez atravesado el intestino del hospedador, la oncosfera alcanza la vena porta hepática y se traslada a través de la sangre hasta alcanzar el órgano blanco en el cual dará origen al metacestodo. Normalmente el sitio de establecimiento del metacestodo es el hígado o el pulmón, aunque muchas otras localizaciones son posibles.

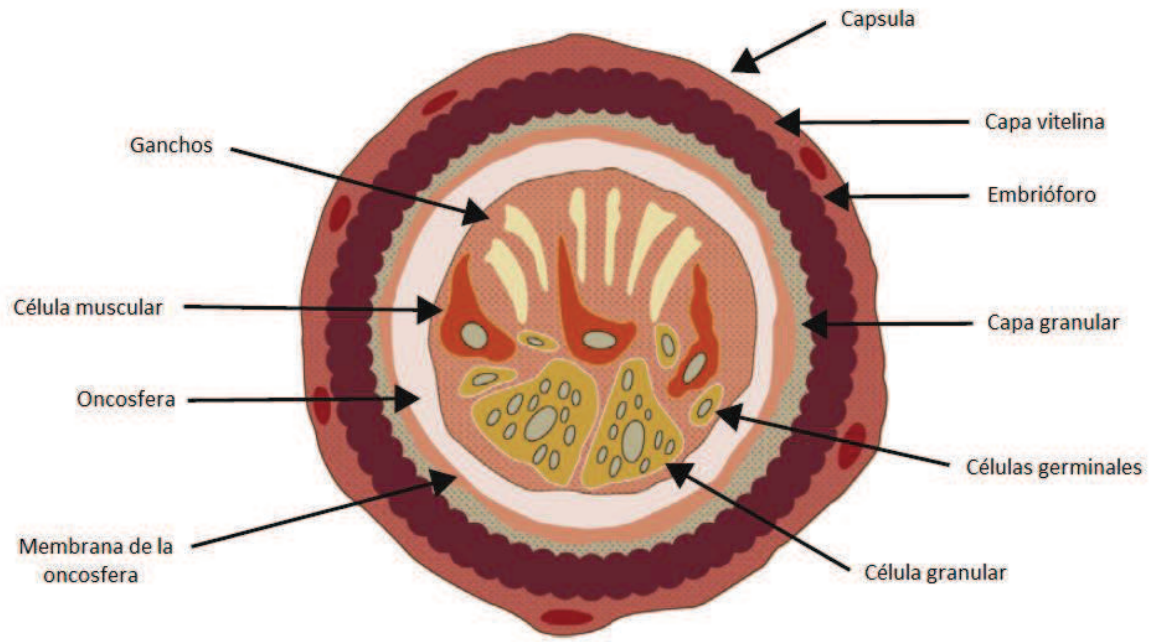


Figura 1.3. Representación esquemática de un huevo de parásito cestodo. En su interior se encuentra un embrión con 3 pares de ganchos (embrión hexacanto). El huevo es inmediatamente infectante al ser excretado por hospedador definitivo. La imagen fue adaptada de Thompson (2017).

1.3.1.3. Metacestodo

El metacestodo en la forma juvenil de los cestodos. Es una forma parasitaria compleja que se considera fértil si se desarrollan los estadios larvarios, denominados escólices o protoescólices (nótese que hace referencia al escólex o cabeza del parásito adulto). Según la especie de cestodo, existen diferentes metacestodos. Entre los más relevantes podemos encontrar: el cisticercoide, el cisticerco, el cenuro y el quiste hidatídico (Figura 1.4).

El **cisticercoide** es pequeño, piriforme, con un extremo anterior con ventosas y ganchos y uno caudal angosto. Está replegado formando una doble pared que cubre todo el cuerpo y se aloja en la cavidad del cuerpo del hospedador intermediario, principalmente invertebrados, pero también en el intestino delgado de los seres humanos, como es el caso de *Hymenolepis nana*. Cuando completa su desarrollo está en condiciones de infectar a los hospedadores definitivos, en el interior de los cuales pierde sus membranas y libera el escólex y un pequeño estróbilo a partir del cual se forma el cestodo adulto (ej.: *Moniezia expansa*, *Dipylidium caninum*, *Hymenolepis nana*). El **cisticerco** es una vesícula de tamaño variable, de forma oval, con una pared fina que contiene líquido en su interior y que presenta un escólex invaginado. Esta forma quística es monocefálica (tiene un solo escólex) y monosomática (posee un solo cuerpo) al igual que el cisticercoide. La localización del cisticerco es variable según la especie parasitaria, por ejemplo: sistema nervioso central, riñón, hígado, bazo, miocardio, músculo estriado, tejido subcutáneo, serosas, etc (por ejemplo: *Taenia solium* y *T. ovis*). El **cenuro** es una vesícula con líquido que se clasifica como policefálico, a partir de su membrana interna brotan numerosos escólices cada uno de los cuales puede dar origen a un adulto, y monosomático, al tener un solo soma. En general el cenuro es de mayor tamaño que el cisticerco y parasita el sistema nervioso central (por ejemplo: *Taenia multiceps*). El **quiste hidatídico** consta de una vesícula formada por dos capas propias: una externa o laminar, la cual es acelular e integrada por láminas superpuestas (compuestas por glicoproteínas y hexaquifosfato de inositol en caso de *Echinococcus granulosus*); y una interna, celular y prolífera (capa germinal) que es una fina lámina granulosa y polinucleada, a partir de la cual se originan cápsulas prolígeras y protoescólices. La cavidad quística está ocupada por un líquido transparente, denominado líquido hidatídico en el flotan pequeñas vesículas prolígeras que contienen dos o más protoescólices, ya que el quiste hidatídico vesicularia hacia el interior de la cavidad con la formación de las cápsulas prolígeras y la posible formación de vesículas hijas endógenas (es decir que tiene varios somas). Dentro de algunos quistes hijos, se pueden formar por invaginación, vesículas terciarias o nietas, cada una de las cuales origina a partir de la membrana prolífera diminutos protoescólices. Continuando con la clasificación anterior, el quiste hidatídico es clasificado como policefálico y polisomático. Esta forma vesicular suele localizarse en el hígado, pulmones, médula ósea, bazo y otros órganos. En estos órganos el parásito puede adquirir una tercera capa denominada adventicia producida por el órgano parasitado como respuesta al agente extraño.

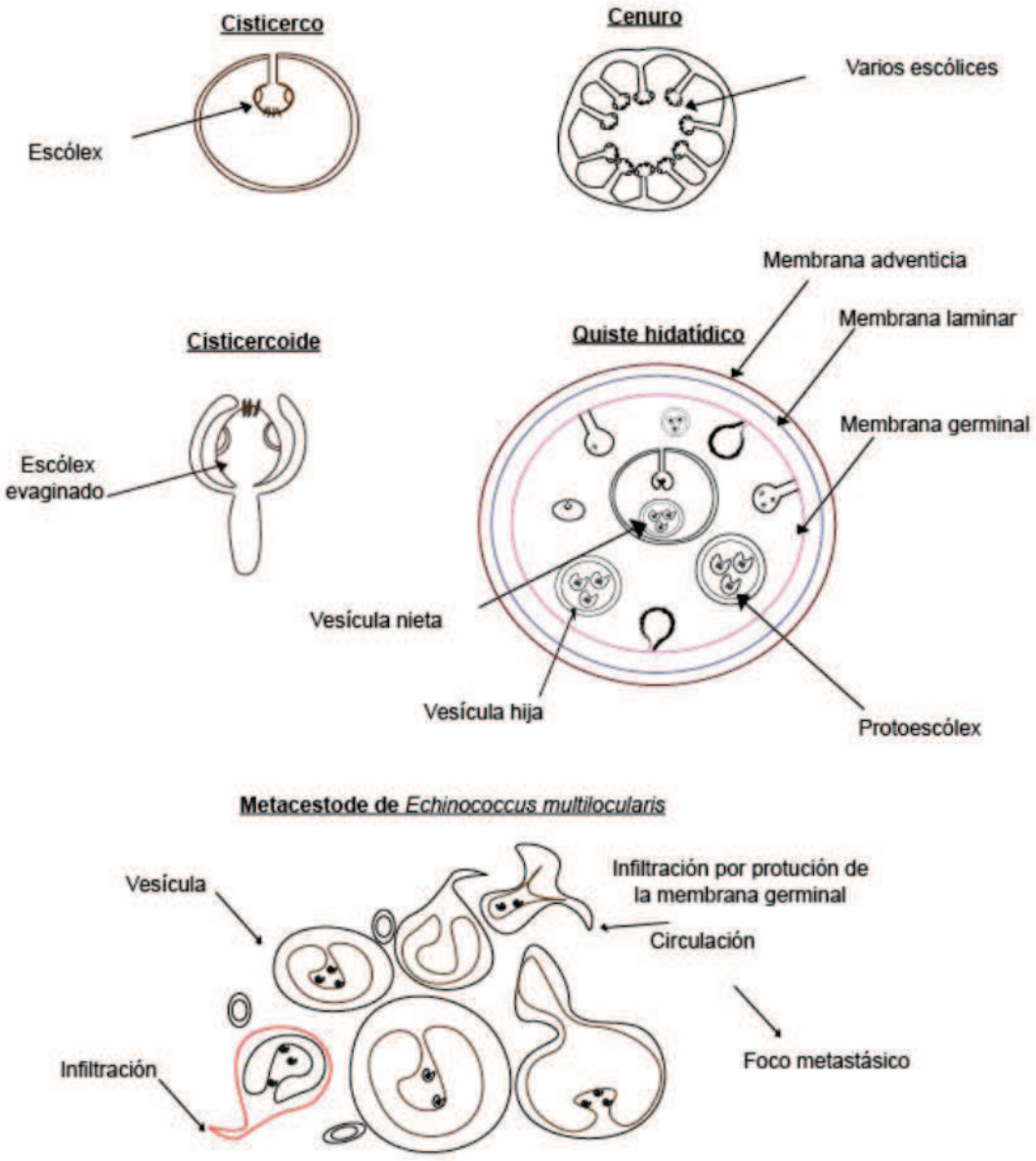


Figura 1.4. Esquema de las principales formas juveniles (metacestodo) que puede adquirir los parásitos cestodos: Se muestra el esquema de los metacestodos conocidos como cisticerco, cenuro, cisticercoide, quiste hidatídico y metacestodo de *Echinococcus multilocularis*. En el quiste hidatídico, la membrana adventicia es formada por el hospedador y no forma parte del metacestodo. Fuente de la imagen (Pérez, 2020).

Existen además otras formas parasitarias, por ejemplo, el **metacestodo** de *Echinococcus multilocularis* que se desarrolla de manera diferente al de *E. granulosus sensu lato* (*s.l.*). A diferencia de este último, el metacestodo de *E. multilocularis* es una estructura multivesicular, infiltrante, sin barrera limitante del tejido del hospedador (membrana adventicia), que consiste en numerosas vesículas pequeñas incrustadas en un estroma denso de tejido conectivo (Thompson, 2017) (Figura 1.4). La masa larvaria generalmente contiene una matriz semisólida en lugar de

fluida. La proliferación se produce de manera endógena y exógena. Esta capacidad proliferativa se les atribuye a las células indiferenciadas de la membrana germinal, denominadas células germinales (Koziol y col., 2014; Moro y Schantz, 2009). El metacestodo consiste en una red de protuberancias celulares sólidas filamentosas de la capa germinal que son responsables del crecimiento infiltrante (Eckert y Deplazes, 2004). Además, el desprendimiento de células germinales de las protuberancias celulares infiltrantes y su posterior distribución a través de la linfa o la sangre puede dar lugar a los focos metastáticos distantes, característicos de *E. multilocularis* (Thompson, 2017).

Todas estas formas juveniles contienen en su interior a los estadios larvarios del parásito (protoescólices o escólices). Estos estadios pierden sus envolturas una vez que se hallan en el hospedador definitivo. Por la acción de las sales biliares y de las enzimas proteolíticas (pepsina y tripsina) comienza el proceso de desenquistamiento, se evaginan los escólices (o los protescólices libres) y se fijan con sus ventosas y ganchos (si poseen) a las paredes del intestino iniciándose así la segmentación del cuerpo, proceso que se conoce con el nombre de estrobilización.

1.4. Cestodos de relevancia en salud humana y medicina veterinaria

A continuación, se describirán las principales enfermedades zoonóticas producidas por cestodos, como la equinococosis (o hidatidosis) y la cisticercosis. Estas enfermedades forman parte del grupo de 17 enfermedades tropicales desatendidas y prioritarias para la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2012), debido a que tienen grandes impactos en la salud pública y la economía de numerosos países, principalmente en aquellos con economías vulnerables y con acceso a prácticas de higiene y salud deficientes. La hidatidosis y la cisticercosis son producidas por la proliferación de las formas juveniles de parásitos del género *Echinococcus* y por *Taenia solium*, respectivamente (Garcia y col., 2007). Los seres humanos se comportan como hospedadores intermediarios, aunque algunos autores prefieren denominar a los seres humanos como hospedadores accidentales ya que, algunos cestodos no logran continuar sus ciclos biológicos. Cabe destacar que, en todos estos casos, los animales domésticos cumplen un rol fundamental en la transmisión de la enfermedad, ya que pueden actuar como hospedadores definitivos o intermediarios según el cestodo involucrado.

1.4.1. Parásitos del género *Echinococcus*

Los cestodos del género *Echinococcus*, en particular su estadio de desarrollo larval (o metacestodos), son los agentes responsables de la enfermedad conocida como hidatidosis o equinococcosis. Las tres formas clínicas de la enfermedad en el hombre son la hidatidosis quística causada por parásitos del complejo *E. granulosus sensu lato* (*s.l.*), la hidatidosis alveolar causada por *E. multilocularis* y la hidatidosis neotropical cuyos agentes etiológicos son *E. vogeli* y *E. oligarthra*. La hidatidosis quística (o equinococcosis quística) es la presentación más frecuente, da cuenta probablemente de más del 95% de los 1 a 3,6 millones de casos globales. Por otra parte, representa un importante problema en Sudamérica, tanto a nivel productivo, como en la salud humana (Cucher y col., 2016). La hidatidosis alveolar (o equinococcosis alveolar) es una enfermedad rara en el ser humano producida por el parásito *E. multilocularis*. Esta enfermedad representa un importante problema en países del hemisferio norte (Casulli y col., 2019). En la Argentina no se han reportado casos autóctonos, siendo considerada como una enfermedad exótica.

1.4.1.1. Ciclo de vida de los parásitos del género *Echinococcus*

El ciclo de vida de los parásitos del género *Echinococcus* involucra dos hospedadores mamíferos (Figura 1.5). En el ciclo biológico de los parásitos del complejo *E. granulosus s.l.*, los perros u otros cánidos actúan como hospedadores definitivos y los mamíferos silvestres o domésticos, como el ganado, y el ser humano actúan como hospedadores intermediarios (Thompson y McManus, 2001). El ciclo se inicia con el estadio de desarrollo adulto, que habita el intestino delgado de un carnívoro (el hospedador definitivo). El parásito adulto es el encargado de producir los huevos que contienen las oncosferas infectivas. Las oncosferas son liberadas junto con las heces del tracto intestinal del hospedador carnívoro hacia el ambiente. Los huevos son por lo general ingeridos por un herbívoro, el hospedador intermediario. Tras la ingestión, la oncosfera que está rodeada de una membrana protectora se libera y migra a través de la pared intestinal, accediendo a través del torrente sanguíneo a varios órganos. Los más comunes el hígado y los pulmones. Dentro del hospedador intermediario, la oncosfera se desarrolla en el estadio de desarrollo larval o metacestodo. Cada oncosfera tiene el potencial de convertirse en un quiste hidatídico. El metacestodo produce por división asexual numerosos protoescólices, cada uno con el potencial de desarrollarse en un parásito adulto después de ser ingerido por el hospedador definitivo apropiado. Los huevos liberados por el hospedador definitivo pueden ser ingeridos

accidentalmente por el ser humano, el cual no juega un rol en el ciclo natural (Thompson y McManus, 2001). La infección del hospedador carnívoro con los estadios de desarrollo inmaduros o adultos de *E. granulosus* s.l. no causan morbilidad. Pero la invasión de órganos, principalmente hígado y pulmones, del hospedador intermediario por el metacestodo puede causar una enfermedad severa e incluso fatal; la hidatidosis quística.

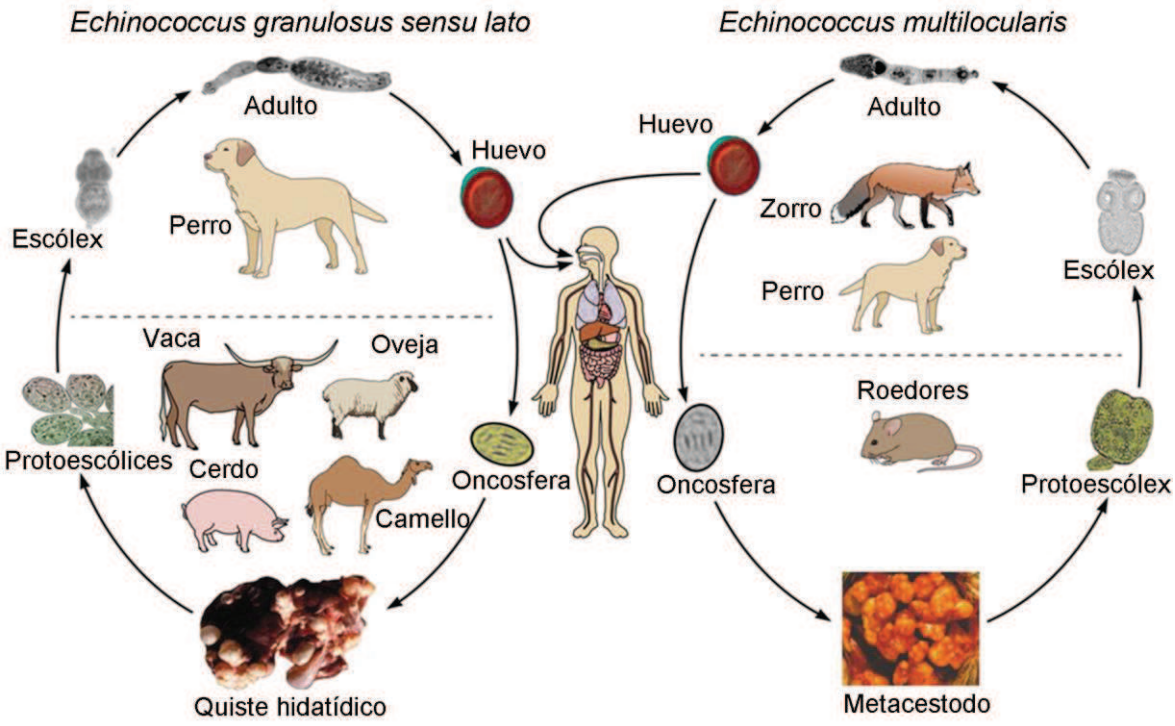


Figura 1.5. Esquema del ciclo de vida de los parásitos del género *Echinococcus*. Se muestran, esquematizados, los diferentes estadios de desarrollo de los parásitos del complejo *Echinococcus granulosus sensu lato* (*s.l.*) y *E. multilocularis*; junto con los hospedadores en los que ingresan o se desarrollan cada uno de ellos. Los estadios de desarrollo son: parásito adulto, huevo, oncosfera, metacestodo, protoescólex invaginado y protoescólex evaginado. En el ciclo de vida de *E. granulosus* s. l. se esquematizan diversos hospedadores intermediarios. Estos y otros hospedadores intermediarios con los que dieron nombre a las diversas cepas o genotipos. Los mismos que, de manera individual o agrupados, son considerados actualmente como especies dentro del complejo *E. granulosus s.l.* Los seres humanos actúan en ambos casos como hospedadores accidentales. La imagen fue adaptada de Wen y col. (2019). *Se muestran quistes hidatídicos en hígados, pero también se pueden presentar en otros órganos, tal como el pulmón.

A diferencia de lo que ocurre con los parásitos del complejo *E. granulosus s.l.*, la transmisión de *E. multilocularis* se produce en un ciclo selvático. Los zorros (principalmente el zorro ártico, *Alopex lagopus*, y el zorro rojo, *Vulpes vulpes*) desempeñan un papel clave como

hospedadores definitivos (Figura 1.5). En algunas áreas, otros cánidos silvestres, como los coyotes (*Canis latrans*), los perros mapaches (*Nyctereutes procyonoides*) y los lobos (*Canis lupus familiaris*), o los felinos salvajes también pueden actuar como hospedadores definitivos. Los pequeños mamíferos, principalmente roedores, son los principales hospedadores intermediarios, aunque el ser humano puede actuar como un hospedador accidental (Casulli y col., 2019). Entre las 40 especies de pequeños mamíferos que son susceptibles a *E. multilocularis* en condiciones naturales, los miembros de la familia *Arvicolidae* (campañoles y lemmings) y *Cricetidae* (hámsters, gerbos y roedores relacionados) son los más susceptibles. Aunque se ha descrito alguna variación entre los aislamientos de *E. multilocularis* de América del Norte y Eurasia, no hay evidencia de diferencias genéticas entre cepas. Tanto la hidatidosis quística como la alveolar, se caracterizan por tener un periodo de incubación asintomático que puede durar muchos años debido al lento desarrollo de la forma juvenil (Casulli y col., 2019). Si la equinococcosis alveolar no es tratada evoluciona de manera progresiva y fatal debido al crecimiento metastásico que presenta el metacestode. En el caso de la hidatidosis alveolar existe una alta tasa de mortalidad (más del 90% en pacientes no tratados) debido al desarrollo metastásico que presenta *E. multilocularis* (Casulli y col., 2019).

1.4.1.2. Especies pertenecientes al complejo *Echinococcus granulosus sensu lato*

El número de especies pertenecientes al género *E. granulosus*, y principalmente al complejo *E. granulosus* s. l., ha sido tema de debate entre los especialistas durante muchos años. Tal es así, que no fue sino hasta la década del 50 del siglo XX, que se determinó que la especie responsable de la equinococcosis alveolar era el parásito *E. multilocularis* y no *E. granulosus s.l.*; como se creía hasta ese momento (Nakao y col., 2007). Gracias al avance en las técnicas de secuenciado de ADN, se comenzaron a analizar genes mitocondriales y nucleares de los diversos integrantes del género *Echinococcus*. Dichos estudios confirmaron que *E. multilocularis*, *E. vogeli* y *E. oligarthra* eran diferentes entre sí y que *E. granulosus s.l.* podía subdividirse en diferentes genotipos (indicados con la letra G seguida de un número). Actualmente, se reconoce que el complejo *E. granulosus s.l.* está compuesto por numerosas variantes genéticas que difieren en una serie de características, tales como el perfil de proteínas, repertorios de carbohidratos y lípidos, morfología de los ganchos, requerimientos metabólicos, desarrollo de quistes fértiles en infecciones naturales, desarrollo de quistes en infecciones experimentales, especificidad del hospedador intermediario, período pre-patente, antigenicidad e infectividad y patogenicidad en los seres humanos (Cucher y col., 2016). La nueva clasificación infiere que *E. granulosus sensu*

*stric*to (*s.s.*) agrupa los genotipos G1 y G3 (Nakao y col., 2013, 2007). Particularmente, el genotipo G1 es el más frecuente en todo el mundo. Este genotipo produce quistes hidatídicos fértiles principalmente en ovejas y es frecuentemente aislado de los seres humanos. *E. equinus* (genotipo G4) tiene notables diferencias morfológicas y de desarrollo con el genotipo G1. Este genotipo solo ha sido encontrado en equinos. *E. ortleppi* (genotipo G5) produce quistes fértiles principalmente en el ganado bovino y ha sido descrito en muy pocos casos humanos. *E. canadensis* incluye los genotipos G6, G7, G8 y G10, ya que el análisis filogenético los agrupó como un grupo monofilético. Los camellos y las cabras son los principales hospedadores intermediarios para el genotipo G6, los cerdos para el genotipo G7 (Dybicz y col., 2013; Schneider y col., 2010) y cérvidos para los genotipos G8 y G10. Estos 4 genotipos han sido aislados de muestras provenientes de seres humanos.

1.4.1.3. Distribución geográfica de la hidatidosis

Si bien la hidatidosis quística tiene una distribución prácticamente global, existen ciertas regiones altamente endémicas (Figura 1.6). Entre ellas se puede mencionar el cono sur de Sudamérica, el norte de África, el sur y este de Europa, la zona este del mar Mediterráneo, Siberia, Asia central y el oeste de China (WHO, 2013). Es importante recordar que actualmente se ha determinado la existencia de varios genotipos causantes de hidatidosis quística. Teniendo en cuenta este escenario, es posible delinear la distribución geográfica de los diferentes genotipos, a saber: *E. granulosus s.s.* (genotipo G1) está presente en Australia, Europa, Estados Unidos, Nueva Zelanda, África, Sudamérica y Rusia; *E. granulosus s.s.* (G3) en Asia; *E. equinus* (G4) en Europa, Oriente Medio y Sudáfrica; *E. ortleppi* (G5) en Europa, Sudáfrica, India, Rusia y Sudamérica; *E. canadensis* (G6/G7) en Europa, África y Sudamérica; *E. canadensis* (G8/G10) en América del Norte y el norte de Europa y Asia (Alvarez Rojas y col., 2014; Thompson y McManus, 2002).

Por otra parte, desde finales del siglo XIX Europa Central ha sido el área endémica más conocida para la equinococcosis alveolar (Eckert y Thompson, 2017) pero la enfermedad es prevalente en varios países del hemisferio norte (Figura 1.6). Esta enfermedad zoonótica se encuentra entre las parasitosis más severas en seres humanos y dentro de las enfermedades tropicales desatendidas prioritarias según la OMS ((WHO, 2012). En Argentina no se han reportado casos autóctonos y es considerada una enfermedad exótica.

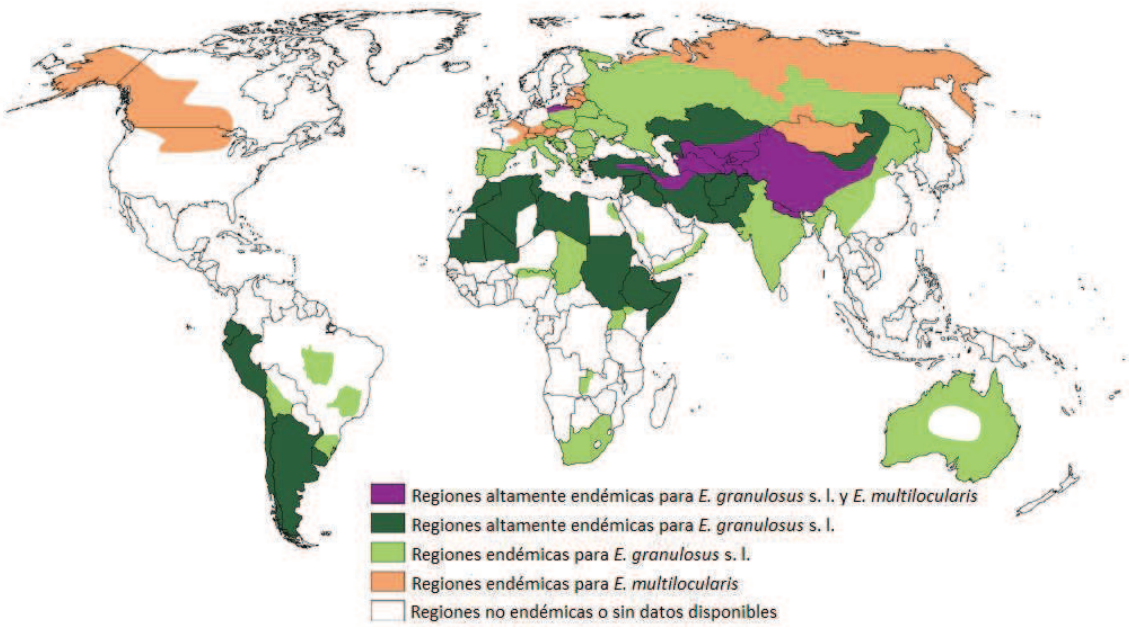


Figura 1.6. Distribución geográfica de la hidatidosis. En el mapa se muestran las zonas geográficas donde se puede encontrar tanto la hidatidosis quística (o equinococcosis quística), causada por parásitos del complejo *Echinococcus granulosus sensu lato* (*s.l.*), como también de la hidatidosis alveolar, causada por el parásito *E. multilocularis*. La Imagen fue adaptada de Wen y col., (2019)

1.4.1.4. Importancia de la hidatidosis quística en nuestra región

Teniendo en cuenta los posibles hospedadores intermediarios de los parásitos del complejo *E. granulosus s.l.* y la importancia de las actividades ganaderas en los países de nuestra región, no sorprende que tanto Argentina, como Uruguay, Brasil y Chile representen una zona altamente endémica para la hidatidosis. En el caso de Argentina, la hidatidosis está distribuida prácticamente en todo el territorio nacional, con mayor prevalencia en zonas rurales y, en particular, en regiones de cría de ganado ovino y caprino, aunque también afecta regiones de cría de ganado bovino y porcino. No obstante, la distribución no es uniforme en todo el territorio, sino que existen provincias afectadas en toda su extensión y otras solo parcialmente (Figura 1.7). Los mayores focos endémicos de hidatidosis en Argentina se localizan en las áreas: Patagónica (Tierra del Fuego, Santa Cruz, Chubut, Río Negro y Neuquén), Pampa Húmeda (Provincia de Buenos Aires, sur de Santa Fe y Córdoba), Mesopotámica (territorio de Corrientes, al sur del río Corrientes, y norte de Entre Ríos hasta el eje La Paz, Federal y Concordia), Cuyana (Provincia de Mendoza y oeste de San Juan), Mediterránea (parte de las provincias de Córdoba, Santiago del Estero, San Luis, La Rioja, Catamarca y San Juan), y de Alta Montaña del Noroeste (Tucumán, Salta, Jujuy y

noroeste de Catamarca) (Moral, 2012). Las especies/genotipos *E. granulosus s.s.* G1, *E. ortleppi* G5 y *E. canadensis* G6 y G7 son responsables de los casos de hidatidosis en seres humanos en nuestro país (Cucher y col., 2016; Debiaggi y col., 2017; Kamenetzky y col., 2002; Rosenzvit y col., 1999).

Desde el punto de vista de la salud pública, la hidatidosis es un problema grave en las zonas endémicas, especialmente en aquellas vinculadas a actividades agro-ganaderas, y más aún en zonas de bajos recursos. La hidatidosis es una enfermedad crónica, que no solo puede ser mortal, sino que puede generar diversos grados de discapacidad que varían tanto en gravedad como en duración. La gravedad de la enfermedad varía mucho de acuerdo a la localización del quiste hidatídico. Por ejemplo, los quistes hepáticos suelen ser asintomáticos durante mucho tiempo, aun cuando desarrollen un tamaño importante, mientras que los quistes cerebrales u oculares pueden traer grandísimas complicaciones incluso siendo pequeños; esto explica por qué los quistes intracerebrales suelen detectarse en niños, mientras que los hepáticos se registran a edades más avanzadas (Moro y Schantz, 2009).

En varios de los países de la región existen, o existieron, programas de control y vigilancia de la hidatidosis tendientes a reducir la prevalencia de la enfermedad. Muchos de ellos se han basado en la administración de drogas antihelmínticas a los perros de regiones altamente endémicas ocho veces al año, con la finalidad de evitar que el parásito llegue a su estado grávido y no así pueda esparcir sus huevos en el ambiente. Estos programas enfrentan, sin embargo, graves complicaciones para poder llegar a ser completamente exitosos. Los mismos tienen amplios requerimientos de vehículos y recursos humanos para lograr desparasitar ya sea a grandes poblaciones de perros, o poblaciones pequeñas pero muy dispersas. Sumado a eso, los accesos a las zonas de mayor prevalencia de hidatidosis muchas veces son bastante precarios, dificultando aún más las tareas de control. No obstante las complicaciones técnicas, han habido algunos avances en el control de la hidatidosis en ciertas regiones; como Uruguay y las provincias argentinas de Tierra del Fuego, Neuquén y Río Negro. En algunos casos, aunque la enfermedad siga afectando al ganado y los perros permanezcan parasitados, se ha logrado disminuir la prevalencia de la hidatidosis en humanos mediante programas de educación sanitaria, detección y tratamiento temprano de los infectados. Cabe destacar que el más grande desafío que deben vencer los programas de control, aparte de las complicaciones técnicas y logísticas, es la continuidad en el tiempo, ya sea por decisiones económicas y/o políticas.

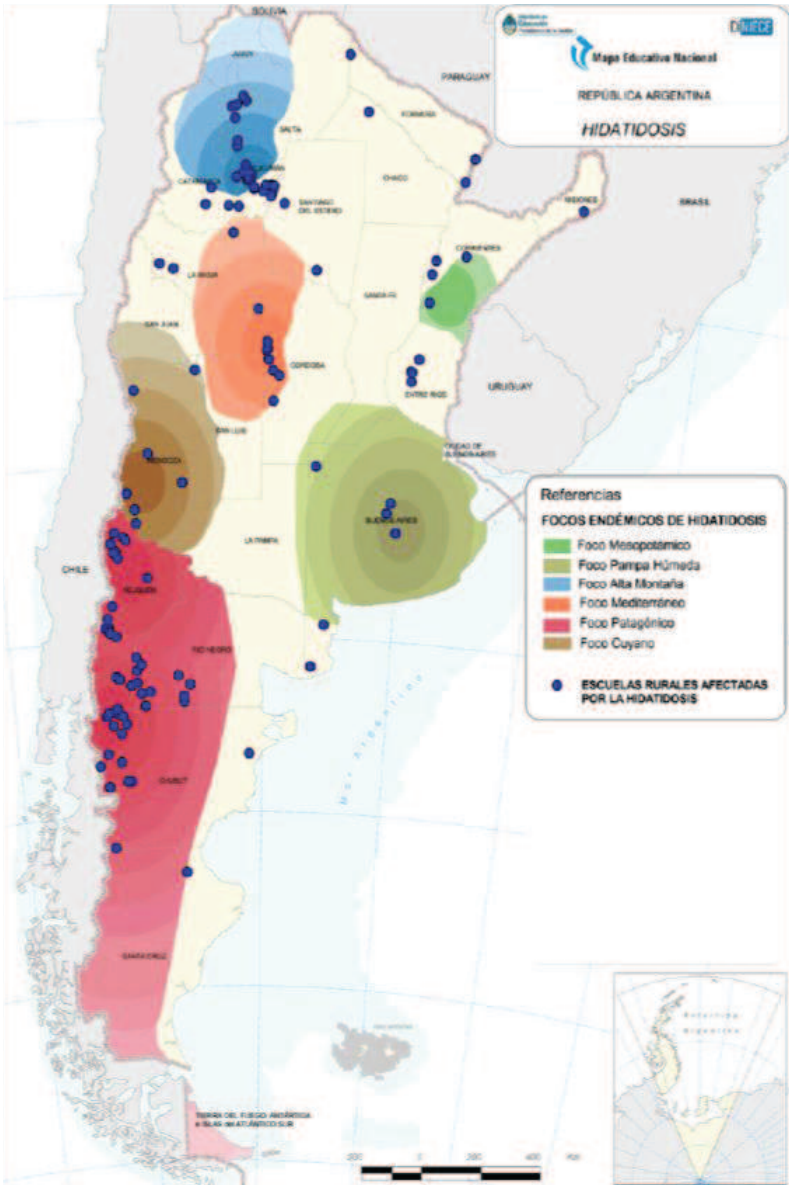


Figura 1.7. Principales focos de hidatidosis quística en Argentina. La figura muestra la distribución de la hidatidosis en la República Argentina, destacando los principales focos de la enfermedad. Los puntos azules indican la ubicación de las escuelas rurales que señalaron que la hidatidosis es una problemática presente en su comunidad (relevamiento 2006-2009). El mapa fue adaptado de la página web del Programa Nacional Mapa Educativo del Ministerio de Educación de la Nación.

Recientemente, en la Provincia de Río Negro, se ha realizado una prueba de campo, en ovejas, de la vacuna EG95. Esta vacuna se basa en una proteína recombinante de la oncosfera de *E. granulosus* (Jabbar y col., 2011). Los resultados han sido prometedores, y han mostrado protección frente a la infección por *E. granulosus* en animales de hasta tres años. No obstante, aún se requieren más estudios que confirmen que los animales se mantienen protegidos durante

toda su vida productiva (Jabbar y col., 2011). Cabe destacar que si bien la aplicación de la vacuna EG95 no está exenta de complicaciones técnicas, de infraestructura y económicas, la misma representa una herramienta más en la lucha contra la hidatidosis.

1.4.1.5. Diagnóstico y tratamiento de la hidatidosis

El diagnóstico de hidatidosis se lleva a cabo mediante examen clínico, diagnóstico por imágenes y serología. En las etapas iniciales del desarrollo de la hidatidosis normalmente no se presentan síntomas, razón por la cual la hidatidosis suele diagnosticarse en adultos en los que el/los quiste/s han crecido durante varios años. La aparición de los síntomas puede variar mucho dependiendo de cuál sea el órgano afectado y de la posición y tamaño del quiste en dicho órgano. Asimismo, pueden surgir complicaciones debidas a rupturas del quiste que pueden generar infecciones secundarias en otros tejidos del hospedador (debido a la plasticidad fenotípica antes mencionada de los protoescólices). La ruptura del quiste puede provocar también reacciones anafilácticas y otras complicaciones sumamente peligrosas para la salud.

Una de las herramientas más útiles para el diagnóstico de la hidatidosis es la ecografía, la cual permite el diagnóstico, clasificación (existe un sistema estandarizado de clasificación por ecografía de los quistes hidáticos, establecido por la OMS) y seguimiento de los quistes, aunque la sensibilidad es baja para quistes de pequeño tamaño. Otras técnicas de imágenes, como la resonancia magnética y la tomografía, son usadas también para el diagnóstico. Las pruebas serológicas constituyen también una herramienta útil para el diagnóstico y seguimiento de la hidatidosis. No obstante, a pesar de su uso muy difundido, aún existen dudas sobre su eficacia, ya que la misma parece variar con la localización, tamaño y estado del quiste. Asimismo, se ha reportado reacción cruzada con antígenos propios de otras helmintiasis, cirrosis hepáticas y ciertos tipos de cáncer, lo cual pone en duda su especificidad.

Respecto al tratamiento de la hidatidosis quística, existen cuatro posibilidades, dependiendo del estado de los quistes: cirugía, esterilización percutánea, tratamientos con drogas antihelmínticas y observación. La cirugía es el tratamiento más habitual y, si bien suele ser efectivo, no garantiza que no se produzca recurrencia. Se aplica a quistes grandes, a quistes infectados, propensos a ruptura o localizados en órganos importantes. Por otra parte, es más difícil de aplicar en pacientes con múltiples quistes en diversos órganos. Las técnicas de esterilización percutánea incluyen a PAIR (Punción, aspiración, inyección y reaspiración), que destruye la capa germinativa del quiste; y cateterismos modificados, que remueven la totalidad

del quiste. La técnica de PAIR involucra una punción percutánea de quiste (asistida por ultrasonido), la aspiración del contenido, inyección de algún protoescolicida adecuado y reaspiración luego de 15 a 20 minutos. Un choque anafiláctico es un posible riesgo al aplicar esta técnica. Este tratamiento se acompaña de administración de drogas antihelmínticas para prevenir quistes secundarios. Los fármacos antiparasitarios que se utilizan para el tratamiento de la hidatidosis se conocen como benzimidazoles, en particular se utilizan el mebendazol y el albendazol (ABZ); siendo este último el más usado actualmente. Estas drogas son más efectivas para el tratamiento de quistes pequeños, no siendo útiles para tratar quistes de más de 10 cm de diámetro. Además, el ABZ resulta inefectivo en alrededor del 40 % de los casos de hidatidosis (Gottstein y col., 2015; Hemphill y col., 2014). Por otro lado, estos compuestos poseen varios efectos secundarios no deseados asociados a su uso prolongado (Horton, 1997; Kyung y col., 2011; Lee y col., 2011). Finalmente, en algunos casos de quistes no complicados, se opta por la estrategia de observación, ya que muchas veces los quistes terminan calcificándose y volviéndose totalmente inactivos, sin generar inconvenientes mayores.

En el caso de *E. multilocularis*, las posibilidades de tratamiento se reducen a la cirugía (con administración posterior de drogas antihelmínticas para prevenir recurrencias), o bien a la administración por largos períodos de benzimidazoles, para los casos que no pueden ser operados. Estas drogas inhiben la proliferación de la larva, pero no la matan. En casos terminales de hidatidosis alveolar se han llevado a cabo trasplantes hepáticos, pero el uso de inmunosupresores asociado a este tipo de intervenciones puede estimular el crecimiento del parásito en caso de no haberse removido por completo (McManus y col., 2012).

De lo antes mencionado se desprende claramente que, a pesar de los avances obtenidos en la lucha contra la hidatidosis, aún resta mucho por hacer en lo que respecta al diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. Sobre todo, teniendo en cuenta que algunas de las alternativas existentes, aunque eficaces, requieren de una gran infraestructura para ser llevadas a cabo o poseen costos muy elevados, siendo que las personas más vulnerables a esta enfermedad suelen ser las de menores recursos. Por ejemplo, la técnica PAIR debe ser llevada a cabo por equipos altamente capacitados, capaces de lidiar con un choque anafiláctico. Asimismo, el costo de los benzimidazoles y las preocupaciones respecto a su eficacia hacen que se necesiten nuevas drogas para tratar esta enfermedad (McManus y col., 2012). Por otra parte, la resistencia a los antihelmínticos resulta en una complicación frecuente en las terapias farmacológicas basadas en una única droga. En este contexto, se han reportado resistencias a triclabendazol en el

tratamiento de la fasciolosis (Kelley y col., 2016) y a praziquantel en el tratamiento de la schistosomiasis (Chai, 2013).

Debe tenerse en cuenta que, para poder llevar a cabo el desarrollo de drogas específicas contra la hidatidosis, que reduzcan el uso de terapias invasivas, es de suma necesidad ampliar nuestro conocimiento en lo que respecta a la biología del parásito, los factores que favorecen su establecimiento, su relación con el hospedador y otras variables que permitan interrumpir su desarrollo y, por consiguiente, el de la enfermedad.

1.4.2. *Taenia solium*

La teniasis humana es una infección intestinal parasitaria causada por tres especies de parásitos cestodos: *Taenia saginata* (conocida como tenia bovina), *T. solium* (tenia porcina) y *T. asiatica* (tenia asiática). La infección por *T. solium* es una de las más importante por las complicaciones que causa (WHO, 2012).

1.4.2.1. Ciclo de vida de *Taenia solium*

En el ciclo de vida de *T. solium* los seres humanos son los únicos hospedadores definitivos, pero tanto los seres humanos como los cerdos han sido documentados como hospedadores intermediarios (Figura 1.8). En los hospedadores intermediarios el embrión hexacanto puede desarrollarse hasta la etapa de cisticerco (Coral-Almeida y col., 2015). La cisticercosis humana y porcina se deben principalmente al contacto directo con las heces humanas. Los seres humanos se infectan más comúnmente por la ingestión de alimentos o agua contaminada con huevos de *T. solium*. También se ha sugerido que los seres humanos pueden auto infectarse a través de malos hábitos de higiene. Los huevos provenientes de un parásito adulto, que ha alcanzado la madurez en el intestino delgado de un ser humano, pueden ser expulsados a través de la proglótide con un número mínimo de 100 000 huevos por día (Gripper y Welburn, 2017). En el tracto intestinal de cerdos y seres humanos, los embriones que se encuentran dentro del huevo penetran en la pared intestinal y se transportan en el torrente sanguíneo a diversos tejidos del cuerpo, incluidos el cerebro, los ojos, la piel y los músculos, donde se depositan y comienzan a crecer. Dentro de estos tejidos el embrión comienza una etapa de múltiples cambios hasta convertirse en un cisticerco.

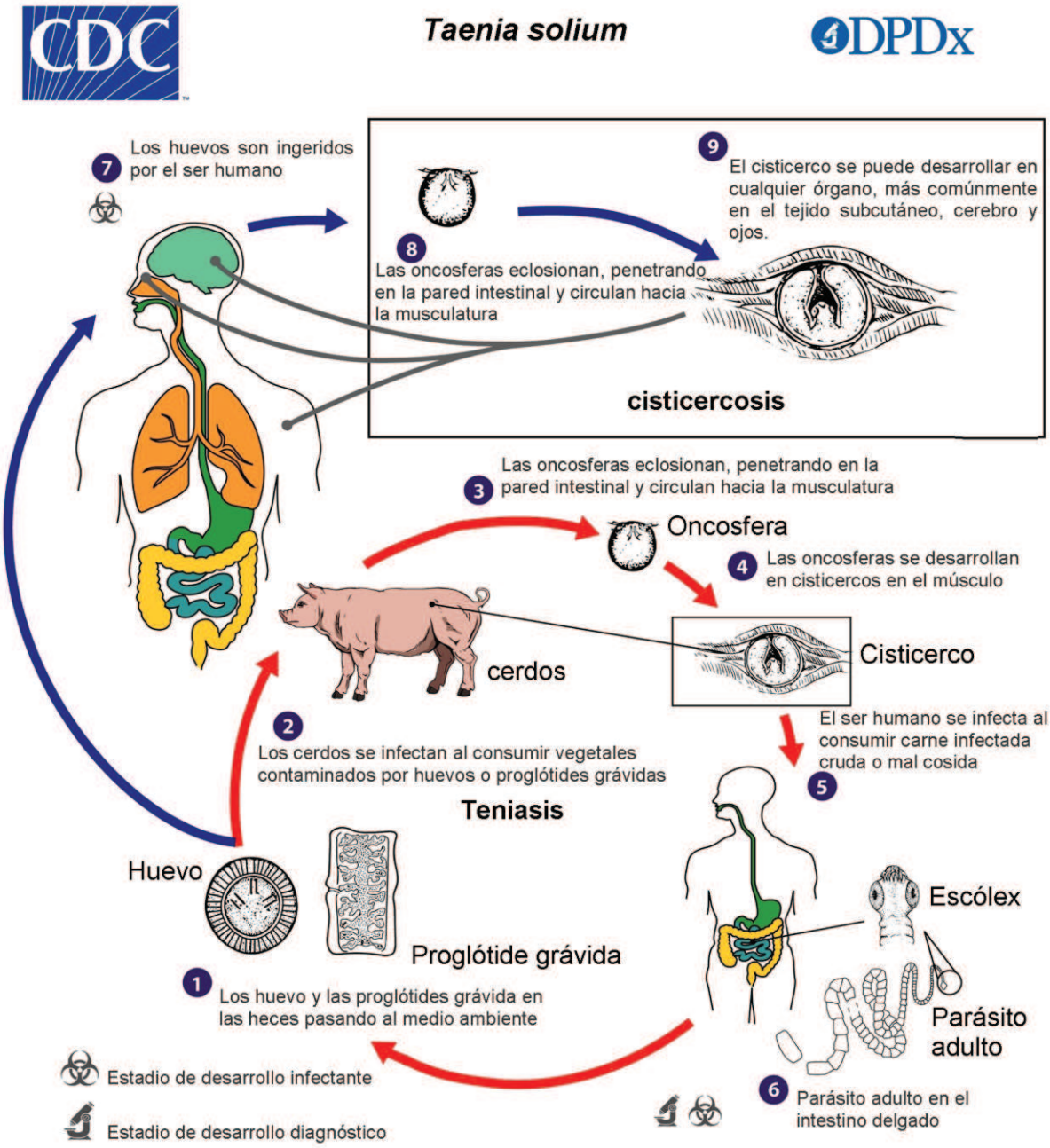


Figura 1.8. Esquema del ciclo de vida del parásito *Taenia solium*. Se muestran esquematizados los diferentes estadios de desarrollo del parásito *T. solium*. Los estadios son: parásito adulto, huevo, oncosfera y cisticerco. Los seres humanos pueden actúan como hospedador definitivo (teniasis) y hospedador intermediario (cisticercosis). La Imagen fue adaptada de la página del Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (https://www.cdc.gov/dpdx/cysticercosis/index.html).

La primera etapa se conoce como la "etapa viable o vesicular" en la cual una membrana se desarrolla alrededor de cada oncosfera, formando una vesícula que contiene un líquido claro que rodea el escólex del parásito. Dependiendo del ambiente circundante y de la naturaleza de la

respuesta inmune que provoca su presencia, los cisticercos pueden permanecer en esta etapa durante meses o incluso años, antes de que comiencen a degenerarse. La "etapa coloidal" marca esta transición, en la cual el escólex muestra signos de deterioro y el líquido vesicular comienza a aparecer turbio. Después de esto, el líquido vesicular se vuelve gradualmente más opaco y el quiste comienza a calcificarse, terminando su evolución como un nódulo calcificado no viable (Coral-Almeida y col., 2015). El ciclo de vida se completa cuando los seres humanos ingieren carne de cerdo cruda o poco cocida que contiene cisticercos viables. Las enzimas digestivas en el intestino delgado hacen que los escólices se evaginen de la vesícula del cisticerco y se adhieran a la pared del intestino de los seres humanos (enfermedad denominada teniasis). Aquí, la tenia madura hasta la edad adulta, momento en el que se liberan a través del excremento de los hospedadores definitivos los proglótidos grávidos. El cisticerco suele alojarse en los músculos, tejido subcutáneo u ojo, pero cuando el cisticerco se aloja en el sistema nervioso central la patología puede ser mucho más grave y se la denomina neurocisticercosis (NCC).

1.4.2.2. Distribución geográfica de la teniasis/cisticercosis

La NCC es la enfermedad helmíntica más común del sistema nervioso central en los seres humanos y presenta una alta prevalencia en países en desarrollo de África, Asia y América Latina (Figura 1.10). Según la OMS es la causa prevenible, más frecuente de epilepsia en estas regiones (WHO, 2012). Se estima que 2 millones de personas padecen epilepsia debido a la infección por *T. solium* en el sistema nervioso central. La NCC sintomática representa aproximadamente la tercera parte de los trastornos convulsivos y contribuye a otras enfermedades neurológicas (Fogang y col., 2015). Sin un manejo adecuado, que no siempre está disponible en muchas áreas endémicas, la NCC todavía se asocia con altas tasas de mortalidad (50 000 muertes por año) (Fogang y col., 2015).

En América Latina, la prevalencia de la cisticercosis por *T. solium* en seres humanos, medida por el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y/o *Western blot*, varia de entre el 3,7% y el 24% (Flisser y col., 2003). Las manifestaciones clínicas de la NCC pueden variar desde una infección completamente asintomática hasta una enfermedad grave e inclusive la muerte. Los signos y síntomas de la NCC suelen ser inespecíficos. El principal factor determinante de la NCC sintomática es la localización de los cisticercos: parénquima cerebral o en los espacios extraparenquimáticos. Cuando el cisticerco se desarrolla en el parénquima cerebral las convulsiones son el síntoma más frecuente (Garcia y col., 2014). En el caso de la NCC

extraparenquimatosa los cisticercos suelen alojarse en el sistema ventricular o en el espacio subaracnoideo. Esto puede desarrollar una hipertensión intracraneal aguda potencialmente mortal (Fogang y col., 2015). La obstrucción del flujo del líquido cefaloraquídeo ocurre con mayor frecuencia cuando los quistes se alojan en el cuarto ventrículo y causan hidrocefalia de manera progresiva. Otra forma de presentación es la encefalitis cisticercal, en la cual los síntomas pueden ser hipertensión intracraneal. La afectación de la médula espinal es rara y representa del 1% al 5% de todos los casos (Fogang y col., 2015).

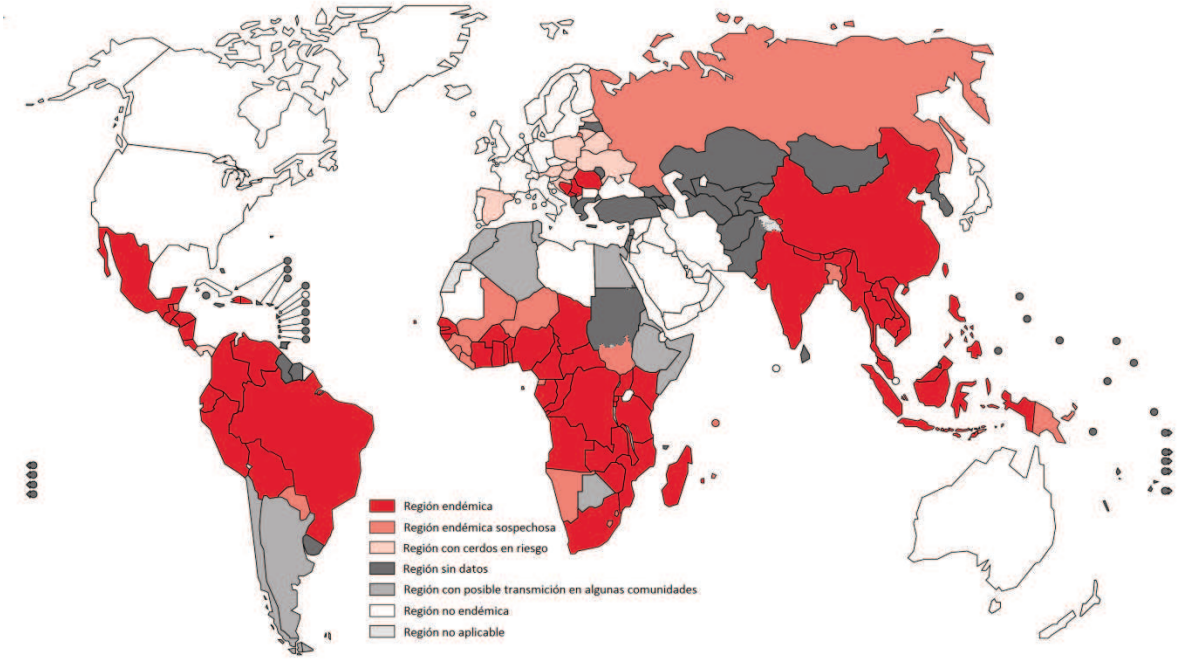


Figura 1.10. Distribución geográfica de la teniasis. En el mapa se muestran las zonas geográficas donde se puede encontrar la teniasis, causada por el parásito *Taenia solium*. La Imagen fue adaptada del reporte de (WHO, 2016).

1.4.2.3. Diagnóstico y tratamiento

Como se mencionó anteriormente la NCC presenta una gran heterogeneidad en cuanto a las presentaciones clínicas. Esto no solo complica el procedimiento de diagnóstico, sino que también afecta el plan de manejo de la enfermedad. Antes de comenzar el tratamiento, se debe determinar el perfil completo de la enfermedad, incluida la evidencia de afectación del SNC, la caracterización de la respuesta inmune existente y el número, la ubicación y la viabilidad de los cisticercos presentes. Solo una vez que se han determinado estos factores, se puede determinar

un plan de tratamiento que se adapte a cada persona. El uso de antihelmínticos en el tratamiento de la NCC ha generado controversia, ya que el uso de fármacos existentes hasta el momento, puede suponer un mayor riesgo para el paciente más que un beneficio, debido principalmente a la extensa respuesta inflamatoria que puede estimularse en respuesta a la muerte masiva de cisticercos en su interior (Sinha y Sharma, 2009). Por lo tanto, en los casos en los que no se puede proporcionar un diagnóstico y una caracterización definitiva de la infección debido a la falta de neuro-imagen, se considera imprudente continuar el tratamiento con antihelmínticos y los pacientes solo deben ser tratados según los síntomas que presenten (Fogang y col., 2015).

1.5. Cestodos modelos

La escasa disponibilidad de material biológico resulta en una de las principales limitaciones experimentales asociadas con el trabajo con cestodos. Por este motivo, en este trabajo se emplearon tetratiridios (TTy) de *Mesocestoides corti* para la evaluación del efecto antihelmíntico de varios compuestos. Este parásito es un modelo de laboratorio de cestodos, ampliamente validado para el estudio de varios aspectos de la biología de cestodos (Hemphill, 2010); en particular en la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento farmacológico (Maggiore y Elissondo, 2014; Markoski y col., 2006). El estadio de desarrollo larvario (tetratiridio) de *M. corti* tiene una capacidad notable de reproducción asexual en la cavidad peritoneal de ratones y algunos otros hospedadores de mamíferos, lo que proporciona una disponibilidad continua de material biológico. Además, se cultiva fácilmente y es considerado como no infectivo para los humanos (Markoski y col., 2003; Specht y Voge, 1965; Thompson y col., 1982).

1.5.1. Ciclo de vida de *Mesocestoides corti*

M. corti tiene un ciclo de vida indirecto del cual aún no se conocen todos los detalles, aunque se sabe que necesita dos hospedadores intermediarios (Figura 1.11). Los primeros hospedadores intermediarios son los artrópodos (hormigas, escarabajos coprófagos, ácaros oribátidos), que ingieren los huevos que son expulsados junto con las heces del hospedador definitivo. Dentro de los artrópodos el huevo se desarrolla a cisticercoides, que es comido junto con el artrópodo por los segundos hospedadores intermediarios; que pueden ser reptiles, anfibios, aves o pequeños mamíferos. En estos segundos hospedadores intermediarios, los cisticercoides se liberan y se desarrollan al estadio de desarrollo infectivo, los tetratiridios (TTy),

que invaden la cavidad peritoneal. Cuando un gato o un perro ingieren a su vez a unos de estos segundos hospedadores intermediarios; los TTy se liberan en el estómago, alcanzan el intestino, se desarrollan a adultos y comienzan a poner huevos. El periodo de prepatencia dura de 15 a 20 días.

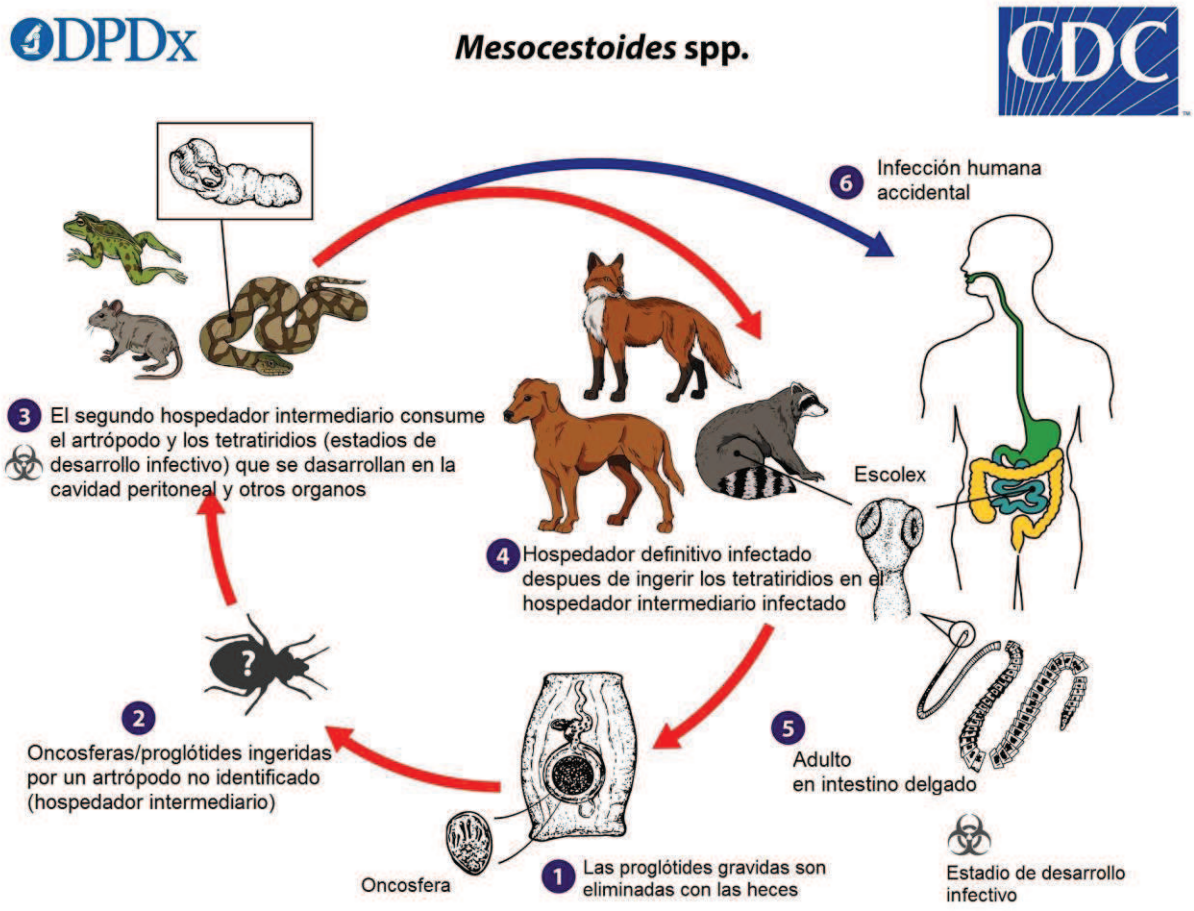


Figura 1.11. Esquema del ciclo de vida de parásitos del género *Mesocestoides*. Se muestran, esquematizados, los diferentes estadios de desarrollo de parásitos del género *Mesocestoides* y los hospedadores en los que ingresan o se desarrollan. Los estadios son: parásito adulto, oncosfera, cisticercoide y tetratiridio. La Imagen fue adaptada de la página del Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (https://www.cdc.gov/dpdx/mesocestoidiasis/index.html).

También puede ocurrir que la mascota u otro hospedador definitivo ingieran accidentalmente un artrópodo contaminado. En este caso, los cisticercoides darán lugar a los tetratiridios que, en vez de quedarse dentro del intestino, atraviesan la pared intestinal e invaden la cavidad peritoneal. En ella pueden además multiplicarse asexualmente por simple división longitudinal. En este caso se habla de una tetratiridiosis, en vez de la mesocestoidiasis que es la infestación del intestino con formas adultas.

1.6. Remodelación de la cromatina

La cromatina es un complejo formado por proteínas histonas y no histonas, asociadas al cromosoma, que se unen al ácido desoxirribonucleico (ADN). Esta estructura es la forma en la que se encuentra el ADN dentro del núcleo celular y tiene una subunidad fundamental, denominada nucleosoma. Cada partícula de nucleosoma está compuesta de un octámero de cuatro histonas, compuestas por dos unidades de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 y 147 nucleótidos del ADN bicatenario (Figura 1.12). El octámero de histonas forma un núcleo de proteínas con una carga positiva a la que se enrolla el ADN, compactando de esta manera el material genético (de Ruijter y col., 2003).

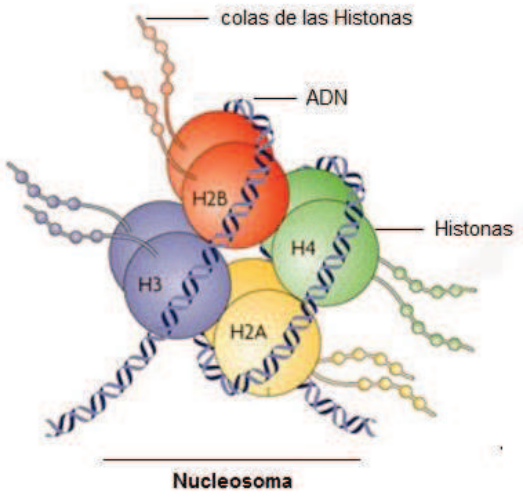


Figura 1.12. Nucleosoma. Representación esquemática del nucleosoma, formado por el ADN enrollado en el octámero de proteínas Histonas. Imagen adaptada del banco de imágenes gratuitas de Adobe® (https://stock.adobe.com/ar/illustrations).

Como se mencionó anteriormente, los cestodos deben realizar pasajes secuenciales entre dos o más hospedadores a fin de completar su ciclo de vida, en los cuales atraviesan diferentes estadios de desarrollo, experimentando una serie de cambios morfológicos que implican procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular. Esta notable plasticidad fenotípica de los cestodos implica sistemas complejos de control de la transcripción genética que modulen el desarrollo y la diferenciación celular. En muchos organismos, incluidos trematodos y turbelarias, el desarrollo embrionario, la diferenciación y la capacidad de adaptación a cambios en el medio ambiente es asociado con cambios en la estructura de la cromatina (Geyer y Hoffmann, 2012; Robb y Alvarado, 2014; Yao y Seto, 2011). Es cada vez más claro que estas modificaciones en el empaquetado del material genético sirven para establecer regiones transcripcionalmente activas e inactivas en el genoma (Cabezas-Cruz y col., 2014).

Los mecanismos implicados en la remodelación de la cromatina incluyen los procesos de metilación del ADN, modificaciones postranscripcionales reversibles de histonas, variantes histónicas, factores de remodelación de la cromatina y ácido ribonucleico (ARN) no codificantes. Las enzimas que intervienen en estos procesos, en especial en la metilación de ADN y las modificación de las histonas, son ampliamente estudiadas como posibles blancos farmacológicos (Cabezas-Cruz y col., 2014; Hailu y col., 2017; Helin y Dhanak, 2013; Mottamal y col., 2015; Pierce y col., 2012; Yao y Seto, 2011).

Las modificaciones postraduccionales de las colas amino-terminales de las histonas generan un sistema de regulación complejo, conocido como el "código de histonas". Un componente importante en el código de histonas es el grado de acetilación de las colas amino terminales, que tiene efecto directo en la estructura de la cromatina. Un porcentaje alto de acetilación (hiperacetilación) está generalmente asociado con la cromatina transcripcionalmente activa: la eucromatina. Por el contrario, un mayor porcentaje de desacetilación se asocia con las regiones compactas de la cromatina: la heterocromatina. Este proceso se encuentra bien regulado por dos clases de enzimas específicas remodeladoras de la cromatina: las enzimas Histona deacetilasas (HDACs) y las enzimas Histona acetiltranferasas (HATs), que remueven o transfieren grupos acetilos a los residuos de lisina en las colas histónicas, respectivamente (Chuang y col., 2009) (Figura 1.13).

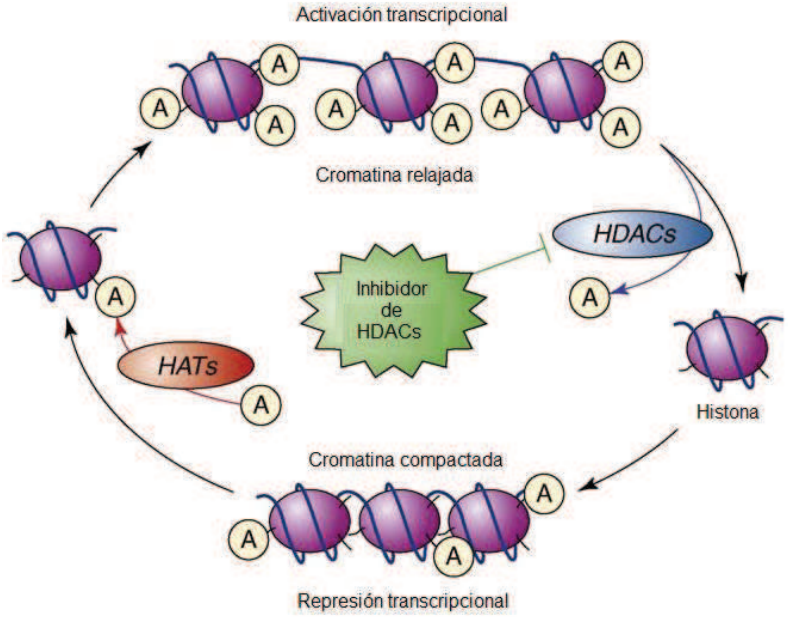


Figura 1.13. Regulación de la expresión génica mediada por la estructura de la cromatina. Representación esquemática de la regulación de la expresión génica mediada por cambios en la estructura de la cromatina, principalmente las modificaciones en la acetilación de las colas histonas. El nivel de acetilación de histona

está regulado por las enzimas Histona deacetiladas (HDACs) e Histona acetiltranferasas (HATs). A: grupo acetilo. La imagen fue adaptada de Chuang y col. (2009).

1.6.1. Las Histonas deacetilasas

Las HDACs forman una familia de enzimas ampliamente conservadas, implicadas en el control de la expresión genética mediante la remoción de residuos acetilo de las histonas y otras proteínas no histonicas (de Ruijter y col., 2003). Estas enzimas tienen una localización tanto nuclear como citosólica y poseen un amplio rango de pesos moleculares. En mamíferos, se han descripto 18 miembros agrupados en dos subfamilias filogenética y estructuralmente relacionadas: las clásicas HDACs que tienen un dominio catalítico dependiente del Zn^{2+} (HDAC 1-11) y las Sirtuinas (SIRTs) que tienen un dominio catalítico dependientes del cofactor NAD^{+} (SIRT 1-7). Las HDACs, a su vez, se clasifican en tres clases principales (Figura 1.14): i) Las HDACs de Clase I, que incluyen las proteínas HDAC1, 2, 3 y 8, relacionadas con la enzima de levadura Rpd3; en *H. sapiens* estas proteínas se expresan en la mayoría de las líneas celulares y se localiza fundamentalmente en el núcleo; ii) Las HDACs de Clase II, que incluyen las proteínas HDAC4, 5, 6, 7, 9 y 10, relacionadas con la proteína de levadura HDA1 y expresadas en el núcleo y el citoplasma de un pequeño número de tejidos. Esta clase puede a su vez subdividirse en dos subclases, HDACs de Clase IIa (HDAC4, 5, 7 y 9) y de Clase IIb (HDAC6 y 10); y iii) Las HDACs de Clase IV, formada por la proteína HDAC11 (de Ruijter y col., 2003; Gregoretti y col., 2004).

En platelmintos se han reportado HDACs de Clase I y II (Cabezas-Cruz y col., 2014; Dubois y col., 2009; Oger y col., 2008; Scholte y col., 2017), así como SIRTs (Lancelot y col., 2013). Por otro lado, se han realizados pruebas con inhibidores de HDACs utilizados en cáncer, como drogas para la Schistosomiasis, Toxoplasmosis y Malaria con resultados (Campo, 2017; Chua y col., 2017; Engel y col., 2015). Sin embargo, en los parásitos cestodos (*E. granulosus* s.s., *E. multilocularis*, *T. solium* y *M. corti*) existe un desconocimiento en este campo. Dado que estos parásitos son agentes causales de varias patologías en humanos y otros mamíferos, resulta importante su estudio y comprensión a fin de desarrollar nuevas terapias contra estas enfermedades parasitarias.

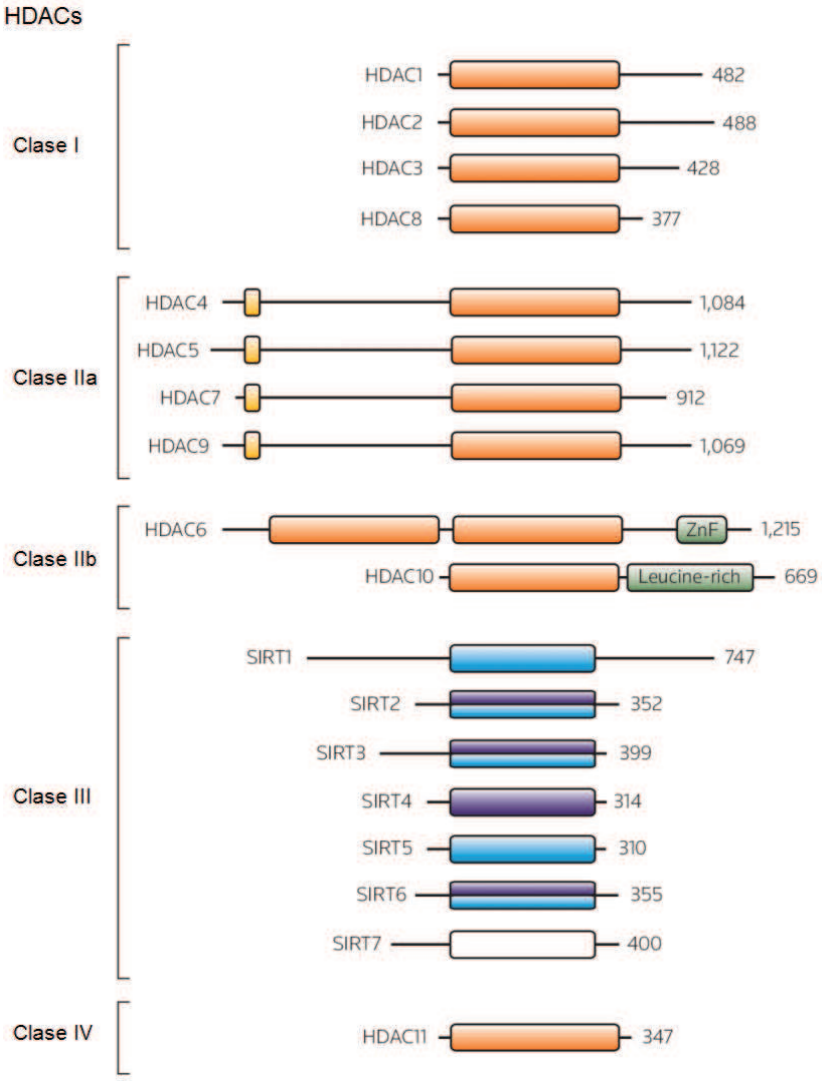


Figura 1.14. La familia de enzimas Histonas desacetilasas (HDACs). Se indican el dominio catalítico HDACs conservado (HDACs clásicas) (rectángulos de color anaranjado), el dominio catalítico de las Sirtuinas (rectángulos de color azul) y el dominio catalítico de ADPribosil transferasa (rectángulos de color morado). No se ha informado actividad catalítica para SIRT7. También se muestran la región rica en leucina en HDAC10 y el dedo de zinc C-terminal (ZnF) en HDAC6. A la izquierda se indica el número de aminoácidos de cada enzima.

1.6.2. Inhibidores de las enzimas HDACs

Son numerosos los estudios que relacionan la regulación deficiente de las HDACs con el cáncer, enfermedades neurológicas y desórdenes de la inmunidad (Falkenberg y Johnstone, 2014). De hecho, ya están aprobados por la FDA (del inglés, *U.S.A. Food and Drug Administration*) cuatro inhibidores de las HDACs (HDACi) como fármacos para el tratamiento de diferentes canceres (Figura 1.15).

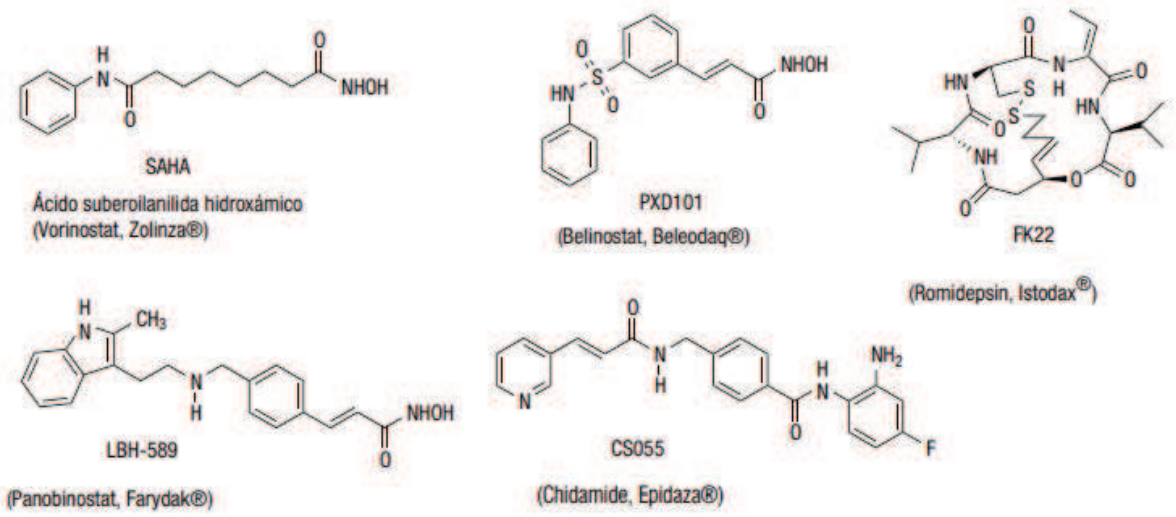


Figura 1.15. Inhibidores de las HDACs. Se muestran las estructuras químicas de los inhibidores de HDACs aprobados por la FDA para el tratamiento de diferentes tipos de cánceres. Epidaza, se encuentra aprobado en China desde 2015. La imagen fue adaptada de Rodríguez de Lera (2016).

Vorinostat (SAHA, Zolinza®) y romidepsina (FK228, Istodax®) son HDACi que se utilizan en clínica desde 2006 y 2009, respectivamente, para el tratamiento del linfoma cutáneo de células T. Belinostat (PDX-101, Beleodaq®) es también un HDACi que ha sido aprobado por la FDA en 2014 para el tratamiento del linfoma de células T periféricas. Panobinostat (LBH589, Farydaq®), otro HDACi, ha sido aprobado recientemente (2015) para el tratamiento de pacientes con mieloma múltiple. Además, chidamide (Epidaza®) es un fármaco aprobado en China en 2015 para el tratamiento de enfermedades hematológicas. Estos compuestos muestran actividad con más de un isotipo de HDAC, constituyendo inhibidores no selectivos; actualmente se encuentra en auge la búsqueda y diseños de inhibidores selectivos de cada isotipo de HDAC, ya que se cree que podrían tener mejor perfil farmacológico y menos efectos secundarios (Kalin y Bergman, 2013; Thaler y Mercurio, 2014).

Por todo lo expresado, se puede observar que las HDACS se encuentran bajo una creciente investigación como blancos terapéuticos, principalmente en cáncer (Drummond y col., 2005; Shankar y Srivastava, 2008) y enfermedades parasitarias (Andrews y col., 2012; Chua y col., 2017; Engel y col., 2015; Marek y col., 2018, 2015). Sin embargo, hasta el momento, no existen estudios específicos sobre estas enzimas en cestodos. Los genomas disponibles de E*chinococcus* spp y *T. solium*, en cuya secuenciación y análisis participó el laboratorio de Biología Molecular de Hidatidosis (BMHid, IMPAM-UBA-CONICET) (Maldonado y col., 2017; Tsai y col., 2013) muestran la

presencia de estas enzimas en estos organismos. Además, el gen HDAC1 en *E. multilocularis* ha mostrado una gran expresión en el metacestodo, el estadio de desarrollo clínicamente relevante de la echinococcosis alveolar (Koziol y col., 2014). Asimismo, se han propuesto como blancos farmacológicos en parásitos, incluyendo helmintos (Chakrabarti y col., 2015; Marek y col., 2013).

HIPÓTESIS

La hipótesis central del presente trabajo de tesis doctoral es que el bloqueo o inhibición de la actividad enzimática de proteínas involucradas en la remodelación de la cromatina (principalmente del tipo HDACs) afecta la viabilidad y/o el desarrollo de cestodos. Se espera que los resultados obtenidos durante este trabajo permitan profundizar en el conocimiento sobre la biología de los cestodos y aporten nuevas alternativas para el tratamiento farmacológico de enfermedades desatendidas causadas por estos parásitos.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente trabajo es evaluar las HDACs en cestodos como potenciales blancos farmacológicos en el tratamiento de enfermedades parasitarias desatendidas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Se proponen cinco objetivos específicos para este trabajo de tesis doctoral:

1) Identificar y analizar los genes codificantes de HDACs en los genomas de cestodos disponibles en las bases de datos parasitarias.

2) Validar las HDACs de cestodos como blancos farmacológicos, determinando el efecto de su inhibición sobre la viabilidad parasitaria.

3) Evaluar el efecto antihelmíntico de un alto número de inhibidores de las enzimas HDACs.

4) Caracterizar el efecto farmacológico de aquellos inhibidores de las HDACs y SIRTs que hayan demostrado mayor actividad antihelmíntica.

5) Caracterizar estructuralmente las HDACs propuestas como potenciales blancos farmacológicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material Parasitario

2.1.1. *Echinococcus granulosus sensu lato* (*s.l.*)

Los protoescólices (PSC) de *E. granulosus s.l.* empleados en este trabajo fueron obtenidos de quiste hepáticos de infecciones naturales en cerdos. El material fue cedido por diferentes mataderos de la provincia de Buenos aires, Argentina; el cual fue procesado como parte del trabajo normal de los mataderos y recolectado bajo el consentimiento de las autoridades locales. Brevemente, la extracción de los PSC se realizó mediante aspiración suave del líquido hidatídico de los quistes con aguja bajo condiciones de esterilidad. El material recolectado se lavó tres veces con PBS pH 7,2, suplementado con levofloxacina (20 µg/mL), a fin de remover los restos de capa germinal que pudieran haber sido arrastrado en la aspiración del líquido hidatídico. La viabilidad parasitaria se determinó mediante el test de exclusión por tinción con eosina. Solo se emplearon muestras con un porcentaje de vialidad superior a 95%. Por último, se determinó la especie y genotipo mediante secuenciación del fragmento de la subunidad 1 del gen mitocondrial Citocromo C oxidasa, como se describió previamente (Avila y col., 2017; Cucher y col., 2013).

2.1.2. *Mesocestoides corti*

Los tetratiridios (TTy) de *M. corti* utilizados en este trabajo corresponden a la cepa originalmente aislada por Specht y Voge (1965). Los mismos fueron cedidos por el Dr. Henrique Ferreira (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil) y mantenidos en el laboratorio mediante pasajes en ratones y ratas, como se describió previamente (Markoski y col., 2003). Brevemente, cada ciclo de pasajes corresponde a un pasaje en ratas hembras adultas Wistar (tres meses de edad) por un periodo de infección de seis meses, seguido por tres pasajes secuenciales en ratones hembras adultas Balb/c (tres meses de edad) por un periodo de infección de tres meses. Las inoculaciones se realizaron con 200 µL de TTy por vía intraperitoneal. Los animales de experimentación fueron criados y alojados a temperatura y ciclos de luz y oscuridad controlados; con agua y comida *ad libitum* en el bioterio del Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPaM), Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires (UBA)-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Argentina. El material

utilizado en este trabajo corresponde a TTy obtenidos de ratones hembra Balb/c. Después de 3 meses de infección, los ratones fueron sacrificados por eutanasia en cámara de CO_2. El material fue recolectado de la cavidad peritoneal bajo condiciones de esterilidad y lavado tres veces con PBS pH 7,2, suplementado con levofloxacina (20 µg/mL). Los TTy fueron incubados por 24 h (horas) antes de su utilización en 5 mL de medio Mco-RPMI 1640 (Anexo A.1.1) en una atmósfera controlada de 5% de CO_2 a 37°C.

2.1.3. Declaraciones Éticas

Todos los experimentos que involucraron animales de experimentación, o muestras biológicas, se llevaron a cabo de acuerdo a los protocolos aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina. Protocolos: "Pasajes *in vivo* de parásitos cestodos: *Mesocestoides corti*" CD N° 1127/2015 y CD N° 1229/2015 y "Punción de quistes hidatídicos provenientes de infecciones naturales" CD N° 3723/2014.

2.2. Identificación y análisis de genes codificantes de HDACs en cestodos

2.2.1. Identificación de genes codificantes de HDACs en los genomas de cestodos

Los genes codificantes de HDACs en cestodos se identificaron mediante búsquedas por homología en los genomas parasitarios disponibles en la base de datos WormBase ParaSite (Howe y col., 2016, 2017) (https://parasite.wormbase.org/index.html), usando la herramienta BLASTp y, como secuencias carnadas (o *query* en inglés), las secuencias canónicas de aminoácidos correspondientes a las HDAC1-11 de *H. sapiens*. En la Tabla 2.1 se muestra la lista de genomas de cestodos empleados. Estos genomas se seleccionaron empleando los criterios para la selección de genomas de nematodos y platelmintos de mayor calidad de ensamblado (International Helminth Genomes Consortium, 2017). Estos criterios definen valores mínimos para los parámetros de N_{50} (≥ 5 Kb) y CEGMA (≥ 85 %). Las secuencias parasitarias obtenidas con un valor de E ≤ 0,00001, en las búsquedas por homología, se emplearon para un análisis de BLASTp recíproco contra el proteoma de *H. sapiens* (https://www.uniprot.org/proteomes/UP000005640).

Tabla 2.1. Lista de genomas de parásitos cestodos empleados

Código	Especie	BioProyect ID[a]	Referencias
Eca	*Echinococcus canadensis G7*	PRJEB8992	Maldonado y col., 2017
Egr	*Echinococcus granulosus sensu stricto* G1	PRJEB121	Tsai y col., 2013
	Echinococcus granulosus sensu stricto G1	PRJNA182977	Zheng y col., 2013
Emu	*Echinococcus multilocularis*	PRJEB122	Tsai y col., 2013
Hdi	*Hymenolepis diminuta*	PRJEB507	Coghlan y col., 2017
Hmi	*Hymenolepis microstoma*	PRJEB124	Tsai y col., 2013
Mco	*Mesocestoides corti*	PRJEB510	Coghlan y col., 2017
Tas	*Taenia asiatica*	PRJEB532	Coghlan y col., 2017
	Taenia asiatica	PRJNA299871	Wang y col., 2016
Tsa	*Taenia saginata*	PRJNA71493	Wang y col., 2016
Tso	*Taenia solium*	PRJNA170813	Tsai y col., 2013

[a] BioProyect ID de acuerdo a la base de datos WormBase Parasite

En algunos casos, los genes codificantes de HDACs no fueron identificados en los genomas parasitarios, o sus secuencias se encontraban truncadas o mal anotadas cuando se realizaron las búsquedas por homología. En estos casos los genes se predijeron empleando el predictor de genes Augustus (Stanke y col., 2006), previamente entrenado para la identificación de genes de parásitos del género *Echinococcus* (Maldonado y col., 2017).

Por último, los genes codificantes de HDACs identificados en los genomas de cestodos se emplearon para realizar BLASTp contra el proteoma de *S. mansoni* (Berriman y col., 2009; Protasio y col., 2012), disponible en la base de datos WormBase ParaSite.

2.2.2. Análisis filogenéticos de los genes codificantes de HDAC en cestodos

Se realizaron análisis filogenéticos a fin de determinar la identidad de los genes de HDACs de cestodos y poder clasificar estos genes dentro de las clásicas familias de las HDACs. Para estos análisis se utilizaron las secuencias de aminoácidos correspondientes a los dominios catalíticos de HDACs de los genes identificados en cestodos, así como también, las HDACs de *H. sapiens* y *S. mansoni*. Los dominios catalíticos de HDACs se identificaron mediante el paquete de herramientas HMMER disponibles en la página Pfam (http://pfam.xfam.org/) y el perfil de secuencia consenso de aminoácidos de la familia de HDACs (Pfam: PF00850). Estas secuencias se alinearon usando el software ClustalW. Los alineamientos se ajustaron manualmente cuando fue necesario. Los árboles filogenéticos se infirieron mediante el método de máxima verosimilitud usando matrices JTT. La estadística consenso fue inferida empleando 1 000 repeticiones. El análisis final involucró

90 secuencia aminoacídicas. Todas las posiciones con una cobertura menor al 90% fueron eliminadas. Se emplearon en total 76 posiciones en el set de datos final. El análisis de evolución se realizó mediante el software MEGA5 (Tamura y col., 2011).

2.2.3. Análisis del porcentaje de identidad entre los genes de HDACs

Se evaluó el grado de similitud de los genes de HDACs identificados en cestodos con las HDACs de *H. sapiens* y *S. mansoni*. Este análisis se realizó calculando el porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoácidos correspondientes a los dominios catalíticos de HDACs identificados en la Sección 2.2.2. Los porcentajes de identidad entre los dominios catalíticos de HDACs se calcularon mediante matrices de identidad, empleando el software Clustal2.1.

2.2.4. Análisis de expresión transcripcional de los genes de HDACs en diferentes estadios de desarrollo de *Echinococcus* spp.

Se analizaron los niveles de expresión de los genes de HDACs en diferentes estadios de desarrollo de parásitos del género *Echinococcus*, mediante datos de RNAseq disponibles para *E. granulosus s.s.* G1 (Zheng y col., 2013) y *E. multilocularis* (Huang y col., 2016). Los niveles de expresión para cada transcripto de HDAC, expresados como RPKM (del inglés, *Reads per kilo base per million mapped reads*), se compararon entre los diferentes estadios de desarrollo. En *E. granulosus s.s.* G1, los estadios de desarrollo analizados fueron: parásito adulto, oncosfera, metacestodo y protoescólex. En *E. multilocularis*, los estadios de desarrollo analizados fueron: oncosfera, oncosfera activada y metacestodo pequeño de 4 semanas de cultivo *in vitro*.

Todos los análisis bioinformáticos descriptos en las secciones anteriores se realizaron utilizando la plataforma y herramientas bioinformáticas del clúster de servidores del Nodo Bioinformático del IMPaM (https://bioinfo.fmed.uba.ar), incorporado al Sistema Nacional de Computación de Alto desempeño (SNCAD), ID 924, Resolución N°: SCAT 024-14, mayo 2014, Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Nación (MinCyT).

2.3. Validación de las HDACs de cestodos como potenciales blancos farmacológicos

2.3.1. Soluciones stock

Las soluciones stock se prepararon disolviendo los compuestos en dimetilsulfóxido (DMSO) al 100%. La concentración de la solución stock para la Tricostatina A (TSA; Cell Signaling Technology, U.S.A.) fue de 10 mM y de 2 mM para el Praziquantel (PZQ) y el Albendazol (ABZ). Las mismas se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

2.3.2. Ensayos de viabilidad empleados

Con el fin de evaluar el efecto de la inhibición de las HDACs sobre la viabilidad parasitaria en cestodos, se adaptaron dos ensayos de viabilidad independientes: ¡) por mediciones metabolicas, basado en la reducción de la resazurina (AlamarBlue®) y ii) por mediciones de motilidad parasitaria. Estas metodologías resultan imprescindibles para la determinación del efecto antihelmíntico de inhibidores de las HDACs sobre la viabilidad parasitaria de TTy de *M. corti* en cultivo *in vitro*.

2.3.2.1. Adaptación del ensayo de viabilidad por reducción de la resazurina para la determinación de la viabilidad parasitaria de *Mesocestoides corti*

El ensayo de viabilidad por reducción de resazurina (o AlamarBlue®) se basa en el empleo de un colorante indicador azul no fluorescente (la resazurina) que es convertido, en una reacción de reducción mediada por las células metabólicamente activas, en un indicador rojo altamente fluorescente (la resofurina). Este indicador, además de emitir fluorescencia, presenta también máximos de absorción en diferentes longitudes de ondas para el compuesto oxidado y reducido, lo que permite la determinación de la viabilidad por mediciones de fluorescencia y absorbancia (Figura 2.1).

Los parámetros a evaluar en la puesta a punto de este método fueron: medio de cultivo, tamaño y número de parásitos por pocillo, si era conveniente realizar la medición mediante fluorescencia o absorbancia, longitudes de onda de medición y efecto del solvente de los compuestos (DMSO). A fin de evaluar estos parámetros, se estableció un protocolo base para

todas las mediciones. Para este protocolo, los TTy de *M. corti*, en número variable, se incubaron en placas de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Alemania) con 200 µL de medio de cultivo Mco-RPMI 1640 por pocillo. Las placas fueron incubadas en una atmósfera controlada de 5% de CO_2 a 37°C. Por otra parte, 24 h previas a las mediciones se agregaron 20 µL del reactivo de AlamarBlue® (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) por pocillo. Todas las mediciones de la puesta a punto se realizaron después de 3 días de incubación. En cuanto a las mediciones por fluorescencia, éstas se llevaron a cabo mediante el Lector de microplacas DTX-880 (Beckman Coulter, U.S.A.) a longitudes de onda de excitación de 540 nm y de emisión de 580 nm. Las mediciones de absorbancia, por su parte, se llevaron a cabo mediante el Lector de microplacas Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) a longitudes de onda de 540 nm, 570 nm, 600 nm y 630 nm.

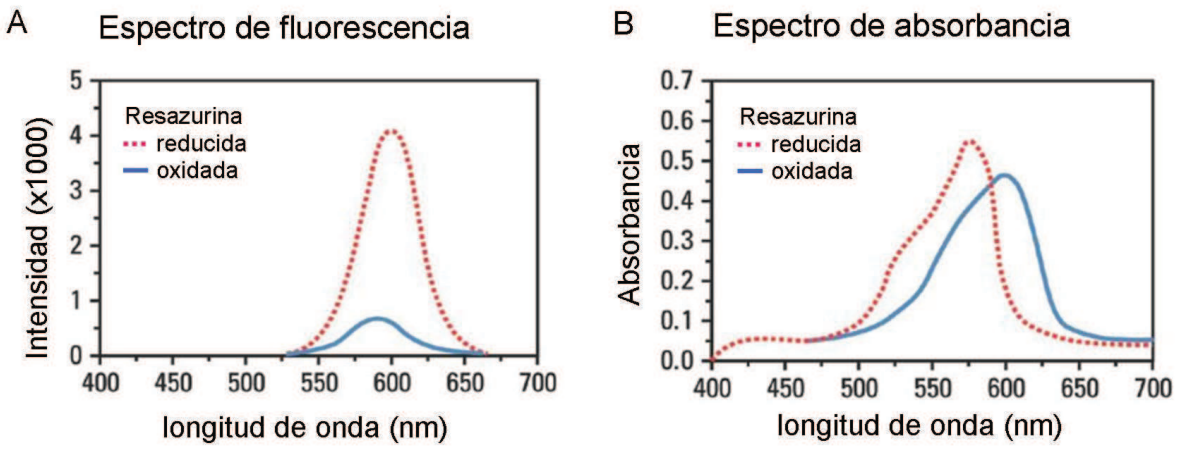


Figura 2.1. Espectros de fluorescencia y absorbancia para la resazurina. Se muestran (A) el espectro de fluorescencia y (B) el espectro de absorbancia de la resazurina, reducida y oxidada, en función de la longitud de onda (nm).

En primera instancia se determinó el medio de cultivo a emplear. Se evaluaron los medios Mco-PRMI 1640 con y sin rojo fenol. Para este fin, las absorbancias se midieron a la longitud de onda de 570 nm para los medios de cultivo antes y después del agregado de la resazurina.

Por otra parte, se determinó el tamaño conveniente de los TTy a emplear a fin de reducir la dispersión de las mediciones. Esto se realizó debido a la heterogeneidad, en cuanto al tamaño, de los TTy de *M. corti*. Para este fin, los parásitos se filtraron por tamaño mediante membranas filtrantes de poliéster de poros de 150 µm y 250 µm. Se realizaron mediciones de fluorescencia

para las diferentes poblaciones parasitarias obtenidas, empleando 20 TTy por pocillo para una réplica biológica por decuplicado.

Otro parámetro a considerar fue el número de TTy por pocillo a emplear. Para ello, se determinó el porcentaje de reducción de la resazurina para diferentes números de parásitos por pocillo (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 TTy por pocillo). El porcentaje de reducción de la resazurina se determinó para tres réplicas biológicas, cada una por triplicado, mediante siguiente ecuación:

[Ecuación 2.1]
$$\%\ de\ reducción\ = \frac{(\varepsilon_{OX})\lambda_2\ A_{\lambda_1} - (\varepsilon_{OX})\lambda_1 A_{\lambda_2}}{(\varepsilon_{RED})\lambda_1\ A^{\circ}_{\lambda_2} - (\varepsilon_{RED})\lambda_2\ A^{\circ}_{\lambda_1}}$$

En donde, ε_{OX} es el coeficiente de extinción molar del reactivo oxidado de AlamarBlue® (de color azul); ε_{RED} es el coeficiente de extinción molar del reactivo reducido de AlamarBlue® (de color rojo); A es la absorbancia medida para el ensayo (medio de cultivo con parásitos y el reactivo de AlamarBlue®); A° es la absorbancia medida para el medio de cultivo (sin los parásitos) con el reactivo de AlamarBlue®; λ_1 es la menor longitud de onda empleada (540nm o 570 nm) y λ_2 es la mayor longitud de onda empleada (600nm o 630 nm). En la Tabla 2.2 se muestran los coeficientes de extinción molar para el reactivo de AlamarBlue® oxidado y reducido para las diferentes longitudes de onda.

Tabla 2.2. Coeficientes de exinción molar del reactivo de AlamarBlue®

Longitud de onda	ε_{RED}	ε_{OX}
540 nm	104395	47619
570 nm	155677	80586
600 nm	14652	117216
630 nm	5494	34798

Por otra parte, a fin de evaluar si el método de determinación de viabilidad por reducción de la resazurina permitiría diferenciar entre parásitos vivo y muertos, se determinó el porcentaje de reducción de la resazurina para diferentes proporciones de TTy de *M. corti* vivos:muertos (20:0; 15:5; 10:10; 2:15 y 0:20). El porcentaje de reducción se determinó para tres réplicas biológicas, cada una por triplicado. Los parásitos muertos se obtuvieron pre-incubando las muestras en etanol al 70% durante 30 min.

Por último, se evaluó el efecto del dimetilsulfóxido (DMSO) sobre la viabilidad parasitaria. Para ello, se determinó el porcentaje de reducción de la resazurina para TTy incubados con diferentes concentraciones de DMSO (0; 0,5; 1; 1,5; 2 y 3%), para 3 y 6 días de incubación. El porcentaje de reducción se determinó para tres réplicas biológicas, cada una por triplicado.

2.3.2.2. Adaptación del ensayo de viabilidad por mediciones de motilidad para la determinación de la viabilidad parasitaria de *Mesocestoides corti*

El ensayo de viabilidad por mediciones de motilidad parasitaria se basa en la cuantificación objetiva de los complejos movimientos producidos por la actividad espontánea de los músculos en los parásitos. La cuantificación de los movimientos parasitarios es utilizada como un criterio de la viabilidad parasitaria (Simonetta y Golombek, 2007). Para la determinación de la motilidad parasitaria se empleó el dispositivo wMicroTracker ONE (WMicrotracker Designplus SRL, Argentina). Este dispositivo está compuesto por un rayo de luz infrarrojo y un sistema sensor. Cuando los parásitos se mueven, bloquean el rayo infrarrojo y esto es detectado por el sensor. El sistema sensor traduce la señal y, mediante diferentes algoritmos, calcula la motilidad parasitaria (expresada como índice de motilidad) en un determinado periodo. Este sistema fue diseñado para la medición de la motilidad, y por ende la viabilidad, de *Caenorhabditis elegans* (Simonetta y Golombek, 2007). Este método tiene la ventaja de permitir un sistema de medición continuo y no invasivo de la viabilidad parasitaria.

Los parámetros a evaluar para la puesta a punto fueron: número de parásitos por pocillo, algoritmo de medición y efecto del DMSO. A fin de evaluar estos parámetros, se estableció un protocolo base para todas las mediciones. Para este protocolo, los TTy de *M. corti*, en número variable, se incubaron en placas de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Alemania) con 200 µL de medio de cultivo Mco-RPMI 1640 por pocillo. Las placas fueron incubadas en una atmósfera controlada de 5% de CO_2 a 37°C. Todas las mediciones de la puesta a punto se llevaron a cabo empleando muestras enriquecidas en TTy entre 150 µm y 250 µm; obtenidas mediante filtración por tamaño. Asimismo, todas las mediciones se realizaron después de 3 días de incubación, con un tiempo de medición de 2 horas a temperatura constante de 37°C.

En primera instancia, se evaluó el número de TTy por pocillo a emplear. Para ello, se determinó la motilidad parasitaria para diferentes números de parásitos por pocillo (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 TTy por pocillo). La motilidad parasitaria se determinó mediante el algoritmo "M3-*C. elegans*", para tres réplicas biológicas; cada una por cuadruplicado.

Por otra parte, a fin de evaluar si el método de determinación de viabilidad por mediciones de motilidad permitiría diferenciar entre parásitos vivos y muertos, se determinó la motilidad parasitaria para diferentes proporciones de TTy de *M. corti* vivos:muertos (5:0; 4:1; 3:2; 2:3, 1:4 y 0:5). La motilidad parasitaria se determinó mediante el algoritmo "M3-*C. elegans*", para tres réplicas biológicas; cada una por cuadruplicado. Los parásitos muertos se obtuvieron pre-incubando las muestras en etanol al 70% durante 30 min.

Por otro lado, se evaluó la dispersión de las mediciones de motilidad mediante los diferentes algoritmos del equipo. Para este fin, se determinó la motilidad relativa para 5 TTy de *M corti* por pocillo con los principales algoritmos: "M3-*C. elegans*" y "M3-Zebrafish". La motilidad parasitaria se determinó para una réplica biológica, por decuplicado.

Por último, se evaluó el efecto del DMSO sobre la viabilidad parasitaria. Para ello, se determinó diariamente la motilidad parasitaria para 5 TTy por pocillo incubados con y sin DMSO 1% hasta los 6 días de incubación. El índice de motilidad relativa (IMR) se calculó mediante la siguiente ecuación:

[Ecuación 2.2]
$$IMR = \frac{\text{Índice de motilidad día } x}{\text{Índice de motilidad día } 0}$$

En donde, el "Índice de motilidad día x" es el determinado para un determinado día de incubación y el "Índice de motilidad día 0" es el determinado para el día 0 de incubación. El IMR se determinó mediante el algoritmo "M3-Zebrafish", para tres réplicas biológicas; cada una por cuadruplicado.

2.3.3. Determinación del efecto del inhibidor de las HDACs "Tricostatina A" sobre la viabilidad parasitaria de *Mesocestoides corti*

Se evaluó el efecto del inhibidor selectivo de las HDACs de Clase I y II, Tricostatina A (TSA), sobre la viabilidad parasitaria de TTy de *M. corti*. La viabilidad parasitaria se determinó mediante los ensayos de medición de la viabilidad por reducción de la resazurina y por mediciones de motilidad; descriptos en las Secciones 2.3.2.1 y 2.3.2.2, respectivamente. En ambos casos, los parásitos (20 TTy por pocillo para el ensayo de Alamar Blue® y 5 TTy por pocillo para el ensayo de

motilidad) se incubaron en 200 µL de medio Mco-RMPI 1640 por pocillo en microplacas de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Alemania), en una atmósfera controlada de 5% de CO_2 a 37°C durante 6 días de incubación y sin cambio del medio de cultivo. A fin de evaluar el efecto de la TSA, los TTy se incubaron con diferentes concentraciones del inhibidor (2, 10 y 20 µM). Asimismo, se utilizaron TTy pretratados con etanol al 70% durante 30 minutos como control positivo de los ensayos y TTy incubados con las drogas antihelmínticas praziquantel (PZQ) y albendazol (ABZ) a concentraciones de 1, 10 y 20 µM, como drogas controles. Todos los ensayos se realizaron con la misma cantidad del vehículo de las drogas (DMSO a la concentración final de 1%) y el correspondiente control negativo (DMSO 1%).

En el caso del ensayo de Alamar Blue®, la viabilidad parasitaria se determinó a los 3 y 6 días postratamiento. Brevemente, 24 h previas a las lecturas se añadieron 20 µL del reactivo de AlamarBlue® por pocillo. Las placas se midieron a longitudes de onda de 570 nm y 600 nm mediante el Lector de microplacas Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.). El porcentaje de viabilidad se determinó comparando el porcentaje de reducción medido para los TTy tratados con el medido para los parásitos del grupo control (incubados con DMSO1%), mediante la siguiente ecuación:

[Ecuación 2.3]
$$\%\ viabilidad\ = \frac{(\varepsilon_{OX})\lambda_2\ A_{\lambda_1} - (\varepsilon_{OX})\lambda_1 A_{\lambda_2}}{(\varepsilon_{OX})\lambda_2\ A*_{\lambda_1} - (\varepsilon_{OX})\lambda_1\ A*_{\lambda_2}}$$

En donde, ε_{OX} es el coeficiente de extinción molar del reactivo oxidado de AlamarBlue® (Tabla 2.2); A es la absorbancia medida para los TTy tratados; A* es la absorbancia medida para los TTy del grupo control; λ_1 es la menor longitud de onda empleada (570 nm) y λ_2 es la mayor longitud de onda empleada (600 nm). El porcentaje de viabilidad se determinó para tres réplicas biológicas, cada una por triplicado.

En el caso de las mediciones de motilidad, la viabilidad parasitaria se determinó para los días 0, 3 y 6 postratamiento. Brevemente, las placas fueron medidas mediante el dispositivo wMicroTracker ONE (WMicrotracker Designplus SRL, Argentina) durante 2 h a temperatura controlada de 37°C. El índice de motilidad se determinó para cada día mediante el algoritmo “M3-Zebrafish”. La viabilidad parasitaria, expresada como índice de motilidad relativa, se calculó mediante la Ecuación 2.2, para tres réplicas biológicas, cada una por cuadruplicado.

2.3.4. Determinación del efecto del inhibidor de las HDACs "Tricostatina A" sobre la morfología parasitaria de *Mesocestoides corti*

Se realizaron inspecciones visuales de los cultivos parasitarios a fin de determinar el efecto de la TSA sobre la morfología general de TTy de *M. corti*. Las placas de cultivo fueron observadas mediante un microscopio invertido (Carl Zeiss, Alemania), acoplado a una cámara de video digital a fin de realizar los registros fotográficos.

2.3.5. Determinación del efecto del inhibidor de las HDACs "Tricostatina A" sobre los niveles de acetilación de proteínas de *Mesocestoides corti*

2.3.5.1. Muestras para Western blot

Se analizó el efecto de la TSA sobre los niveles de acetilación de proteínas de TTy de *M. corti*, mediante Western Blot semicuantitativo. Las muestras para los Western Blot se obtuvieron incubando 50 µL de pellet de TTy de *M. corti* (aproximadamente 100 TTy) en 1 mL de medio Mco-RPMI 1640 con TSA a concentraciones de 20 y 40 µM. Asimismo, se emplearon muestras incubadas con las drogas antihelmínticas PZQ y ABZ a 20 µM; como drogas controles. Todos los ensayos se realizaron con la misma cantidad del vehículo de las drogas (DMSO a la concentración final de 1%) y el correspondiente control negativo (DMSO 1%). Se obtuvieron extractos de proteínas totales (homogenatos) de TTy luego de 3 y 6 días postratamiento. Brevemente, los pellets previamente tratados se lavaron tres veces con PBS en hielo y se re-suspendieron en 500 µL se solución tampón RIPA fría (Anexo A1.2). Los homogenatos se obtuvieron lisando las muestras parasitarias por sonicación (6 repeticiones de 30 seg al 60% de intensidad, con intervalos de incubación en hielo de 60 seg) empleando un sonicador celular ultrasónico Torbéo. La lisis completa se verificó por inspección al microscopio invertido. Los homogenatos se purificaron por centrifugación a 15 000 g durante 60 min a 4°C; se recogieron los sobrenadantes y se determinó la concentración de proteínas totales mediante el ensayo de Bradford (Bradford, 1976), por triplicado para cada muestra. La concentración de proteínas se realizó empleando el kit colorimétrico para medición de concentración de proteínas totales Bio-Rad *Protein Assay* (Bio-Rad, U.S.A.), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Las muestras se conservaron -80 ° C hasta su utilización.

2.3.5.2. Ensayo de Western blot

Los homogenatos de proteínas totales se analizaron mediante SDS-PAGE (del inglés, *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) (He, 2011) y Western Blot (Burnette, 1981). Los homogenatos se disolvieron en la solución tampón de carga SDS-PAGE 5X (Anexo A.1.3.3) y se desnaturalizaron por calentamiento a 98°C durante 5 min. La separación de proteínas se realizó mediante SDS-PAGE en un mini-gel de SDS-PAGE al 15% (Anexo A1.3.7). Para ello se sembraron 25 µg de proteínas totales de cada muestra por calle y se corrió a 120 V por 2 h. Además, se sembró 3 µL del marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad, U.S.A.) por gel. Finalmente, las muestras se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa Amersham RPN203D (GE Healthcare, U.S.A.) por el método de transferencia semi-seco, usando el equipo SEMI-PHOR (Bio-Rad, U.S.A). La transferencia se comprobó por tinción con el colorante rojo Ponceau.

Para los Western Blot, las membranas se bloquearon con la solución tampón TBS-T (Anexo A1.4) con 5% p/v de leche descremada (Sttevy, Argentina) durante 2 h a temperatura ambiente con agitación. Las membranas se incubaron con los anticuerpos anti-Histona H4 tetra-acetilada (anticuerpo policlonal de conejo producido mediante el péptido [AGGAcKGGAcKGMGAc KVGAAcKRHS]; correspondiente a los aminoácidos 2-19 de la histona H4, acetilada en todos los residuos de lisina, de *Tetrahymena* conjugado a KLH) (06-866; EMD Millipore, U.S.A.) y el anticuerpo anti-pan lisina acetilada (anticuerpo policlonal de conejo producido mediante KLH acetilado conjugado) (ICP0380; Inmunechem, Canadá). Ambos anticuerpos se emplearon a la dilución de 1:2000. La incubación se realizó durante toda la noche a 4°C con agitación suave. Después de la incubación, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T durante 5 min y se incubaron con el anticuerpo secundario (anticuerpo anti conejo conjugado con HRP) (Sigma-Aldrich, U.S.A.) a una dilución de 1:3000 durante 2 h a temperatura ambiente con agitación suave. Después de la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas se lavaron dos veces en TBS-T durante 5 min y una vez en TBS durante otros 5 min en agitación suave. Los complejos Antígeno-Anticuerpo1°-Anticuerpo2°, en las membranas, se detectaron mediante el sistema de detección de ECL (del inglés, *Enhanced Chemiluminescence*) (Sigma-Aldrich, U.S.A.), como se describió previamente (Mruk y Cheng, 2011). Las bandas se visualizaron y documentaron mediante el equipo BioSpectrum 515 Imaging Systems (UVP, Alemania); de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

2.3.6. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos para los ensayos de viabilidad se analizaron mediante el software GhraphPad Prism 8. Para analizar los efectos de los compuestos sobre la viabilidad parasitaria, para ambos ensayos, se realizó una prueba de ANOVA de dos colas. Las diferencias significativas ($P \leq 0,05$) se determinaron mediante el post-test de Dunnett. Los análisis se realizaron para tres réplicas biológicas independientes (correspondientes a muestras de ratones diferentes), cada una por triplicado para el ensayo de AlamarBlue® y por cuadruplicado para el ensayo de motilidad, comparando cada compuesto y concentración con los parásitos del grupo control.

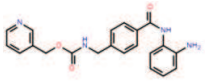
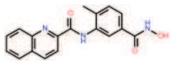
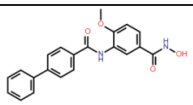
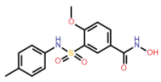
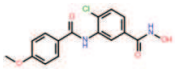
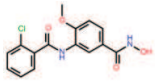
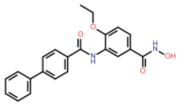
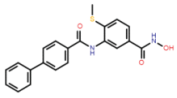
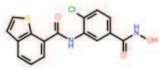
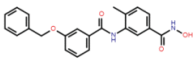
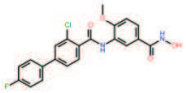
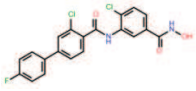
Los análisis de densitometría de los Western Blot se llevaron a cabo utilizando el software ImageJ versión 1.49; para dos réplicas biológicas independientes, por duplicado. La normalizaron se realizó en base a la cantidad total de proteínas de la misma muestra, determinada por tinción con azul de Coomassie en un mini-gel SDS-PAGE al 15% cargado con las mismas muestras y corrido en paralelo. Los resultados se expresaron como el cambio en la densidad relativa en comparación con el grupo control de homogenatos de TTy incubados con el vehículo de la droga (DMSO al 1%).

2.4. Evaluación del efecto antihelmíntico de un alto número de inhibidores de HDACs

2.4.1. Soluciones Stock

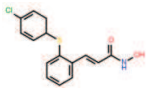
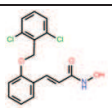
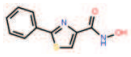
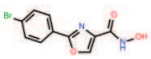
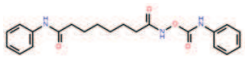
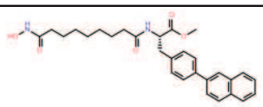
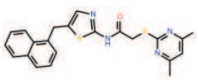
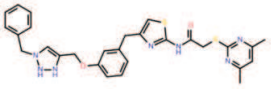
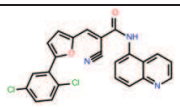
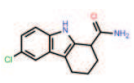
Los inhibidores de las HDACs y Sirtuinas evaluados en este trabajo se muestran en la Tabla 2.3, junto con su estructura química y la referencia bibliográfica. Las soluciones stock se prepararon disolviendo los compuestos en dimetilsulfóxido (DMSO) al 100%. La concentración de stock para todos los compuestos fue de 10 mM. Las mismas se almacenaron a -20°C hasta su utilización. Todos los compuestos de la Tabla 2.3 fueron gentilmente cedidos por el Dr. Mandred Jung (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Alemania) y el Dr. Wolfgang Sippl (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Alemania).

Tabla 2.3. Lista de inhibidores de la enzimas Histonas deacetilasas y Sirtuinas ensayados

Nombre	Estructura quimica	Blanco farmacológico	Referencias*
Entinostat		HDACs de Clase I (HDAC1 y HDAC3 principalmente)	(Hu y col., 2003)
TH60		SmpHDAC8	(Heimburg y col., 2016 y 2017) 13k y 3 respectivamente
TH65		SmpHDAC8	(Heimburg y col., 2016) (Marek y col., 2018) 13l y 5 respectivamente
TH71		SmpHDAC8	(Heimburg y col., 2016) 16a
TH74		SmpHDAC8	(Heimburg y col., 2016) 13t
TH85		SmpHDAC8	(Heimburg y col., 2016) 13o
TH92		SmpHDAC8	(Heimburg y col., 2016) 13za
TH119		SmpHDAC8	no publicado
TH120		SmpHDAC8	(Marek y col., 2018) 6
TH128		SmpHDAC8	no publicado
TH137	n. d.	SmpHDAC8	no publicado
TH138		SmpHDAC8	no publicado
TH139		SmpHDAC8	no publicado
TH143	n. d.	SmpHDAC8	no publicado
EG13	n. d.	SmpHDAC8	no publicado
EG18	n. d.	SmpHDAC8	no publicado

Continua en la página siguiente

Continua de la página anterior

EG20	n. d.	SmpHDAC8	no publicado
EG32	n. d.	SmpHDAC8	no publicado
TB56	n. d.	SmpHDAC8	no publicado
TB87		SmpHDAC8	no publicado
TB98		SmpHDAC8	no publicado
PZ5	n. d.	SmpHDAC8	no publicado
PZ28	n. d.	SmpHDAC8	no publicado
PZ31	n. d.	SmpHDAC8	no publicado
SD14	n. d.	SmpHDAC8	no publicado
JS16		HsaHDAC6	(Senger y col., 2016) 4e
JS28		HsaHDAC6	(Senger y col., 2016) 4g
KK16		HsaHDAC6	(King y col., 2018) 2d
ST36		HsaHDAC6	(Schäfer y col., 2008) 4l
Mz25		SIRT2	(Rumpf y col., 2015) (Schiedel y col., 2016) SirtReal2
Mz236		SIRT2	(Schiedel y col., 2016) 9
AGK2		SIRT2	(Outeiro y col., 2007)
Ex-527		SIRT1	(Napper y col., 2005)

* Debajo de la referencia bibliográfica se indica la denominación del compuesto en la publicación citada.

2.4.2. Determinación del efecto antihelmíntico de los inhibidores de las HDACs y las Sirtuinas sobre la viabilidad parasitaria de *Mesocestoides corti*

Se evaluó el efecto de los inhibidores de las enzimas HDACs y las Sirtuinas sobre la viabilidad parasitaria de TTy de *M. corti*. La viabilidad parasitaria se determinó mediante el ensayo de viabilidad por mediciones de motilidad. Brevemente, se incubaron 5 TTy por pocillo en 200 µL de medio Mco-RMPI 1640 por pocillo en microplacas de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Alemania), en una atmósfera controlada de 5% de CO_2 a 37°C durante 9 días; sin cambio del medio de cultivo. Los inhibidores de HDACs y las Sirtuinas (Tabla 2.3) se evaluaron a diferentes concentraciones (2, 20 y 50 µM). Asimismo, se utilizaron TTy pretratados con etanol al 70% durante 30 minutos como control positivo de los ensayos y TTy incubados con las drogas antihelmínticas PZQ y ABZ y el inhibidor de HDACs TSA a la concentración de 20 µM, como drogas controles. Todos los ensayos se realizaron con la misma cantidad del vehículo de las drogas (DMSO a la concentración final de 1%) y el correspondiente control negativo (DMSO 1%). La viabilidad parasitaria se determinó diariamente mediante el dispositivo wMicroTracker ONE (WMicrotracker Designplus SRL, Argentina) durante 2 h a temperatura controlada de 37°C. El índice de motilidad se determinó para cada día mediante el algoritmo “M3-Zebrafish”. La viabilidad parasitaria, expresada como índice de motilidad relativa, se calculó mediante la Ecuación 2.2, para tres réplicas biológicas, cada una por cuadruplicado.

2.4.3. Determinación del efecto de los inhibidores de HDACs y Sirtuinas sobre la morfología de *Mesocestoides corti*

Se realizaron inspecciones visuales de los cultivos parasitarios a fin de determinar el efecto de los inhibidores de las enzimas HDACs y las Sirtuinas sobre la morfología general de TTy de *M. corti*. Las placas de cultivo fueron observadas mediante un microscopio invertido (Carl Zeiss, Alemania), acoplado a una cámara de video digital a fin de realizar los registros fotográficos.

2.4.4. Análisis estadístico

Los datos obtenidos para la determinación del efecto antihelmíntico de los inhibidores de las enzimas HDACs y las Sirtuinas se analizaron mediante el software GhraphPad Prism 8. Para analizar los efectos de los compuestos sobre la viabilidad parasitaria se realizó una prueba de

ANOVA de dos colas. Las diferencias significativas (P ≤ 0,05) se determinaron mediante el post-test de Dunnett. Los análisis se realizaron para tres réplicas biológicas independientes (correspondientes a muestras de ratones diferentes), cada una por cuadruplicado, comparando cada compuesto y concentración con los parásitos del grupo control.

2.5. Caracterización del efecto farmacológico de los inhibidores seleccionados de las enzimas HDACs y Sirtuinas

Se caracterizaron los mejores inhibidores de las enzimas HDACs y Sirtuinas seleccionados en base a su efecto antihelmíntico determinado en la Sección 2.4. Se tomó como criterio para la selección que los compuestos produzcan la muerte de los TTy de *M. corti* (IMR por debajo de 0,05) antes de los 9 días de incubación a la concentración de 20 μM.

2.5.1. Determinación del efecto dosis-respuesta de los inhibidores seleccionados de las enzimas HDACs y Sirtuinas

Se evaluó el efecto dosis-respuesta de los inhibidores de las enzimas HDACs y las Sirtuinas seleccionados sobre la viabilidad parasitaria de TTy de *M. corti*. La viabilidad parasitaria se determinó mediante el ensayo de viabilidad por mediciones de motilidad. Brevemente, se incubaron 5 TTy por pocillo en 200 μL de medio Mco-RMPI 1640 por pocillo en microplacas de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Alemania), en una atmósfera controlada de 5% de CO_2 a 37°C durante 6 días, sin cambio del medio de cultivo. Los inhibidores de HDACs y Sirtuinas seleccionados se evaluaron a diferentes concentraciones: Entinostat (0,05; 0,1; 0,5; 1; 2; 20 y 50 μM), TH65 (2, 5, 10, 15, 20 y 50 μM), TH92 (2, 5, 10, 15, 20 y 50 μM) y Mz25 (2, 10, 20, 30, 40 y 50 μM). Asimismo, se utilizaron TTy pretratados con etanol al 70% durante 30 minutos como control positivo de los ensayos. Por otra parte, también se evaluó el efecto dosis-respuesta de la droga antihelmíntica ABZ (2, 10, 20, 30, 40 y 50 μM), como droga control. Todos los ensayos se realizaron con la misma cantidad del vehículo de las drogas (DMSO a la concentración final de 1%) y el correspondiente control negativo (DMSO 1%). La viabilidad parasitaria se determinó a los días 0 y 6 postratamiento mediante el dispositivo wMicroTracker ONE (WMicrotracker Designplus SRL, Argentina) durante 2 h a temperatura controlada de 37°C. El índice de motilidad se determinó para cada día mediante el algoritmo “M3-Zebrafish”. La viabilidad parasitaria, expresada como índice de motilidad relativa, se calculó mediante la Ecuación 2.2. Los datos obtenidos se analizaron mediante el

software GhraphPad Prism 8. Para analizar el efecto dosis-respuesta de los compuestos seleccionados y el ABZ sobre la viabilidad parasitaria, se realizaron regresiones no lineales a fin de obtener curvas respuesta vs [inhibidor]. Asimismo, se calcularon los parámetros: concentración inhibitoria media (IC_{50}), concentración inhibitoria 25% (IC_{25}) y 90% (IC_{90}), mediante interpolaciones en de las curvas con un intervalo de confianza de 95% (IC95%). Los análisis se realizaron para tres réplicas biológicas independientes (correspondientes a muestras de ratones diferentes), cada una por cuadruplicado.

2.5.2. Determinación de la reversibilidad del efecto antihelmíntico de los inhibidores seleccionados de las enzimas HDACs y Sirtuinas

Se evaluó la reversibilidad del efecto antihelmíntico de los inhibidores de las enzimas HDACs y las Sirtuinas seleccionados sobre la viabilidad parasitaria de TTy de *M. corti*. La viabilidad parasitaria se determinó mediante el ensayo de viabilidad por mediciones de motilidad. Brevemente, se incubaron 5 TTy por pocillo en 200 µL de medio Mco-RMPI 1640 por pocillo en microplacas de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Alemania), en una atmósfera controlada de 5% de CO_2 a 37°C durante 6 días, sin cambio del medio de cultivo. Los inhibidores de HDACs y Sirtuinas seleccionados se evaluaron a concentraciones cercanas a los IC_{90} determinados en la Sección 2.5.1. Asimismo, se utilizaron TTy pretratados con etanol al 70% durante 30 minutos como control positivo de los ensayos. Por otra parte, también se evaluó la reversibilidad del efecto de la droga antihelmíntica ABZ, utilizada como droga control, a concentración cercana al IC_{90} determinado. Todos los ensayos se realizaron con la misma cantidad del vehículo de las drogas (DMSO a la concentración final de 1%) y el correspondiente control negativo (DMSO 1%). Después de los 6 días postratamientos, lo TTy de *M. corti* se lavaron tres veces con PBS (a fin de eliminar los compuestos) y se incubaron en 200 µL de medio Mco-RMPI 1640 (sin los compuestos) por pocillo en una atmósfera controlada de 5% de CO_2 a 37°C durante 8 días adicionales, sin cambio del medio de cultivo. La viabilidad parasitaria se determinó diariamente hasta los 14 días postratamiento mediante el dispositivo wMicroTracker ONE (WMicrotracker Designplus SRL, Argentina) durante 2 h a temperatura controlada de 37°C. El índice de motilidad se determinó para cada día mediante el algoritmo “M3-Zebrafish”. La viabilidad parasitaria, expresada como índice de motilidad relativa, se calculó mediante la Ecuación 2.2. Por último, los datos obtenidos se analizaron mediante el software GhraphPad Prism 8, para tres réplicas biológicas independientes (correspondientes a muestras de ratones diferentes), cada una por cuadruplicado.

2.5.3. Determinación del efecto de los inhibidores seleccionados de las enzimas HDACs y Sirtuinas sobre la ultraestructura de *Mesocestoides corti*

Se evaluó el efecto de los inhibidores de las enzimas HDACs y Sirtuinas seleccionados sobre la morfología ultraestructural de TTy de *M. corti*, mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Para ello, se incubaron 20 µL de pellet de TTy de *M. corti* (aproximadamente 40 TTy) por pocillo en 500 µL de medio Mco-RMPI 1640 por pocillo en microplacas de 24 pocillos (Greiner Bio-One, Alemania), en una atmósfera controlada de 5% de CO_2 a 37°C durante 6 días, sin cambio del medio de cultivo. Los inhibidores de HDACs y Sirtuinas seleccionados se evaluaron a concentraciones de 20 µM. Asimismo, también se evaluó el efecto el inhibidor de las HDACs TSA a 20 µM. Todos los ensayos se realizaron con la misma cantidad del vehículo de las drogas (DMSO a la concentración final de 1%) y el correspondiente control negativo (DMSO 1%). Después de los 6 días postratamientos, los TTy de *M. corti* se lavaron tres veces con PBS y se fijaron en 1 mL de Solución de Fijación fría (glutaraldehído al 3% en Solución tampón fosfato 0,1%) durante 72 h a 4°C. Después de la fijación, se realizaron 3 lavados de 15 min cada uno con Solución tampón fosfato 0,1 % (Anexo A1.6). Finalmente, las muestras se deshidrataron por incubaciones secuenciales en concentraciones ascendentes de etanol: 50% (10 min), 70% (10 min), 80% (10 min), 90% (10 min), 95% (10 min), 100% (10 min, 2 veces) y luego se incubaron en Hexametildisilazano (HMDS; 5 min, 1 h y toda la noche) bajo campana. Antes de su observación, todos los especímenes se cubrieron con partículas de oro (100 Å de espesor) y se tomaron microfotografías a 15 KV en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6460 LV. Este objetivo fue llevado a cabo por medio de una pasantía en el laboratorio de la Dra. Celina Elissondo del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP), Argentina.

2.5.4. Determinación del efecto antihelmíntico de combinaciones de a pares de los compuestos seleccionados y el ABZ

Se evaluó el efecto antihelmíntico de combinaciones de a pares de los inhibidores de las enzimas HDACs y Sirtuinas seleccionados, y el ABZ, sobre la viabilidad parasitaria de TTy de *M. corti*. La viabilidad parasitaria se determinó mediante el ensayo de viabilidad por mediciones de motilidad. Brevemente, se incubaron 5 TTy por pocillo en 200 µL de medio Mco-RMPI 1640 por pocillo en microplacas de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Alemania), en una atmósfera controlada de 5% de CO_2 a 37°C durante 9 días, sin cambio del medio de cultivo. Los inhibidores de HDACs y

Sirtuinas seleccionados y el ABZ se evaluaron, individualmente o en combinaciones, a concentraciones cercanas a los IC_{25} determinados en la Sección 2.5.1. Asimismo, se utilizaron TTy pretratados con etanol al 70% durante 30 minutos como control positivo de los ensayos. Todos los ensayos se realizaron con la misma cantidad del vehículo de las drogas (DMSO a la concentración final de 1%) y el correspondiente control negativo (DMSO 1%). La viabilidad parasitaria se determinó diariamente hasta los 9 días postratamiento mediante el dispositivo wMicroTracker ONE (WMicrotracker Designplus SRL, Argentina) durante 2 h a temperatura controlada de 37°C. El índice de motilidad se determinó para cada día mediante el algoritmo "M3-Zebrafish". La viabilidad parasitaria, expresada como índice de motilidad relativa, se calculó mediante la Ecuación 2.2. Por último, los datos obtenidos se analizaron mediante el software GhraphPad Prism 8, para tres réplicas biológicas independientes (correspondientes a muestras de ratones diferentes), cada una por cuadruplicado.

Para los 6 días de incubación se calculó el Índice de efecto proporcional (IEP) de los pares de compuestos, mediante la siguiente ecuación:

[Ecuación 2.4] $$IEP = \frac{Efecto\ proporcional\ teórico - Efecto\ proporcional\ medido}{Efecto\ proporcional\ teórico}$$

En donde, el "efecto proporcional medido" corresponde al efecto determinado (en este caso, corresponde a los índice de motilidad relativa determinados a los 6 días de incubación) para la combinación de un par de compuesto y el "efecto proporcional teórico" corresponde a la multiplicación de los efectos individuales, determinados para cada compuesto a los 6 días de incubación.

2.6. Caracterización estructural de las HDACs como potenciales blancos farmacológicos

2.6.1. Clonado y secuenciación de la HDAC8 de *Echinococcus canadensis* G7 y *Mesocestoides corti*

Se determinaron las secuencias completas correspondientes a los CDS (del inglés, *Coding Sequence*) de la HDAC8 de *M. corti* (McoHDAC8) y *E. canadensis* G7 (EcaHDAC8), mediante RT-PCR, clonado y secuenciación. Para ello, se extrajo ARN total a partir de 50 μL de pellet de TTy de

M. corti y PSC de *E. canadensis* G7, utilizando el reactivo Trizol (Life Technologies, U.S.A.); de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la obtención de los ADNc (ADN complementarios), un total de 2 µg del ARN obtenido se trató con ADNasa I libre de ARNasa (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.); de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La transcripción reversa se realizó mediante la Transcriptasa reversa SuperScript III (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) y el cebador oligo$_{(dT)}$18 (Integrated DNA Technologies, U.S.A.) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Los ADNc correspondientes a cada HDAC8 se amplificaron por PCR (del inglés, *Polymerase Chain Reaction*), utilizando la ADN polimerasa de alta fidelidad KAPA HiFi (Biosystems, U.S.A.) y cebadores específicos para cada gen: HDAC8 de *M. corti* (HDAC8-F: 5'-ATGCCTTCGCGAGTTGGCATTG-3' y HDAC8-R: 5´- CTATGGACCCAGGCGATTGAACGA-3´) y para HDAC8 de *E. canadensis* G7 (HDAC8-F: 5´-ATGCCCTCTCCCGTTGGTATTG-3´ y HDAC8-R: 5´-TTAAACGCGTTAAAGGCACAA-3´) (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) de acuerdo a las especificaciones del fabricante (más especificaciones y los ciclos de PCR se pueden ver en el Anexo A6.1). Los cebadores fueron diseñados manualmente para obtener los CDS completos, basados en secuencias nucleotídicas de los genes de HDAC8. Los productos se clonaron en el vector pCR2.1-TOPO utilizando el kit de clonación TOPO® TA (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Los genes EcaHDAC8 y McoHDAC8 se secuenciaron en ambas direcciones utilizando un secuenciador automático de ADN ABI 377 en Macrogen (Macrogen, Corea del Sur) y cebadores específicos para cada gen de HDAC8 y para las secuencias del Fago M13 integradas en el vector pCR2.1-TOPO. Las secuencias consenso para las lecturas de los genes EcaHDAC8 y McoHDAC8 se construyeron mediante el programa PhredPhrap (Gordon y col., 1998, 2001). Las secuencias aminoacídicas fueron obtenidas a partir de las secuencias nucleotídicas utilizando la herramienta Translate del portal de recursos de Bioinformática ExPASy (https://web.expasy.org/translate/).

2.6.2 Modelado por homología de las HDAC8 de *Echinococcus canadensis* G7 y *Mesocestoides corti*

Las estructuras tridimensionales para las proteínas EcaHDAC8 y McoHDAC8 se obtuvieron mediante modelado de homología, empleando los programas: PHYRE2 (Kelley y col., 2015), SWISS-MODEL (Arnold y col., 2006; Benkert y col., 2008; Biasini y col., 2014; Schwede y col., 2003), PsiPred (McGuffin y col., 2000) y Geno3D (Combet y col., 2002) y como plantillas las estructuras tridimensionales de las proteínas HDAC8 de *H. sapiens* (HsaHDAC8, PDB:

1t64)(Somoza y col., 2004) y *S. mansoni* (SmpHDAC8, PDB: 4bz5)(Marek y col., 2013). Todos los modelos obtenidos se validaron calculando parámetros como: TMscore (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/TM-score/), RMSD (integrado en PyMol), ERRAT y Verify-3D (http://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES/). Asimismo, se obtuvieron gráficos de Ramachandran para los modelos obtenidos, mediante la página Rampage (http://mordred.bioc.cam.ac.uk/rapper/rampage.php).

La visualización de los modelos estructurales y las imágenes generadas en este trabajo se realizaron utilizando el software PyMol versión 2.0.4 (https://pymol.org). Finalmente, se realizaron comparaciones estructurales entre los modelos de EcaHDAC8 y McoHDAC8 y las estructuras de HsaHDAC8 y SmpHDAC8, a fin identificar residuos conservados en bolsillo catalítico, en el mecanismo catalítico y la unión al cofactor Zn^{2+} y el inhibidor TSA.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

En esta sección se muestran los resultados obtenidos en el estudio de las enzimas Histonas deacetilasas (HDACs) de cestodos como potenciales blancos farmacológicos para el tratamiento de enfermedades parasitarias desatendidas. Esta sección se dividió en cinco partes principales correspondientes a cada uno de los objetivos específicos propuestos en este trabajo de tesis doctoral.

3.1. Identificación y análisis de genes codificantes de enzimas HDACs en cestodos

3.1.1. Se identificaron varios genes codificantes de enzimas HDACs en los genomas de cestodos

A fin de identificar los genes codificantes de HDACs presentes en los genomas de parásitos cestodos, disponibles en la base de datos WormBase ParaSite, se realizaron búsquedas por homología empleando las HDACs de *H. sapiens* como secuencias carnadas. En la Tabla 3.1 se muestran todos los genes codificantes de HDACs identificados en cestodos. En las filas principales de la Tabla 3.1 se muestran cada una de las especies de cestodos analizadas. Estas especies parasitarias fueron seleccionadas de acuerdo a la calidad del genoma, empleando los criterios previamente reportados para la selección de genomas de nematodos y platelmintos de mayor calidad de ensamblado (International Helminth Genomes Consortium, 2017). Estos criterios definen valores mínimos para los parámetros de N_{50} (≥ 5 Kb) y CEGMA (≥ 85 %). El parámetro N_{50} es una mediana ponderada de la longitud de los *contigs*, que se utiliza para describir la "integridad" del genoma ensamblado que está fragmentado en *contigs* de diferentes longitudes. El N50 es mayor para un genoma con mejor calidad de ensamblado. El parámetro CEGMA, por su parte, busca un conjunto de genes altamente conservados en la mayoría de los organismos eucariotas en el genoma ensamblado. La cantidad de estos genes encontrados se expresa como un porcentaje. Cuantas más proteínas completas se identifiquen (o al menos secuencias parciales) en el genoma ensamblado, mayor será su calidad. Por otra parte, en las columnas de la Tabla 3.1 se muestran los códigos de identificación (Gen ID) para cada gen codificante de HDACs identificado, de acuerdo a la WormBase ParaSite. También se muestran, para cada gen de HDAC, el tamaño en aminoácidos (aa) y su ortólogo más cercano en *H. sapiens* y *S. mansoni* con sus correspondientes valores de E y porcentajes de identidad global. En las búsquedas por homología, se realizan alineamientos de las secuencias carnadas con las secuencias de la base de datos a

analizar. Una vez finalizada la búsqueda, se calcula la puntuación final de los alineamientos resultantes y se determina su significación tomando en cuenta la probabilidad que tiene dicho alineamiento de haber sido obtenido por azar de acuerdo al tamaño de la base de datos. Al final se reportan solo los alineamientos que hayan obtenido una probabilidad menor al valor de E (valor de corte). Esto permite definir qué alineamientos queremos obtener de acuerdo a su significación estadística. Cuanto menor sea el valor de E, más significativo es un alineamiento.

Como se observa en la Tabla 3.1, se identificaron siete genes codificantes de HDACs en los genomas de los parásitos *E. granulosus s.s.* G1, *E. multilocularis*, *H. microstoma* y *T. solium*; y seis genes codificantes de las HDACs en los genomas borradores de *E. canadensis* G7, *H. diminuta*, *M. corti*, *T. asiatica* y *T. saginata*. Se puede observar que algunos genes codificantes de HDACs no poseen un Gen ID asociado (estos genes se encuentran marcados con el superíndice "b" en la Tabla 3.1). Esto se debe a que estos genes no fueron identificados en los genomas parasitarios, o sus secuencias se encontraban truncadas, cuando se realizaron las búsquedas por homología. En estos casos los genes fueron predichos usando el predictor de genes Augustus, previamente entrenado para la identificación de genes de parásitos del género *Echinococcus* (Maldonado y col., 2017). Los parámetros reportados en la Tabla 3.1 y en los posteriores análisis corresponden a los genes predichos por el predictor de genes Augustus.

Tabla 3.1. Genes codificantes de enzimas Histonas desacetilasas (HDACs) identificados en los genomas de parásitos cestodos

Especies	Gen ID[a]	Tamaño (aa)	Ortólogo más cercano en:				
			Homo sapiens				*Schistosoma mansoni*
			HDAC	Clase	Valor de E	% de Identidad	HDAC (Gen ID[a]; valor de E y % de Identidad)
Echinococcus canadensis G7	EcaHDAC1[b]	491	HDAC 2	I	0,0	69	HDAC 1 (Smp_005210; 0,0; 76)
	ECANG7_06509	424	HDAC 3	I	0,0	69	HDAC 3 (Smp_093280; 0,0; 76)
	ECANG7_02279[c]	406	HDAC 8	I	$4,0e^{-86}$	39	HDAC 8 (Smp_0911990; $1,0e^{-126}$; 46)
	ECANG7_04174	1182	HDAC 5	II	$2,0e^{-53}$	39	HDAC 5 (Smp_069380; $2,0e^{-77}$; 47)
	ECANG7_01724	2066	HDAC 6	II	$1,0e^{-146}$	36	HDAC 6 (Smp_138770; 0,0; 43)
	ECANG7_00442	1293	HDAC 7	II	$1,0e^{-112}$	40	HDAC 4 (Smp_191310; 0,0; 45)
Echinococcus granulosus sensu stricto G1	EgrG_001102300	516	HDAC 2	I	0,0	69	HDAC 1 (Smp_005210; 0,0; 76)
	EgrG_001114800	418	HDAC 3	I	0,0	69	HDAC 3 (Smp_093280; 0,0; 78)
	EgrG_000103800	406	HDAC 8	I	$4,0e^{-86}$	39	HDAC 8 (Smp_0911990; $1,0e^{-126}$; 46)
	EgrG_000527350	1116	HDAC 5	II	$2,0e^{-53}$	39	HDAC 5 (Smp_069380; $2,0e^{-77}$; 48)
	EgrHDAC6[b]	1128	HDAC 6	II	$1,0e^{-105}$	37	HDAC 6 (Smp_138770; $1,0e^{-178}$; 44)
	EGR_01373	1282	HDAC 7	II	$1,0e^{-115}$	41	HDAC 4 (Smp_191310; 0,0; 50)
	EgrG_000970800	827	HDAC 10	II	$5,0e^{-99}$	43	HDAC 6 (Smp_138770; $1,0e^{-106}$; 41)
Echinococcus multilocularis	EmuJ_001102300	555	HDAC 2	I	0,0	69	HDAC 1 (Smp_005210; 0,0; 76)
	EmuJ_001114800	412	HDAC 3	I	0,0	69	HDAC 3 (Smp_093280; 0,0; 78)
	EmuJ_000103800	406	HDAC 8	I	$4,0e^{-87}$	39	HDAC 8 (Smp_0911990; $1,0e^{-128}$; 46)
	EmuJ_000527350	1116	HDAC 5	II	$1,0e^{-53}$	39	HDAC 5 (Smp_069380; $1,0e^{-77}$; 48)
	EmuHDAC6[b]	1128	HDAC 6	II	$1,0e^{-139}$	34	HDAC 6 (Smp_138770; $1,0e^{-178}$; 44)
	EmuJ_000831600	650	HDAC 7	II	$1,0e^{-115}$	41	HDAC 4 (Smp_191310; 0,0; 51)
	EmuJ_000970800	820	HDAC 10	II	$1,0e^{-18}$	42	HDAC 6 (Smp_138770; $1,0e^{-105}$; 42)

Continua en la página siguiente

Continua de la página anterior

Hymenolepis diminuta	HDID_0000695401	497	HDAC 1	I	0,0	76	HDAC 1 (Smp_005210; 0,0; 78)
	HdiHDAC3[b]	357	HDAC 3	I	0,0	70	HDAC 3 (Smp_093280; 0,0; 76)
	HDID_0000705201	415	HDAC 8	I	$4,0e^{-76}$	36	HDAC 8 (Smp_0911990; $1,0e^{-113}$; 42)
	HDID_0000742001	1832	HDAC 6	II	$1,0e^{-153}$	41	HDAC 6 (Smp_138770; 0,0; 47)
	HDID_0000456601	1292	HDAC 7	II	$1,0e^{-115}$	43	HDAC 4 (Smp_191310; 0,0; 49)
	HDID_0000011501	1153	HDAC 9	II	$2,0e^{-50}$	38	HDAC 5 (Smp_069380; $4,0e^{-70}$; 46)
Hymenolepis microstoma	HmN_000018400	496	HDAC 1	I	0,0	75	HDAC 1 (Smp_005210; 0,0; 73)
	HmN_000625300	415	HDAC 3	I	0,0	68	HDAC 3 (Smp_093280; 0,0; 78)
	HmN_000022600	408	HDAC 8	I	$1,0e^{-89}$	40	HDAC 8 (Smp_0911990; $1,0e^{-121}$; 45)
	HmN_000847300	1286	HDAC 4	II	$1,0e^{-114}$	42	HDAC 4 (Smp_191310; 0,0; 52)
	HmN_000118500	884	HDAC 6	II	$3,0e^{-68}$	38	HDAC 6 (Smp_138770; $4,0e^{-89}$; 37)
	HmN_000055900	522	HDAC 7	II	$1,0e^{-46}$	53	HDAC 5 (Smp_069380; $3,0e^{-62}$; 75)
	HmN_000118400	798	HDAC 10	II	$1,0e^{-95}$	41	HDAC 6 (Smp_138770; $4,0e^{-96}$; 42)
Mesocestoides corti	MCOS_0000151801	522	HDAC 2	I	0,0	72	HDAC 1 (Smp_005210; 0,0; 77)
	MCOS_0000264901	423	HDAC 3	I	0,0	65	HDAC 3 (Smp_093280; 0,0; 79)
	McoHDAC8[c]	408	HDAC 8	I	$6,0e^{-82}$	40	HDAC 8 (Smp_0911990; $1,0e^{-114}$; 46)
	MCOS_0000628401	1310	HDAC 4	II	$1,0e^{-120}$	44	HDAC 4 (Smp_191310; 0,0; 52)
	MCOS_0000067101	1225	HDAC 9	II	$1,0e^{-52}$	40	HDAC 5 (Smp_069380; $8,0e^{-76}$; 39)
	MCOS_0000847101	523	HDAC 10	II	$7,0e^{-76}$	41	HDAC 6 (Smp_138770; $4,0e^{-77}$; 40)
Taenia asiatica	TASK_0000062801	502	HDAC 2	I	0,0	72	HDAC 1 (Smp_005210; 0,0; 75)
	TASK_0000683201	445	HDAC 3	I	$1,0e^{-175}$	59	HDAC 3 (Smp_093280; 0,0; 68)
	TASs00042g05048m00001	732	HDAC 8	I	$2,0e^{-74}$	40	HDAC 8 (Smp_0911990; $1,0e^{-103}$; 47)
	TASK_0000507001	1323	HDAC 4	II	$1,0e^{-109}$	40	HDAC 4 (Smp_191310; 0,0; 46)
	TASK_0000489301	1141	HDAC 5	II	$2,.0e^{-54}$	38	HDAC 5 (Smp_069380; $6,0e^{-74}$; 48)
	TASs00024g03791m00001	2126	HDAC 10	II	$7,0e^{-75}$	38	HDAC 6 (Smp_138770; $5,0e^{-96}$; 37)
Taenia saginata	TSAs00040g05661m00001	502	HDAC 2	I	0,0	72	HDAC 1 (Smp_005210, 0.0, 75)
	TSAs00037g05353m00001	377	HDAC 3	I	$1,0e^{-95}$	62	HDAC 3 (Smp_093280; $1,0e^{-106}$; 71)
	TSAs00052g06532m00001	732	HDAC 8	I	$2,0e^{-74}$	40	HDAC 8 (Smp_0911990; $1,0e^{-104}$; 47)
	TSAs00025g04272m00001	1302	HDAC 4	II	$1,0e^{-115}$	41	HDAC 4 (Smp_191310; 0,0; 48)
	TSAs00074g07737m00001	1141	HDAC 5	II	$5,0e^{-55}$	38	HDAC 5 (Smp_069380; $4,0e^{-74}$; 48)
	TSAs00013g02847m00001	2163	HDAC 6	II	$1,0e^{-136}$	37	HDAC 6 (Smp_138770; 0,0; 41)
Taenia solium	TsM_000660000	502	HDAC 2	I	0,0	69	HDAC 1 (Smp_005210; 0,0; 75)
	TsM_000728400	405	HDAC 3	I	$1,0e^{-129}$	58	HDAC 3 (Smp_093280; $1,0e^{-159}$; 67)
	TsM_000312400	447	HDAC 8	I	$6,0e^{-73}$	40	HDAC 8 (Smp_0911990; $1,0e^{-106}$; 47)
	TsM_000840000	556	HDAC 4	II	$4,0e^{-88}$	42	HDAC 4 (Smp_191310; $1,0e^{-139}$; 49)
	TsM_000886700	951	HDAC 6	II	$1,0e^{-120}$	36	HDAC 6 (Smp_138770; $1,0e^{-174}$; 40)
	TsM_000033200	1144	HDAC 7	II	$2,0e^{-50}$	37	HDAC 5 (Smp_069380; $7,0e^{-72}$; 48)
	TsM_000886600	816	HDAC 10	II	$3,0e^{-78}$	41	HDAC 6 (Smp_138770; $9,0e^{-89}$; 44)

[a] Gen ID de acuerdo a la anotación genómica en la base de datos WormBase ParaSite
[b] Genes predichos mediante el predictor de genes Agustus
[c] Genes validados mediante clonado y secuenciación del ADNc

En el caso de los parásitos *E. granulosus* s. s. G1 y *T. asiatica* se encuentran disponibles dos genomas ensamblados para cada organismo en la WormBase ParaSite. En la Tabla 3.2 y Tabla 3.3 se muestran las comparaciones entre los genes codificantes de HDACs identificados en cada uno de los genomas ensamblados para *E. granulosus s.s.* G1 y *T. asiatica*, respectivamente. Asimismo, se muestran los respectivos códigos de identificación, Gen ID para los genes y BioProyect ID para los genomas de acuerdo a la WormBase ParaSite, el tamaño de los genes codificantes de HDACs

en aminoácidos (aa) y el porcentaje de identidad global entre los genes identificados en cada genoma parasitario. Por último, también se indica el ortólogo más cercano en *H. sapiens*.

En el caso del parásito *E. granulosus s.s.* G1 los dos genomas disponibles son PRJEB121 y PRJNA182977. El genoma PRJEB121 corresponde al ensamblado por The Parasite Genomic Group de The Wellcome Trust Sanger Institute, desde ahora (y solo a fines prácticos) se hará referencia a este genoma como *E. granulosus s.s.* G1 Sanger (Tsai y col., 2013). Por otro lado, el genoma PRJNA182977 corresponde al ensamblado por The Key Laboratory of Health and Disease Genomics de The Chinese National Human Genome Center, desde ahora se hará referencia a este genoma como *E. granulosus s.s.* G1 ChGC (Zheng y col., 2013). Como se observa en la Tabla 3.2, en el genoma *E. granulosus s.s.* G1 Sanger se identificaron 8 genes codificantes de HDACs, mientras que en el genoma *E. granulosus s.s.* G1 ChGC se identificaron 7 genes. En ambos genomas se identificaron genes codificantes de HDACs ortólogos a HDAC2, HDAC3, HDAC5, HDAC7 y HDAC8 de *H. sapiens,* uno por cada gen de HDACs de *H. sapiens* (Tabla 3.2). Analizando las secuencias de estos genes, y comparando las mismas entre ambos genomas de *E. granulosus s.s.* G1, se puede observar que estos genes son similares entre sí en tamaño (excepto para los genes ortólogos a HDAC7 de *H. sapiens*) y poseen identidades globales entre ellos de entre el 83% y 100 % (Tabla 3.2). En el caso de los genes con ortología con HDAC7 de *H. sapiens*, el gen identificado en el genoma *E. granulosus s.s.* G1 ChGC tiene 1282 aa (EGR_01373.1) mientras que el gen identificado en el otro genoma es de solo 650 aa (EgrG_000831600). El gen EGR_01373.1 de 1282 aa se seleccionó para los análisis posteriores, debido a que presenta el dominio catalítico de las HDACs completo (identificado por medio de la página Pfam; Familia HDACs: PF00850).

Tabla 3.2. Comparación de los genes codificantes de HDACs identificados en los dos genomas disponibles para *Echinococccus granulosus sensu stricto* G1

BioProyect ID[a]				% de Identidad	Ortólogo más cercano en *Homo sapiens*	Clase
PRJEB121 (Sanger)		PRJNA182977 (ChGC)				
Gen ID	Tamaño (aa)	Gen ID	Tamaño (aa)			
EgrG_001102300	516	EGR_03724.1	520	97	HDAC 2	I
EgrG_001114800	418	EGR_05604.1	427	100	HDAC 3	I
EgrG_000103800	406	EGR_08567.1	427	100	HDAC 8	I
EgrG_000527350	1116	EGR_03909.1	1182	83	HDAC 5	II
EgrG_000970900	868	EGR_07180.1	1128	82	HDAC 6	II
EgrG_000831600	650	EGR_01373.1	1282	95	HDAC 7	II
EgrG_000970800	827	EGR_07178.1	104	37	HDAC 10	II
EgrG_000971000	184	EGR_07180.1	1128	91	HDAC 10	II

[a] BioProyect ID de acuerdo a la base de datos WormBase ParaSite

Por otra parte, en el genoma *E. granulosus s.s.* G1 Sanger se pudieron identificar tres genes codificantes de HDACs con ortología con la HDAC6 y HDAC10 de *H. sapiens*: EgrG_000970800 de 827 aa, EgrG_000970900 de 868 aa y EgrG_000971000 de solo 184 aa (Tabla 3.2). En el otro genoma disponible, *E. granulosus s.s.* G1 ChGC, se identificaron solo dos genes con ortología con la HDAC6 y HDAC10 de *H. sapiens*: EGR_07178.1 de solo 104 aa y EGR_07180.1 de 1128 aa (Tabla 3.2). En la Figura 3.1 y el Anexo A.3.1 se puede observar que el gen EGR_07178.1 se corresponde con un fragmento dentro del gen EgrG_000970800. Sin embargo, solo en este último gen se pudo identificar el dominio catalítico de HDACs completo (Figura 3.1), por este motivo este gen fue seleccionado para los análisis posteriores.

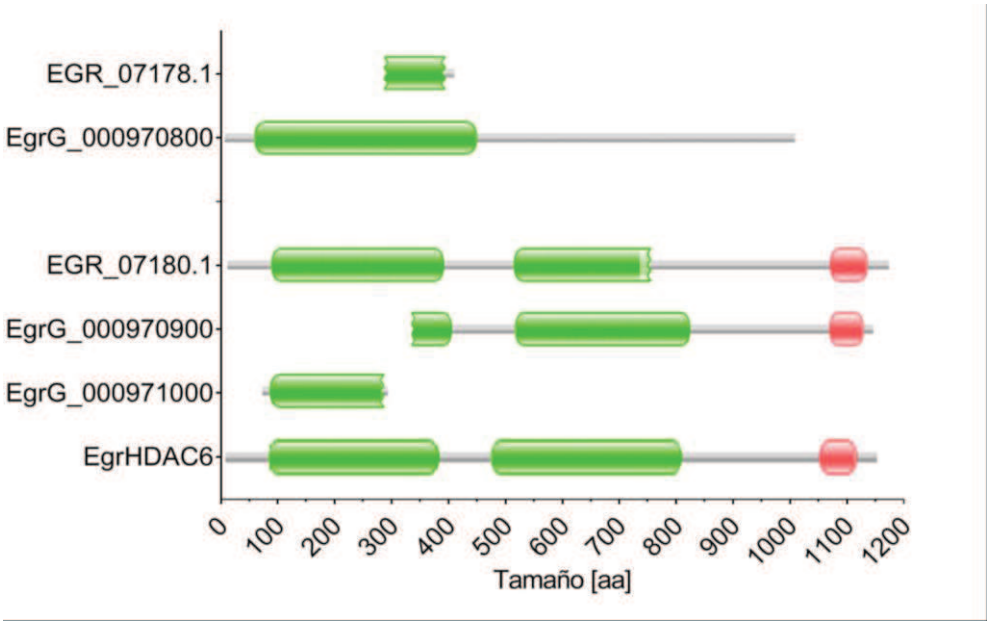


Figura 3.1. Genes codificantes de HDACs identificados en *Echinococcus granulosus sensu stricto* (*s.s.*) G1 con ortología con las HDAC6/HDAC10 de *Homo sapiens*. Se muestra el esquema de los genes codificantes de HDACs identificados en los dos genomas de *E. granulosus s.s.* G1, disponibles en la WormBase ParaSite, que mostraron ortología con las HDAC6/HDAC10 de *Homo sapiens*. Los dominios catalíticos, identificados mediante la página Pfam, se esquematizan como rectángulos curvos de color verde para los dominios HDACs (Familia HDACs: PF00850) y rojo para los dominios de dedos de Zn en ubiquitina-hidrolasas y otras proteínas (Familia zf-UBP: PF02148).

Por otra parte, también se pudo observar que los genes EgrG_000970900 y EgrG_000971000 se corresponden con fragmentos dentro del gen EGR_07180.1 (Figura 3.1, Anexo A.3.2 y Anexo A.3.3). Se pudieron identificar dos dominios catalíticos de HDACs parciales en el gen EGR_07180.1, que coinciden con la ubicación de los fragmentos con correspondencia

con los genes EgrG_000970900 y EgrG_000971000 (Figura 3.1, Anexo A.3.2 y Anexo A.3.3). Asimismo, se puede observar en el extremo carboxilo de algunos genes la presencia de un dominio de dedos de Zn (Familia zf-UBP: PF02148) (Figura 3.1), similar al reportados en HDAC6 de *H. sapiens* (Figura 1.14). Dado que en ninguno de los genes reportados se pudieron identificar los dos dominios catalíticos de HDACs completos (Figura 3.1), como ocurre en la HDAC6 de *H. sapiens* (Figura 1.14) y otros organismos, el gen EgrHDAC6 fue predicho usando el predictor de genes Augustus. En este gen se pudieron identificar los dos dominios catalíticos de HDACs completos y el dominio de dedos de Zn (Figura 3.1). Los parámetros reportados en la Tabla 3.1 y en los posteriores análisis corresponden al gen EgraHDAC6, predicho mediante el predictor de genes Augustus.

Por otra parte, los dos genomas disponibles para el parásito *T. asiatica* son PRJEB532 y PRJNA2998717. El genoma PRJEB532 corresponde al ensamblado por The Parasite Genomic Group de The Wellcome Trust Sanger Institute; desde ahora (y solo a fines prácticos) se hará referencia a este genoma como *T. asiatica* Sanger (International Helminth Genomes Consortium, 2017). Por otro lado, el genoma PRJNA299871 corresponde al ensamblado por The Chinese Academy of Agricultural Sciences, desde ahora se hará referencia a este genoma como *T. asiatica* CAAS (Wang y col., 2016).

Tabla 3.3. Comparación de los genes codificantes de HDACs identificados en los dos genomas disponibles para *Taenia asiatica*

BioProyect ID[a]				% de Identidad	Ortólogo más cercano en *Homo sapiens*	Clase
PRJEB532 (Sanger)		PRJNA299871 (CAAS)				
Gen ID	Tamaño (aa)	Gen ID	Tamaño (aa)			
TASK_0000062801	502	TASs00082g06876m00001	502	100	HDAC 2	I
TASK_0000683201	445	TASs00089g07089m00001	344	93	HDAC 3	I
		TASs00042g05048m00001	732		HDAC 8	I
TASK_0000507001	1323	TASs00001g00246m00001	1323	100	HDAC 4	II
TASK_0000489301	1141	TASs00134g08193m00001	1121	100	HDAC 5	II
TASK_0000403201	683	TASs00024g03791m00001	2126	98	HDAC 6/10	II
TASK_0000403001	219	TASs00024g03791m00001	2126	100	HDAC 6/10	II
TASK_0000403101	126	TASs00024g03791m00001	2126	87	HDAC 6/10	II

[a] BioProyect ID de acuerdo a la base de datos WormBase ParaSite

Como se observa en la Tabla 3.3, en el genoma *T. asiatica* Sanger se identificaron 7 genes codificantes de HDACs; mientras que en el genoma *T. asiatica* CAAS se identificaron 6 genes. En ambos genomas se identificaron genes codificantes de HDACs ortólogos a HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5 de *H. sapiens,* uno por cada gen de HDACs de *H. sapiens.* Analizando las secuencias de estos genes y comparando las mismas entre ambos genomas se puede observar que estos genes

son similares entre sí en tamaño y poseen identidades globales entre ellos de entre el 93% y 100 % (Tabla 3.3). Asimismo, solo en el genoma *T. asiatica* CAAS se pudo identificar un gen codificante de HDACs con ortología con la HDAC8 de *H. sapiens*, TASs00042g05048m00001 de 732 aa.

Por otra parte, en el genoma *T. asiatica* Sanger se pudieron identificar tres genes codificantes de HDACs con ortologías con las HDAC6 y HDAC10 de *H. sapiens*: TASK_0000403201 de 683 aa, TASK_0000403001 de 219 aa y TASK_0000403101 de 126 aa, mientras que en el genoma *T. asiatica* CAAS se pudo identificar solo un gen con ortología con la HDAC6 y HDAC10 de *H. sapiens*: TASs00024g03791m00001 de 2126 aa. Analizando las secuencias de estos genes, se observó que los genes TASK_0000403201, TASK_0000403001 y TASK_0000403101 se corresponden con fragmentos dentro del gen TASs00024g03791m00001 (Figura 3.2, Anexo A.4.1, Anexo A.4.2 y Anexo A.4.3). En este último gen se pudieron identificar tres dominios catalíticos de HDACs parciales que coinciden con algunos de los fragmentos con correspondencia con los genes TASK_0000403201, TASK_0000403001 y TASK_0000403101 (Figura 3.2, Anexo A.4.1, Anexo A.4.2 y Anexo A.4.3).

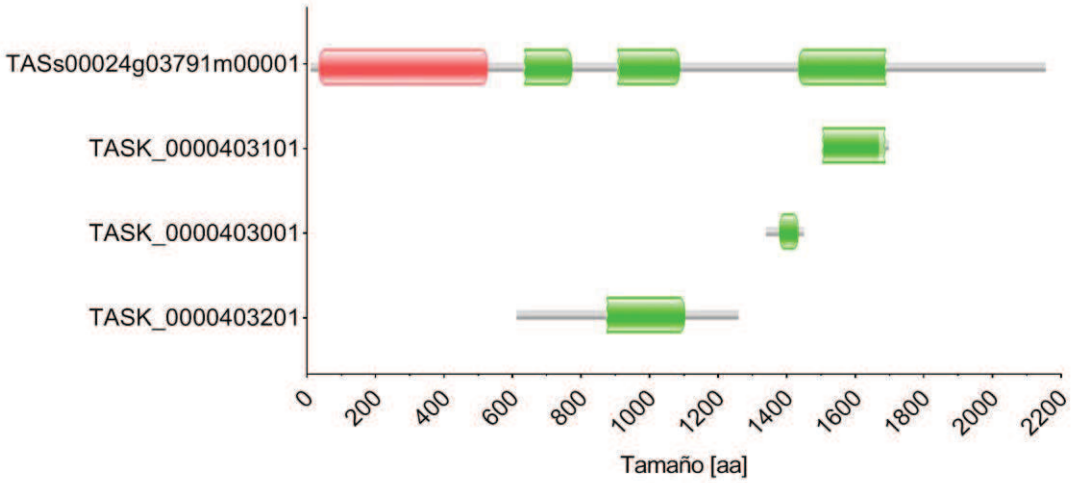


Figura 3.2. Genes codificantes de HDACs identificados en *Taenia asiatica* con ortología con las HDAC6/HDAC10 de *Homo sapiens*. Se muestra el esquema de los genes codificantes de HDACs identificados en los dos genomas de *T. asiatica*, disponibles en la WormBase ParaSite, que mostraron ortología con las HDAC6/HDAC10 de *Homo sapiens*. Los dominios catalíticos, identificados mediante la página Pfam, se esquematizan como rectángulos curvos de color verde para los dominios HDACs (Familia HDACs: PF00850) y rojo para el dominio transportador de fosfato (Familia PHO4 PF01384).

El gen TsaHDAC6 se intentó predecir usando el predictor de genes Augustus. Sin embargo, posiblemente debido a que ambos genomas disponibles para *T. asiatica* son borradores, no fue posible identificar dicho gen completo. El gen TASs00024g03791m00001 fue seleccionado para los análisis posteriores. Cabe aclarar que la presencia de tres dominios catalíticos de HDACs y el dominio transportador de fosfato (Familia PHO4 PF01384) en el gen TASs00024g03791m00001 (Figura 3.2) sea posiblemente debida a la baja calidad del genoma *T. asiatica* CAAS.

3.1.2. El análisis filogenético reveló la presencia de varios miembros dentro de las HDACs de Clase I y II en parásitos cestodos

A fin de determinar la identidad de cada uno de los genes codificantes de HDACs identificados en cestodos (Sección 3.1.1) e inferir las relaciones filogenéticas entre estos genes con las HDACs de *H. sapiens* y *S. mansoni*, se realizaron análisis filogenéticos. Los mismos se realizaron empleando solo los dominios catalíticos de HDACs identificados en cada uno de los genes codificantes de HDACs analizados. Estos dominios, de aproximadamente unos 300 a 400 aa, fueron identificados empleando la base de datos de dominios Pfam (Familia HDACs: PF00850).

En la Figura 3.3 se muestran las relaciones filogenéticas inferidas entre los genes de HDACs identificados en los parásitos cestodos, *H. sapiens* (resaltados en color amarillo) y *S. mansoni* (resaltados en color verde); representadas mediante un diagrama de árbol filogenético.

Los análisis evolutivos mostraron que las HDACs de cestodos se agrupan en dos ramas filogenéticas o clases principales, correspondientes a las Clases I y II de la familia de enzimas HDACs (las líneas correspondientes a estas ramas filogenéticas se muestran coloreadas en el árbol de la Figura 3.3 en rosa y azul, respectivamente). No se identificó ningún miembro de las HDACs de Clase IV en los cestodos analizados. Con respecto al número de genes en cada una de las Clases de enzimas HDACs, se identificaron tres miembros dentro de las HDACs de Clase I en todos los cestodos analizados. En particular, solamente un miembro de la subclase HDAC1/2 fue identificado en los cestodos analizados. Estos genes fueron nombrados como HDAC1. Los otros dos genes agrupados dentro de las HDACs de Clase I corresponden a la HDAC3 y HDAC8. Por otro lado, se identificaron tres o cuatro miembros dentro de las HDACs de Clase II en los cestodos analizados. Las relaciones filogenéticas de estos genes con las HDACs de *H. sapiens* no pudieron ser resueltas, por lo que estos miembros fueron nombrados según su relación filogenética con las HDACs de *S. mansoni* (Figura 3.3).

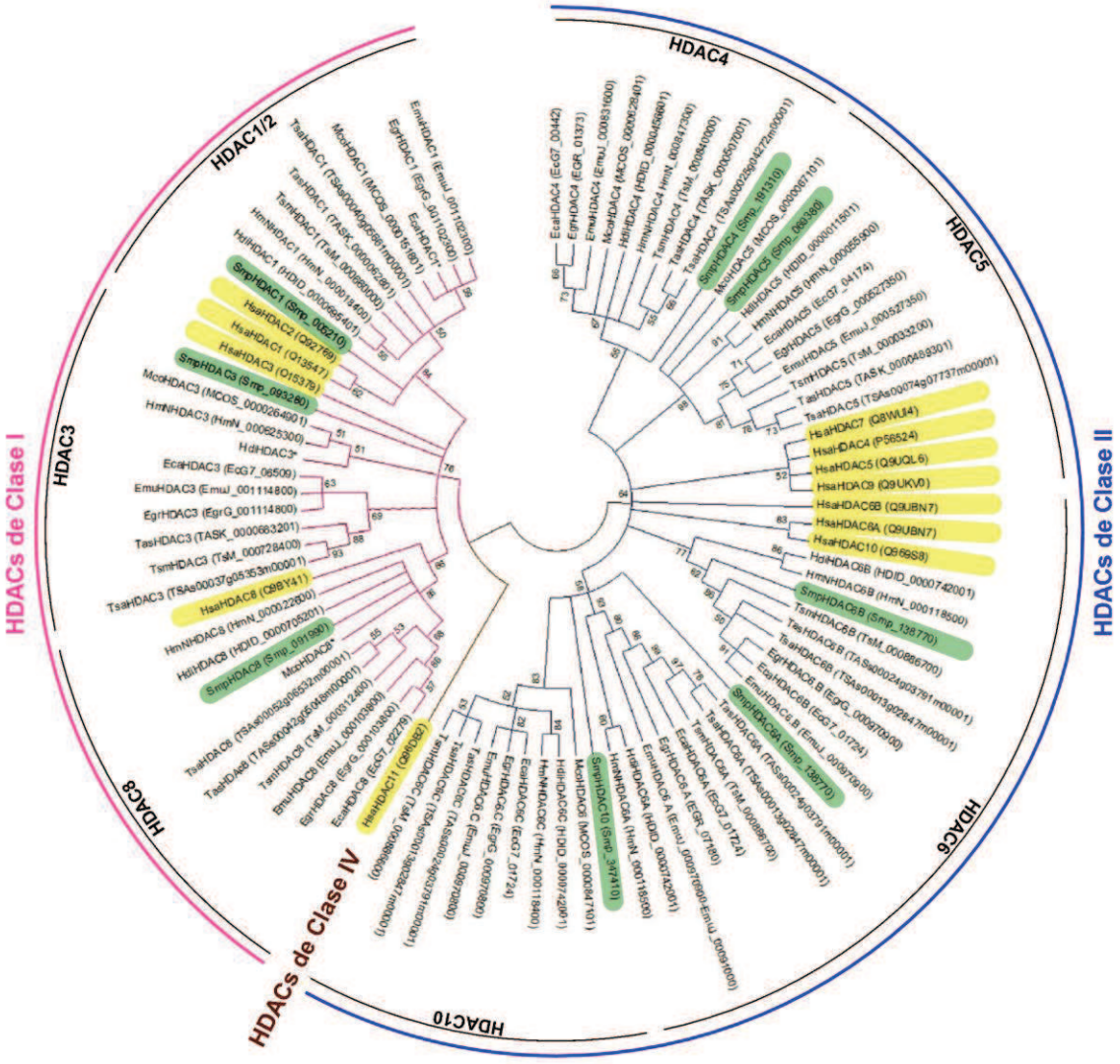


Figura 3.3. Árbol filogenético de los genes codificantes de HDACs de *Homo sapiens*, *Schistosoma mansoni* y los parásitos cestodos analizados. El árbol filogenético fue inferido utilizando las secuencias de aminoácidos de los dominios catalíticos de HDACs identificados en los genes de HDACs de los parásitos cestodos: *Echinococcus canadensis* G7 (Eca), *E. granulosus sensu stricto* G1 (Egr), *E. multilocularis* (Emu), *Hymenolepis diminuta* (Hdi), *H. microstoma* (HmN), *Mesocestoides corti* (Mco), *Taenia asiatica* (Tas), *T. saginata* (Tsa) y *T. solium* (Tso); y en las HDACs de *H. sapiens* (Hsa; resaltados en color amarillo) y *S. mansoni* (Smp; resaltados en color verde). El árbol filogenético fue obtenido utilizando el método de máxima probabilidad mediante el modelo basado en la matriz JTT. El árbol filogenético fue inferido luego de realizar 1000 repeticiones (*Bootstrap*). Las ramas corresponden a particiones reproducidas en al menos el 50% de las repeticiones. El porcentaje de árboles replicados en el que los taxones asociados quedan agrupados en la prueba *bootstrap* (1000 repeticiones) se muestran junto a las ramas. El análisis involucró 90 secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones con menos del 95% de cobertura del sitio fueron eliminadas. Hubo un total de 79 posiciones en el conjunto de datos finales. El análisis filogenético se realizó empleando el software MEGA5.

Por último, en algunos genes codificantes de HDACs de cestodos se identificaron dos dominios catalíticos de HDACs (EgrHDAC6, EmuHDAC6, HmN_000118500 y TsM_000886700) e incluso tres dominios catalíticos de HDACs (ECAN7_01724, HDID_0000742001, TASs00024g03791m00001 y TSAs00013g02847m00001). Todos estos dominios catalíticos de HDACs mostraron relación filogenética con las HDAC6 y HDAC10 de *H. sapiens* y *S. mansoni*. Por este motivo fueron nombrados como HDAC6A, HDAC6B y HDAC6C. Cabe aclarar que la presencia de tres dominios catalíticos de HDACs en algunos genes se podría deber a la baja calidad de los genomas para estos parásitos. Por último, las ramas en el árbol filogenético, correspondientes a cada uno de los isotipos de HDACs, mostraron que las secuencias aminoacídicas de las HDACs de las diferentes especies parasitarias se agrupan en diferentes géneros de acuerdo a sus relaciones evolutivas.

3.1.3. Las comparaciones entre las HDACs de cestodos y *Homo sapiens* proporcionaron información relevante a fin de definir candidatos a blancos farmacológicos

Las secuencias de aminoácidos de los dominios catalíticos de HDACs los genes de HDACs de cestodos, *H. sapiens* y *S. mansoni* fueron comparadas mediante matrices de identidad a fin de definir los mejores candidatos a blancos farmacológicos. En la Figura 3.4 se muestran los porcentajes de identidad para cada gen codificante de HDACs identificado en cestodos, comparado con sus ortólogos en *H. sapiens* y *S. mansoni*. Este análisis proporcionó información relevante ya que las enzimas parasitarias con bajos porcentajes de identidad con su ortólogo en *H. sapiens* constituyen potenciales blancos farmacológicos selectivos.

Los dominios catalíticos de las HDAC1 y HDAC3 de cestodos mostraron los mayores grados de similitud con sus correspondientes ortólogos en *H. sapiens*, con porcentajes de identidad de aminoácidos superiores al 86% y 64%; respectivamente (Figura 3.4). Por otra parte, los dominios catalíticos de las HDAC8 de cestodos mostraron porcentajes de identidad de aminoácidos de aproximadamente 48%, con su correspondiente ortólogo en *H. sapiens* (Figura 3.4), por lo que constituyen el miembro más divergente dentro de las HDACs de Clase I en cestodos. Por otro lado, los dominios catalíticos de las HDACs de Clase II de cestodos (HDAC4, HDAC5, HDAC6 y HDAC10) mostraron porcentajes de identidad de aminoácidos, con sus correspondientes ortólogos en *H. sapiens,* en el rango del 41% al 61% (Figura 3.4). Finalmente, también comparamos los porcentajes de identidad de aminoácidos de los dominios catalíticos de HDACs de cestodos con los informados previamente para *S. mansoni*. Los dominios catalíticos de las

HDAC1 y HDAC3 de cestodos mostraron los mayores grados de similitud con sus correspondientes ortólogos en *S. mansoni*, con porcentajes de identidad de aminoácidos superiores al 86% y 74%; respectivamente. Los dominios catalíticos de las otras HDACs de cestodos (HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC8 y HDAC10) mostraron porcentajes de identidades aminoacídicas, con sus correspondientes ortólogos en *S. mansoni,* en el rango del 37% al 73% (Figura 3.4).

HDAC1

	Hsa	Smp
Eca	86	86
Egr	86	86
Emu	86	86
Hdi	87	89
HmN	86	89
Mco	86	90
Tas	86	89
Tsa	86	89
Tsm	86	89

HDAC3

	Hsa	Smp
Eca	71	80
Egr	71	81
Emu	71	80
Hdi	71	80
HmN	72	80
Mco	70	81
Tas	69	79
Tsa	78	86
Tsm	64	74

HDAC8

	Hsa	Smp
Eca	45	52
Egr	45	52
Emu	45	53
Hdi	48	37
HmN	45	53
Mco	45	54
Tas	45	55
Tsa	45	55
Tsm	45	54

HDAC4

	Hsa	Smp
Eca	57	72
Egr	57	72
Emu	57	72
Hdi	58	73
HmN	57	73
Mco	57	71
Tas	57	73
Tsa	57	73
Tsm	61	70

HDAC5

	Hsa	Smp
Eca	50	48
Egr	50	48
Emu	50	48
Hdi	47	45
HmN	46	45
Mco	47	46
Tas	50	48
Tsa	50	48
Tsm	49	49

HDAC6A

	Hsa	Smp
Eca	41	52
Egr	42	54
Emu	41	53
Hdi	48	62
HmN	48	63
Mco	44	49
Tas	49	59
Tsa	49	59
Tsm	39	51

HDAC6B

	Hsa	Smp
Eca	49	55
Egr	48	54
Emu	47	54
Hdi	49	52
HmN	46	49
Tas	51	60
Tsa	48	55
Tsm	50	56

HDAC6C (HDAC10)

	Hsa	Smp
Eca	54	62
Egr	48	59
Emu	48	59
Hdi	47	57
HmN	46	57
Tas	47	57
Tsa	50	60
Tsm	47	56

Figura 3.4. Comparación de las secuencias de aminoácidos de los dominios catalíticos de HDACs. Se muestran los porcentajes de identidad entre los residuos de aminoácidos de los dominios catalíticos de HDACs de los cestodos: *Echinococcus canadensis* G7 (Eca), *E. granulosus sensu stricto* G1 (Egr), *E. multilocularis* (Emu), *Hymenolepis diminuta* (Hdi), *H. microstoma* (HmN), *Mesocestoides corti* (Mco), *Taenia asiatica* (Tas), *T. saginata* (Tsa) y *T. solium* (Tso); con los dominios catalíticos de HDACs de *Homo sapiens* (Hsa) o *Schistosoma mansoni* (Smp). En cada panel se muestra el porcentaje de identidad para cada gen de HDAC. Los porcentajes de identidad fueron determinados utilizando una matriz de identidad porcentual creada por Clustal2.1.

3.1.4. Los genes codificantes de HDACs se expresan en diferentes estadios del desarrollo en parásitos del género *Echinococcus*

Los niveles de expresión de los genes codificantes de HDACs, identificados en los parásitos *E. granulosus s.s.* G1 y *E. multilocularis,* se analizaron empleando datos de expresión transcripcional disponibles para estos organismos.

En las Figura 3.5 y Figura 3.6 se muestran los niveles de expresión transcripcional, en RPKM, para cada gen codificante de HDACs identificado en los parásitos *E. granulosus s.s.* G1 y *E. multilocularis*; respectivamente, para diferentes estadios del desarrollo. El RPKM es una métrica de expresión empleada para normalizar la profundidad de secuenciación y la longitud del gen. La normalización en las métricas de expresión son necesarias para eliminar los sesgos técnicos en los datos secuenciados, como la profundidad de secuenciación (una mayor profundidad de secuenciación produce más recuento de lectura para el gen expresado al mismo nivel) y longitud del gen (las diferencias en la longitud del gen generan recuento de lecturas desiguales para los genes expresados en el mismo nivel; más largo el gen más el recuento de lectura). El RPKM se calcula: contando el número de lecturas totales en una muestra y dividiendo este número por 1 000 000 (este es el factor de escala *per million*). Las lecturas para un gen particular se dividen por el factor de escala "*per million*". Esto normaliza la lectura para la profundidad de secuencia. Luego se divide este valor por la longitud del gen, *per kilo base*; obteniéndose el RPKM (del inglés, *Reads per kilo base per million mapped reads*).

En la Figura 3.5 se puede observar que todos los genes de HDACs de *E. granulosus s.s.* G1 se expresan en al menos uno de los estadios del desarrollo analizados; estando los genes EgrHDAC1 y EgrHDAC6 expresados en todos estadios del desarrollo analizados. Cabe destacar que el gen EgrHDAC1 presentó niveles de expresión transcripcional superiores a los otros genes de HDACs en los estadios de desarrollo correspondientes a parásito adulto, oncosfera y metacestodo. Por otra parte, el gen EgrHDAC10 presentó niveles de expresión transcripcional superiores a los otros genes de HDACs en el estadio del desarrollo correspondiente a protoescólex. Por último, el gen EgrHDAC8 solo presentó niveles de expresión transcripcional detectables en los estadios del desarrollo correspondientes a parásitos adultos y metacestodo (Figura 3.5).

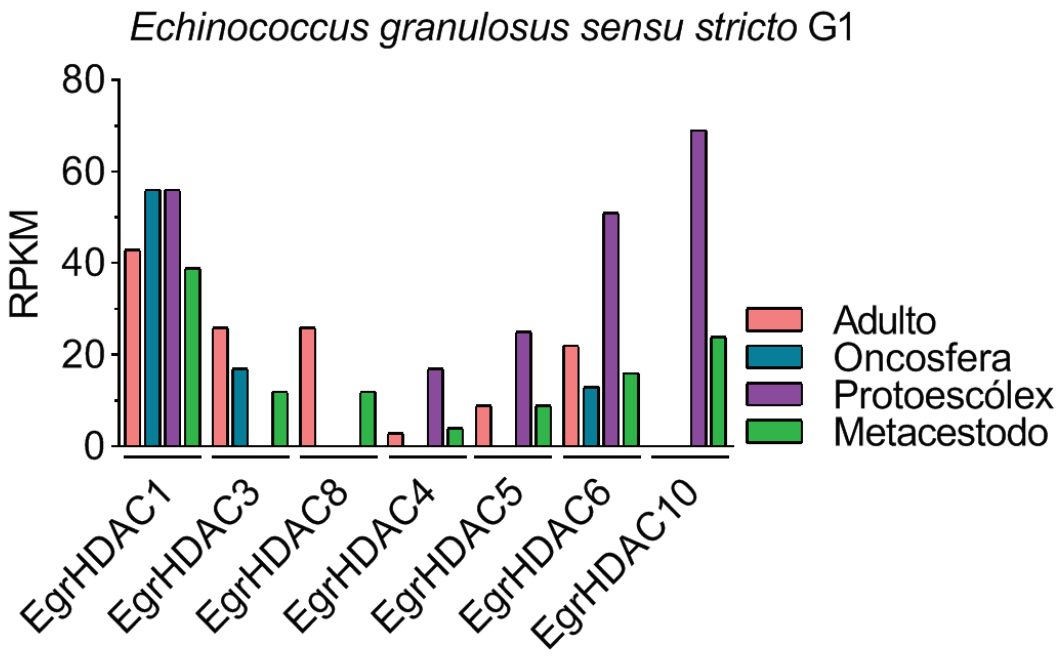


Figura 3.5. Niveles de expresión transcripcional de los genes de HDACs en el parásito *Echinococcus granulosus sensu stricto* (*s.s.*) G1. Se muestran los niveles de expresión transcripcional de los genes codificantes de HDACs identificados en el parásito *E. granulosus s.s.* G1 como RPKM (del inglés, *Reads per kilo base per million mapped reads*). Los niveles de expresión transcripcional fueron determinados mediante RNAseq para varios estadios del desarrollo: parásito adulto, oncosfera, metacestodo y protoescólex (Zheng y col., 2013).

En la Figura 3.6 se puede observar que todos los genes codificantes de HDACs de *E. multilocularis* se expresan en todos los estadios del desarrollo analizados; con la única excepción del gen EmuHDAC5 que presentó bajos niveles de expresión transcripcional y solo en los estadios del desarrollo correspondientes a oncosfera y oncosfera activada. Por otra parte, el gen EmuHDAC1 presentó niveles de expresión transcripcional superiores a los otros genes de HDACs en los estadios del desarrollo correspondientes a oncosfera y metacestodo pequeño de 4 semanas de cultivo *in vitro*. Cabe destacar que el gen EmuHDAC8 presentó un aumento en el nivel de expresión transcripcional en el estadio del desarrollo correspondientes a oncosfera activada, comparado con los otros estadios del desarrollo analizados en *E. multilocularis* (Figura 3.6).

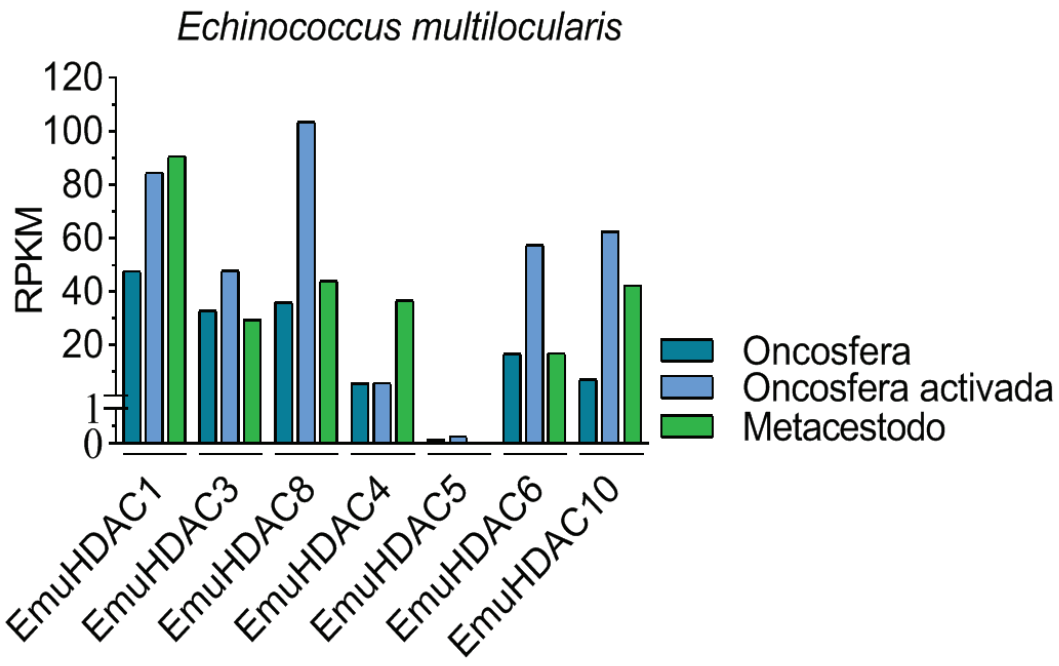


Figura 3.6. Niveles de expresión transcripcional de los genes de HDACs en *Echinococcus multilocularis*. Se muestran los niveles de expresión transcripcional de los genes codificantes de HDACs identificados en el parásito *E. multilocularis* como RPKM (del inglés, *Reads per kilo base per million mapped reads*). Los niveles de expresión transcripcional fueron determinados mediante RNAseq para varios estadios del desarrollo: oncosfera, oncosfera activada y metacestodo pequeño de 4 semanas de cultivo *in vitro* (4wCW) (Huang y col., 2016).

3.2. Validación de las enzimas HDACs de cestodos como potenciales blancos farmacológicos

La relevancia de las enzimas HDACs en la supervivencia de los cestodos fue determinada usando el cultivo *in vitro* de tetratiridios (TTy) del modelo de cestodos *Mesocestoides corti*. Para ello, se determinó el efecto la inhibición de las HDACs sobre la viabilidad parasitaria, empleando el inhibidor de las HDACs Tricostatina A (TSA). La viabilidad parasitaria fue determinada mediante dos ensayos de viabilidad parasitaria independientes. Por un lado, el ensayo de reducción de la resazurina (o AlamarBlue®) y por otro, mediante mediciones de la motilidad parasitaria. Ambos métodos fueron adaptados para la determinación del efecto antihelmíntico de compuestos sobre TTy de *M. corti*.

3.2.1. Adaptación del ensayo de viabilidad por reducción de la resazurina para la determinación de la viabilidad parasitaria de *Mesocestoides corti*

El ensayo de viabilidad por reducción de la resazurina fue adaptado a parásitos cestodos, en particular *M. corti*, a fin de determinar el efecto antihelmíntico de varios compuestos en cultivo *in vitro*. La resazurina es un colorante indicador azul no fluorescente que es convertido, en una reacción de reducción mediada por las células metabólicamente activas, en un indicador rojo altamente fluorescente la resofurina. Este indicador, además de emitir fluorescencia, presenta máximos de absorción en diferentes longitudes de ondas para el compuesto oxidado y reducido (Figura 2.1). Debido al gran número de parámetros a definir a fin de adaptar el ensayo de viabilidad AlamarBlue para la medición de la viabilidad parasitaria de TTy de *M. corti*, se definió un protocolo base a emplear. En este protocolo, se tomó 3 días como el tiempo de incubación de los parásitos, además 24 h previas a la medición se agregó 20 µL del reactivo de AlamarBlue® (resazurina) por pocillo. Los parámetros a definir fueron: el medio de cultivo, el tamaño y número de parásitos por pocillo, si era conveniente realizar la medición mediante fluorescencia o absorbancia, las longitudes de onda para la medición y el efecto del DMSO.

En primera instancia se evaluó el medio de cultivo a emplear. Esto se realizó debido a que los medios de cultivos en general llevan un indicador de pH, como el rojo fenol, que podría intervenir con las mediciones de absorbancia de la resazurina. El medio de cultivo a emplear para el cultivo de *M. corti* fue Mco-PRMI 1640. Las absorbancias, medidas a longitudes de onda de 570 nm, para los medios de cultivo con y sin rojo fenol se muestran en la Figura 3.7A. Las absorbancias medidas para el medio Mco-PRMI 1640 con rojo fenol (0,063) fue mayor que la medida para el medio sin rojo fenol (0,028). Esta diferencia en la absorbancia se mantuvo cuando se agregó la resazurina al medio de cultivo (Figura 3.7A). Si bien la diferencia en las absorbancias medidas para ambos medios no fue significativa, se optó por utilizar el medio Mco-RPMI 1640 sin rojo fenol para los ensayos posteriores debido a que de esta manera se logró una mejor discriminación visual de los resultados. Cabe aclarar que, debido a que el indicador de pH es importante en el cultivo parasitario ya que indica cuando es necesario realizar un cambio del medio de cultivo sobre todo en cultivos mantenidos durante muchos días; en todas las placas ensayadas se incorporaron TTy incubados con Mco-RPMI 1640 con rojo fenol en las mismas condiciones del ensayo, como indicadores del pH.

A

Medio	Absorbancia
Mco-RPMI 1640 sin rojo fenol	0,029
Mco-RPMI 1640 con rojo fenol	0,063

Medio + resazurina	Absorbancia
Mco-RPMI 1640 sin rojo fenol	0,516
Mco-RPMI 1640 con rojo fenol	0,554

B

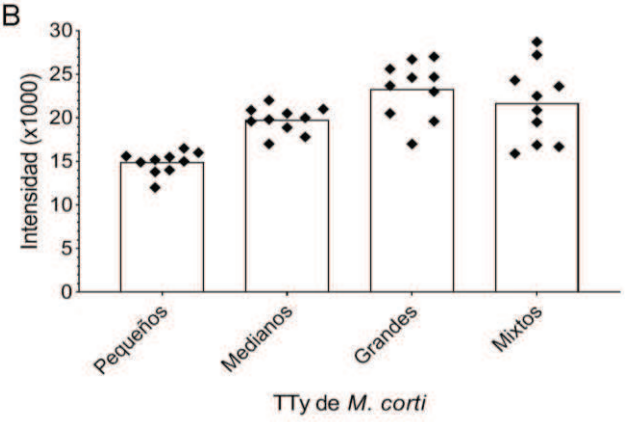


Figura 3.7. Ensayo de la viabilidad por reducción de la resazurina (AlamarBlue®). El ensayo de viabilidad AlamarBlue® fue adaptado para la medición de la viabilidad parasitaria en cultivo *in vitro* de *Mesocestoides corti*. (A) Absorbancia del medio Mco-RPMI 1640 solo o con la resazurina y con y sin rojo fenol, medida a 570 nm (C) Intensidad de fluorescencia medida para diferentes grupos de TTy de *M. corti* separados por tamaño mediante un sistema de doble tamizado (n = 10), medida a longitudes de onda de excitación de 570 nm y emisión de 585 nm. Pequeños: muestra enriquecida en parásitos menores a 150 µm; Medianos: muestra enriquecida en parásitos entre los 150 µm y 250 µm; Grandes: muestra enriquecida en parásitos mayores a 250 µm y Mixtos: muestra de parásitos sin filtrar.

La otra variable a optimizar fue el tamaño los parásitos a emplear en los ensayos. Los TTy de *M. corti* son muy variables en cuanto al tamaño, encontrándose algunos parásitos muy pequeños (< 100 µm) y otros muy grandes (> 300 µm) en las muestras recolectadas de ratones. Para separar los parásitos por tamaño se empleó un sistema doble de tamizaje; que permitió obtener tres grupos de TTy: un grupo enriquecido en parásitos pequeños (menores a 150 µm), un grupo enriquecido en parásitos medianos (mayores a 150 µm y menores a 250 µm) y un grupo enriquecido en parásitos grandes (mayores a 250 µm). Estos grupos de parásitos, junto con parásitos heterogéneos (sin filtrar) fueron empleados a fin de determinar la reproducibilidad de las mediciones. En la Figura 3.7B se pueden ver la fluorescencia medida a longitudes de onda de excitación de 570 nm y emisión de 585 nm para los grupos parasitarios ensayados. Para todos los grupos parasitarios ensayados se incubaron 20 TTy de *M corti* por pocillo. Como se puede observar en la Figura 3.7B, las mediciones de fluorescencias para el grupo sin filtrar y el grupo de parásitos grandes mostraron mucha dispersión. Por otra parte, las mediciones de fluorescencias para los grupos de parásitos pequeños y medianos mostraron dispersiones menores con respecto a los otros grupos. El grupo de parásitos medianos fue elegido para los análisis posteriores,

debido a que se obtiene muy poco material para el grupo de parásitos pequeños durante el filtrado.

Una vez definido el rango de tamaños de los parásitos a emplear, se prosiguió a determinar el número adecuado de TTy de *M. corti* por pocillo. En la Figura 3.8A se muestra el porcentaje de reducción de la resazurina en función del número de TTy de *M. corti* por pocillo. Como se puede observar el sistema se satura para más de 30 parásitos por pocillos. Está zona de la curva no resulta conveniente, si se elige un número de parásitos por pocillo dentro de esta meseta cualquier compuesto que aumente la viabilidad parasitaria no podría ser detectado. Se eligió 20 como el número de parásitos por pocillos a fin de tener un rango más amplio de trabajo. Para 20 TTy de *M. corti* por pocillo se obtuvo una de reducción de la resazurina del 70%. Usando este número parásitos por pocillo se podrían evaluar compuestos que tengan tanto un efecto negativo como también positivo en la viabilidad parasitaria.

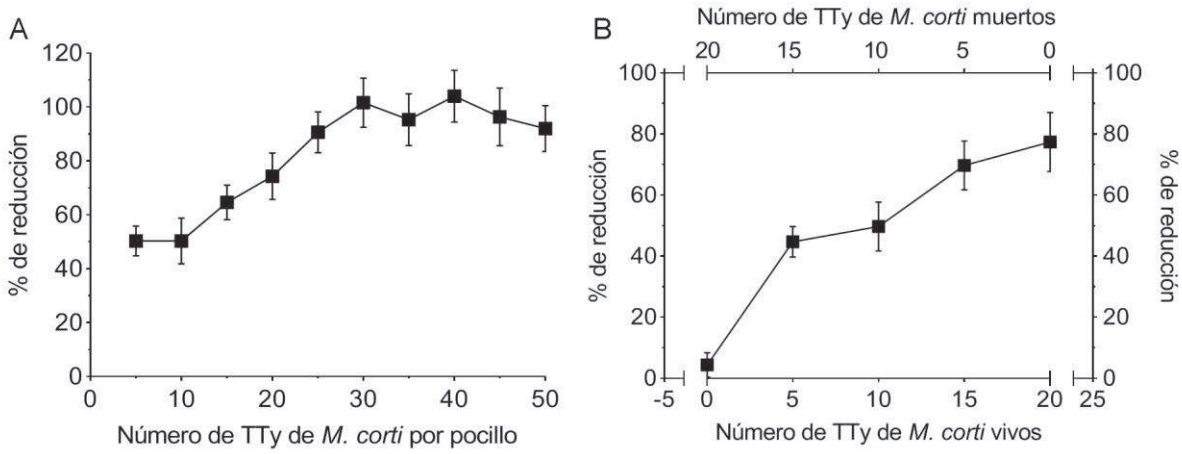


Figura 3.8. Curvas de reducción de la resazurina en función del número de tetratiridios (TTy) de *Mesocestoides corti* por pocillo. Se muestran la curva de reducción de la resazurina en función del (A) número de parásitos vivos por pocillo y (B) diferentes números de parásitos vivos y muertos por pocillo (20 TTy final por pocillo). Los parásitos muertos corresponden a muestras de TTy de *M. corti* tratadas con etanol al 70% por 30 min. Se muestran las mediciones de reducción de la resazurina para una réplica biológica por triplicado. Las barras de error representan la desviación estándar.

Por otra parte, también se determinó si mediante este sistema de medición de viabilidad parasitaria se podría discriminar entre parásitos vivos y muertos. En la Figura 3.8B se muestra una curva con diferentes proporciones de TTy de *M. corti* vivo y muertos por pocillo. Los parásitos muertos se obtuvieron tratando las muestras con etanol al 70% durante 30 min. Las mediciones del porcentaje de reducción de la resazurina para las diferentes proporciones de parásitos vivos:

muertos (Figura 3.8B) dieron una pendiente similar a la curva de reducción vs número de parásitos vivos (Figura 3.8A). Por lo que, el sistema nos permitiría discriminar entre TTy de *M. corti* vivos y muertos.

Como se dijo anteriormente, la resazurina presenta espectros de fluorescencia y absorbancia diferentes para el reactivo oxidado y reducido (Figura 2.1), pudiéndose determinar la viabilidad parasitaria por mediciones de fluorescencia o absorbancia. Asimismo, es posible emplear más de un par de longitudes de ondas para la determinación de la viabilidad parasitaria: 540-630 nm y 570-600 nm. Si bien las mediciones de fluorescencia resultan más directas, ya que en el caso de la absorbancia se necesitan realizar mediciones a diferentes longitudes de ondas y calcular posteriormente el porcentaje de reducción de la resazurina, en el IMPaM (lugar donde se llevó a cabo este trabajo) no se cuenta con el equipo necesario; recurriéndose a la prestación de servicios de terceros para dicha medición. Por este motivo la viabilidad parasitaria se determinó mediante mediciones de absorbancia. En la Figura 3.9A se muestran los porcentajes de reducción de la resazurina para cada par de longitudes de onda ensayadas. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes condiciones ensayadas. Se optó por el par de longitudes de onda 570 nm y 600 nm, ya que éstos se corresponden con los máximos en el espectro de absorbancia para el reactivo reducido y oxidado, respectivamente (Figura 2.1).

Por último, se determinó el porcentaje máximo de DMSO que se podría utilizar en la determinación de la viabilidad parasitaria. El DMSO es un solvente orgánico ampliamente empleado para disolver diferentes tipos de compuestos. Además, al ser un disolvente aprótico y altamente polar es miscible tanto con el agua como con disolventes orgánicos como alcoholes, cetonas, etc. Sin embargo, el DMSO puede llegar a ser tóxico para las células; por este motivo se evaluó el efecto del DMSO sobre la viabilidad parasitaria de TTy de *M. corti* mediante el ensayo de reducción de la resazurina. En la Figura 3.9B se muestra el porcentaje de reducción de la resazurina para diferentes concentraciones de DMSO. Para concentraciones de DMSO menores al 2% no se observó una disminución estadísticamente significativa en la viabilidad parasitaria de TTy de *M. corti*. Por otra parte, para concentraciones de DMSO iguales o superiores a 2% se observó una disminución estadísticamente significativa en la viabilidad parasitaria (Figura 3.9B). Las mediciones realizadas para determinar el efecto del DMSO sobre el cultivo parasitario se realizaron a tres días de incubación. Sin embargo, para determinar el efecto antihelmíntico de los compuestos sobre TTy de *M. corti* se necesitan realizar mediciones de viabilidad para otros tiempos de incubación. En la Figura 3.9C se muestra el porcentaje de reducción de la resazurina para parásitos tratados con DMSO al 1%, determinado a 3 y 6 días de incubación. No se observó

una disminución estadísticamente significativa en la viabilidad parasitaria para el DMSO a la concentración de 1% para 3 y 6 días de incubación, comparado con la viabilidad parasitaria determinada para los TTy de *M. corti* sin DMSO (Figura 3.9C).

Finalmente, cabe aclarar que no se observó viraje del medio en los parásitos incubados con medio Mco-RPMI 1640 con rojo fenol hasta los 6 días de incubación.

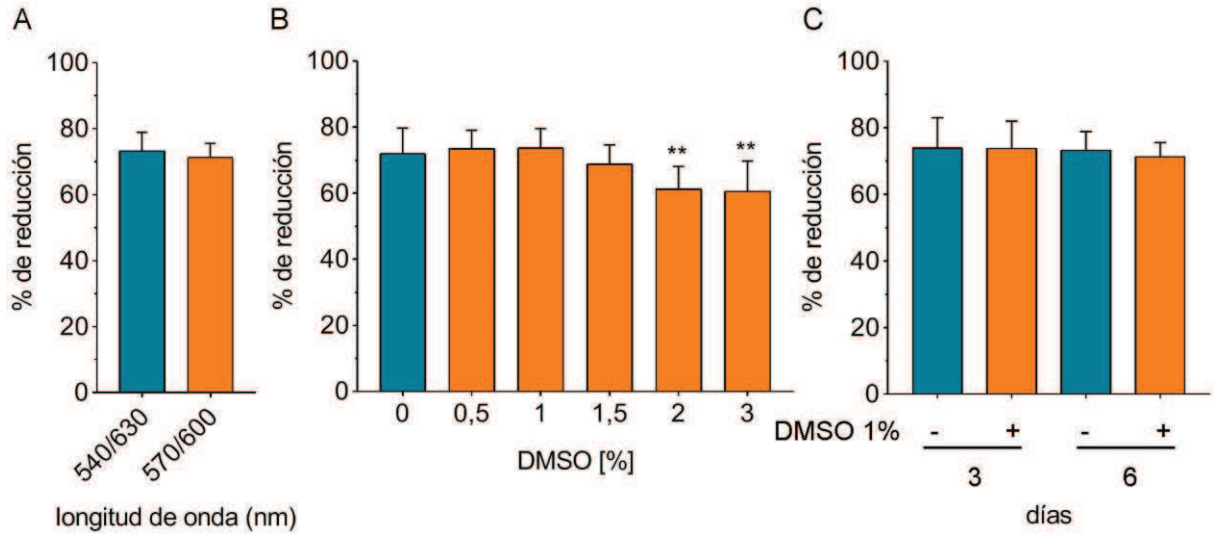


Figura 3.9. Determinación de las longitudes de onda y porcentaje de DMSO óptimo para el ensayo de viabilidad parasitaria por reducción de la resazurina en tetratiridios (TTy) de *Mesocestoides corti*. Se muestran el porcentaje de reducción de la resazurina en función de (A) los pares de longitud de onda 540/630 nm y 570/600 nm, (B) el porcentaje de DMSO en el medio de cultivo y (C) los días de incubación. Los porcentajes de reducción fueron determinados para tres réplicas biológicas independientes, cada una por triplicado. En todas las barras, las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican aquellas concentraciones que mostraron diferencias estadísticas significativas, en comparación con el control (DMSO 1%), usando el análisis de las varianzas (ANOVA) de una vía (**, $p \leq 0,01$).

3.2.2. Adaptación del ensayo de viabilidad por mediciones de motilidad para la determinación de la viabilidad parasitaria de *Mesocestoides corti*

El ensayo de viabilidad por medición de la motilidad parasitaria fue adaptado para la medición de la viabilidad parasitaria, a fin de determinar el efecto antihelmíntico de varios compuestos sobre el cultivo *in vitro* del parásito *M. corti*. Este ensayo se basa en la medición de los movimientos realizados por parásitos que son captados por el dispositivo wMicroTracker. Este

dispositivo está compuesto por un rayo de luz infrarrojo y un sistema sensor. Cuando los parásitos se mueven, bloquean el rayo infrarrojo y esto es detectado por el sensor. Mediante diferentes algoritmos es posible calcular el movimiento de los parásitos, expresado como índice de motilidad relativa (IMR), en un determinado periodo. Este sistema fue diseñado para la medición de la motilidad, y por ende la viabilidad, de *Caenorhabditis elegans* (Simonetta y Golombek, 2007) y tiene la ventaja de permitir un sistema de medición continuo y no invasivo de la viabilidad.

A fin de adaptar el ensayo de motilidad a la medición de la viabilidad parasitaria de TTy de *M. corti*, se definió un protocolo base a emplear. En base a los resultados obtenidos para el ensayo AlamarBlue®, en este protocolo se empleó el grupo de parásitos medianos (mayores de 150 µm y menores de 250 µm) y se tomó 3 días como el tiempo de incubación de los parásitos. Los parámetros a definir fueron el número de parásitos por pocillo, el algoritmo de medición y el efecto del DMSO. La viabilidad parasitaria, medida por el ensayo de motilidad, se expresa como un índice de motilidad relativa (IMR). Este índice es la relación entre el índice de motilidad calculado para un determinado día con respecto al índice de motilidad para el día 0.

En la Figura 3.10A se muestra el índice de motilidad parasitaria en función del número de TTy de *M. corti* por pocillo. Como se puede observar el sistema se satura para más de 7 parásitos por pocillo. Se eligió 5 como el número de parásito por pocillos a fin de tener un rango más amplio de trabajo. Para 5 TTy de *M. corti* por pocillo se obtuvo un índice de motilidad de 936 ± 151 después de 2 h de medición usando el algoritmo "M3-*C. elegans*".

Por otra parte, también se determinó si mediante este sistema de medición de viabilidad parasitaria se podría discriminar entre parásitos vivos y muertos. En la Figura 3.10B se muestra una curva con diferentes números de TTy de *M. corti* vivos y muertos por pocillos. Los parásitos muertos se obtuvieron tratando las muestras con etanol al 70% durante 30 min. Las mediciones de la motilidad para diferentes proporciones de parásitos vivos: muertos (Figura 3.10B) dieron una pendiente similar a la curva de motilidad vs número de parásitos vivos (Figura 3.10A). Por lo que, el sistema nos permitiría discriminar entre TTy de *M. corti* vivos y muertos.

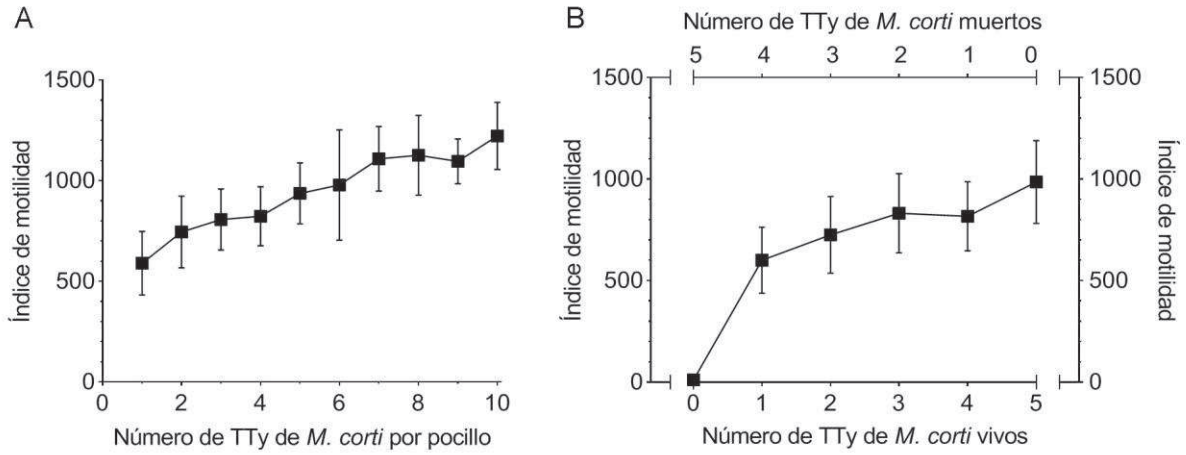


Figura 3.10. Curvas de motilidad parasitaria en función del número de tetratiridios (TTy) de *Mesocestoides corti* por pocillo. Se muestran la curva de motilidad parasitaria en función del (A) número de parásitos por pocillo y (B) diferentes proporciones de parásitos vivos y muertos por pocillo (5 TTy final por pocillo). Los parásitos muertos corresponden a muestras de TTy de *M. corti* tratadas con etanol al 70% por 30 min. Se muestran las mediciones de motilidad, como índice de motilidad, para una réplica biológica por triplicado. Las barras de error representan la desviación estándar. Los índices de motilidad fueron calculados para 2 horas de medición usando el algoritmo "M3-*C. elegans*".

El índice de motilidad parasitaria se puede calcular empleando diferentes algoritmos disponibles en el software del equipo wMicroTracker. En la Figura 3.11A se muestran los índices de motilidad parasitaria determinados para 5 TTy de *M. corti* por pocillo después de 2 h de medición con los dos algoritmos principales: M3-*C. elegans* y M3-Zebrafish. Se puede observar que los índices de motilidad determinados con el algoritmo M3-Zebrafish presentan menos dispersión. Por dicho motivo, este algoritmo fue elegido para los cálculos de índices de motilidad posteriores.

Por último, se determinó el efecto del DMSO sobre la viabilidad parasitaria de TTy de *M. corti* a lo largo de los días de incubación. En la Figura 3.11B se muestran los índices de motilidad relativa en función de los días de incubación para TTy de *M. corti* incubados en medio solo o medio con DMSO al 1%. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los índices de motilidad relativa para los parásitos incubados con DMSO 1% hasta los 6 días de incubación, comparado con los parásitos incubados en medio solo (Figura 3.11B).

Finalmente, cabe aclarar que no se observó viraje del medio en los parásitos incubados con medio Mco-RPMI 1640 con rojo fenol hasta los 6 días de incubación.

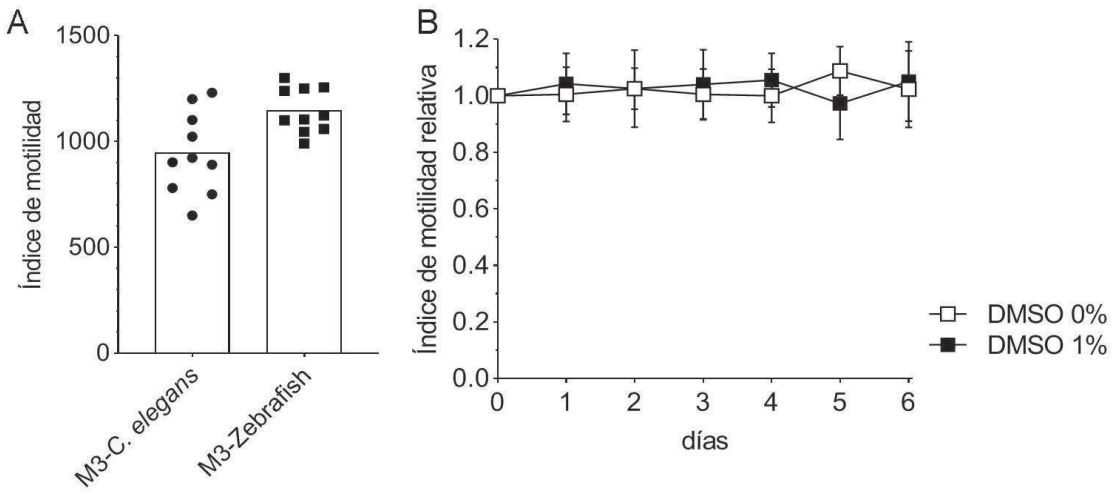


Figura 3.11. Selección del algoritmo y análisis del efecto del DMSO para la medición de la viabilidad parasitaria por mediciones de motilidad en tetratiridios (TTy) de *Mesocestoides corti*. Se muestran (A) el índice de motilidad calculado mediante los dos algoritmos principales: M3-*C. elegans* y M3-Zebrafish (n = 10) y (B) el índice de motilidad relativa para parásitos incubados en medio solo o medio con DMSO al 1% en función de los días de incubación. Los índices de motilidad relativa fueron determinados para tres réplicas biológicas independientes, cada una por cuadruplicado. Las barras de error representan la desviación estándar.

3.2.3. La inhibición de las enzimas HDACs afecta la viabilidad de *Mesocestoides corti*

El efecto de la inhibición de las HDACs sobre la viabilidad de TTy de *M. corti* fue determinado usando los métodos para la medición de la viabilidad adaptados en las Secciones 3.2.1 y 3.2.2. Para ello se empleó un inhibidor selectivo de las HDACs de Clase I y II, la Tricostatina A (TSA).

En la Figura 3.12 se muestra el efecto de la TSA sobre la viabilidad parasitaria de TTy de *M. corti*, determinado mediante el ensayo de reducción de la resazurina para 3 y 6 días de incubación. Se puede observar que la TSA no produjo un efecto estadísticamente significativo en la viabilidad de los TTy de *M. corti* a los 3 días de incubación, para ninguna de las concentraciones ensayadas (Figura 3.12A). Sin embargo, a los 6 días de incubación la TSA produjo una disminución estadísticamente significativa en la viabilidad de los parásitos tratados en comparación con los no

tratados (DMSO1%). Los porcentajes de viabilidad determinados para los parásitos tratados con la TSA a los 6 días de incubación fueron de: 61,8% para 1 µM ($p \leq 0,0001$), 58,9% para 10 µM ($p \leq 0,0001$) y 58,4% para 20 µM ($p \leq 0,0001$) (Figura 3.12B). Como controles se utilizaron TTy incubados en: el vehículo de la droga (DMSO 1%; control negativo), praziquantel en diferentes concentraciones (PZQ; droga control) y TTy pretratados con etanol al 70% (EtOH70%) por 30 min (control positivo) (Figura 3.12).

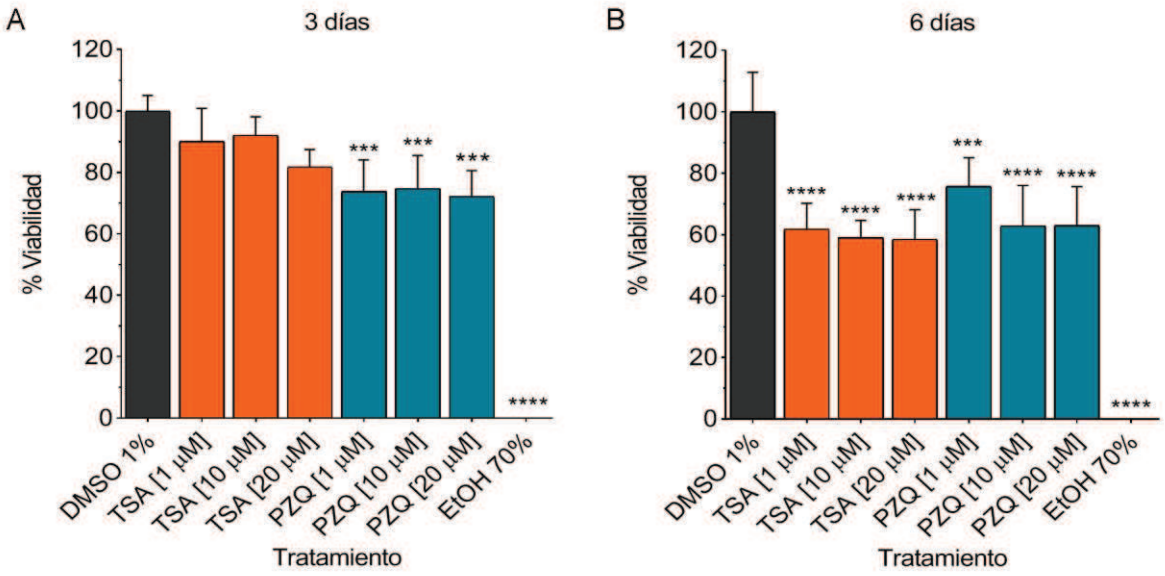


Figura 3.12. Efecto de la Tricostatina A (TSA) sobre la viabilidad de tetratiridios (TTy) de *Mesocestoides corti* determinado mediante el ensayo de reducción de la resazurina (o Alamar Blue®). Se muestran los porcentajes de viabilidad parasitaria, determinados mediante el ensayo de reducción de la resazurina, para TTy de *M. corti* tratados con TSA a concentraciones de 1, 10 y 20 µM a los (A) 3 y (B) 6 días de incubación. Las viabilidades parasitarias se determinaron para tres réplicas biológicas independientes, cada una por triplicado. Como controles se utilizaron TTy incubados en: el vehículo de la droga (DMSO 1%; control negativo), praziquantel (PZQ; droga control) y TTy pretratados con etanol al 70% (EtOH70%) por 30 min (control positivo). En todas las barras, las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican aquellas concentraciones que mostraron diferencias estadísticas significativas en la viabilidad parasitaria; en comparación con el control (DMSO 1%), usando el análisis de las varianzas (ANOVA) de dos vías (***, $p \leq 0,001$; ****, $p \leq 0,0001$).

Al analizar el efecto de la TSA sobre la viabilidad parasitaria de TTy de *M. corti*, mediante el ensayo de movilidad parasitaria, se obtuvieron resultados similares. En la Figura 3.13 se muestra el efecto de la TSA sobre la viabilidad parasitaria, como índice de motilidad relativa (IMR), para 3 y

6 días de incubación. Se puede observar que, a los 3 días de incubación, la TSA no produjo un efecto estadísticamente significativo en la viabilidad de los TTy de *M. corti* para las concentraciones de 2 y 10 µM. Solo se observó una disminución estadísticamente significativa en la viabilidad parasitaria en los TTy tratados con 20 µM de TSA (IMR = 0.81; p ≤ 0,05) (Figura 3.13A). Sin embargo, a los 6 días de incubación la TSA produjo una disminución estadísticamente significativa en la viabilidad de los parásitos tratados en comparación con los no tratados (DMSO1%). Los índices de motilidad relativa determinados para los parásitos tratados con la TSA a los 6 días de incubación fueron de: 0,43 para 1 µM (p <0,0001), 0,55 para 10 µM (p ≤ 0,0001) y 0,37 para 20 µM (p ≤ 0,0001) (Figura 3.13B). Como controles se utilizaron TTy incubados en: el vehículo de la droga (DMSO 1%; control negativo), praziquantel en diferentes concentraciones (PZQ; droga control) y TTy pretratados con etanol al 70% (EtOH70%) por 30 min (control positivo) (Figura 3.13).

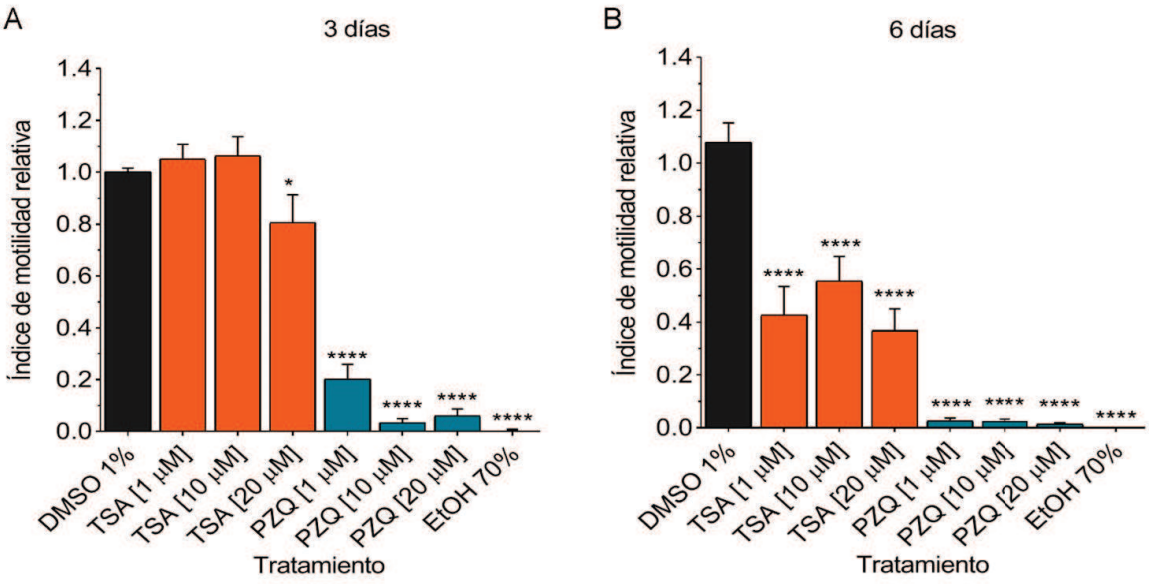


Figura 3.13. Efecto de la Tricostatina A (TSA) sobre la viabilidad de tetratiridios (TTy) de *Mesocestoides corti*, determinado mediante el ensayo de motilidad parasitaria. Se muestran los índices de motilidad relativa, determinados mediante el ensayo de motilidad parasitaria, para TTy de *M. corti* tratados con TSA a concentraciones de 1, 10 y 20 µM a los (A) 3 y (B) 6 días de incubación. Los índices de motilidad relativa se determinaron para tres réplicas biológicas independientes, cada una por triplicado. Como controles se utilizaron TTy incubados en: el vehículo de la droga (DMSO 1%; control negativo), praziquantel (PZQ; droga control) y TTy pretratados con etanol al 70% (EtOH70%) por 30 min (control positivo). En todas las barras, las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican aquellas concentraciones que mostraron diferencias estadísticas significativas en la viabilidad parasitaria; en comparación con el control

(DMSO 1%), usando el análisis de las varianzas (ANOVA) de dos vías (*, p ≤ 0,05; ***, p ≤ 0,001; ****, p ≤ 0,0001).

3.2.4. La Tricostatina A produce alteraciones en la morfología parasitaria de *Mesocestoides corti*

Se realizaron inspecciones visuales de los cultivos parasitarios a fin de determinar si la TSA produce alteraciones en la morfología de los TTy de *M. corti*. En la Figura 3.14 se muestran las microfotografías de los TTy de *M. corti* incubados con TSA o el vehículo de la droga (DMSO 1%) a 3 y 6 días de incubación.

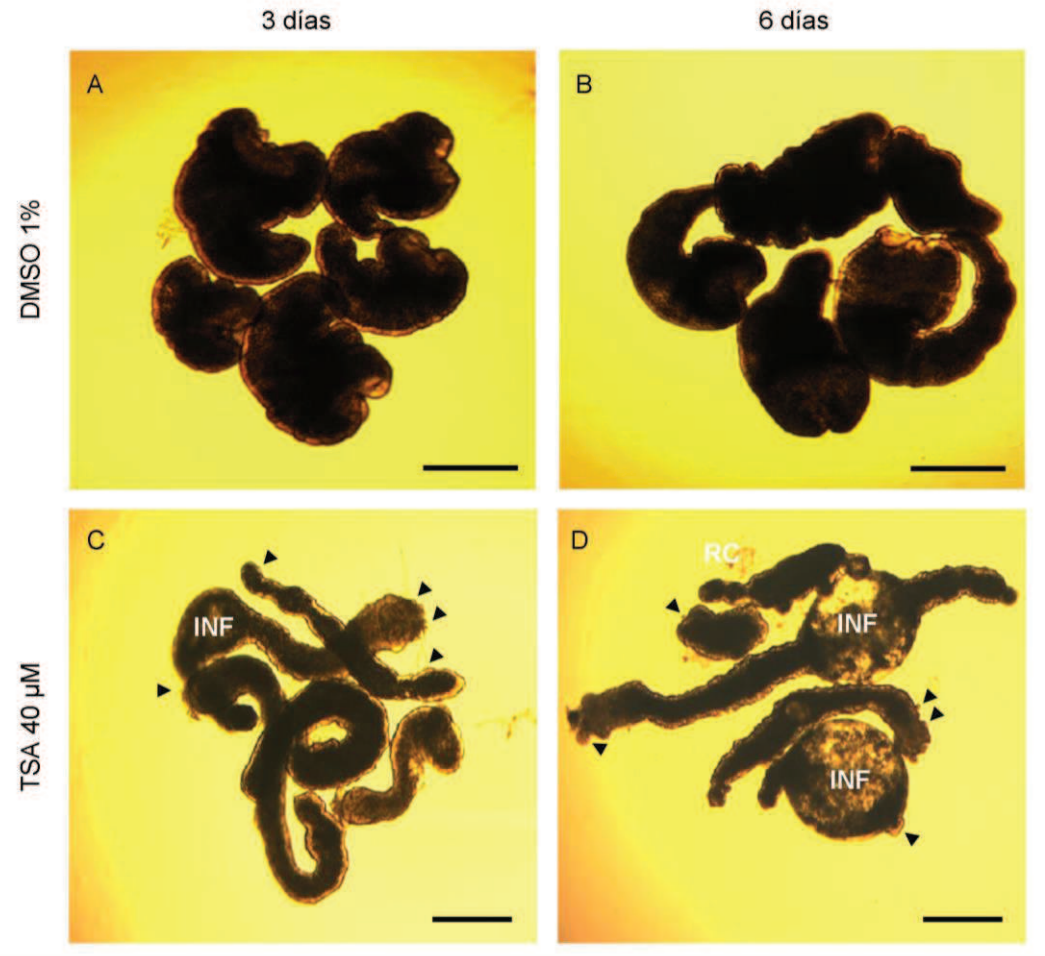


Figura 3.14. Efecto de la Tricostatina A (TSA) sobre la morfología parasitaria de tetratiridios (TTy) de *Mesocestoides corti* en cultivo *in vitro*. Se muestran las alteraciones en la morfología parasitaría producidas en los TTy de *M. corti* tratados con 40 µM de TSA a (C) 3 y (D) 6 días de incubación; en comparación con los parásitos incubados con el vehículo de la droga (DMSO 1%) a (A) 3 y (B) 6 días de incubación. Se puede observar la presencia de pequeñas ampollas en el tegumento parasitario (señaladas mediante flechas) e infiltraciones del medio de cultivo (IF) en los TTy de *M. corti* y restos celulares (RC) en el medio de cultivo.

Estas alteraciones fenotípicas fueron observadas para tres réplicas biológicas independientes. Las barras de escala representan 100 μm.

En la Figura 3.14 se puede observar que la TSA produjo alteraciones en el tegumento y en la morfología general de los TTy de *M corti*. Asimismo, se pueden apreciar la presencia de pequeñas ampollas a lo largo del tegumento parasitario (señaladas mediante flechas) y varias infiltraciones del medio de cultivo (INF) en diferentes zonas de los TTy de *M. corti*. Por último, también se observaron restos celulares en el medio de cultivo (RC). Estos efectos fueron observados para la TSA a la concentración de 40 μM, para 3 y 6 días de incubación (Figura 3.14C y Figura 3.14D, respectivamente). En cambio, no se observaron alteraciones fenotípicas apreciables en los TTy de *M. corti* incubados con DMSO1% (control negativo) a los 3 y 6 días de incubación (Figura 3.14A y Figura 3.14B, respectivamente).

3.2.5 La Tricostatina A inhibe fuertemente la desacetilación de proteínas en *Mesocestoides corti*

En la Sección 3.2.4 se demostró que la TSA produce una disminución de la viabilidad parasitaria y alteraciones en el tegumento en los TTy de *M. corti*. A fin de determinar si los efectos observados con la TSA se producen efectivamente debido a la inhibición de las enzimas HDACs de cestodos, se evaluaron los cambios en los niveles de acetilación de las proteínas de TTy de *M. corti* mediante la técnica de Western Blot semicuantitativa. Para esta técnica se utilizaron los anticuerpos contra la histona H4 tetra-acetilada y contra los grupos de lisina acetiladas presentes en las proteínas (pan-lisina acetilada).

En la Figura 3.15 se muestra el efecto de la TSA sobre los niveles de acetilación de proteínas provenientes de homogenatos de TTy de *M. corti* tratados durante 3 días. En la Figura 3.15A se muestran las bandas detectadas con los anticuerpos anti Histona H4 tetra-acetilada y anti pan-lisina acetilada. Asimismo, en el panel inferior se muestra el gel teñido con azul de Coomassie, empleado como control de carga. El cual indica que la aparición de dichas bandas en presencia del inhibidor no se debe a diferencias en la concentración de proteínas sembradas. En los homogenatos de TTy de *M. corti* tratados con TSA, a concentraciones de 20 μM y 40 μM, se detectó una banda intensa con un peso molecular relativo de 15 kDa (tamaño esperado para la Histona H4 de *M. corti*) cuando se empleó el anticuerpo anti Histona H4 tetra-acetilada. Por otra parte, cuando se empleó el anticuerpo anti pan-lisina acetilada se detectaron dos bandas muy próximas e intensas con pesos moleculares relativos de 15 kDa y 16 kDa. Con este anticuerpo

además se detectó una banda adicional con un peso molecular relativo de 50 kDa. Estas bandas no se detectaron, o se observaron menos intensas, en los homogenatos de TTy tratados con PZQ, ALB o el vehículo de la droga (DMSO 1%), usados como controles.

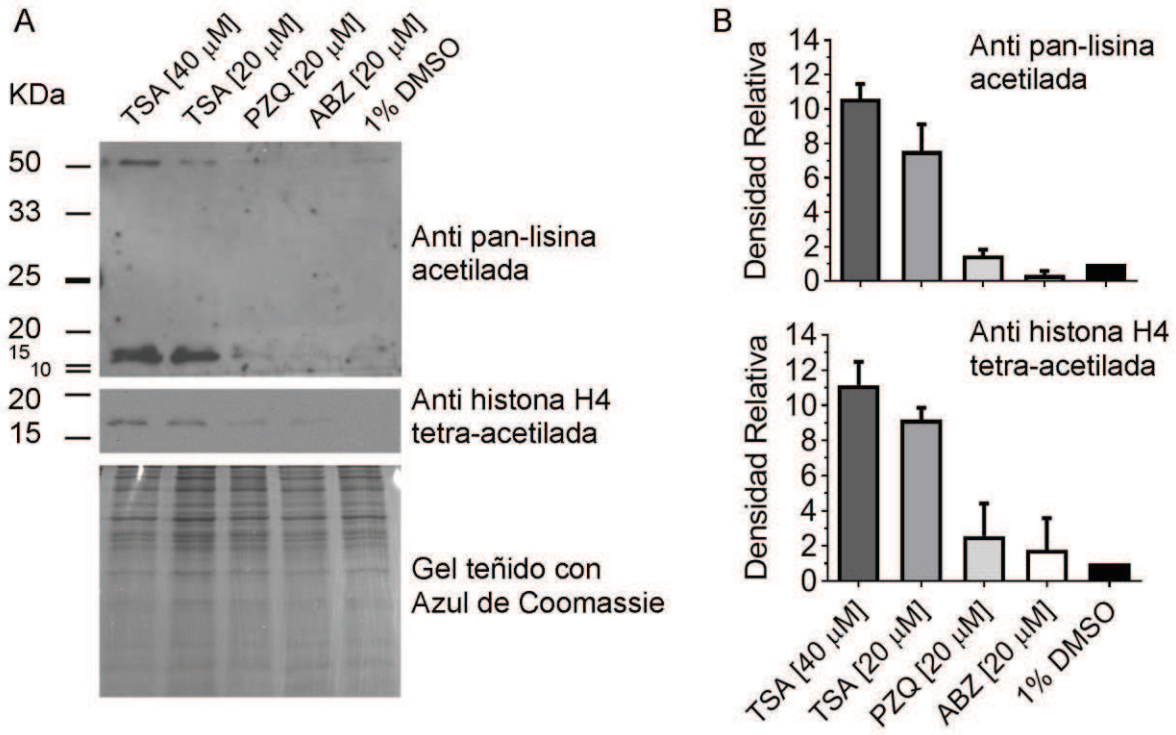


Figura 3.15. Efecto de la Tricostatina A (TSA) sobre los niveles de acetilación de proteínas provenientes de homogenatos de tetratiridios (TTy) de *Mesocestoides corti*. Hiperacetilación de proteínas en homogenatos de TTy de *M. corti* incubados con TSA. (A) Western Blot para los homogenatos de TTy de *M. corti* tratados con 20 μM o 40 μM de TSA, o el vehículo de la droga (DMSO 1%) durante tres días, utilizando los anticuerpos anti Histona H4 tetra-acetilada y anti pan-lisina acetilada. Como controles negativos se utilizaron praziquantel (PZQ) y albendazol (ABZ) a 20 μM. En el panel inferior se muestra el gel teñido con azul de Coomassie. (B) Análisis de densitometría de los Western Blot. Las muestras se normalizaron de acuerdo a la cantidad total de proteínas de la misma muestra, observada mediante tinción con azul de Coomassie. Los resultados se expresan como el cambio en la densidad relativa en comparación con el grupo control (DMSO 1%), establecido como 1. Las barras de error representan la desviación estándar.

Por otra parte, en la Figura 3.15B se muestra la densidad relativa, determinada mediante análisis de densitometría, para todas las bandas detectadas con los anticuerpos anti-Histona H4 acetilada y anti-pan lisina acetilada; empleado en los Western Blot de la Figura 3.15A. Para ambos anticuerpos se determinó que la densidad relativa de las bandas observadas en los homogenatos de TTy de *M. corti* tratados con TSA fueron aproximadamente 8 y 10 veces mayores que las

detectadas en los homogenatos de los parásitos del grupo control (DMSO 1%), para las concentraciones de TSA de 20 μM y 40 μM; respectivamente. Por último, las densidades relativas de las bandas observadas en los homogenatos de TTy de *M. corti* tratados con PZQ o ABZ fueron mucho menores que las observadas en los homogenatos de TTy de *M. corti* tratados con TSA, para ambos anticuerpos; siendo las densidades relativas de estas bandas iguales o apenas mayores que las detectadas en los homogenatos de los parásitos del grupo control.

En la Figura 3.16 se muestra el efecto de la TSA sobre los niveles de acetilación de proteínas provenientes de homogenatos de TTy de *M. corti* tratados durante 6 días. En la Figura 3.16A se muestran las bandas detectadas con los anticuerpos anti Histona H4 tetra-acetilada y anti pan-lisina acetilada. Asimismo, en el panel inferior se muestra el gel teñido con azul de Coomassie, empleado como control de carga. En los homogenatos de TTy de *M. corti* tratados con TSA, a concentraciones de 20 μM y 40 μM, se detectó una banda intensa con un peso molecular relativo de 15 kDa cuando se empleó el anticuerpo anti Histona H4 tetra-acetilada. Estas bandas fueron menos intensas que las detectadas para homogenatos de TTy de *M. corti* tratados durante 3 días (Figura 3.15). Por otra parte, cuando se empleó el anticuerpo anti pan-lisina acetilada solo se detectó una banda intensa con un peso molecular relativo de 15 kDa. La banda adicional (con un peso molecular relativo de 50 kDa) observada en homogenatos de TTy de *M. corti* tratados durante 3 días (Figura 3.15) no fue detectada en los homogenatos de parásitos tratados durante 6 días (Figura 3.16A). Por último, estas bandas no se detectaron en homogenatos de TTy de *M. corti* tratados con PZQ, ALB o el vehículo de la droga (DMSO 1%).

En la Figura 3.16B se muestra la densidad relativa, determinada mediante análisis de densitometría, para todas las bandas detectadas con los anticuerpos anti-Histona H4 acetilada y anti-pan lisina acetilada; empleado en los Western Blot de la Figura 3.16A. Para ambos anticuerpos se determinó que la densidad relativa de las bandas observadas en los homogenatos de TTy de *M. corti* tratados con TSA fueron de aproximadamente 3 y 4 veces mayores que las detectadas en los homogenatos de los parásitos del grupo control (DMSO 1%), para las concentraciones de la TSA de 20 μM y 40 μM. Por último, las densidades relativas de las bandas observadas en los homogenatos de TTy de *M. corti* tratados con PZQ o ABZ fueron menores que las observadas en los homogenatos de TTy de *M. corti* tratados con TSA, para ambos anticuerpos; siendo las densidades relativas de estas bandas iguales que las detectadas en los homogenatos de los parásitos del grupo control.

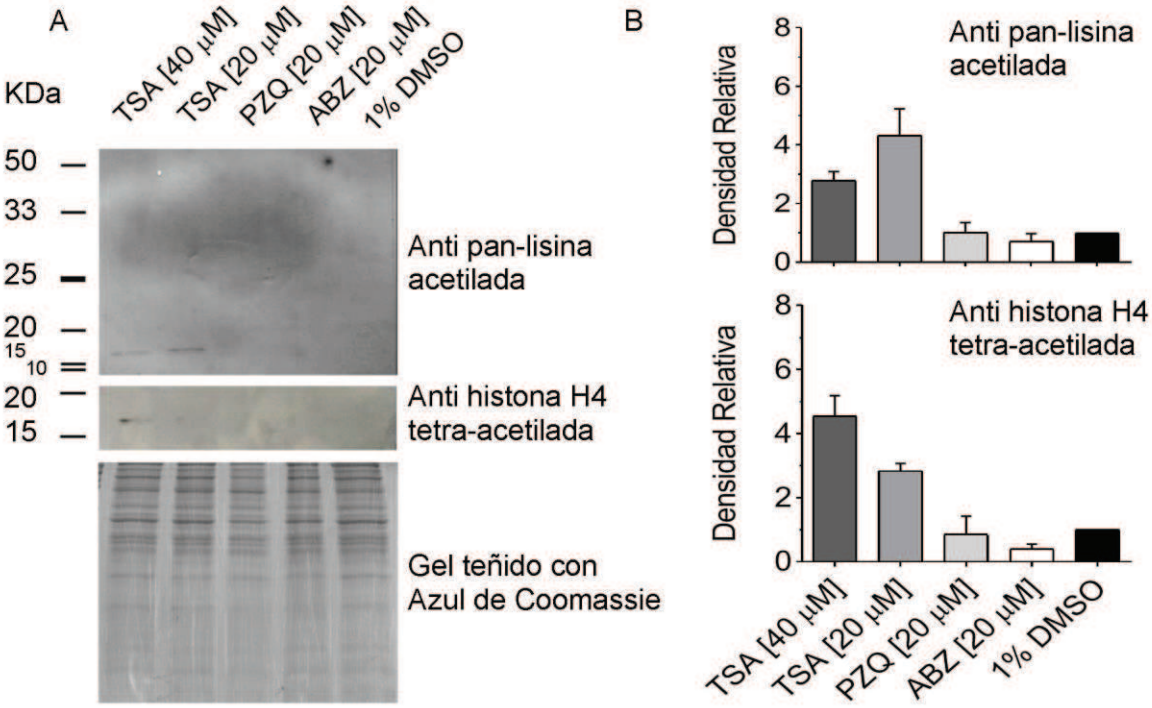


Figura 3.16. Efecto de la Tricostatina A (TSA) sobre los niveles de acetilación de proteínas provenientes de homogenatos de tetratiridios (TTy) de *Mesocestoides corti*. Hiperacetilación de proteínas en homogenatos de TTy de *M. corti* incubados con TSA. (A) Western Blot para los homogenatos de TTy de *M. corti* tratados con 20 μM o 40 μM de TSA, o el vehículo de la droga (DMSO 1%), durante seis días utilizando los anticuerpos anti Histona H4 tetra-acetilada y anti pan-lisina acetilada. Como controles negativos se utilizaron praziquantel (PZQ) y albendazol (ABZ) a 20 μM. En el panel inferior se muestra el gel teñido con azul de Coomassie. (B) Análisis de densitometría de los Western Blot. Las muestras se normalizaron de acuerdo a la cantidad total de proteínas de la misma muestra, observada mediante tinción con azul de Coomassie. Los resultados se expresan como el cambio en la densidad relativa en comparación con el grupo control (DMSO 1%), establecido como 1. Las barras de error representan la desviación estándar.

3.3. Evaluación del efecto antihelmíntico de un alto número de inhibidores de las enzimas HDACs

En esta sección se muestra el perfil antihelmíntico de un alto número de inhibidores de las enzimas HDACs (HDACi), determinado mediante el cultivo *in vitro* de TTy de *M. corti*. Inicialmente se evaluaron 12 HDACi; que incluían 4 HDACi contra las HDACs de Clase I, 4 HDACi contra las HDACs de Clase II y 4 HDACi contra las Sirtuinas (o HDACs de Clase III, Anexo A1.5). En base a los resultados obtenidos con la evaluación inicial, se evaluaron 21 compuestos adicionales. Estos compuestos corresponden a análogos estructurales de los HDACi que tuvieron efecto en la viabilidad parasitaria. En total se evaluaron 33 compuestos con actividad conocida contra las

enzimas HDACs (Tabla 2.3). Todas las mediciones fueron llevadas a cabo mediante el ensayo de viabilidad por medición de la motilidad parasitaria. Este método tiene la ventaja de permitir un sistema de medición continuo y no invasivo de la viabilidad parasitaria, a diferencia de lo que sucede con el método de viabilidad por reducción de la resazurina. Estas características permiten evaluar la viabilidad parasitaria sobre una misma placa durante todo el periodo de ensayo. Además, este método tiene un menor costo, lo cual es un factor muy importante a considerar en la evaluación de un alto número de compuestos. Por todos estos motivos, este método fue elegido para la determinación del efecto antihelmíntico de los inhibidores de las HDACs.

3.3.1. Evaluación del efecto antihelmíntico de inhibidores de las HDACs de Clase I sobre *Mesocestoides corti*

En la Figura 3.17 se muestra el efecto antihelmíntico de los inhibidores de las HDACs de Clase I: Entinostat, TH65, TH71 y TH120, determinado mediante el ensayo de motilidad parasitaria, utilizando el cultivo *in vitro* de TTy de *M. corti*. La viabilidad parasitaria se muestra como índice de motilidad relativa (IMR) en función de los días de incubación.

El Entinostat (también conocido como SNDX-275 y MS-275) es un compuesto de la clase benzamida que actúa como inhibidor selectivo de las HDACs de Clase I (Hu y col., 2003). Este compuesto produjo una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad parasitaria de los TTy de *M. corti;* con respecto a los parásitos del grupo control incubados con el vehículo de la droga (DMSO1%), a los 2 días de tratamiento para la concentración de 50 μM (IMR = 0,87; $p \leq 0,0001$); a los 3 días de tratamiento para 20 μM (IMR = 0,46; $p \leq 0,0001$) y a los 4 días de tratamiento para 2 μM (IMR = 0,42; $p \leq 0,0001$) (Figura 3.17A). Asimismo, el Entinostat produjo la muerte de los TTy de *M. corti* tratados (disminución del IMR por debajo de 0,05) a los 5 días de tratamiento para la concentración de 50 μM ($p \leq 0,0001$), y a los 6 días de tratamiento para 20 μM y 2 μM ($p \leq 0,0001$ para ambas concentraciones) (Figura 3.17A). Por otra parte, también se realizaron inspecciones visuales de los TTy de *M. corti* tratados con el Entinostat a diferentes concentraciones y días de tratamiento. El Entinostat produjo alteraciones en el tegumento parasitario y pérdida de la morfología general de los TTy de *M. corti* tratados a todas las concentraciones ensayadas (Figura 3.18). Se puede observar un alargamiento en los parásitos tratados, la presencia de pequeñas ampollas a lo largo del tegumento parasitario (señaladas mediante flechas) y varias infiltraciones del medio de cultivo (INF) en diferentes zonas de los TTy de *M. corti*. Por último, también se observaron restos celulares (RC) en el medio de cultivo. Estas

alteraciones fenotípicas no se observaron para los parásitos incubados con DMSO 1% (control negativo), incluso hasta los 9 días de incubación.

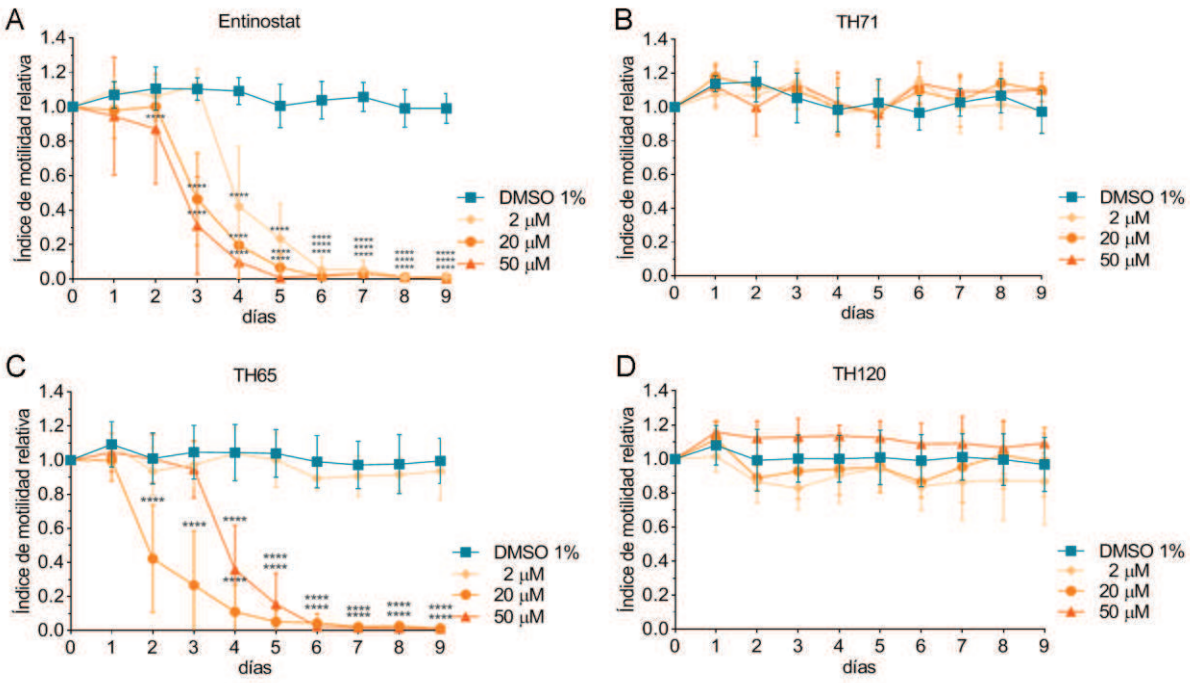


Figura 3.17. Efecto de los inhibidores de las HDACs de Clase I: Entinostat, TH65, TH71 y TH120 sobe la viabilidad parasitaria de tetratiridios (TTy) de *Mesocestoides corti*. Se muestran los índices de motilidad relativos determinados para los inhibidores de las HDACs de Clase I: (A) Entinostat, (B) TH71, (C) TH65 y (D) TH120 a las concentraciones de 2, 20 y 50 µM, o con el vehículo de la droga (DMSO 1%), a distintos tiempos de incubación. Los índices de motilidad relativos se determinaron para tres réplicas biológicas independientes, cada una por cuadruplicado. Las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican aquellas concentraciones que mostraron diferencias estadísticas significativas en la viabilidad parasitaria, en comparación con el control negativo (DMSO 1%), usando el análisis de las varianzas (ANOVA) de dos vías (****, $p \leq 0{,}0001$).

Por otra parte, los HDACi: TH71, TH65 y TH120 son compuestos derivados del 3-aminobenzohidroxamato que fueron diseñados como inhibidores selectivos de la HDAC8 del parásito *S. mansoni* (Heimburg y col., 2016). De acuerdo a los sustituyentes incorporados, estos HDACi presentan un efecto selectivo sobre esta enzima por sobre las otras HDACs de *S. mansoni* y por sobre la HDAC8 de *H. sapiens* (Heimburg y col., 2016). En la Figura 3.17C se puede observar que el TH65 produjo una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad parasitaria de los TTy de *M. corti*; con respecto a los parásitos del grupo control incubados con el vehículo de la

droga (DMSO1%), a los 2 días de tratamiento para la concentración de 20 μM (IMR= 0,42; p ≤ 0,0001) y a los 4 días de tratamiento para 50 μM (IMR= 0,36; p ≤ 0,0001). No se observó una diferencia estadísticamente significativa en la viabilidad parasitaria de los TTy de *M. corti* tratados con el TH65 a la concentración de 2 μM; con respecto a los parásitos del grupo control, incluso hasta los 9 días de tratamiento (Figura 3.17C). Por otra parte, el TH65 produjo la muerte de los TTy de *M. corti* tratados (disminución del IMR por debajo del 0,05) a los 6 días de tratamiento para las concentraciones de 50 μM y 20 μM (p ≤ 0,0001 para ambas concentraciones) (Figura 3.17C). También se realizaron inspecciones visuales de los TTy de *M. corti* tratados con el TH65 a diferentes concentraciones y días de tratamiento. El TH5 produjo alteraciones en el tegumento parasitario y pérdida de la morfología general de los TTy de *M. corti* tratados a las concentraciones de 20 μM y 50 μM (Figura 3.19). Se puede observar un alargamiento en los parásitos tratados, la presencia de pequeñas ampollas a lo largo del tegumento parasitario (señaladas mediante flechas) y varias infiltraciones del medio de cultivo (INF) en diferentes zonas de los TTy de *M. corti*. Asimismo, también se observaron restos celulares (RC) en el medio de cultivo. No se observaron alteraciones fenotípicas apreciables para los parásitos del grupo control (incubados con DMSO 1%) y en los parásitos incubados con el TH65 a la concentración de 2 μM, incluso hasta los 9 días de incubación (Figura 3.19). Asimismo, se pudo observar la formación de pequeños cristales en el medio de cultivo cuando se empleó el TH65 a 50 μM (señalados mediante círculos), esto podría explicar el menor efecto observado en los TTy de *M. corti* incubados con el TH65 a 50 μM para los primeros días de tratamiento.

Por último, los otros inhibidores de las HDACs de Clase I: TH71 y TH120 no mostraron un efecto estadísticamente significativo en la viabilidad parasitaria de los TTy de *M. corti* para ninguna de las concentraciones y tiempos ensayados (Figura 3.17B y Figura 3.17D, respectivamente).

Entinostat

50 µM | 20 µM | 2 µM | DMSO 1%

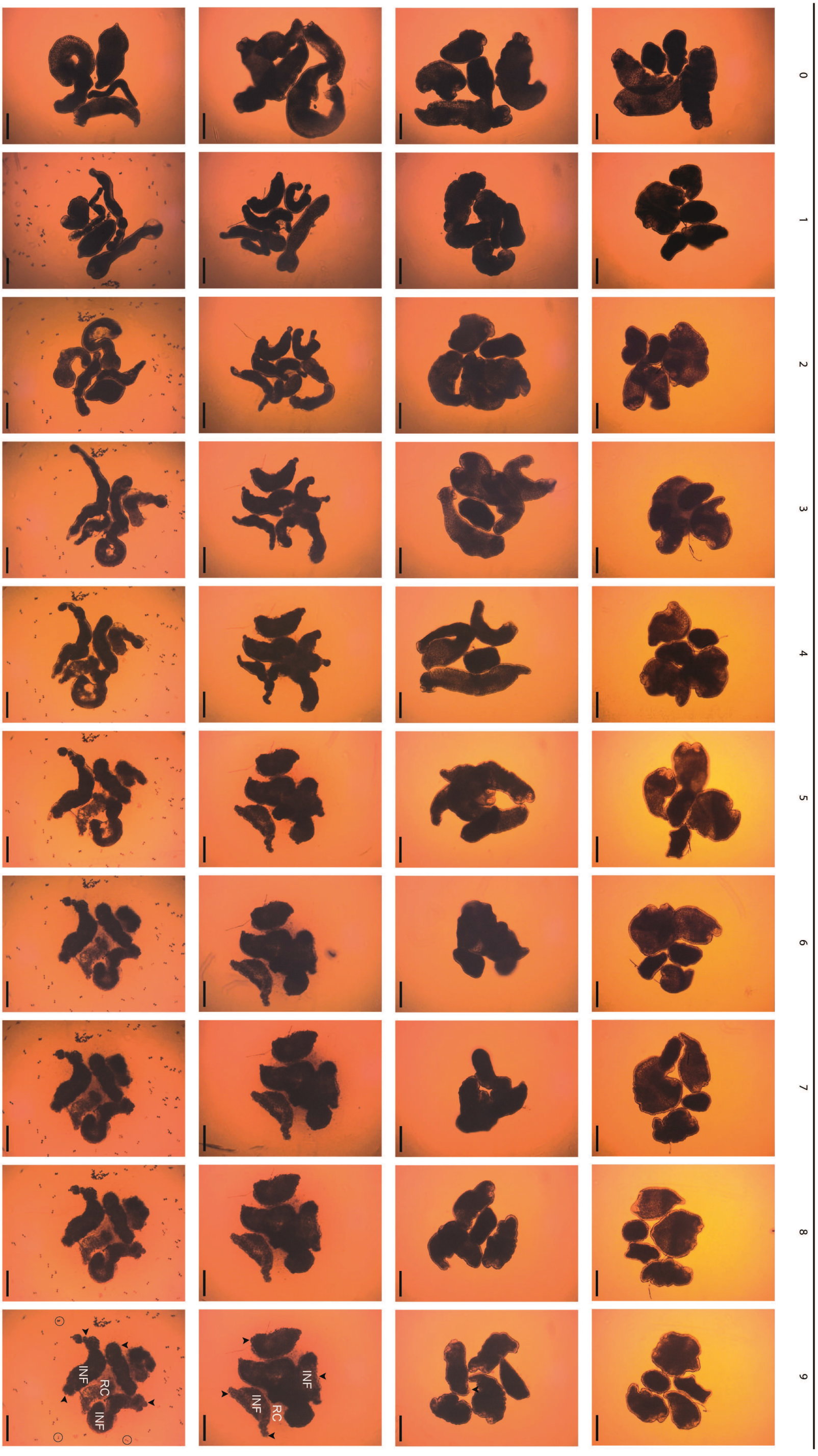
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9

días

Figura 3.18. Efecto del inhibidor de las HDACs de Clase I Entinostat sobre la morfología parasitaria de tetratiridios (TTy) de *Mesocestoides corti*. Se muestran las alteraciones en la morfología parasitaria producidas en TTy de *M. corti* tratados con 2 μM, 20 μM y 50 μM de Entinostat para diferentes días de tratamiento, en comparación con los parásitos del grupo control incubados con el vehículo de la droga (DMSO 1%). Se puede observar la presencia de pequeñas ampollas en el tegumento parasitario (señaladas mediante flechas), infiltraciones del medio de cultivo (INF) y restos celulares (RC) en el medio de cultivo. Todas las alteraciones fenotípicas antes mencionadas se encuentran señalizadas en las microfotografías correspondientes a los 9 días de incubación. Estas alteraciones fenotípicas fueron observadas para tres réplicas biológicas independientes. Las barras de escala representan 100 μm.

TH65

50 µM | 20 µM | 2 µM | DMSO 1%



0 1 2 3 4 5 6 7 8 9

días

Figura 3.19. Efecto del inhibidor de las HDACs de Clase I TH65 sobre la morfología parasitaria de tetratiridios (TTy) de *Mesocestoides corti*. Se muestran las alteraciones en la morfología parasitaria producidas en TTy de *M. corti* tratados con 2 μM, 20 μM y 50 μM de TH65 para diferentes días de tratamiento, en comparación con los parásitos del grupo control incubados con el vehículo de la droga (DMSO 1%). Se puede observar la presencia de pequeñas ampollas en el tegumento parasitario (señaladas mediante flechas), infiltraciones del medio de cultivo (INF) y restos celulares (RC) en el medio de cultivo. Todas las alteraciones fenotípicas antes mencionadas se encuentran señalizadas en las microfotografías correspondientes a los 9 días de incubación. Estas alteraciones fenotípicas fueron observadas para tres réplicas biológicas independientes. Las barras de escala representan 100 μm.

3.3.2. Evaluación del efecto antihelmíntico de inhibidores de las HDACs de Clase II sobre *Mesocestoides corti*

En la Figura 3.20 se muestra el efecto antihelmíntico de los inhibidores de las HDACs de Clase II: JS16, JS26, KK16 y ST36, determinado mediante el ensayo de motilidad parasitaria utilizando el cultivo *in vitro* de TTy de *M. corti*. La viabilidad parasitaria se muestra como índice de motilidad relativa (IMR) en función de los días de incubación. Ninguno de los inhibidores de las HDACs de Clase II ensayados mostraron un efecto estadísticamente significativo en la viabilidad parasitaria de los TTy de *M. corti;* ni alteraciones fenotípicas apreciables, incluso hasta los 9 días de tratamiento para ninguna de las concentraciones ensayadas (Figura 3.20).

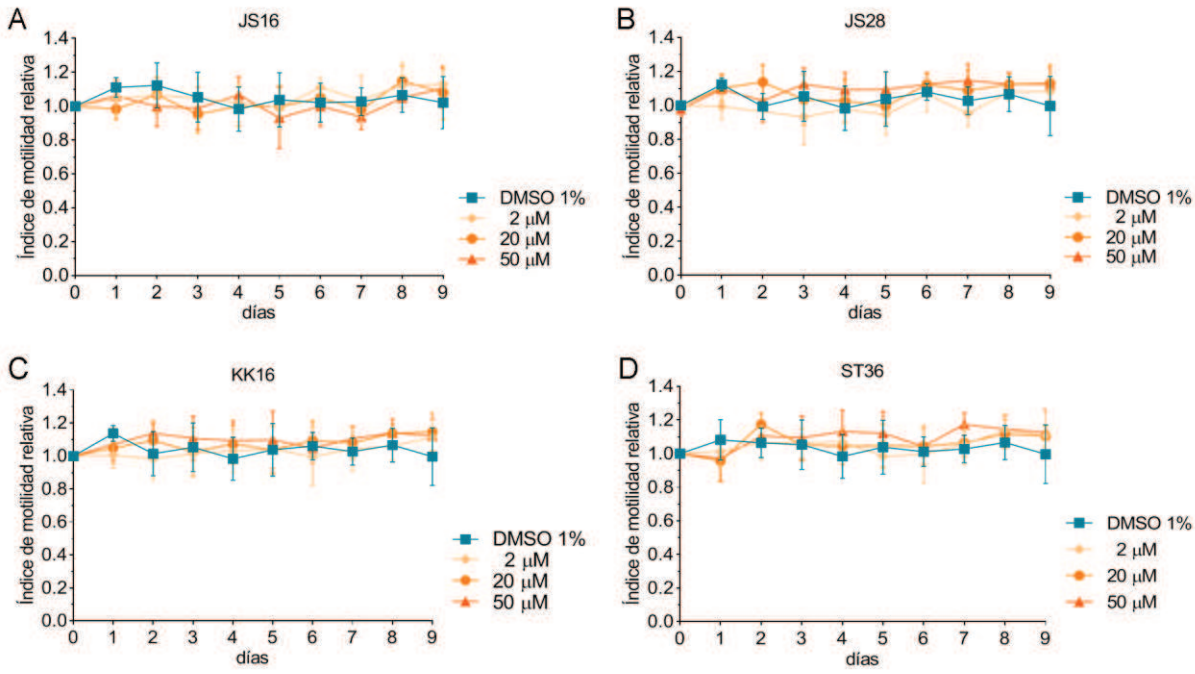


Figura 3.20. Efecto de los inhibidores de las HDACs de Clase II: JS26, KK16 y ST36, sobe la viabilidad parasitaria de tetratiridios (TTy) de *Mesocestoides corti*. Se muestran los índices de motilidad relativos determinados para los inhibidores de las HDACs de Clase II: (A) JS16, (B) JS26, (C) KK16 y (D) ST36 a las concentraciones de 2, 20 y 50 µM, o con el vehículo de la droga (DMSO 1%) en función de los días de tratamiento. Los índices de motilidad relativos se determinaron para tres réplicas biológicas independientes, cada una por cuadruplicado. Las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican aquellas concentraciones que mostraron diferencias estadísticas significativas en la viabilidad parasitaria, en comparación con el control negativo (DMSO 1%), usando el análisis de las varianzas (ANOVA) de dos vías.

3.3.3. Evaluación del efecto antihelmíntico de inhibidores de las Sirtuinas (o HDACs de Clase III) sobre *Mesocestoides corti*

Si bien este trabajo se propone el estudio de las HDACs de cestodos, específicamente las pertenecientes a las Clases I y II, como potenciales blancos farmacológicos, también se evaluaron 4 inhibidores de las Sirtuinas (o HDACS de Clase III; ver Anexo A5): Mz25, Mz236, Ex527 y AGK2. En la Figura 3.21 se muestra el efecto antihelmíntico de los inhibidores de las Sirtuinas, determinado mediante el ensayo de motilidad parasitaria utilizando el cultivo *in vitro* de TTy de *M. corti*. La viabilidad parasitaria se muestra como índice de motilidad relativa (IMR) en función de los días de incubación.

El Mz25 (también conocido como SirReal2) es un compuesto de la clase aminotiazol que actúa como inhibidor selectivo de la Sirt2 (Rumpf y col., 2015). Este compuesto produjo una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad parasitaria de los TTy de *M. corti,* con respecto los parásitos del grupo control incubados con DMSO1%, a los 2 días de tratamiento para la concentración de 50 µM (IMR = 0,85; $p \leq 0,0001$) y a los 5 días de tratamiento para 20 µM (IMR = 0,82; $p \leq 0,0001$). No se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la viabilidad parasitaria de los TTy de *M. corti* tratados con Mz25 a la concentración de 2 µM, con respecto a los parásitos del grupo control, incluso hasta los 9 días de tratamiento (Figura 3.21A). Por otra parte, el Mz25 produjo la muerte de los TTy de *M. corti* tratados (disminución del IMR por debajo del 0,05) a los 6 días de tratamiento para la concentración de 50 µM ($p \leq 0,0001$) y una disminución del 91% de la viabilidad parasitaria a los 9 días de tratamiento para 20 µM (IMR = 0.09; $p \leq 0,0001$) (Figura 3.21A). También se realizaron inspecciones visuales de los TTy de *M. corti* tratados con el Mz25 a diferentes concentraciones y días de tratamiento. El Mz25 produjo alteraciones en el tegumento parasitario y pérdida de la morfología general en los TTy de *M. corti* tratados a las concentraciones de 20 µM y 50 µM (Figura 3.22). Se puede apreciar una gran alteración del tegumento parasitario en los TTy de *M. corti* tratados con el Mz25, junto con la presencia extensiones (EXT) en el tegumento en forma de agujas. Asimismo, se pueden observar un alargamiento en los parásitos tratados, la presencia de pequeñas ampollas a lo largo del tegumento parasitario (señaladas mediante flechas) y varias infiltraciones del medio de cultivo (INF) en diferentes zonas de los TTy de *M. corti*. Por último, también se observaron restos celulares (RC) en el medio de cultivo. No se observaron alteraciones fenotípicas apreciables para los parásitos del grupo control (incubados con DMSO 1%) ni para los parásitos incubados con el Mz25 a la concentración de 2 µM, incluso hasta los 9 días de incubación (Figura 3.22). Por último,

los otros inhibidores de las Sirtuinas: Mz236 (Schiedel y col., 2016), Ex527 (Napper y col., 2005) y AGK2 (Outeiro y col., 2007) no mostraron un efecto estadísticamente significativo en la viabilidad parasitaria ni alteraciones en la morfología en los TTy de *M. corti,* incluso hasta los 9 días de tratamiento para ninguna las concentraciones ensayadas (Figura 3.21B, Figura 3.21C y Figura 3.21D, respectivamente).

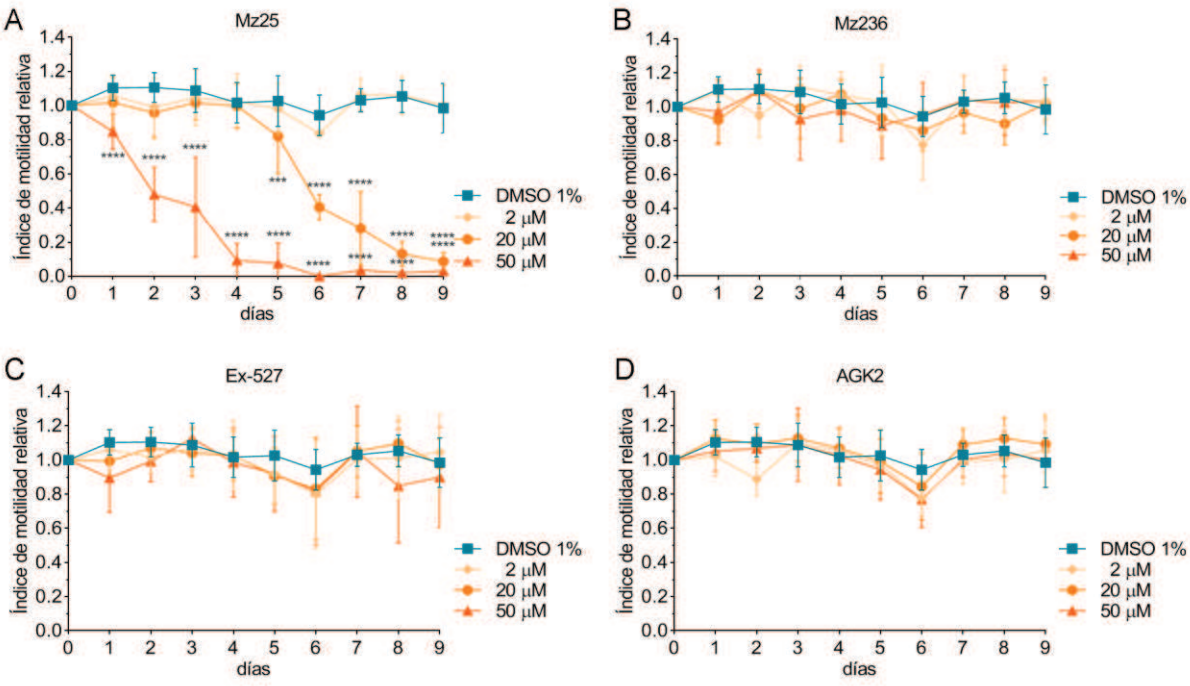


Figura 3.21. Efecto de los inhibidores de las Sirtuinas (o HDACs de Clase III): Mz25, Mz236, Ex527 y AGK2 sobre la viabilidad parasitaria de tetratiridios (TTy) de *Mesocestoides corti*. Se muestran los índices de motilidad relativos determinados para los inhibidores de las Sirtuinas: (A) Mz25, (B) Mz236, (C) Ex527 y (D) AGK2 a las concentraciones de 2, 20 y 50 µM, o con el vehículo de la droga (DMSO 1%) en función de los días de tratamiento. Los índices de motilidad relativos se determinaron para tres réplicas biológicas independientes, cada una por cuadruplicado. Las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican aquellas concentraciones que mostraron diferencias estadísticas significativas en la viabilidad parasitaria, en comparación con el control negativo (DMSO 1%), usando el análisis de las varianzas (ANOVA) de dos vías (***, $p \leq 0{,}001$; ****, $p \leq 0{,}0001$).

Mz25

50 µM | 20 µM | 2 µM | DMSO 1%

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9

días

EXT
EXT
EXT
RC
RC
EXT
EXT
INF

Figura 3.22. Efecto del inhibidor de las Sirtuinas Mz25 sobre la morfología parasitaria de tetratiridios (TTy) de *Mesocestoides corti*. Se muestran las alteraciones en la morfología parasitaria producidas en los TTy de *M. corti* tratados con 2 μM, 20 μM y 50 μM de Mz25 a distintos días de tratamiento, en comparación con los parásitos del grupo control incubados con el vehículo de la droga (DMSO 1%). Se puede observar una gran alteración del tegumento parasitario con formación de estructuras con forma de agujas (EXT) a lo largo del cuerpo de los TTy de *M. corti*, la presencia de pequeñas ampollas en el tegumento parasitario (señaladas mediante flechas), infiltraciones del medio de cultivo (INF) y restos celulares (RC) en el medio de cultivo. Todas las alteraciones fenotípicas antes mencionadas se encuentran señalizadas en las microfotografías correspondientes a los 9 días de incubación. Estas alteraciones fenotípicas fueron observadas para tres réplicas biológicas independientes. Las barras de escala representan 100 μm.

3.3.4. Controles empleados

Para la determinación del perfil de actividad antihelmíntica de los HDACi sobre la viabilidad parasitaria, utilizando el cultivo *in vitro* de TTy de *M. corti*, se utilizaron varios controles. En la Figura 3.23 se muestra la viabilidad parasitaria, como el índice de motilidad relativa (IMR), en función de los días de incubación para los controles empleados.

Se puede observar que los TTy de *M. corti* incubados con DMSO al 1%, usados como control negativo del ensayo, presentan IMR cercanos a 1 durante los 9 días de incubación (Figura 3.23A). Asimismo, los TTy de *M. corti* incubados con DMSO al 1% no presentaron alteraciones morfológicas apreciables, incluso hasta los 9 días de incubación. Como control positivo del ensayo se emplearon TTy de *M. corti* tratados con Etanol al 70% (EtOH 70%) durante 30 minutos. Los IMR obtenidos para estos parásitos fueron de aproximadamente 0 durante todo el ensayo (Figura 3.23A). Además de los controles negativo y positivo, también se utilizaron PZQ, ALB y TSA a concentraciones de 20 μM como drogas de control. En la Figura 3.23A se puede observar que la TSA produjo una disminución estadísticamente significativa en los TTy tratados, con un IMR de 0.10 ($p \leq 0,001$) a los 9 días postratamiento. Cabe destacar que los resultados obtenidos para la TSA son comparables a los obtenidos previamente, en los ensayos de validación de las HDACs como blancos farmacológicos (Sección 3.2.3). Por otra parte, el PZQ produjo una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad parasitaria al día 1 de tratamiento (IMR = 0,45, $p \leq 0,001$) al igual que el ABZ (IMR = 0,75, $p \leq 0,01$).

Por último, se determinó el efecto del DMSO sobre la viabilidad parasitaria de los TTy de *M. corti* a lo largo de los días de incubación. Si bien el efecto del DMSO se había determinado antes, para el ensayo de viabilidad por mediciones de motilidad parasitaria, solo había sido determinado hasta los 6 días de incubación. Sin embargo, debido a que en la determinación del perfil antihelmíntico de los HDACi se emplean incubaciones de hasta 9 días, este parámetro fue nuevamente determinado. En la Figura 3.23B se muestran los IMR en función de los días de incubación para los TTy de *M. corti* incubados en medio solo o medio con DMSO al 1%. No se observaron diferencias estadísticamente significativas para los parásitos incubados con DMSO 1%, incluso hasta los 9 días de incubación, comparado con los TTy de *M. corti* incubados en medio solo (Figura 3.23B). Finalmente, cabe aclarar que no se observó viraje del medio en los parásitos incubados con medio Mco-RPMI 1640 con rojo fenol hasta los 9 días de incubación.

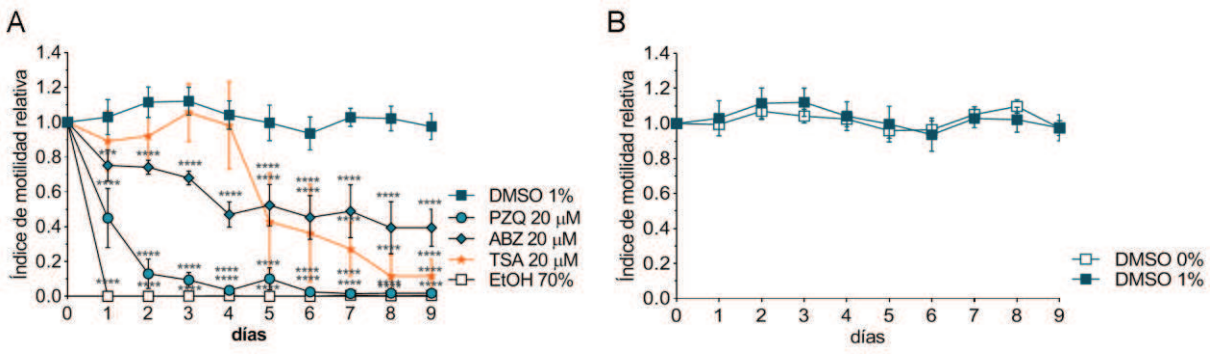


Figura 3.23. Controles utilizados en la determinación de perfil de actividad antihelmíntica de los inhibidores de las HDACs sobre la viabilidad parasitaria de tetratiridios (TTy) de *Mesocestoides corti*. Se muestran los índices de motilidad relativa determinados para (A) los controles empleados y (B) el DMSO a distintos días de incubación. Los índices de motilidad relativos se determinaron para tres réplicas biológicas independientes, cada una por cuadruplicado. Las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican aquellas concentraciones que mostraron diferencias estadísticas significativas en la viabilidad parasitaria, en comparación con el control negativo (DMSO 1%), usando el análisis de las varianzas (ANOVA) de dos vías (***, $p \leq 0,001$; ****, $p \leq 0,0001$).

3.3.5. Evaluación del efecto antihelmíntico de los compuestos derivados del 3-aminobenzohidroxamato (serie TH) sobre *Mesocestoides corti*

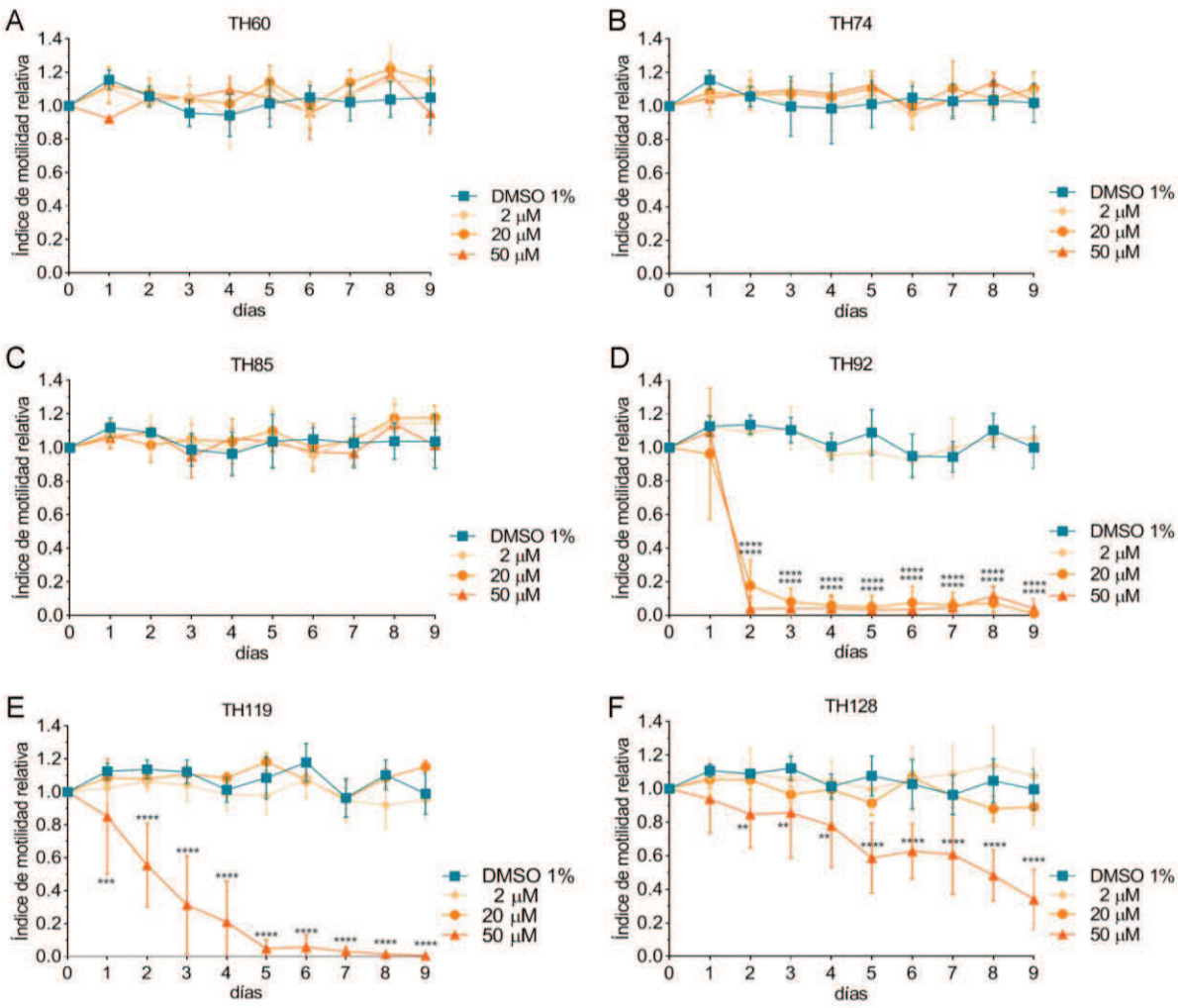
En la Sección 3.3.1 se evaluó el efecto antihelmíntico de los compuestos derivados del 3-aminobenzohidroxamato: TH71, TH65 y TH120. Estos compuestos pertenecen a una serie de compuestos diseñados racionalmente (serie TH), en base a la estructura tridimensional de la HDAC8 del parásito *S. mansoni,* como inhibidores selectivos de la SmpHDAC8 (Heimburg y col., 2016). Debido a que el compuesto TH65 mostró un potente efecto antihelmíntico (Figura 3.17C), se evaluaron otros compuestos de la serie TH. En la Figura 3.24 se muestra el efecto antihelmíntico de los HDACi de la serie TH: TH60, TH74, TH85, TH92, TH119; TH128, TH137, TH138, TH139 y TH143, determinado mediante el ensayo de motilidad parasitaria utilizando el cultivo *in vitro* de TTy de *M. corti*. La viabilidad parasitaria se muestra como índice de motilidad relativa (IMR) en función de los días de incubación.

El TH92 produjo una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad parasitaria de los TTy de *M. corti;* con respecto a los parásitos del grupo control incubados con el vehículo de la droga (DMSO1%), a los 2 días de tratamiento para las concentraciones de 20 µM (IMR = 0,19; $p \leq 0,0001$) y 50 µM (IMR = 0,04; $p \leq 0,0001$). No se observó una diferencia estadísticamente significativa en la viabilidad parasitaria de los TTy de *M. corti* tratados con TH92 a 2 µM, con

respecto a los parásitos del grupo control, incluso hasta los 9 días de tratamiento (Figura 3.24D). Asimismo, el TH92 produjo la muerte de los TTy de *M. corti* tratados (disminución del IMR por debajo de 0,05) a los 2 días de tratamiento para la concentración de 50 μM ($p \leq 0,0001$), y a los 3 días de tratamiento para 20 μM (Figura 3.24D). Por otra parte, también se realizaron inspecciones visuales de los TTy de *M. corti* tratados con el TH92 a diferentes concentraciones y días de tratamiento. El TH92 produjo alteraciones en el tegumento parasitario y pérdida de la morfología general en los TTy de *M. corti* tratados a las concentraciones de 20 μM y 50 μM (Figura 3.25). Se pueden apreciar un gran daño a lo largo de todo el tegumento, la presencia de pequeñas ampollas (señaladas mediante flechas) y varias infiltraciones del medio de cultivo (INF) en diferentes zonas de los TTy de *M. corti*. Por último, también se observaron restos celulares (RC) en el medio de cultivo. Estas alteraciones fenotípicas solo fueron observadas en los TTy de *M. corti* tratado con el TH92 a concentraciones de 20 μM y 50 μM, ya que no se observaron alteraciones fenotípicas apreciables para los parásitos del grupo control (incubados con DMSO 1%) y los parásitos incubados con el TH92 a 2 μM, hasta los 9 días de incubación (Figura 3.25).

Por otro lado, los HDACi de la serie TH: TH119, TH128, TH137, TH138, TH139 y TH143 produjeron una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad parasitaria de los TTy de *M. corti;* con respecto a los parásitos del grupo control incubados con el vehículo de la droga (DMSO1%): al día 1 postratamiento para el TH119 a la concentración de 50 μM (IMR = 0,85; $p \leq 0,001$) (Figura 3.24E); a los 2 días de tratamiento para el TH128 a la concentración de 50 μM (IMR = 0,85; $p \leq 0,01$) (Figura 3.24F); a los 3 días de tratamiento para el TH137 a la concentración de 50 μM (IMR = 0,69; $p \leq 0,05$) (Figura 3.24G); a los 3 días de tratamiento para el TH138 a la concentración de 50 μM (IMR = 0,83; $p \leq 0,001$) (Figura 3.24H); al día 1 de tratamiento para el TH139 a la concentración de 50 μM (IMR = 0,50; $p \leq 0,0001$) (Figura 3.4I) y a los 5 y 7 días de tratamiento para el TH143 a las concentraciones de 50 μM (IMR = 0,65; $p \leq 0,0001$) y 20 μM (IMR = 0,76; $p \leq 0,01$), respectivamente (Figura 3.24J). No se observó una diferencia estadísticamente significativa en la viabilidad parasitaria de los TTy de *M. corti* tratados con estos HDACi a las otras concentraciones ensayadas, con respecto a los parásitos del grupo control, incluso hasta los 9 días postratamiento (Figura 3.24). Asimismo, estos compuestos produjeron la muerte de los TTy de *M. corti* tratados (disminución del IMR por debajo de 0,05) a los 5 días de tratamiento para el TH119 a la concentración de 50 μM ($p \leq 0,0001$) (Figura 3.24E); a los 7 días de tratamiento para el TH138 a la concentración de 50 μM ($p \leq 0,0001$) (Figura 3.24H) y a los 6 días de tratamiento para el TH139 a la concentración de 50 μM ($p \leq 0,0001$) (Figura 3.24I). Por otra parte, también se realizaron inspecciones visuales de los TTy de *M. corti* tratados con estos HDACi de la serie TH a diferentes concentraciones y días de tratamiento. Todos estos compuestos produjeron

alteraciones en el tegumento parasitario y pérdida de la morfología general de los TTy de *M. corti* tratados a la concentración de 50 μM; y en algunos casos como el TH143 incluso a la concentración de 20 μM (Figura 3.26). Con este compuesto se pudo observar un gran daño a lo largo de todo el tegumento, la presencia de pequeñas ampollas (señaladas mediante flechas) y varias infiltraciones del medio de cultivo (INF) en diferentes zonas de los TTy de *M. corti*. Por último, también se observaron restos celulares (RC) en el medio de cultivo. Estas alteraciones fenotípicas solo fueron observadas en los TTy de *M. corti* tratado con el TH143 a las concentraciones de 20 μM y 50 μM, ya que no se observaron alteraciones fenotípicas apreciables para los parásitos del grupo control (incubados con DMSO 1%) y los parásitos incubados con el TH143 a 2 μM, incluso hasta los 9 días de incubación (Figura 3.26). Asimismo, con los compuestos TH119, TH128, TH137, TH138 y TH139 observaron alteraciones fenotípicas similares (no se muestran). Por último, los otros inhibidores de las HDACs de la serie TH: TH60, TH74 y TH85 no mostraron un efecto estadísticamente significativo en la viabilidad parasitaria de los TTy de *M. corti;* incluso hasta los 9 días postratamiento para ninguna de las concentraciones ensayadas, Figura 3.24A, Figura 3.24B y Figura 3.24C; respectivamente.



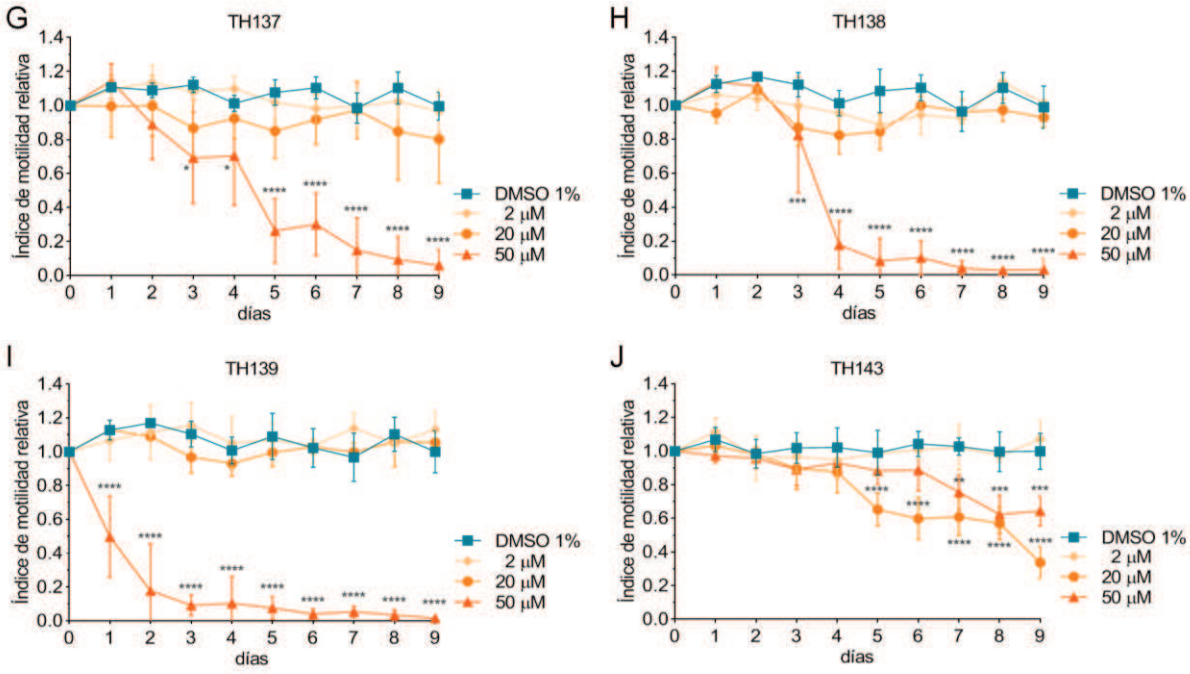


Figura 3.24. Efecto de los inhibidores de las HDACs de la serie TH sobe la viabilidad parasitaria de tetratiridios (TTy) de *Mesocestoides corti*. Se muestran los índices de motilidad relativos determinados para los inhibidores de las HDACs de la serie TH: (A) TH60, (B) TH74, (C) TH85, (D) TH92, (E) TH119, (F) TH128, (G) TH137, (H) TH138, (I) TH139 y (J) TH143, a las concentraciones de 2, 20 y 50 µM, o con el vehículo de la droga (DMSO 1%). Los índices de motilidad relativos se determinaron para tres réplicas biológicas independientes, cada una por cuadruplicado. Las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican aquellas concentraciones que mostraron diferencias estadísticas significativas en la viabilidad parasitaria, en comparación con el control negativo (DMSO 1%), usando el análisis de las varianzas (ANOVA) de dos vías (*, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$; ****, $p \leq 0,0001$).

TH92

50 µM | 20 µM | 2 µM | DMSO 1%

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9

días

RC

INF

Figura 3.25. Efecto del inhibidor de las HDACs de la serie TH TH92 sobre la morfología parasitaria de tetratiridios (TTy) de *Mesocestoides corti*. Se muestran las alteraciones en la morfología parasitaria producidas en los TTy de *M. corti* tratados con 2 μM, 20 μM y 50 μM de TH92; para diferentes días de tratamiento, en comparación con los parásitos del grupo control, incubados con el vehículo de la droga (DMSO 1%). Se puede observar la presencia de pequeñas ampollas en el tegumento parasitario (señaladas mediante flechas), infiltraciones del medio de cultivo (INF) y restos celulares (RC) en el medio de cultivo. Todas las alteraciones fenotípicas antes mencionadas se encuentran señalizadas en las microfotografías correspondientes a los 9 días de incubación. Estas alteraciones fenotípicas fueron observadas para tres réplicas biológicas independientes. Las barras de escala representan 100 μm.

TH143

50 µM | 20 µM | 2 µM | DMSO 1%

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9

días

INF

INF

RC

INF

INF

RC

Figura 3.26. Efecto del inhibidor de las HDACs de la serie TH TH143 sobre la morfología parasitaria de tetratiridios (TTy) de *Mesocestoides corti*. Se muestran las alteraciones en la morfología parasitaria producidas en los TTy de *M. corti* tratados con 2 μM, 20 μM y 50 μM de TH143; para diferentes días de tratamiento, en comparación con los parásitos del grupo control, incubados con el vehículo de la droga (DMSO 1%). Se puede observar la presencia de pequeñas ampollas en el tegumento parasitario (señaladas mediante flechas), infiltraciones del medio de cultivo (INF) y restos celulares (RC) en el medio de cultivo. Todas las alteraciones fenotípicas antes mencionadas se encuentran señalizadas en las microfotografías correspondientes a los 9 días de incubación. Estas alteraciones fenotípicas fueron observadas para tres réplicas biológicas independientes. Las barras de escala representan 100 μm.

3.3.6. Evaluación del efecto antihelmíntico de los compuestos serie EG, TB, Pz y SD sobre *Mesocestoides corti*

Además de los compuestos de la serie TH, se evaluaron otros compuestos cedidos por el Dr. Wolfgang Sippl. Estos compuestos corresponden a HDACi de las series EG (EG13, EG18, EG20 y EG32), TB (TB87 y TB98), Pz (Pz5, Pz28 y Pz31) y el compuesto SD14. Todos estos compuestos fueron también diseñados como inhibidores selectivos de la SmpHDAC8.

En la Figura 3.27 se muestra el efecto antihelmíntico de los inhibidores de las HDACS de la serie EG: EG13, EG18, EG20 y EG32; determinado mediante el ensayo de motilidad parasitaria, utilizando el cultivo *in vitro* de TTy de *M. corti*. La viabilidad parasitaria se muestra como índice de motilidad relativa (IMR) en función de los días de incubación.

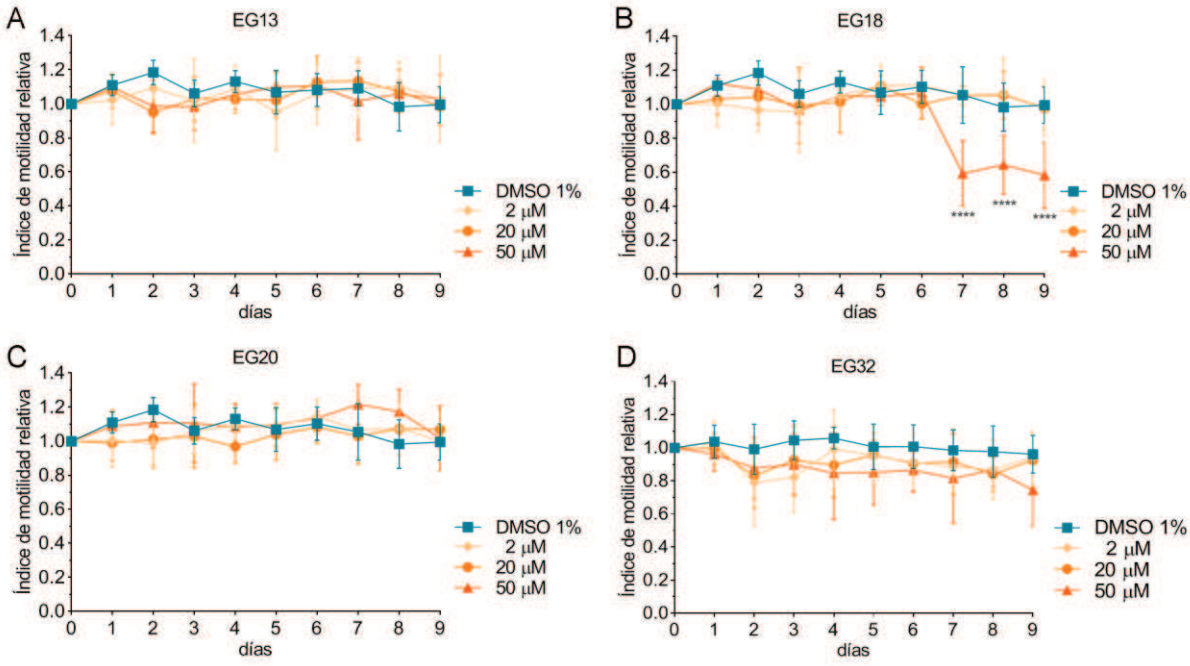


Figura 3.27. Efecto de los inhibidores de las HDACs de la serie EG sobe la viabilidad parasitaria de tetratiridios (TTy) de *Mesocestoides corti*. Se muestran los índices de motilidad relativa determinados para los inhibidores de las HDACs de la serie EG: (A) EG13, (B) EG18, (C) EG20 y (D) EG32, a las concentraciones de 2, 20 y 50 µM, o con el vehículo de la droga (DMSO 1%). Los índices de motilidad relativos se determinaron para tres réplicas biológicas independientes, cada una por cuadruplicado. Las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican aquellas concentraciones que mostraron diferencias estadísticas significativas en la viabilidad parasitaria, en comparación con el control negativo (DMSO 1%), usando el análisis de las varianzas (ANOVA) de dos vías (****, $p \leq 0{,}0001$).

El compuesto EG18 produjo una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad parasitaria de los TTy de *M. corti;* con respecto los parásitos del grupo control incubados con DMSO1%, a los 7 días de tratamiento para la concentración de 50 μM (IMR = 0,59; p ≤ 0,0001). No se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la viabilidad parasitaria de los TTy de *M. corti* tratados con el EG18 a la concentración de 2 μM y 20 μM; con respecto a los parásitos del grupo control, incluso hasta los 9 días de tratamiento (Figura 3.27B). Ninguno de los compuestos de la serie EG produjo la muerte de los TTy de *M. corti* tratados (disminución del IMR por debajo del 0,05) para ninguna de las concentraciones ensayadas, incluso hasta a los 9 días de incubación.

Por otra parte, en la Figura 3.28 se muestra el efecto antihelmíntico de los inhibidores de las HDACS de la serie TB: TB56, TB87 y TB98; determinado mediante el ensayo de motilidad parasitaria, utilizando el cultivo *in vitro* de TTy de *M. corti*. La viabilidad parasitaria se muestra como índice de motilidad relativa (IMR) en función de los días de incubación. Los compuestos TB56, TB87 y TB98 produjeron una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad parasitaria de los TTy de *M. corti;* con respecto a los parásitos del grupo control incubados con el vehículo de la droga (DMSO1%): a los 4 días de tratamiento para el TB56 a la concentración de 50 μM (IMR = 0,73; p ≤ 0,001) (Figura 3.28A); a los 5 días de tratamiento para el TB87 a la concentración de 50 μM (IMR = 0,77; p ≤ 0,05) (Figura 3.28B) y a los 3 días de tratamiento para el TB98 a la concentración de 50 μM (IMR = 0,77; p ≤ 0,0001) (Figura 3.28C). Asimismo, ninguno de estos compuestos produjo la muerte de los TTy de *M. corti* tratados (disminución del IMR por debajo de 0,05) para todas las concentraciones ensayadas, hasta los 9 días de incubación. Por otra parte, también se realizaron inspecciones visuales de los TTy de *M. corti* tratados con estos HDACi de la serie TB a diferentes concentraciones y días de tratamiento. Todos estos compuestos produjeron alteraciones en el tegumento parasitario y pérdida de la morfología general de los TTy de *M. corti* tratados a la concentración de 50 μM (no se muestran). Se pudieron observar daño a lo largo de todo el tegumento, la presencia de pequeñas ampollas y varias infiltraciones del medio de cultivo en diferentes zonas de los TTy de *M. corti*. Por último, también se observaron restos celulares en el medio de cultivo. Estas alteraciones fenotípicas solo fueron observadas a la concentración de 50 μM, ya que no se observaron alteraciones fenotípicas apreciables para los parásitos del grupo control (incubados con DMSO 1%) y los parásitos incubados con estos compuestos a 2 μM y 20 μM, incluso hasta los 9 días de incubación.

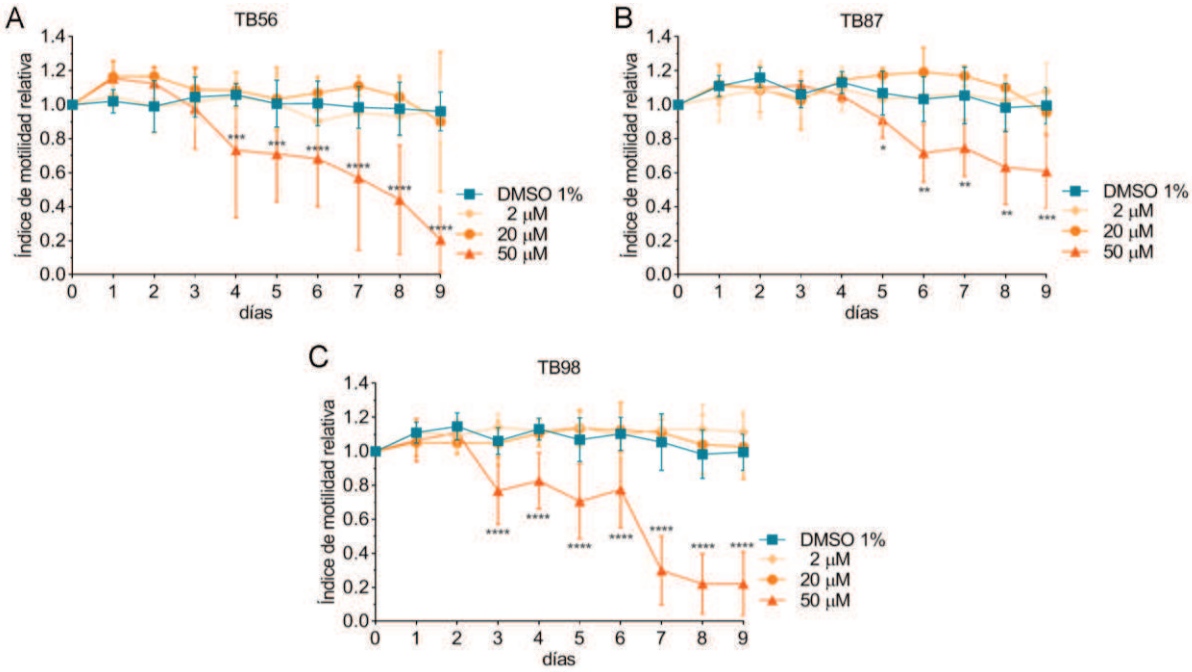


Figura 3.28. Efecto de los inhibidores de las HDACs de la serie TB sobe la viabilidad parasitaria de tetratiridios (TTy) de *Mesocestoides corti*. Se muestran los índices de motilidad relativa determinados para los inhibidores de las HDACs de la serie TB: (A) TB56, (B) TB87 y (C) TB98, a las concentraciones de 2, 20 y 50 µM, o con el vehículo de la droga (DMSO 1%). Los índices de motilidad relativos se determinaron para tres réplicas biológicas independientes, cada una por cuadruplicado. Las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican aquellas concentraciones que mostraron diferencias estadísticas significativas en la viabilidad parasitaria, en comparación con el control negativo (DMSO 1%), usando el análisis de las varianzas (ANOVA) de dos vías (*, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$; ****, $p \leq 0,0001$).

Por último, en la Figura 3.29 se muestra el efecto antihelmíntico de los inhibidores de las HDACS de la serie Pz: Pz5, Pz28, Pz31 y el compuesto SD14; determinado mediante el ensayo de motilidad parasitaria, utilizando el cultivo *in vitro* de TTy de *M. corti*. La viabilidad parasitaria se muestra como índice de motilidad relativa (IMR) en función de los días de incubación. El compuesto Pz31 produjo una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad parasitaria de los TTy de *M. corti;* con respecto a los parásitos del grupo control incubados con el vehículo de la droga (DMSO1%): al día 1 de tratamiento para la concentración de 50 µM (IMR = 0,89; $p \leq 0,01$) (Figura 3.29C). No se observó una disminución estadísticamente significativa para los otros compuestos (Pz5, Pz28 y SD14) en ninguna de las concentraciones ensayadas, ni para el Pz31 a las concentraciones de 2 µM y 20 µM; incluso hasta los 9 días de incubación. Por otra parte, ninguno de estos compuestos produjo la muerte de los TTy de *M. corti* tratados (disminución del IMR por debajo de 0,05) para todas las concentraciones ensayadas, incluso hasta

los 9 días de incubación. Por último, se realizaron inspecciones visuales de los TTy de *M. corti* tratados con estos HDACi de la serie Pz a diferentes concentraciones y días de tratamiento. El Pz31 produjo alteraciones en el tegumento parasitario y pérdida de la morfología general de los TTy de *M. corti* tratados a la concentración de 50 μM. Se pudieron observar daño a lo largo de todo el tegumento, la presencia de pequeñas ampollas y varias infiltraciones del medio de cultivo en diferentes zonas de los TTy de *M. corti* (no se muestran). Por último, también se observaron restos celulares en el medio de cultivo. Estas alteraciones fenotípicas solo fueron observadas en los TTy de *M. corti* tratados con Pz31 a la concentración de 50 μM, ya que no se observaron alteraciones fenotípicas apreciables para los parásitos del grupo control (incubados con DMSO 1%) ni en los parásitos incubados con los otros compuestos o con el Pz31 a 2 μM y 20 μM, incluso hasta los 9 días de incubación.

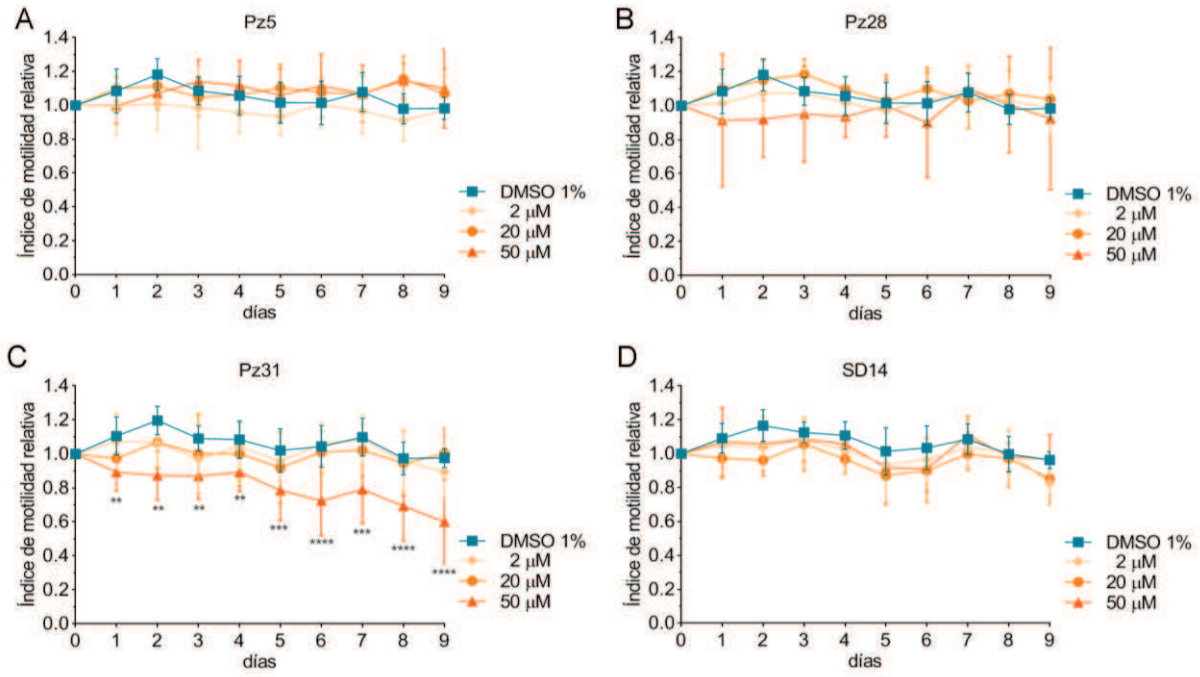


Figura 3.29. Efecto de los inhibidores de las HDACs de la serie Pz y el compuesto SD14 sobe la viabilidad parasitaria de tetratiridios (TTy) de *Mesocestoides corti*. Se muestran los índices de motilidad relativa determinados para los inhibidores de las HDACs de la serie Pz: (A) Pz5, (B) Pz28, (C) Pz31 y el compuesto (D) SD14, a las concentraciones de 2, 20 y 50 μM, o con el vehículo de la droga (DMSO 1%). Los índices de motilidad relativos se determinaron para tres réplicas biológicas independientes, cada una por cuadruplicado. Las barras de error representan la desviación estándar y los asteriscos indican aquellas concentraciones que mostraron diferencias estadísticas significativas en la viabilidad parasitaria, en comparación con el control negativo (DMSO 1%), usando el análisis de las varianzas (ANOVA) de dos vías (**, $p \leq 0{,}01$; ***, $p \leq 0{,}001$; ****, $p \leq 0{,}0001$).

3.4. Caracterización del efecto farmacológico de los inhibidores seleccionados de las enzimas HDACs y Sirtuinas

En esta sección se muestra la caracterización del efecto de los inhibidores seleccionados de las enzimas HDACs (HDACi) y Sirtuinas. Los compuestos fueron seleccionados en base al efecto antihelmíntico, determinado mediante el cultivo *in vitro* de TTy de *M. corti* (Sección 3.3), usando como criterio para la selección aquellos compuestos que hayan producido la muerte de los TTy de *M. corti* tratados (disminución del IMR por debajo de 0,05), para concentraciones iguales o menores que 20 μM antes de los 9 días de incubación. Los compuestos seleccionados fueron: TH65, TH92, Entinostat y Mz25.

3.4.1. Los compuestos seleccionados presentan un efecto antihelmíntico dependiente de la dosis

Se determinó el efecto dosis-respuesta de los compuestos seleccionados: TH65, TH92, Entinostat y Mz25, y del ABZ (usado como droga control) sobre la viabilidad parasitaria, empleando el cultivo *in vitro* del parásito *M. corti*. La viabilidad parasitaria se determinó a los 6 días de incubación, para cada compuesto, mediante el ensayo de movilidad y se muestra como el índice de motilidad relativa (IMR) en función de la concentración.

En la Figura 3.30 se muestra el efecto antihelmíntico en función de la concentración, junto con la estructura química, para los compuestos: TH65 (Figura 3.30A), TH95 (Figura 3.30B), Entinostat (Figura 3.30C), Mz25 (Figura 3.30D) y ABZ (Figura 3.30E). Se puede observar que todos los compuestos ensayados mostraron un efecto dosis-respuesta dependiente de la concentración. Este ensayo nos proporciona información relevante; ya que a partir de los datos obtenidos se pueden determinar, mediante análisis de regresión no lineal, los valores de la concentración inhibitoria media (IC_{50}) para cada compuesto. El IC_{50} es una medida de la potencia de un compuesto para inhibir determinada función biológica o proceso bioquímico. Este parámetro nos permite comparar la potencia de los compuestos en un mismo ensayo. Los valores determinados de IC_{50} fueron de 11,57 ± 0,51 μM para el TH65 (Figura 3.30A), de 6,30 ± 0,41 μM para el TH92 (Figura 3.30B), de 1,08 ± 0,08 μM para el Entinostat (Figura 3.30C), de 16 ± 2 μM para el Mz25 (Figura 3.30D) y de 21 ± 1 μM para el ABZ. Estos valores, junto con los valores de los parámetros concentración inhibitoria 25% (IC_{25}) y concentración inhibitoria 90% (IC_{90}), para cada compuesto,

se encuentran resumidos en la Tabla 3.4. Estos últimos parámetros se emplearon en ensayos posteriores, por lo que serán explicados en sus secciones correspondientes.

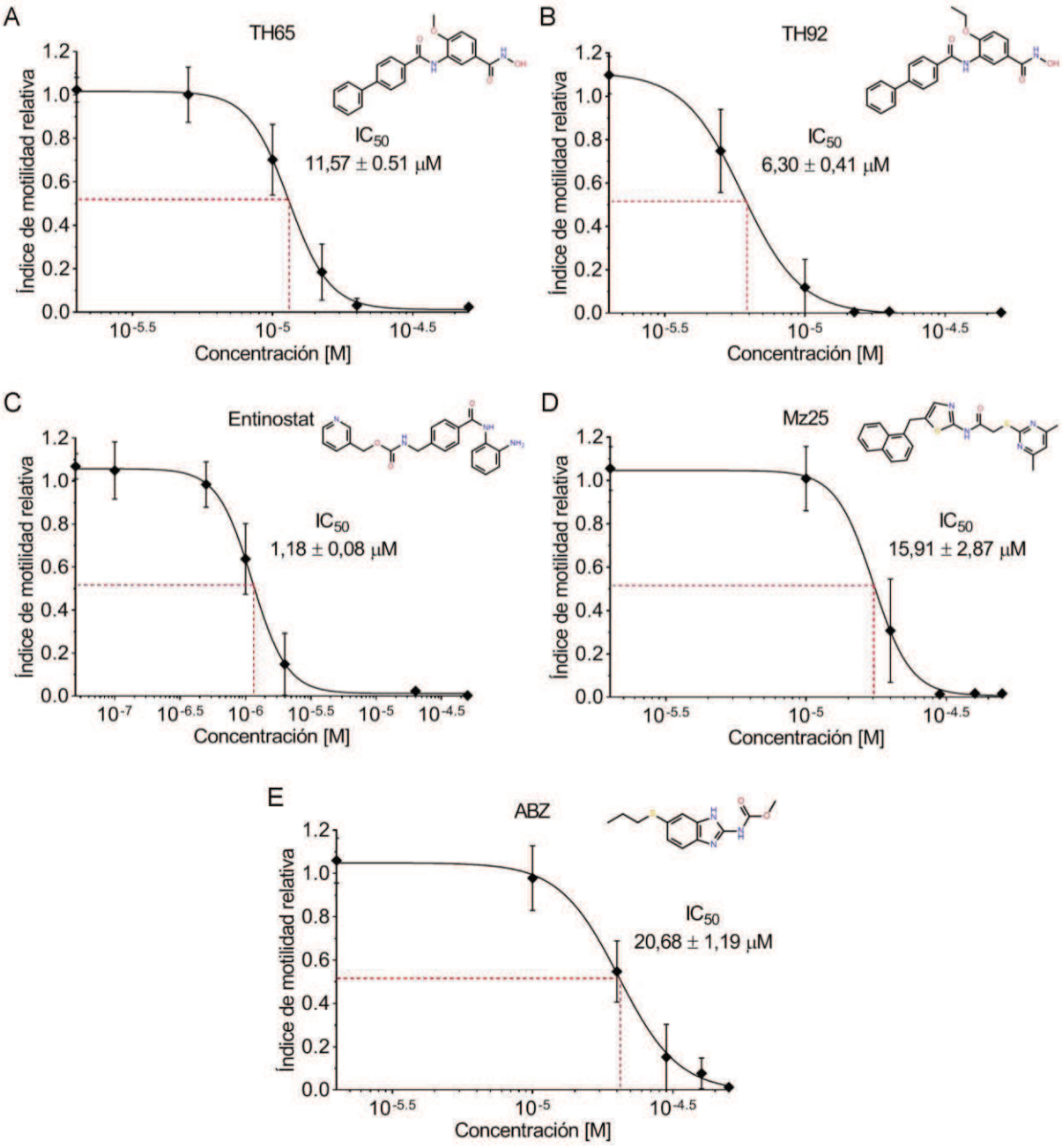


Figura 3.30. Dependencia de la concentración del efecto antihelmíntico de los inhibidores de las HDACs y las Sirtuinas seleccionados y el ABZ (droga control) sobre la viabilidad parasitaria de tetratiridios (TTy) de *Mesocestoides corti.* Se muestran los índices de motilidad relativa en función de la concentración de los compuestos seleccionados: (A) TH65 y (B) TH92, (C) Entinostat y (D) Mz25, y del (E) ALB; determinados a los 6 días de incubación para tres réplicas biológicas independientes, cada una por cuadruplicado. Las barras de error representan la desviación estándar. En cada gráfico se muestra además, la estructura química de los

compuestos y los valores de concentración de inhibición media (IC_{50}); determinados por medio de regresiones no lineales. Los IC_{50} se expresan en μM (IC_{50} ± $CI_{95\%}$) con sus correspondientes valores de intervalo de confianza 95% ($CI_{95\%}$).

Es interesante destacar que los valores de IC_{50} determinados para todos los compuestos seleccionados: TH65, TH92, Entinostat y Mz25, fueron menores al obtenido para el ABZ (21 ± 1 μM); usado como droga control. Por otra parte, el Entinostat mostró el valor más bajo de IC_{50} (1,08 ± 0,08 μM) para los compuestos seleccionados (por lo tanto, el más potente); mientras que el Mz25 mostró el valor más alto de IC_{50} (16 ± 2 μM). Como se mencionó anteriormente, el Entinostat es un inhibidor selectivo de las HDACs de Clase I y el Mz25 es un inhibidor de las Sirtuinas. Por último, se puede observar además que el valor de IC_{50} determinado para el TH92 es de aproximadamente la mitad que el determinado para el TH65. Estos compuestos pertenecen a la serie TH de inhibidores de las HDACs que derivan del compuesto 3-aminobenzohidroxamato. En la Figura 3.30A y Figura 3.30B se muestran las estructuras para el TH65 y TH92, respectivamente. Se puede observar que ambos compuestos poseen un grupo difenil y un grupo éter como sustituyentes. En el caso del TH65 el grupo éter está representado por un metoxilo y en el caso del TH92 por un etóxido.

Tabla 3.4. Valores de concentración inhibitoria 25% (IC_{25}), media (IC_{50}) y 90% (IC_{90}) para inhibidores de las HDACs y las Sirtuinas y para Albendazol (ABZ).

Compuesto	IC_{25} ± IC95% [μM]	IC_{50} ± IC95% [μM]	IC_{90} ± IC95% [μM]
TH65	9,60 ± 0,51	11,57 ± 0,51	17,11 ± 1,71
TH92	4,99 ± 0,31	6,30 ± 0,41	10,32 ± 1,41
Entinostat	0,86 ± 0,07	1,18 ± 0,08	2,41 ± 0,45
Mz25	14,76 ± 2,26	15,91 ± 2,87	25,52 ± 3,27
ALB	16,04 ± 1,52	20,68 ± 1,19	35,16 ± 4,24

3.4.2. Los compuestos seleccionados presentan un efecto antihelmíntico irreversible

La reversibilidad del efecto antihelmíntico de los compuestos seleccionados: Entinostat, TH65, TH92 y Mz25, y del ABZ, sobre la viabilidad parasitaria se determinó utilizando el cultivo *in vitro* del parásito cestodo *M. corti*. Para este ensayo los parásitos se incubaron con los compuestos durante 6 días. Tras este periodo, los TTy de *M. corti* fueron lavados tres veces con PBS y luego incubados en medio Mco-RPMI 1640 fresco por 8 días adicionales. Para la determinación de la reversibilidad del efecto, los compuestos fueron ensayados a

concentraciones cercanas a los valores determinados para la IC_{90} (sección 3.4.1). El IC_{90}, al igual que el IC_{50}, es una medida de la potencia de un compuesto. En este caso, el IC_{90} corresponde a la concentración que, a determinado día, causa el 90 % del efecto. Representando, de esta manera, una concentración subletal de los compuestos. Este parámetro es útil en el ensayo de reversibilidad; ya que, al tratarse de una concentración subletal para los parásitos, estos aún tienen una viabilidad mínima que puede ser revertida en un proceso reversible.

En la Figura 3.31 se muestra la viabilidad parasitaria, determinada mediante el ensayo de movilidad, como el índice de motilidad relativa (IMR) en función de los días de incubación para cada compuesto. Se puede observar que todos los compuestos ensayados presentaron un efecto antihelmíntico dependiente del tiempo de incubación. Los valores de IMR obtenidos fueron cercanos a los esperados, considerando que los compuestos se probaron a concentraciones aproximadas a los valores determinados de IC_{90}; con la excepción del ABZ, en donde se determinó un IMR de 0,62 a los 6 días de incubación. El efecto antihelmíntico de los compuestos no fue revertido tras el lavado e incubación con medio fresco, incluso hasta los 8 días de incubación adicionales. Cabe destacar que todos los compuestos ensayados produjeron la muerte de todos los TTy de *M. corti* tratados antes o a los 10 días de incubación (Figura 3.31). Como control negativo se utilizaron TTy de *M. corti* incubados con DMSO al 1%. Mientras que, como control positivo se utilizaron TTY de *M. corti* tratados con etanol al 70% durante 30 minutos.

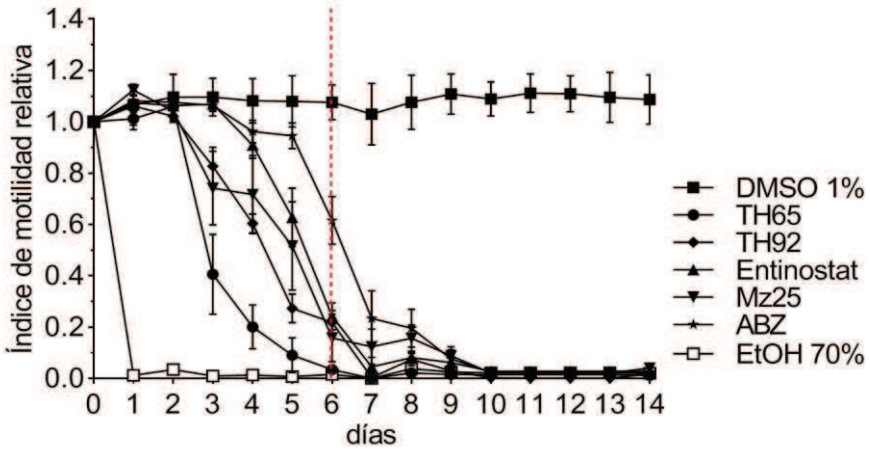


Figura 3.31. Ensayo de reversibilidad del efecto antihelmíntico de los inhibidores de las HDACs y las Sirtuinas seleccionados y del ABZ sobe la viabilidad parasitaria de tetratiridios (TTy) de *Mesocestoides corti*. Se muestran los índices de motilidad relativa en función de los días de incubación para los compuestos seleccionados: TH65, TH92, Entinostat y Mz25, y el ABZ; determinados para tres réplicas

biológicas independientes, cada una por cuadruplicado. Las barras de error representan la desviación estándar. Los compuestos fueron ensayados a concentraciones cercanas a los valores determinados para la IC_{90}. Luego de 6 días de incubación, los parásitos fueron lavados tres veces con PBS1X e incubados con medio fresco sin compuestos.

3.4.3. Los compuestos seleccionados alteran la morfología parasitaria a nivel ultraestructural

En la sección 3.3 se mostró que varios inhibidores de las HDACs y las Sirtuinas producen alteraciones en la morfología general de los TTy de *M. corti* a nivel estructural. En esta sección se muestra el efecto de los compuestos seleccionados: TH65, TH92, Entinostat y Mz25 sobre la morfología de TTy de *M. corti* a nivel ultraestructural, mediante microscopía electrónica de barrido (MEB).

En la Figura 3.32 se muestran las microfotografías obtenidas por MEB de los TTy de *M. corti* tratados con los compuestos seleccionados: TH65, TH92, Entinostat y Mz25, a la concentración de 20 μM tras 6 días de incubación. Asimismo, como controles se emplearon TTy de *M corti* incubados con TSA a 20 μM y DMSO al 1%. En la Figura 3.32 se puede observar que todos los compuestos ensayados producen alteraciones en la morfología general parasitaria a nivel ultraestructural; en comparación con los TTy de *M. corti* del grupo control, incubado con el vehículo de la droga (DMSO1%). Las microfotografías fueron tomadas para tres rangos de aumentos (cabe aclarar que se habla de rango de aumentos debido a que no todos los parásitos tienen el mismo tamaño): 1) Aumento Bajo, para aumentos en el rango de 150X a 270X. En este rango de aumentos es posible apreciar la morfología general de los TTy de *M. corti* completa; pudiéndose distinguir la región anterior (RA) con las ventosas (V), el cuello (C) y la región posterior (RP), 2) Aumento Medio, para aumentos en el rango de 550X a 750X. En este rango de aumentos es posible apreciar estructuras como las ventosas con mucho mayor detalle y, por último, 3) Aumentos Altos, para aumentos de 1200X. A este aumento es posible distinguir estructuras en el tegumento parasitario, como las microtricas (Mi). Estas estructuras se pueden distinguir en las microfotografías de los TTy de *M. corti* incubados con DMSO1% (Figura 3.32).

DMSO 1%

TH65 20 mM

TH92 20 mM

Entinostat 20 mM

Mz25 20 mM

TSA 20 mM

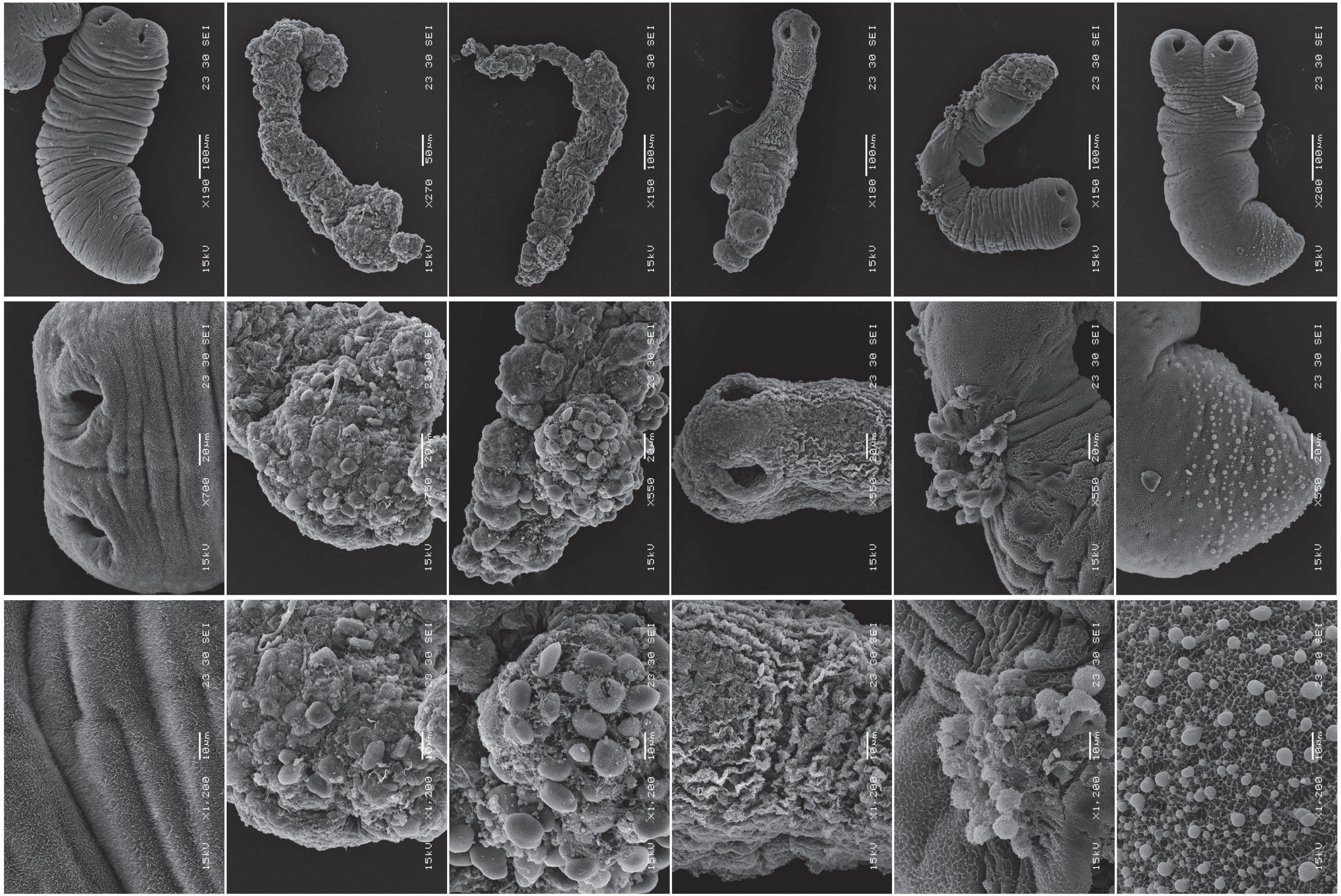


Figura 3.32. Efecto de los inhibidores de las HDACs y las Sirtuinas seleccionados y la Tricostatina A (TSA) sobre la morfología parasitaria de tetratiridios (TTy) de *Mesocestoides corti*. Se muestran las microfotografías, obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (MEB), a diferentes aumentos de los TTy de *M corti* incubados con 20 µM de (B, H y N) TH65, (C, I y Ñ) TH92, (D, J y O) Entinostat, (E, K y P) Mz25 y (F, L y Q) TSA, a los 6 días de incubación; en comparación con (A, G y M) los parásitos del grupo control, incubados con el vehículo de la droga (DMSO 1%). Se puede observar la gran alteración de la morfología y ultraestructura parasitaria. Asimismo, se puede observar la presencia de pequeñas ampollas (o vesículas) en el tegumento parasitario (flechas). Las regiones remarcadas con un círculo en los TTy de *M. corti* incubados con el Mz25, posiblemente correspondan a las extensiones del tegumento en formas de agua observadas por microscopia óptica. Región anterior (RA), región posterior (RP), cuello (C), ventosas (V) y microtricos (Mi). Las microfotografías se muestran a tres grados de aumentos: (A, B, C, D, E y F) microfotografías tomadas a aumentos bajos, en el rango de 150X a 270X, (G, H, I, J, K y L) microfotografías tomadas a aumentos medios, en el rango de 550X a 750X y (M, N, Ñ, O, P y Q) microfotografías tomadas a aumento alto, correspondiente a 1200X. El tamaño de las barras se muestra en cada imagen.

Por otra parte, con los compuestos TH65 y TH92 se puede observar una pérdida completa de la morfología general de los TTy de *M. corti* a aumentos bajos (Figura 3.32). En estos parásitos no fue posible identificar ningún elemento característico de los TTy de *M. corti;* como la región posterior, cuello y región anterior con las ventosas. Asimismo, a aumentos medios se observó, para ambos compuestos, la presencia de varias vesículas grandes de alrededor de 10 μm de diámetro (señaladas con flechas) a lo largo del tegumento parasitario. En el caso de los TTy de *M. corti* incubados con los compuestos Entinostat y Mz25, se puede observar a aumentos bajos una gran alteración de la morfología general parasitaria. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con los compuestos TH65 y TH92, para los parásitos incubados con Entinostat y Mz25 es posible distinguir algunos elementos característicos de los TTy de *M. corti*, como son las ventosas (V). En el caso de los TTy de *M. corti* incubados con el Entinostat, se puede observar en el tegumento parasitario la presencia de zonas con una gran cantidad de pliegues o superposiciones del tegumento. Para este compuesto se habían observado anteriormente la presencia de varias infiltraciones del medio de cultivo en el cuerpo parasitario (Figura 3.18). Estas estructuras no se pudieron observar mediante MEB. Esto posiblemente se debe a alteraciones producidas durante el proceso de fijación de las muestras. Los pliegues del tegumento, observados mediante MEB en los TTy de *M. corti* incubados con el Entinostat (Figura 3.32), posiblemente corresponden a las infiltraciones observadas anteriormente que, por el proceso de fijación, perdieron el medio de cultivo que tenían dentro. En el caso de los TTy de *M. corti* incubados con el Mz25, se puede observar en el tegumento parasitario la presencia de zonas puntuales con una gran cantidad de daño (señaladas mediante un círculo) (Figura 3.32). Para este compuesto se habían observado anteriormente la presencia de extensiones (EXT) en el tegumento en forma de agujas (Figura 3.22). Estas estructuras no se pudieron observar mediante MEB, posiblemente debido a alteraciones producidas durante el proceso de fijación de las muestras. Es posible que estas estructuras correspondan a las zonas puntuales con gran cantidad de daño observadas mediante MEB en los TTy de *M. corti* incubados con el Mz25 (Figura 3.32). Por último, en el caso de los TTy de *M. corti* incubados con la TSA se puede observar, a aumento bajo, que la morfología general parasitaria se mantiene. Sin embargo, se puede identificar la presencia de varias vesículas pequeñas de alrededor de 10 μm en toda la parte posterior de los parásitos (señaladas con fechas).

Por último, En la Figura 3.32 también se muestran las microfotografías de los TTy de *M. corti* tratados con los compuestos a aumento alto (1200X). A este aumento es posible observar en los TTy de *M. corti* la presencia de microvellosidades (denominadas microtricos) en forma de un césped homogéneo y continuo a lo largo del tegumento parasitario. Los microtricos se pueden

observar en los TTy de *M. corti* del grupo control, incubados con DMSO 1% (Figura 3.32), pero no se observan en los TTy tratados con los compuestos ensayados (TH65, TH92, Entinostat, Mz25 y TSA). En este último además se puede observar que el tegumento parasitario se encuentra altamente alterado.

3.4.4. El efecto antihelmíntico de los compuestos se potencia usando combinaciones de a pares

Se determinó el efecto antihelmíntico de combinaciones de a pares de los compuestos seleccionados: TH65, TH92, Entinostat y Mz25, y del ABZ (usado como droga control) sobre la viabilidad parasitaria, empleando el cultivo *in vitro* del parásito *M. corti*. La viabilidad parasitaria se determinó mediante el ensayo de movilidad y se muestra como el índice de motilidad relativa (IMR) en función de los días de incubación. Este ensayo resulta importante para determinar qué combinaciones de compuestos podrían ser útiles a fin disminuir la concentración a emplear de los mismos, manteniendo o potenciando el efecto de los compuestos individuales. Para la determinación del efecto antihelmíntico de las combinaciones de a pares, los compuestos fueron ensayados solos o en combinaciones a concentraciones cercanas a los valores determinados para la IC_{25} (Sección 3.4.1). El IC_{25}, al igual que el IC_{50}, es una medida de la potencia de un compuesto. En este caso, el IC_{25} corresponde a la concentración que, a determinado día, causa el 25% del efecto. Este parámetro es útil en el ensayo de combinaciones de a pares; ya que al tratarse de una concentración que tiene muy poco efecto para los parásitos, estos muestran una viabilidad muy alta. De esta manera se cuenta con un margen más amplio para determinar el efecto potenciado por los pares de compuestos.

En la Figura 3.33 se muestra la viabilidad parasitaria, determinada mediante el ensayo de movilidad, como el índice de motilidad relativa (IMR) en función de los días de incubación para el ABZ en combinación con los compuestos seleccionados. Se puede observar que los pares de compuestos: ABZ-TH65, ABZ-TH92 y ABZ-Entinostat, presentaron un efecto antihelmíntico dependiente del tiempo de incubación mayor que el determinado para los compuestos individuales, Figura 3.33A, Figura 3.33B y Figura 3.33C; respectivamente. Se determinaron valores de IMR para estos pares de compuestos (a los 6 días de incubación) de 0,33 para el par ABZ-TH65, de 0,42 para el par ABZ-TH92 y de 0,30 para el par ABZ-Entinostat. En cambio, se determinaron IMR cercanos a 1 para los TTy de *M. corti* incubados con los compuestos individuales o el vehículo de la droga (DMSO 1%). Esto valores fueron de cercanos a los esperados, considerando que los compuestos se ensayaron a concentraciones aproximadas a los valores determinados de IC_{25}.

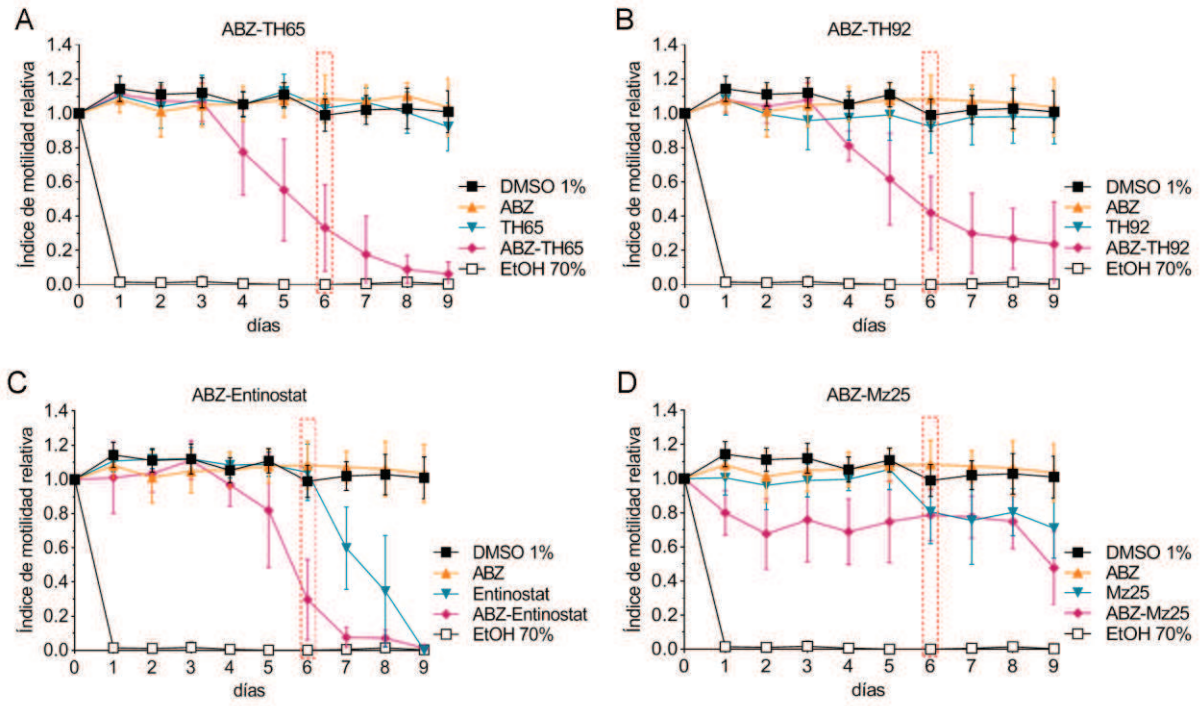


Figura 3.33. Efecto antihelmíntico del albendazol (ABZ) en combinación con los inhibidores de las HDACs y las Sirtuinas seleccionados sobre la viabilidad parasitaria de tetratiridios (TTy) de *Mesocestoides corti.* Se muestran los índices de motilidad relativa en función de los días de incubación para los pares de compuestos: (A) ABZ-TH65, (B) ABZ-TH92; (C) ABZ-Entinostat y (D) ABZ-Mz25; determinados para tres réplicas biológicas independientes, cada una por cuadruplicado. Las barras de error representan la desviación estándar. Los compuestos fueron ensayados, individuales o en pares, a concentraciones cercanas a los valores determinados para la IC_{25}. Los índices de motilidad relativa determinados a los 6 días de incubación (recuadro en color rojo) se emplearon para calcular el índice de efecto proporcional para los diferentes pares de compuestos (Figura 3.35).

Por otra parte, en la Figura 3.34 se muestra la viabilidad parasitaria, determinada mediante el ensayo de movilidad, como el índice de motilidad relativa (IMR) en función de los días de incubación para las diferentes combinaciones de a pares de los compuestos seleccionados. Se puede observar que los pares de compuestos: Mz25-Entinostat, Entinostat-TH65, Entinostat-TH92 y TH65-TH92 presentaron un efecto antihelmíntico dependiente del tiempo de incubación mayor que el determinado para los compuestos individuales, Figura 3.34C, Figura 3.34D, Figura 3.34E y Figura 3.34F; respectivamente. Se determinaron valores de IMR para estos pares de compuesto (a los 6 días de incubación) de 0,42 para el par Mz25-Entinostat, de 0,14 para el par Entinostat-TH65, de 0,07 para el par Entinostat-TH92 y de 0,16 para el par TH65-TH92. Asimismo, se determinaron IMR cercanos a 1 para los TTy de *M. corti* incubados con los compuestos individuales o el vehículo

de la droga (DMSO1%). Esto valores fueron de cercanos a los esperados, considerando que los compuestos se ensayaron a concentraciones aproximadas a los valores determinados de IC_{25}.

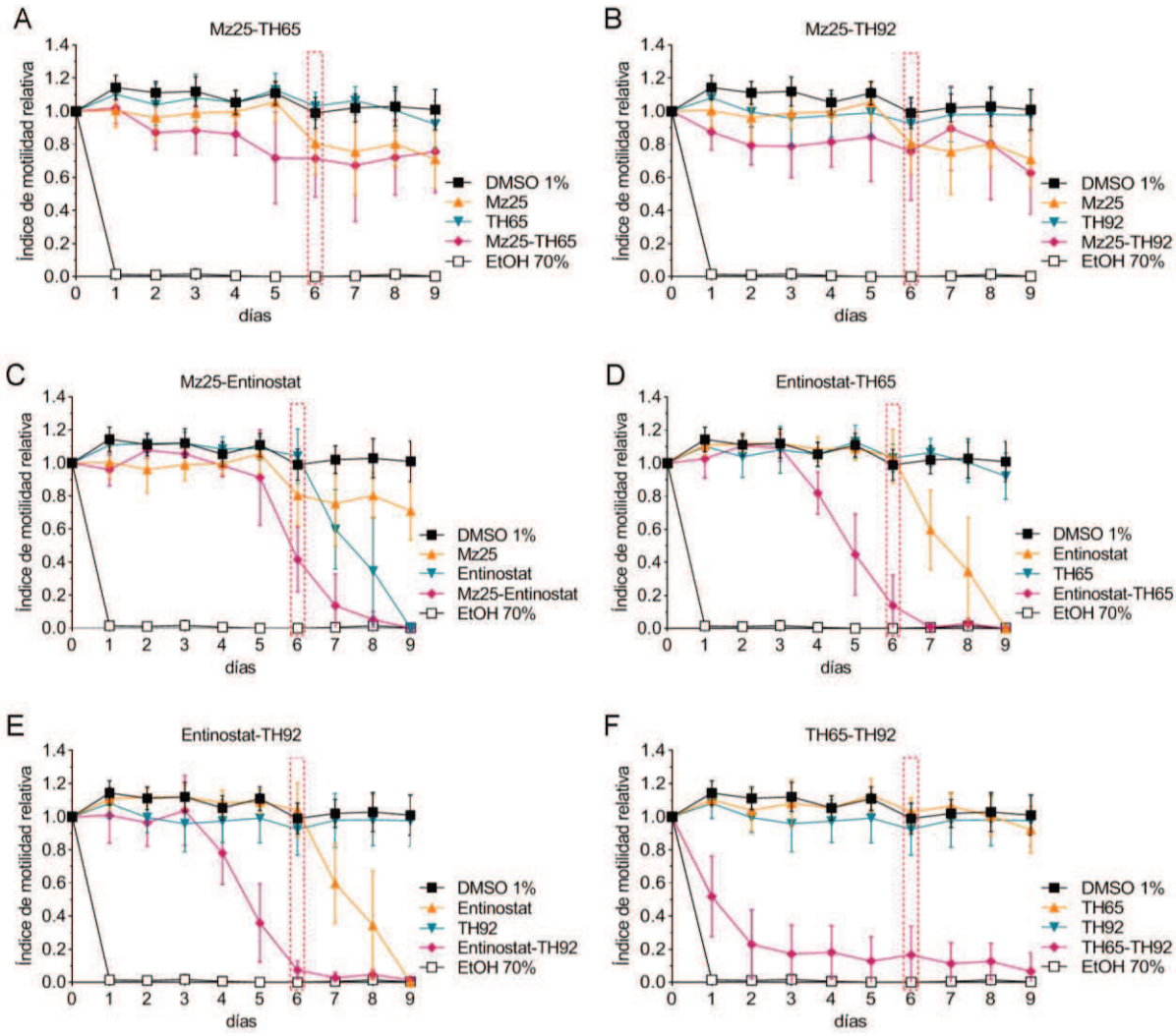


Figura 3.34. Efecto antihelmíntico de los pares de combinación de los inhibidores de las HDACs y las Sirtuinas seleccionados sobre la viabilidad parasitaria de tetratiridios (TTy) de *Mesocestoides corti.* Se muestran los índices de motilidad relativa en función de los días de incubación para los pares de compuestos: (A) Mz25-TH65, (B) Mz25-TH92, (C) Mz25-Entinostat, (D) Entinostat-TH65, (E) Entinostat-TH92 y (F) TH65-TH92; determinados para tres réplicas biológicas independientes, cada una por cuadruplicado. Las barras de error representan la desviación estándar. Los compuestos fueron ensayados de manera individual o en combinaciones de a pares, a concentraciones cercanas a los valores de IC_{25}. Los índices de motilidad relativa determinados a los 6 días de incubación (recuadro en color rojo) se emplearon para calcular el índice de efecto proporcional para los diferentes pares de compuestos (Figura 3.35).

Por último, se caracterizó el efecto antihelmíntico de las combinaciones de a pares. La interacción de los compuestos puede ser clasificada dentro de tres clases principales: 1) Efecto

aditivo (o sinergia de suma), cuando el efecto final es aproximadamente igual a la suma de los efectos de los compuestos individuales, 2) Efecto potenciador (sinergia de potenciación), cuando el efecto final es mucho mayor del esperado para la suma de los efectos de los compuestos individuales y 3) Efecto antagónico (o antagonismo), cuando la interacción da lugar a una disminución de los efectos de uno o ambos fármacos. A fin de caracterizar el efecto antihelmíntico de las combinaciones de a pares de los compuestos, se calculó el índice de efecto proporcional (IEP) utilizando la Ecuación 2.4.

[Ecuación 2.4] $$IEP = \frac{Efecto\ proporcional\ teórico - Efecto\ proporcional\ medido}{Efecto\ proporcional\ teórico}$$

En donde, el "efecto proporcional medido" corresponde al efecto determinado (en este caso, corresponde a los índices de motilidad relativa determinados a los 6 días de incubación) para la combinación de un par de compuestos. El "efecto proporcional teórico" corresponde a la multiplicación de los efectos individuales, determinados para cada compuesto a los 6 días de incubación. El valor del efecto proporcional teórico, corresponde a el valor de IMR que se asume tendría la combinación de un par de compuesto si el efecto fuese simplemente aditivo (Planer et al., 2014). A partir del índice de efecto proporcional, es posible clasificar la interacción de los compuestos en las combinaciones de a pares. Se habla de un efecto aditivo para valores de -0,5 < IEP < 0,5. Se habla de un efecto potenciador para valores de 0,5 ≤ IEP ≤ 1, presentando una mayor sinergia de potenciación cuanto más cercano sea este valor a 1. Por último, se habla efecto antagónico para valores de -1 ≤ IEP ≤ -0,5, cuanto más cercano sea este valor a -1 mayor será el efecto antagónico de los compuestos.

En la Figura 3.35 se muestra el índice de efecto proporcional determinado para todas las combinaciones de a pares de los compuestos, como un mapa de color. En dicho mapa el color verde indica un efecto potenciador, el rojo un efecto antagónico y amarillo un efecto aditivo. Se puede observar que las diferentes combinaciones del ABZ con los otros compuestos mostraron un efecto potenciador, con excepción del par ABZ-Mz25. Asimismo, las diferentes combinaciones de los inhibidores de HDACs mostraron también un efecto potenciador, obteniéndose valores para el índice de efecto proporcional mayores de 0,80 para todos estos pares. Por último, en el caso de las combinaciones con el inhibidor de las Sirtuinas Mz25, solo el par Mz25-Entinostat mostró un efecto potenciador con un valor del índice de efecto proporcional de 0,50. Las otras

combinaciones mostraron efecto aditivo, con valores del índice de efecto proporcional cercanos a 0. Ninguno de los pares de compuestos ensayados mostró un efecto antagónico.

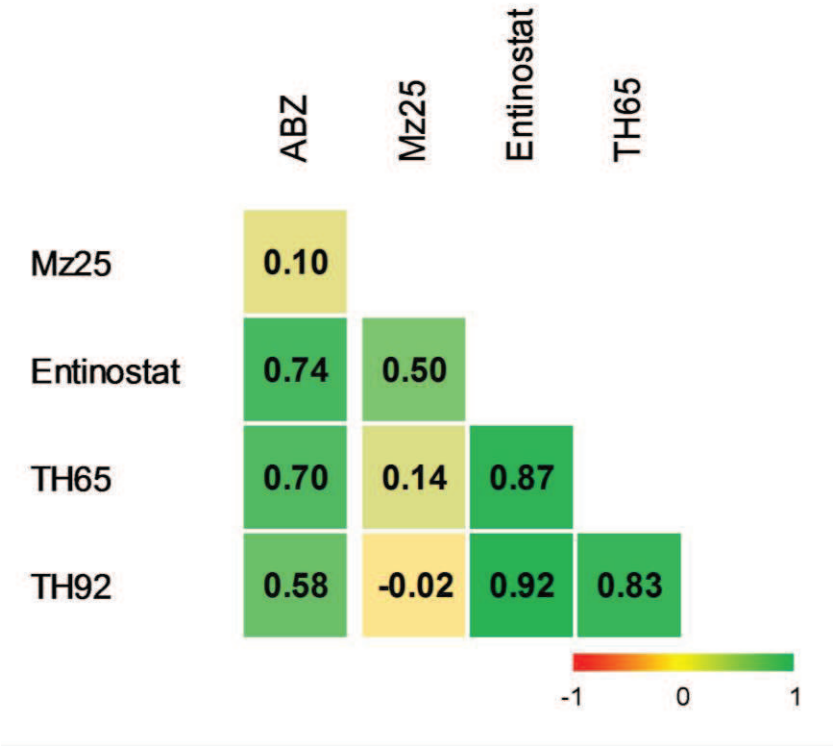


Figura 3.35. Clasificación del efecto antihelmíntico de los pares de combinación de compuestos sobre la viabilidad parasitaria de tetratiridios (TTy) de *Mesocestoides corti.* Se muestran los valores del índice de efecto proporcional, determinados para los pares de compuestos, en forma de mapa de colores. Los valores del índice de efecto proporcional fueron determinados para tres réplicas biológicas independientes, cada una por cuadruplicado. El diagrama de colores corresponde a: efecto potenciador (color verde; para valores entre 0,5 y 1), efecto aditivo (color amarillo; para valores entre -0,5 y 0,5) y efecto antagónico (color rojo; para valores entre -1 y -0,5). Ninguno de los pares de compuestos ensayados mostró un efecto antagónico.

3.5. Caracterización estructural de las HDACs como potenciales blancos farmacológicos

En esta sección se abordará la caracterización de las HDAC8 de parásitos cestodos como potenciales blancos farmacológicos. Las HDAC8 resultan interesantes ya que representan blancos farmacológicos validados en numerosas enfermedades, incluyendo enfermedades parasitarias como la schistosomiasis (Chakrabarti y col., 2015). En cestodos se identificó un gen codificante con ortología con la HDAC8 de *H. sapiens*, en todos los genomas analizados (secciones 3.1.1 y 3.1.2). Analizando sus secuencias de aminoácidos se demostró que este gen, en cestodos, muestra bajos niveles de identidad (menores al 48%) con respecto a su ortólogo en *H. sapiens*;

representando el gen de HDACs con el porcentaje de identidad más bajo con su ortólogo en *H. sapiens* dentro de los genes de HDACs de Clase I identificados (sección 3.1.3). Por otra parte, el análisis de expresión transcripcional por RNAseq mostró que el gen EgrHDAC8, de *E. granulosus* s. s G1, presenta niveles de expresión detectables solo en los estadios del desarrollo correspondientes a parásitos adultos y capa germinal. En *E. multilocularis*, el gen EmuHDAC8 mostró un aumento en el nivel de expresión transcripcional en oncosferas activadas (sección 3.1.4). Estos estadios de desarrollo resultan importantes ya que están asociados con altos niveles de proliferación y diferenciación celular. Asimismo, en ambos parásitos se detectó expresión transcripcional del gen HDAC8 en el estadio de desarrollo de relevancia clínica, la capa germinal. Por último, mediante ensayos de viabilidad se determinó la actividad antihelmíntica de varios compuestos diseñados como inhibidores selectivos de la SmpHDAC8 de *S. mansoni*; obteniéndose, para varios de ellos, resultados muy prometedores sobre el parásito cestodo *M. corti*. En particular, los compuestos derivados del 3-amidabenzohidroxamato TH65 y TH92 mostraron un potente efecto antihelmíntico, con reducción del 100% de la viabilidad parasitaria y alteraciones de la morfología general y ultraestructura para varias concentraciones. Por todos los motivos mencionados, las HDAC8s de parásitos cestodos se eligieron para su estudio como potenciales blancos farmacológicos.

3.5.1. Clonado y secuenciación de la HDAC8 de *Echinococcus canadensis G7* y *Mesocestoides corti*

Se confirmaron las secuencias de los genes predichos para la HDAC8 de los parásitos *E. granulosus s.l.* y *M. corti*, mediante RT-PCR, clonación y secuenciación. Para la obtención del ARN a emplear, se utilizaron TTy de *M. corti* recolectados de ratón y PSC de *E. granulosus s.l.* recolectados de quistes hepáticos provenientes de infecciones naturales de cerdos. El material de *E. granulosus s.l.* se genotificó en primera instancia a fin de determinar la especie o genotipo de trabajo. La genotipificación se realizó mediante amplificación y secuenciación de la subunidad 1 del gen mitocondrial citocromo C oxidasa. Los resultados de la genotipificación indicaron que los PSC corresponden al genotipo *E. canadensis* G7. Después de la determinación del genotipo de las muestras de PSC, se procedió a la obtención del ADNc para cada muestra y a la amplificación de los genes EcaHDAC8 y McoHDAC8, mediante RT-PCR usando cebadores específicos (Anexo A6.1).

En la Figura 3.36 se muestran los productos de amplificación obtenidos, para cada muestra, a diferentes temperaturas de hibridación. Se puede observar que para ambas muestras se

obtuvieron bandas del tamaño esperado para los genes EcaHDAC8 y McoHDAC8 (aproximadamente 1,2 Kb), en todas las temperaturas de hibridación analizadas. En el caso del gen McoHDAC8, no se observaron diferencias apreciables en la intensidad de las bandas observadas para todas las temperaturas analizadas. Sin embargo, para EcaHDAC8 se observaron bandas muy tenues cuando se emplearon temperaturas de hibridación de 61°C y 65°C. Para ambos genes, se eligió la temperatura de hibridación de 57°C. Para esta temperatura se observaron, en ambos genes, bandas muy fuertes (Figura 3.36).

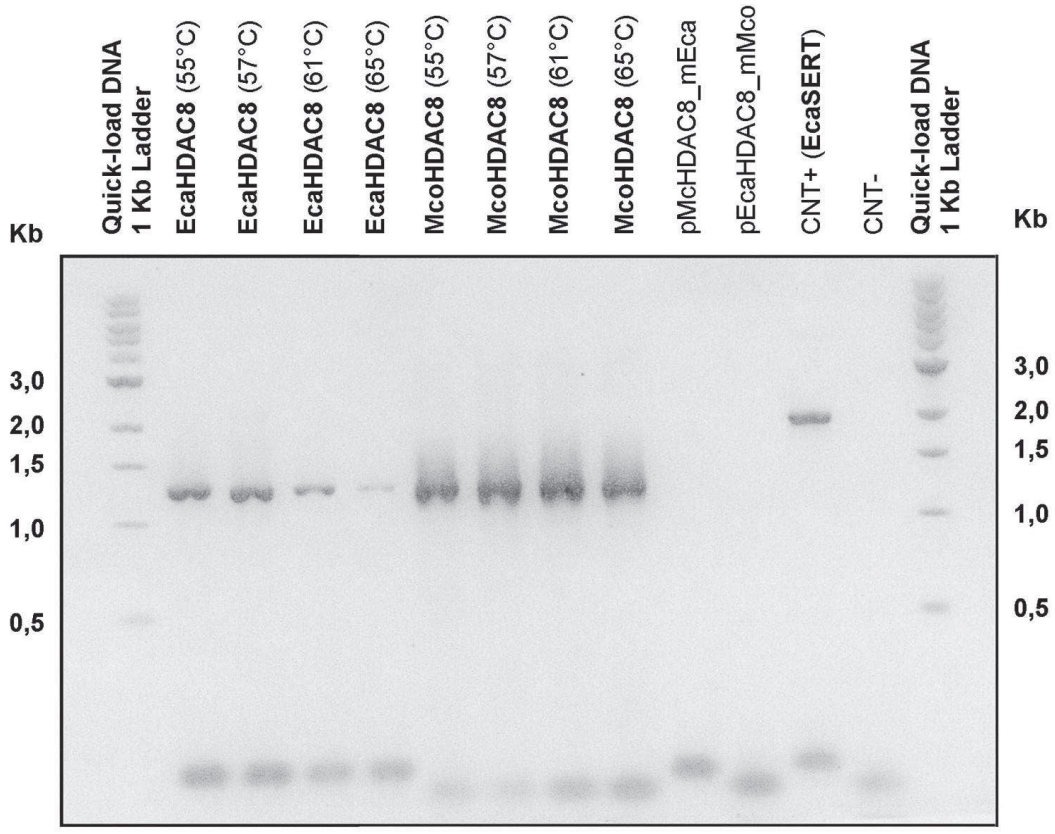


Figura 3.36. Amplificación mediante RT-PCR de los genes EcaHDAC8 y McoHDAC8. Se muestra el gel de agarosa, teñido con el colorante GelRed, para la amplificación mediante RT-PCR en gradiente de temperatura (55°C a 65°C) de los genes EcaHDAC8 y McoHDAC8. La primera y última calle corresponden al marcador de peso molecular empleado (Quick-load DNA 1 kb ladder). pEcaHDAC8_mMco: prueba de especificidad de los cebadores específicos del gen EcaHDAC8, usando ADNc obtenido a partir de tetratiridios de *Mesocestoides corti*. pMcoHDAC8_mEca: prueba de especificidad de los cebadores específicos del gen McoHDAC8, usando ADNc obtenido a partir de protoescólices de *Echinococcus canadensis* G7. CNT+: control positivo de la PCR, se empleó la amplificación del gen EcaSERT. CNT-: control negativo de la PCR, se empleó H_2O calidad biología molecular en lugar del templado de ADNc.

Por otra parte, en la Figura 3.36 también se pueden observar los controles empleados. Se emplearon cebadores específicos del gen EcaSERT como control positivo de la PCR. La amplificación de este gen había sido verificada previamente en el laboratorio BMHid. Como control negativo de la PCR se reemplazó la muestra de ADNc por H_2O calidad biología molecular. Por último, se probó la especificidad de los cebadores. Para ello, se probaron los cebadores específicos de EcaHDAC8 con la muestra de ADNc de TTy de *M. corti* (pEcaHDAC8_mMco) y los cebadores específicos de McoHDAC8 con la muestra de ADNc de los PSC de *E. canadensis* G7 (pMcoHDAC8_mEca).

Los fragmentos de amplificación (de aproximadamente 1200 pb) obtenidos a la temperatura de hibridación de 57°C, para ambos genes, fueron purificados del gel de agarosa y clonados en el vector pCR2.1 TOPO-TA. Estos vectores se emplearon para transformar bacterias de *E. coli* DH5α quimio-competentes. La transformación de las bacterias con el vector conteniendo el inserto se verificó mediante PCR de colonia (Anexo A6.2).

En la Figura 3.37 se muestran los productos de amplificación obtenidos para las colonias transformadas con el vector y los insertos, para ambos genes. Se puede observar que varias colonias de bacterias fueron transformadas correctamente con los vectores-insertos para cada gen de HDAC8. De acuerdo a la intensidad de las bandas obtenidas, se eligieron la colonia 9 de bacterias transformadas con el gen EcaHDAC8 y la colonia 7 de bacterias transformadas con el gen McoHDAC8 (Figura 3.37). Estas colonias de bacterias fueron replicadas y amplificadas por cultivo en medio LB; y los plásmidos correspondientes se extrajeron y purificaron por medio de *minipreps*. Finalmente, los plásmidos purificados fueron secuenciados. Se obtuvieron cuatro lecturas para cada gen, correspondientes a las lecturas directa e inversa de los cebadores específicos y las secuencias del fago M13 integradas en el vector de clonación. Las cuales fueron integradas a fin de obtener las secuencias consenso para cada gen de HDAC8. Las secuencias consensos obtenidas para los genes EcaHDAC8 y McoHDAC8, junto con su traducción a secuencias de aminoácidos, se pueden ver en los Anexo A2.1 y Anexo A2.2; respectivamente.

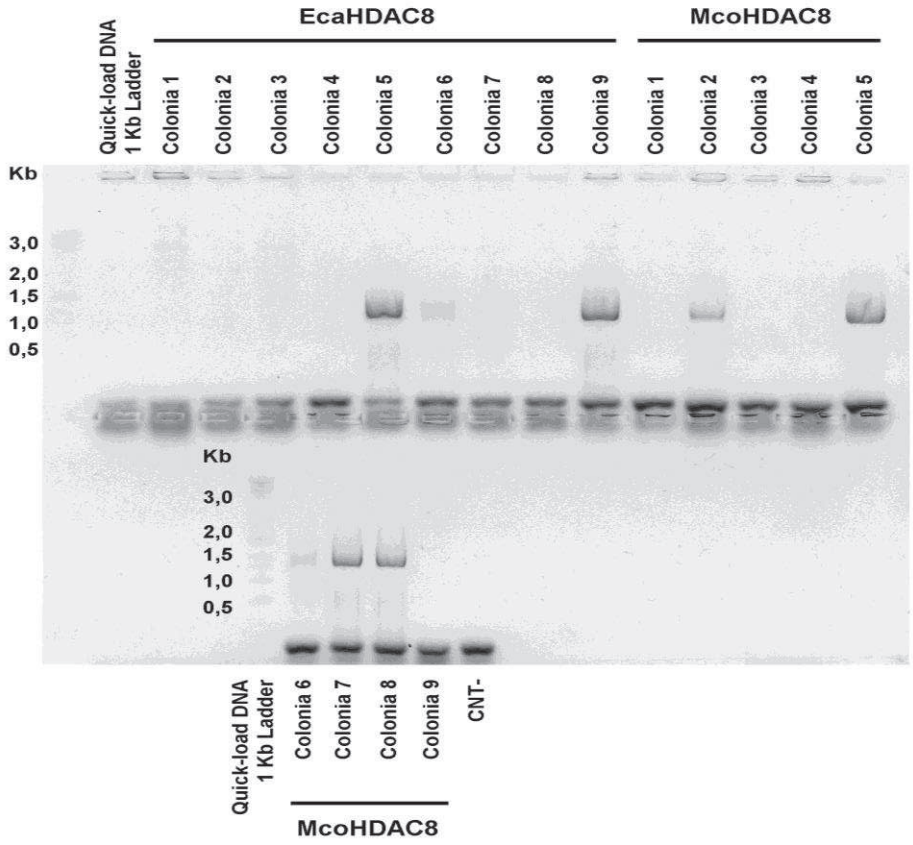


Figura 3.37. PCR de colonia para las bacterias *Escherichia coli* DH5α transformadas con el vector-inserto correspondientes a los genes EcaHDAC8 y McoHDAc8. Se muestra el gel de agarosa, teñido con el colorante GelRed e iluminado con luz UV, para la amplificación mediante PCR de las colonias transformadas con los genes EcaHDAC8 y McoHDAC8, clonados en el vector pCR2.1 TOPO-TA. La PCR de colonia se realizó empleando cebadores específicos para cada gen (fueron ensayadas 9 colonias por gen). La primera calle de cada sector del gel corresponde al marcador de peso molecular Quick-load DNA 1 kb ladder. CNT-: control negativo de la PCR.

3.5.2. Los genes EcaHDAC8 y McoHDAC8 tienen inserciones en sus secuencias que no están presentes en su ortólogo de *Homo sapiens* (HsaHDAC8)

Se realizaron alineamientos de secuencias, con las secuencias de aminoácidos traducidas para los genes completos de EcaHDAC8 y McoHDAC8 en conjunto con las secuencias de sus ortólogos en *H. sapiens* (HsaHDAC8) y *S. mansoni* (SmpHDAC8), a fin de comparar y determinar diferencias y similitudes en las secuencias de estos genes.

En la Figura 3.38 se muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos para los genes analizados. Asimismo, se muestran identidades/similitudes (≤ 75%) entre las secuencias como un diagrama de color verde oscuro/claro, respectivamente. Se puede observar que los genes EcaHDAC8 y McoHDAC8 mostraron un nivel general de conservación de residuos de aminoácidos con respecto a sus ortólogos HsaHDAC8 y SmpHDA8. Sin embargo, en estos genes se puede observar la presencia de inserciones (representadas mediante cuadrados) de varios residuos de aminoácidos, que no están presentes en su ortólogo HsaHDAC8. Estas inserciones también se pudieron observar en el gen SmpHDAC8 (Figura 3.38). Por último, se puede observar que los residuos implicados en el dominio catalítico de HDACs y de unión al cofactor Zn^{2+} se encuentran conservados en las HDAC8s de cestodos (señalados mediante fechas y asteriscos, respectivamente).

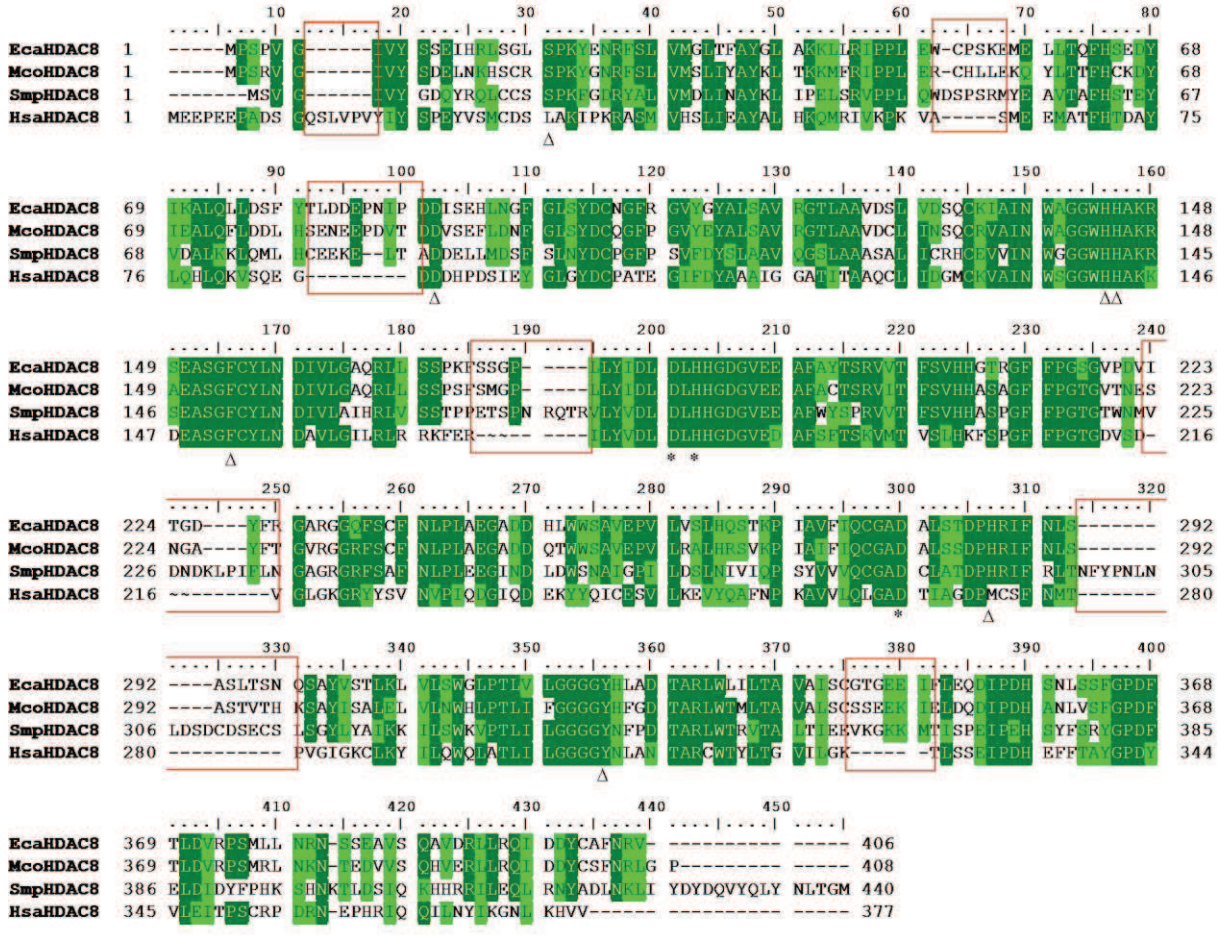


Figura 3.38. Alineamiento de secuencias de las secuencias de aminoácidos de los genes de HDAC8. Se muestra el alineamiento de secuencias para las secuencias de aminoácidos de los genes HDAC8 de *Homo sapiens* (HsaHDAC8), *Schistosoma mansoni* (SmpHDAC8), *Echinococcus canadensis* G7 (EcaHDAC8) y *Mesocestoides corti* (McoHDAC8). Las identidades/similitudes (≤ 75%) entre las secuencias se muestran en

niveles de color verde oscuro/claro, respectivamente. Los residuos implicados en el dominio catalítico de las HDAC se encuentran señaladas mediante flechas (Δ). Los residuos implicados en la coordinación con el cofactor Zn^{2+} se encuentran señalados mediante asteriscos (*). En los recuadros rojos se muestran las inserciones identificadas en las HDAC8 parasitarias, no encontradas en HsaHDAC8.

3.5.3. Los modelos estructurales para las EcaHDAC8 y McoHDAC8 presentan la estructura canónica de las enzimas HDACs

Se obtuvieron modelos de estructura 3D para los genes EcaHDAC8 y McoHDAC8, mediante modelado por homología usando como templado las estructuras obtenidas por cristalización y difracción de rayos X para los genes HsaHDAC8 y SmpHDAC8. Los modelos de estructura 3D se realizaron mediante los programas: PHYRE2 (Kelley y col., 2015), SWISS-MODEL (Arnold y col., 2006; Benkert y col., 2008; Biasini y col., 2014; Schwede y col., 2003), PsiPred (McGuffin y col., 2000) y Geno3D (Combet y col., 2002). Cada uno de los modelos obtenidos se validó por medio de los parámetros: RMSD, TMscore, ERRAT y Verify-ED. En la Tabla 3.5 y Tabla 3.6 se muestran un resumen de los parámetros calculados para validar los móldelos de estructura 3D obtenidos para EcaHDAC8 y McoHDAC8, respectivamente.

Tabla 3.5. Parámetros determinados para validar los modelos de estructuras 3D para EcaHDAC8

Modelos	RMSD (n° de residuos)		TMscore		ERRAT	Verify-3D
	HsHDAC8	SmHDAC8	HsHDAC8	SmHDAC8		
Geno3D_1	2,52 (360)	1,82 (376)	0,96	0,93	86,04	87,06
Geno3D_2	2,24 (360)	1,80 (376)	0,92	0,91	85,41	86,01
Geno3D_3	2,39 (352)	1,81 (376)	0,96	0,92	85,61	84,05
Phyre2	2,32 (360)	2,76 (352)	0,90	0,92	89,67	85,43
SwissModel	1,63 (360)	1,16 (376)	0,94	0,97	92,89	88,56
HsHDAC8 (4bz5)					97,47	94,77
SmpHDAC8 (2v5w)					92,13	92,82

El parámetro RMSD (del inglés, *Root Mean Square Deviation*, o desviación de la media cuadrática) es la distancia media cuadrática mínima entre las estructuras básicas de las proteínas superpuestas. Este parámetro es empleado para comparar alineamientos estructurales basados en la comparación de la forma tridimensional. Asimismo, este valor puede ser utilizado para estudiar el grado de divergencia entre las estructuras alineadas. A mayor valor de RMSD, mayores

son las diferencias. En la Tabla 3.5 y Tabla 3.6 se muestran los valores de RMSD, determinados mediante el algoritmo incorporado en el programas Pymol, para cada modelo de estructura 3D obtenido para EcaHDAC8 y McoHDAC8; en comparación con las estructuras nativas disponibles para la HDAC8 de *H. sapiens* (HsaHDAC8; PBD 2v5w) (Vannini y col., 2007) y *S. mansoni* (SmpHDAC8; PDB 4bz5) (Marek y col., 2013). Entre paréntesis se muestra el número total de residuos que pudo alinear el algoritmo. En el caso de EcaHDAC8, se obtuvieron valores de RMSD en el rango de 1,63-2,52 y 1,16-2,76, cuando se compararon los móldelos de estructura 3D obtenidos con la HsaHDAC8 y SmpHDAC8; respectivamente (Tabla 3.5). Por otra parte, para McoHDAC8, se obtuvieron valores de RMSO en el rango de 1,57-2,91 y 1,13-2,87 cuando se compararon los móldelos de estructura 3D obtenidos con la HsaHDAC8 y SmpHDAC8; respectivamente (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Parámetros determinados para validar los modelos de estructuras 3D para McoHDAC8

Modelos	RMSD (n° de residuos)		TMscore		ERRAT	Verify-3D
	HsHDAC8	SmHDAC8	HsHDAC8	SmHDAC8		
Geno3D_1	2,34 (352)	1,93 (376)	0,90	0,91	91,00	81,59
Geno3D_2	2,41 (352)	2,12 (376)	0,95	0,90	88,55	79,85
Geno3D_3	1,96 (352)	1,94 (368)	0,96	0,93	84,22	89,05
Phyre2	1,57 (360)	2,74 (352)	0,99	0,92	69,25	86,27
PsiPred	1,93 (352)	2,87 (344)	0,96	0,88	65,25	83,82
SwissModel_1	2,91 (344)	1,99 (376)	0,94	0,97	67,88	89,30
SwissModel_2	2,23 (360)	1,13 (376)	0,96	0,98	91,61	83,83
SwissModel_3	2,52 (360)	1,68 (376)	0,95	0,96	67,01	84,83
HsHDAC8 (4bz5)					97,47	94,77
SmpHDAC8 (2v5w)					92,13	92,82

Por otra parte, el parámetro TM-score es una métrica utilizada para medir la similitud entre dos estructuras de proteínas. Este algoritmo está diseñado para resolver dos problemas principales en las métricas tradicionales, como el parámetro RMSD: (1) el TM-score mide la similitud de la estructura global y es menos sensible a las variaciones estructurales locales; (2) el valor del TM-score, para pares de estructura aleatorias, es independiente de la longitud de las mismas. El parámetro TM-score tiene valores entre 0 y 1, donde 1 indica una combinación perfecta entre las dos estructuras. Siguiendo estadísticas estrictas de estructuras en el PDB (del inglés, *Protein Data Bank*, los puntajes por debajo de 0,17 corresponden a proteínas no relacionadas elegidas al azar, mientras que para las estructuras con un puntaje mayor a 0,5 generalmente se asume que presentan la misma estructura. En la Tabla 3.5 y Tabla 3.6 se

muestran los valores de TM-score, determinados mediante el algoritmo disponible en la página de Zhang Lab, Universidad de Michigan (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/TM-score/), para cada modelo de estructura 3D obtenido para EcaHDAC8 y McoHDAC8; en comparación con las estructuras de HsaHDAC8 y SmpHDAC8. En el caso de EcaHDAC8, se obtuvieron valores de TM-score mayores de 0,90 y 0,91 para los modelos de estructura 3D obtenidos, cuando se compararon con las estructuras de HsaHDAC8 y SmpHDAC8; respectivamente (Tabla 3.5). Por otra parte, para McoHDAC8 se obtuvieron valores de TM-score mayores de 0,90 y 0,88 para los modelos de estructura 3D obtenidos, cuando se compararon con las estructuras de HsaHDAC8 y SmpHDAC8; respectivamente (Tabla 3.6).

Los parámetros ERRAT y Verify-3D, por su parte, son empleados para verificar y determinar la calidad de los modelos de estructura 3D de las proteínas. En el caso de ERRAT, este algoritmo considera interacciones atómicas específicas para distinguir las regiones correctas o incorrectas en la estructura una proteína. Este algoritmo investiga las estadísticas de las interacciones atómicas por pares y es capaz de tener en cuenta seis diferentes interacciones átomo-átomo unidas no covalentemente: CC, CN, CO, NN, NO y OO. Verify-3D, por su parte, determina la compatibilidad de un modelo de estructura 3D con su propia secuencia de aminoácidos, asignando una clase estructural basada en la ubicación y el entorno (estructura alfa, beta, bucle, etc.; región polar, no polar, etc.) y comparando los resultados con estructuras validadas en las bases de datos de estructuras de proteínas, como PDB). Ambos parámetros se expresan en porcentajes, mientras más alto el porcentaje mayor será la calidad del modelo de estructura 3D. En la Tabla 3.5 y Tabla 3.6 se muestran los valores de ERRAT y Verify-3D, determinados mediante los algoritmos disponibles en la página del Instituto de Biología Molecular y del Instituto DOE-MBI de la Universidad de California (https://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES/), para cada modelo de estructura 3D obtenido para EcaHDAC8 y McoHDAC8; respectivamente. En el caso de EcaHDAC8, se obtuvieron valores de ERRAT y Verify-3D mayores a 85,41% y 84,05% para los modelos de estructura 3D obtenidos, respectivamente (Tabla 3.5). Por otro lado, para McoHDAC8, se obtuvieron valores de ERRAT y Verify-3D mayores a 65,25% y 79,85% para todos los modelos de estructura 3D obtenidos, respectivamente (Tabla 3.6).

Los modelos de estructura 3D para la EcaHDAC8 y McoHDAC8 se eligieron en base a los parámetros determinados para su validación y se muestran resaltados en la Tabla 3.5 y Tabla 3.6, respectivamente. Estos modelos de estructura 3D se usaron para realizar alineamientos estructurales, a fin de comparar similitudes y diferencias estructurales con las estructuras nativas de la HsaHDAC8 y SmpHDAC8.

En la Figura 3.39 se muestra el alineamiento estructural de los modelos obtenidos para EcaHDAC8 (en color azul) y McoHDAC8 (en color verde), junto con las estructuras 3D de las proteínas HsaHDAC8 (en color rojo) y SmpHDAC8 (en color violeta).

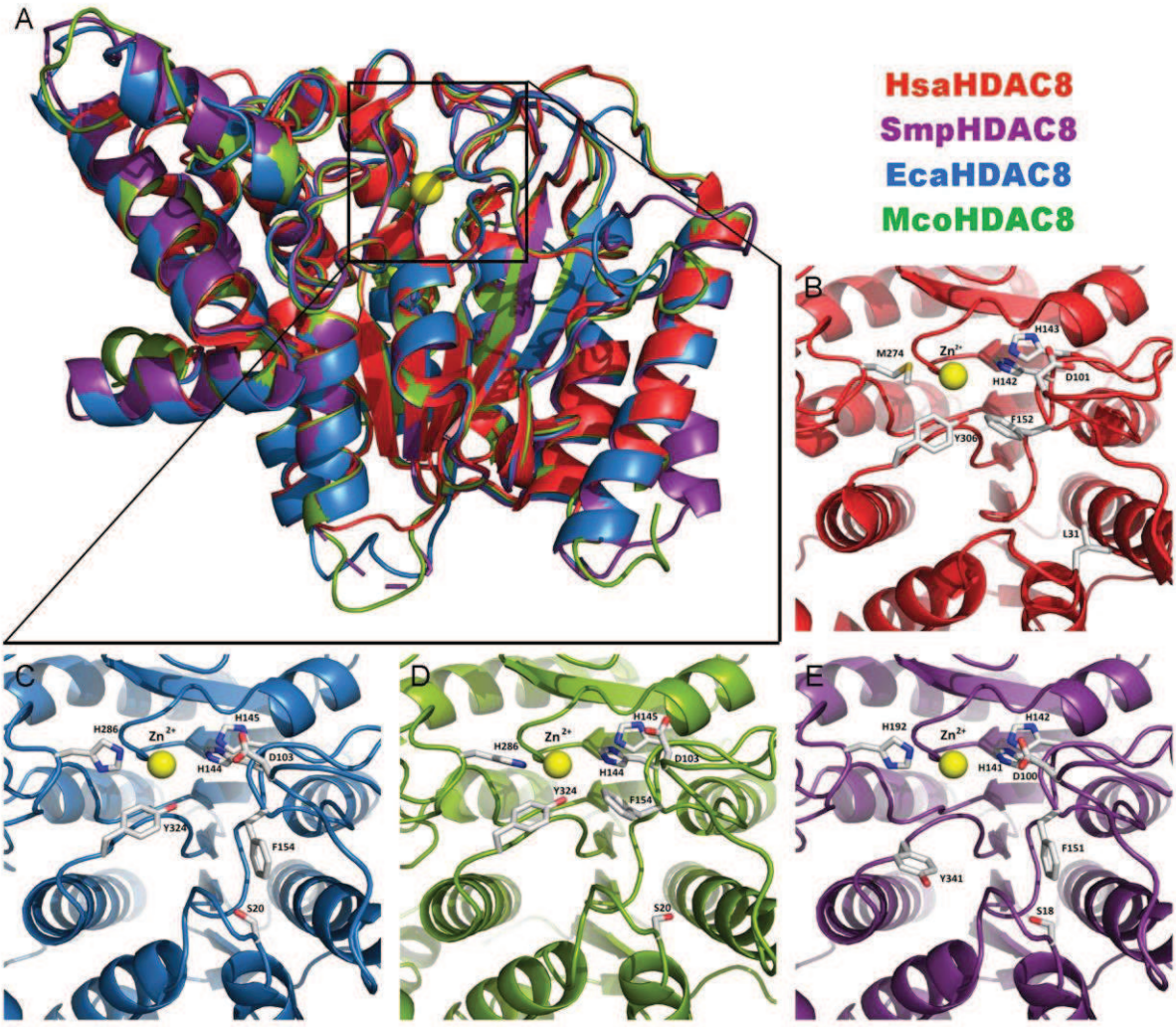


Figura 3.39. Los modelos estructurales de EcaHDAC8 y McoHDAC8 adoptan la estructura canónica tridimensional de las enzimas HDACs. (A) Superposición de las estructuras tridimensionales de HsaHDAC8 (rojo; PDB 1T64; *Homo sapiens*), SmpHDAC8 (violeta; PDB 4BZ5; *Schistosoma mansoni*) y modelos de estructurales tridimensionales de EcaHDAC8 (azul; *Echinococcus canadensis* G7) y McoHDAC8 (verde; *Mesocestoides corti*). Todas las estructuras tridimensionales están representadas como *cartoon*. La esfera amarilla representa el cofactor Zn^{2+}. Vista ampliada de los sitios catalíticos de (B) HsaHDAC8, (C) EcaHDAC8 y (D) McoHDAC8 y (E) SmpHDAC8. Las cadenas laterales de los residuos implicados en la unión al cofactor Zn^{2+}, la catálisis y la formación del sitio activo están representadas como bastones.

Las estructuras tridimensionales para EcaHDAC8 y McoHDAC8 sugieren que estas proteínas adoptarían la forma estructural canónica de las enzimas HDACs; formado por varias hojas β paralelas y entrelazadas rodeadas por un sándwich de hélices α (Figura 3.39A). Asimismo, se muestra una vista ampliada del sitio catalítico para cada proteína. Se puede observar que los residuos implicados en el mecanismo catalítico (se muestran las cadenas laterales representadas como bastones) se encuentran conservados en EcaHDAC8 y McoHDAC8 (Figura 3.39C y Figura3.39D, respectivamente). Solo los residuos correspondientes a la leucina en posición 31 (L31) y metionina en posición 274 (M274) de HsaHDAC8 (Figura 3.39B) se encuentran reemplazados por los residuos de serina e histidina en EcaHDAC8 (S20 y H286) y McoHDAC8 (S20 y H286). Las mutaciones de los residuos L31 y M274 de HsaHDAC8, presentes en cestodos, fueron también reportadas en SmpHDAC8 (S18 y H292) (Figura 3.39E) (Marek y col., 2013).

Por último, En la Figura 3.40 se muestra una vista ampliada del sitio catalítico en donde se resaltan las cadenas laterales de los residuos implicados en la coordinación del cofactor Zn^{2+} (representadas como bastones). Estos residuos se encuentran altamente conservados en EcaHDAC8 y McoHDAC8.

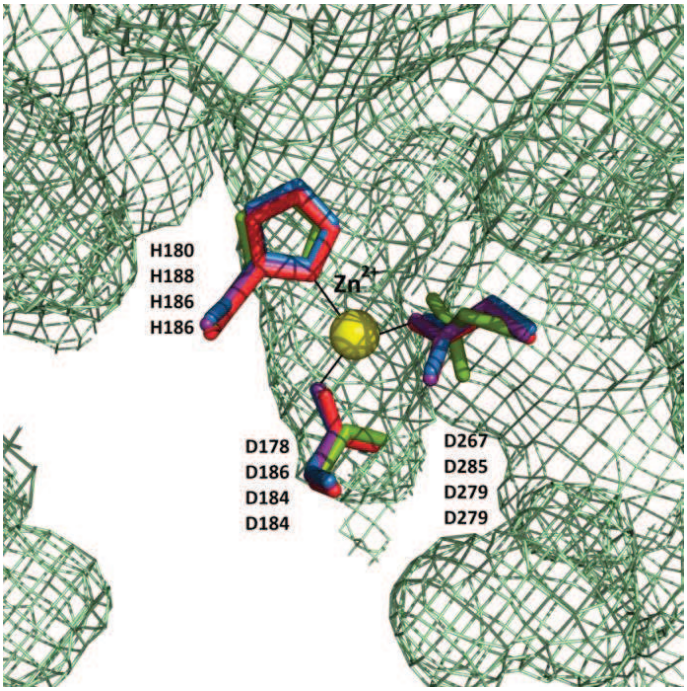


Figura 3.40. Residuos implicados en la coordinación del cofactor Zn^{2+} en EcaHDAC8 y McoHDAC8. Se muestran las cadenas laterales de los residuos implicados en la coordinación del cofactor Zn^{2+} de: HsaHDAC8 (rojo), SmpHDAC8 (violeta), EcaHDAC8 (azul) y McoHDAC8 (verde), representadas como

bastones. La esfera amarilla representa el cofactor Zn^{2+}. La superficie de HsaHDAC8 se muestra de fondo en verde.

3.5.4. Los modelos estructurales de EcaHDAC8 y McoHDAC8 presentan particularidades estructurales

Se identificaron particularidades estructurales en los modelos obtenidos mediante modelado por homología, para las proteínas EcaHDAC8 y McoHDAC8 que las distinguen de su ortólogo en *H. sapiens* HsaHDAC8. En las proteínas de cestodos se pudo observar la presencia de varias características estructurales particulares; principalmente en la región circundante a la fenilalanina en posición 154 (F154) de las proteínas de cestodos (Figura 3.41). Estas características estructurales sugieren que la F154 podría adoptar una conformación particular conocida como "*flipped out*" en las HDAC8s de cestodos, lo cual resulta importante en el diseño de inhibidores selectivos (Heimburg y col., 2016; Marek y col., 2013).

En la Figura 3.41 se pueden observar las características particulares encontradas en las HDAC8s de cestodos, por medio de diagramas de los modelos estructurales. Estas características son: 1) la leucina en posición 31 (L31), detrás de la fenilalanina (F152) de HsaHDAC8 se encuentra sustituida por un residuo de serina en EcaHDAC8 (S20) y McoHDAC8 (S20). El residuo de serina, al ser mucho más pequeño que la leucina, permite que el residuo de fenilalanina pueda adoptar la conformación "*flipped out*"; por disminución del impedimento estérico. 2) La presencia de varios residuos aromáticos alrededor de la fenilalanina, identificados en EcaHDAC8 (Y23, F107, Y113, W143 y Y156) y McoHDAC8 (Y23, F107, Y113, W143 y Y156). Estos residuos formarían una estructura conocida como "jaula aromática" que contribuye a que el residuo de fenilalanina pueda adoptar la conformación "*flipped out*"; por efecto hidrofóbico. Estas características, junto con la conformación particular del residuo de fenilalanina, fueron previamente reportadas en viarias estructuras obtenidas por cristalografía y difracción de rayos X para la HDAC8 de *S. mansoni* (Marek y col., 2013). En esta proteína, la leucina (L31) de HsaHDAC8 se encuentra reemplazada por un residuo de serina (S18) y se identificaron los residuos que forman la "jaula aromática" (F21, F104, Y110, W140 e Y153) (Marek y col., 2013). Sin embargo, hasta el momento, no se han reportado para la HDAC8 de *H. sapiens*. Cabe destacar que estas características particulares, encontradas en la SmpHDAC8, constituyen un punto importante en el diseño de inhibidores selectivos de la HDAC8 parasitaría, como lo son los compuestos TH65 y TH92 (Heimburg y col., 2016).

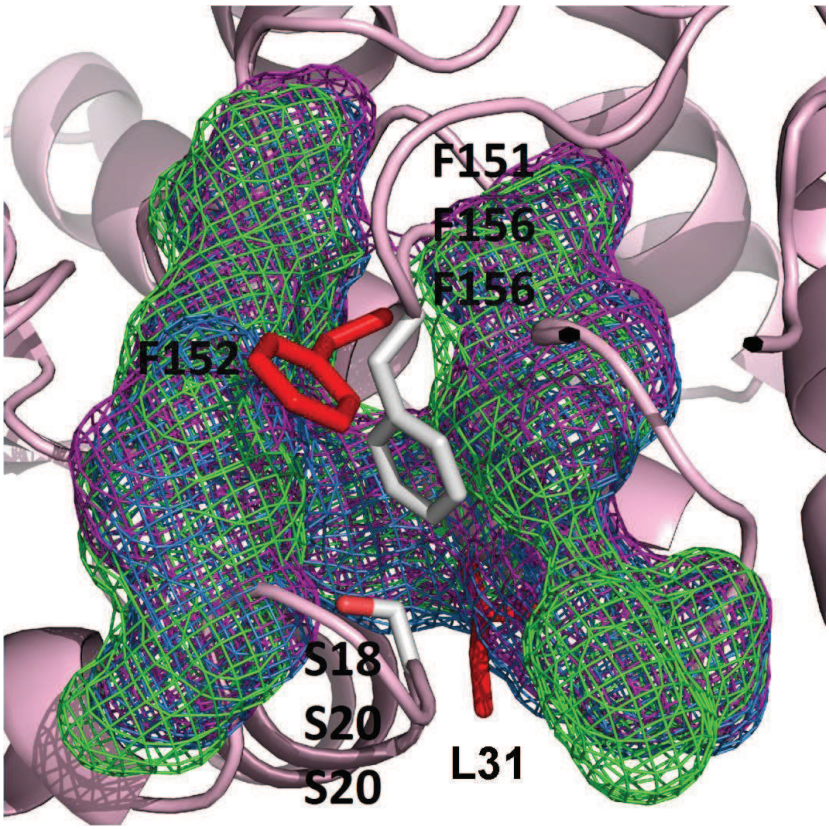


Figura 3.41. Entorno estructural de la fenilalanina de la HDAC8 de *Homo sapiens* (F152), *Schistosoma mansoni* (F151), *Echinococcus canadensis* G7 (F156) y *Mesocestoides corti* (F156). Se muestra la representación del entorno estructural y los residuos circundantes para la fenilalanina de HsaHDAC8 F152 (*H. sapiens*; PDB 1T64), SmpHDAC8 F151 (*S. mansoni*; PDB 4BZ5), EcaHDAC8 F156 (*E. canadensis* G7) y McoHDAC8 F156 (*M. corti*). Se muestra la sustitución del residuo de leucina en HsaHDAC8 (L31), por un residuo más pequeño, como serina, en SmpHDAC8 (S18), EcaHDAC8 (S20) y McoHDAC8 (S20). Las cadenas laterales de los residuos mencionados anteriormente se muestran representadas como bastones (de color rojo para HsaHDAC8 y blanco para SmpHDAC8, EcaHDAC8 y McoHDAC8). La estructura conocida como "jaula aromática" se muestra representada como malla. Esta estructura está formada por varios residuos aromáticos en SmpHDAC8: F21, F104, Y110, W140 e Y153 (de color violeta), EcaHDAC8: Y23, F107, Y113, W143 e Y156 (de color azul) y McoHDAC8: Y23, F107, Y113, W143 e Y156 (de color verde).

3.5.5. Los residuos implicados en la unión al inhibidor de las HDACs "Tricostatina A" se encuentran conservados en EcaHDAC8 y McoHDAC8

Por último, se analizaron los residuos implicados en la unión al inhibidor de las HDACs de Clase I y II, la Tricostatina A (TSA). En la Figura 3.42 se muestra una vista ampliada del sitio

catalítico de la HDAC8 de *H. sapiens,* en coordinación con la TSA (HsaHDAC8-TSA; PDB 1T64) (Figura 3.42A), y de los modelos estructurales de EcaHDAC8 (Figura 3.42B) y McoHDAC8 (Figura 3.42C). Se puede observar que los residuos implicados en la unión a la TSA se encuentran altamente conservados en EcaHDAC8 y McoHDAC8.

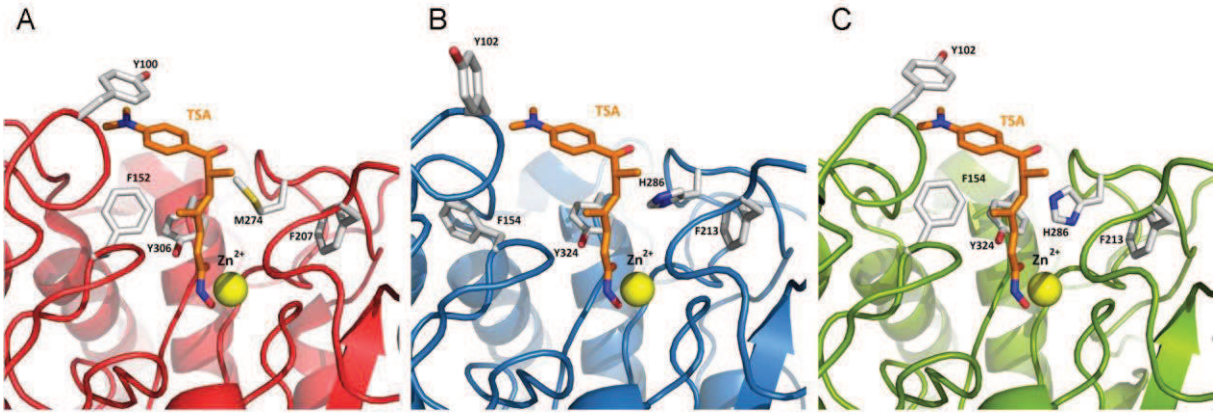


Figura 3.42 Los residuos involucrados en la unión al inhibidor de las-HDACs Tricostatina A (TSA) se encuentran conservados en modelos estructurales obtenidos por modelado por homología para EcaHDAC8 y McoHDAC8. Se muestra una vista ampliada del sitio catalítico de (A) la estructura tridimensional de HsaHDAC8 (*Homo sapiens*; PDB 1T64; en color rojo) y los modelos estructurales de (B) EcaHDAC8 (*Echinococcus canadensis* G7; en color azul) y McoHDAC8 (*Mesocestoides corti*; en color verde). Las proteínas se muestran representadas como *cartoon*. La esfera amarilla representa el cofactor Zn^{2+}. La TSA (en color naranja) y las cadenas laterales de los residuos implicados en la unión a la TSA (en color blanco) se muestran representados como bastones.

DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis doctoral se planteó como hipótesis que las enzimas Histonas deacetilasas (HDACs) juegan un papel importante en el desarrollo y la sobrevida de los parásitos cestodos, constituyendo potenciales blancos farmacológicos para el desarrollo de nuevas alternativas quimioterapéuticas contra enfermedades desatendidas causadas por estos parásitos.

En primera instancia, mediante análisis *in silico* sobre los genomas de cestodos (disponibles en la base de datos WomBase ParaSite), se determinó el repertorio de genes codificantes de enzimas HDACs de varias especies de cestodos. Se pudieron identificar entre 6 y 7 genes codificantes de HDACs en los genomas de varias especies de los géneros *Echinococcus*, *Taenia*, *Mesocestoides* e *Hymenolepis*; incluyendo la EmuHDAC1 previamente reportada en el parásito *E. multilocularis* (Koziol y col., 2014). Por otra parte, se determinó la identidad de los genes codificantes de HDACs en cestodos, mediante análisis filogenético. Este análisis nos permitió inferir la presencia de 3 miembros de las HDACs de Clase I y 3-4 miembros de las HDACs de Clase II en los cestodos analizados. El número de genes de HDACs identificados en cestodos es similar al reportado en los genomas de otros parásitos, incluido el trematodo *S. mansoni* (Scholte y col., 2017). En *S. mansoni* se identificaron tres genes de HDACs de Clase I (Oger y col., 2008) y cuatro genes de HDACs de Clase II (Scholte y col., 2017). Cabe destacar que se identificó un número menor de genes de HDACs en los genomas de cestodos, con respecto al número de genes de HDACs presentes en *H. sapiens* (Gray y Ekström, 2001; Gregoretti y col., 2004)*;* esto podría reflejar la menor complejidad de los parásitos cestodos. Por otra parte, solo se identificó un único miembro de la subclase HDAC1/2 en todos los genomas de cestodos analizados; al igual que en *S. mansoni* (Oger y col., 2008). La presencia de un único miembro de la subclase HDAC1/2 en parásitos está de acuerdo con la idea de que la duplicación del gen HDAC1 es específica para vertebrados (Brunmeir y col., 2009; Gregoretti y col., 2004). Asimismo, se analizaron los niveles de expresión transcripcional de los genes de HDACs, mediante datos de RNAseq disponibles para diferentes estadios de desarrollo de parásitos del género *Echinococcus*. Todos los genes de HDACs identificados mostraron niveles de expresión transcripcional en varios estadios de desarrollo de los parásitos *E. granulosus s.s.* G1 y *E. multilocularis*. Los altos niveles de expresión transcripcional observados para los genes de HDACs de Clase I y Clase II, sugieren que estos genes podrían tener un rol importante en la biología y la supervivencia parasitaria. La expresión de los tres genes de HDACs de Clase I también se reportó en varios estadios de desarrollo de *S. mansoni* (Oger y col., 2008). En este parásito, el gen SmpHDAC8 se expresa en todos los estadios de desarrollo

analizados. Además, el gen SmpHDAC8 presenta niveles de expresión transcripcional superiores a los otros genes de HDACs de Clase I en varios estadios de desarrollo (Oger y col., 2008). Sin embargo, esto no parece ser el caso para los parásitos *E. granulosus s.s.* G1 y *E. multilocularis*. En *E. granulosus s.s.* G1, el gen EgrHDAC1 presentó niveles de expresión transcripcional superiores a los otros genes de HDACs de Clase I, en todos los estadios de desarrollo analizados. El gen EgrHDAC8, por su parte, solo mostró expresión transcripcional detectable en estadios de desarrollo asociados con altos niveles de proliferación parasitaria, tales como parásito adulto y metacestodo, en donde se producen las oncosferas y los protoescólices; respectivamente. Estos resultados sugieren que el gen EgrHDAC8 podría tener un papel importante en la diferenciación y desarrollo del parásito *E. granulosus s.s.* G1. Por otra parte, en *E. multilocularis* el gen EmuHDAC1 presentó niveles de expresión transcripcional superiores a los otros genes de HDACs de Clase I en los estadios de desarrollo correspondientes a oncosferas y metacestodo. Cabe destacar que, EmuHDAC8 mostró un aumento en su nivel de expresión transcripcional en oncosferas activadas, en comparación a las oncosferas sin activar, lo que sugiere que el gen EmuHDAC8 podría tener un papel importante en el desarrollo de *E. multilocularis*. Los niveles de expresión transcripcional diferentes observados para los genes HDAC8 en oncosferas de *E. granulosus* s. s. G1 y *E. multilocularis,* se podría deber al hecho de que los datos de RNAseq de *E. granulosus* s. s. G1 fueron secuenciados utilizando la tecnología Roche 454 (Zheng y col., 2013), mientras que los datos de RNAseq de *E. multilocularis* fueron secuenciados utilizando la tecnología Illumina GA (Huang y col., 2016), que proporciona una mayor profundidad de secuenciación. Por lo tanto, los datos de expresión transcripcional mostrados no podrían ser comparables entre especies. Sin embargo, se pudo observar que HDAC8 se expresa en el metacestodo que constituye el estadio de relevancia clínica en ambos parásitos. Por último, en esta sección se analizó el grado de identidad entre los genes de HDACs identificados en cestodos con las HDACs de *H. sapiens*. Esto se realizó debido a que las proteínas con mayor divergencia de secuencia con sus ortólogos de *H. sapiens*, podrían constituir potenciales blancos farmacológicos selectivos. En este contexto, los análisis de identidad de aminoácidos de los dominios catalíticos de HDACs mostraron que algunos de los genes de HDACs en cestodos, como los genes de las HDAC8 y HDAC6, difieren en más del 55 % con sus ortólogos en *H. sapiens*; lo que sugiere que estas diferencias podrían explotarse farmacológicamente.

En base a los resultados del análisis *in silico*, se decidió validar las enzimas HDACs como blancos farmacológicos en cestodos. La relevancia de las HDACs sobre la viabilidad parasitaria se determinó midiendo el efecto de la inhibición de las HDACs, mediante el uso de la Tricostatina A (TSA; un inhibidor selectivo de las HDACs de Clase I y II), sobre el cultivo *in vitro* de tetratiridios

(TTy) de *M. corti*. Para este fin, se adaptaron al modelo de laboratorio de cestodos, *M. corti*, dos ensayos de viabilidad parasitaria independientes. Uno de los ensayos fue el de reducción de la resazurina (basado en la actividad metabólica), empleado previamente para la determinación de viabilidad parasitaria en metacestodos de *E. multilocularis* (Rufener y col., 2018; Stadelmann y col., 2016), y el otro el de determinación de motilidad parasitaria, empleado previamente para la determinación del efecto de neurotransmisores en la motilidad parasitaria de protoescólices de *E. canadensis* G7 (Camicia y col., 2013) y de TTy de *M. corti* (Camicia y col., 2018). En este trabajo se muestran las múltiples variantes a considerar al adaptar estas metodologías para la medición del efecto antihelmíntico de un alto número de compuestos, producido tras varios días de incubación, sobre TTy de *M corti*. Se pudo observar que el tiempo de tratamiento para el cual ocurrió una disminución significativa de la viabilidad fue coincidente con ambas metodologías. Mediante estos métodos, se determinó que la TSA produce una disminución significativa de la viabilidad de TTy de *M. corti* a los 6 días postratamiento. Asimismo, se observaron alteraciones en el tegumento y en la morfología general de los parásitos tratados con la TSA. Estos resultados mostraron que la TSA produce alteraciones fenotípicas en TTy de *M. corti* similares a las observadas comúnmente en el tratamiento con agentes quimioterapéuticos, tales como el PZQ y el ABZ (Markoski y col., 2006), y muestran concordancia con la disminución de la viabilidad parasitaria reportada en formas juveniles de *S. mansoni* después de la incubación con TSA, en concentraciones y tiempos de incubación comparables (Dubois y col., 2009). Por otra parte, se determinó si efectivamente la TSA produce la inhibición de las enzimas HDACs de cestodos; evaluando el cambio en los niveles de acetilación de las proteínas parasitarias mediante la técnica de Western Blot semicuantitativa. El aumento observado en los niveles de acetilación de las proteínas de TTy de *M. corti*, incluyendo la histona H4, después del tratamiento con la TSA sugiere que las enzimas HDACs de *M. corti* son inhibidas por la TSA. Sin embargo, no es posible confirmar si esto se debe a un efecto directo o indirecto del inhibidor. Por otra parte, se observó un aumento en los niveles de acetilación a los 6 días de incubación, en coincidencia con una disminución de la viabilidad parasitaria. El aumento en los niveles de acetilación también se observó para tiempos más cortos de incubación (3 días), lo que sugiere que hay un retraso en el efecto de la TSA sobre la viabilidad parasitaria. Por último, se pudieron detectar dos bandas (con pesos moleculares relativos de alrededor 15-16 kDa) cuando se empleó el anticuerpo anti-pan lisina acetilada en los TTy de *M. corti,* después del tratamiento con TSA. Estos resultados sugieren que otras histonas diferentes de la histona H4 (como la histona H2A o H3 de *M. corti*) pueden ser afectadas, en cuanto a sus niveles de acetilación, como consecuencia del tratamiento. Cabe destacar que el peso molecular relativo de las bandas detectadas es coherente el peso molecular de las histonas H2A y H3 de *M. corti* (Gen

ID: MCU_008363 y MCU_012803, respectivamente). Los resultados de este ensayo demuestran claramente que la TSA causa un aumento en los niveles de acetilación de las proteínas parasitarias, probablemente a través de la inhibición de las enzimas HDACs; lo que sugiere que la función de estas enzimas se encuentra conservada en cestodos.

Por otra parte, en este trabajo de tesis se propuso realizar un perfil de actividad antihelmíntica de compuestos con actividad conocida contra las diferentes clases de HDACs. Se evaluaron un total de 33 compuestos, distribuidos entre inhibidores de HDACs de Clases I y II. Se incluyeron además compuestos contra las Sirtuinas. Se observó para varios de los compuestos ensayados una disminución de la viabilidad parasitaria y alteraciones en el tegumento y la morfología general de TTy de *M. corti* tratados. Más aún, varios de estos compuestos mostraron un potente efecto antihelmíntico sobre TTy de *M. corti,* mostrando una disminución del 100% de la viabilidad parasitaria antes de los 9 días de incubación. Dentro de los inhibidores de las HDACs de Clase I, se ensayaron varios inhibidores diseñados en base a la estructura tridimensional de la HDAC8 de *S. mansoni* (SmpHDAC8) que constituyen inhibidores selectivos. Estos compuestos incluyen principalmente derivados del 3-aminobenzohidroxamato, en particular la serie TH de compuestos (Heimburg y col., 2016). Los compuestos TH65 y TH92 mostraron un potente efecto antihelmíntico. El efecto en viabilidad parasitaria de TTy de *M. corti* determinado para el TH65 fue similar al reportado en esquistosómulos de *S. mansoni*, mientras que en el caso del TH92 el efecto determinado fue mucho mayor al reportado en *S. mansoni* (Heimburg y col., 2016). Este último resultado se podría deber a una mayor afinidad del TH92 por la HDAC8 de *M. corti* en comparación con la SmpHDAC8 o a una mayor capacidad de difusión/acumulación intraparasitaria del compuesto. También se evaluaron inhibidores comerciales de las HDACs, que podrían ser considerados para la estrategia de reposicionamiento de drogas. Entre los compuestos comerciales evaluados, el Entinostat (un inhibidor selectivo de las HDACs de Clase I, en particular de la HDAC1 y HDAC3 de *H. sapiens*) (Hu y col., 2003) mostró un potente efecto antihelmíntico, causando una disminución del 100% de la viabilidad parasitaria incluso a la concentración de 2 μM. La estrategia de reposicionamiento de drogas constituye una alternativa de utilidad especialmente en el campo de las enfermedades parasitaria desatendidas, ya que permite evitar costosos estudios farmacocinéticos y toxicológicos (Bellera y col., 2018). Por otra parte, ninguno de los inhibidores de las HDACs de Clase II evaluados (JS16, JS28, KK16, ST36) mostró un efecto significativo en la viabilidad parasitaria. Estos compuestos fueron diseñados como inhibidores de la HDAC6 de *H. sapiens*; mostrando una inhibición selectiva de la HsaHDAC6 en relación con las otras HDACs de *H. sapiens* y un potente efecto en el cultivo de líneas celulares humanas (King y col., 2018; Schäfer y col., 2008; Senger y col., 2016). El nulo efecto de estos compuestos sobre la

viabilidad parasitaria de TTy de *M. corti*, podría ser consecuencia del bajo porcentaje de identidad que se observó entre los dominios de las HDAC6 de cestodos con los de la HsaHDAC6 (menores al 51% en todos los cestodos analizados). Por otra parte, los genes de HDAC6 en parásitos del género *Echinococcus* mostraron altos niveles de expresión transcripcional en todos los estadios de desarrollo analizados. En particular, se observó un aumento en los niveles de expresión transcripcional del gen EmuHDAC6 en oncosferas activas en comparación con oncosferas sin activar, lo que sugiere que el gen EmuHDAC6 podría tener un papel importante en la diferenciación de *E. multilocularis*. Por todos estos motivos, resulta interesante una caracterización más profunda de las HDAC6 de cestodos. Por último, también se evaluaron varios inhibidores de las enzimas Sirtuinas (Mz25, Mz236, Ex527 y AGK2). De estos compuestos, solo el inhibidor selectivo de la Sirt2, Mz25 (Rumpf y col., 2015; Schiedel y col., 2016), mostró un potente efecto sobre la viabilidad parasitaria de TTy de *M. corti*. El Mz25 produjo alteraciones en el tegumento y en la morfología general parasitaria, particularmente se observaron estructuras en formas de agujas que parecen ser extensiones del tegumento parasitario. Estas extensiones podrían corresponder a microtúbulos, que al estar acetilados formarían estructuras más estables (Rumpf y col., 2015; Takemura y col., 1992). La falta de efecto antihelmíntico en TTy de *M. corti* observada para el Mz236, un análogo estructural del Mz25 con un IC_{50} casi 3 veces menor que éste con la Sirt2 (Schiedel y col., 2016), muestra la importancia de la síntesis y evaluación de varios derivados conteniendo distintos sustituyentes para cada serie estructural de compuestos.

En base a los resultados obtenidos en la determinación del perfil antihelmíntico de los inhibidores de HDACs, se seleccionaron para una caracterización más profunda los compuestos más potentes: Entinostat, TH65, TH92 y Mz25. Estos compuestos mostraron un efecto antihelmíntico dependiente de la dosis y el tiempo de incubación (con IC_{50} entre 1 y 16 μM); siendo el Entinostat el compuesto más potente mientras que el Mz25 el menos potente. Los 4 compuestos mostraron un efecto antihelmíntico superior al obtenido con la TSA y la droga antihelmíntica ABZ. Asimismo, se comprobó que el efecto antihelmíntico observado para estos compuestos es irreversible, produciendo la muerte de los TTy de *M. corti*. Por otra parte, se evaluó el efecto de los compuestos seleccionados en la morfología parasitaria, a nivel ultraestructural, mediante microscopía electrónica de barrido. Para todos los compuestos se observó un gran daño en el tegumento parasitario y en la morfología general parasitaria. Se pudieron observar vesículas de diferentes tamaños, depresiones del tegumento y pérdida de los microticos en toda la superficie parasitaria después del tratamiento. Estos daños del tegumento son similares a los observados con otros compuestos sobre la superficie de TTy de *M. corti*, como el timol (Maggiore y Elissondo, 2014). Por último, se caracterizó el efecto antihelmíntico de

combinaciones de a pares de los compuestos seleccionados y con el ABZ, mediante el cálculo del índice de efecto proporcional (IEP) (Planer y col., 2014). Varias de estas combinaciones mostraron un potente efecto antihelmíntico con IEP ≥ 0,5; lo que indica que el efecto observado se debe a un efecto potenciado para los pares y no son solo a un efecto aditivo de los efectos individuales. Cabe destacar que se observó un aumento en el efecto antihelmíntico de las combinaciones de los compuestos seleccionados con el ABZ, con excepción del par ABZ-Mz25. Este resultado sugiere que sería posible disminuir la concentración de la droga antihelmíntica ABZ en el tratamiento, lo cual podría reducir sus efectos adversos y aumentar la eficacia del tratamiento. Sin embargo, es necesario un trabajo adicional para establecer si las combinaciones de drogas pueden ser efectivas en modelos animales y potenciales candidatos para posibles ensayos clínicos.

Por último, en base a los resultados obtenidos durante este trabajo se decidió caracterizar las enzimas HDAC8 de cestodos. Estas proteínas mostraron porcentajes de identidad de solo un 45-48 % con respecto a la HDAC8 de *H. sapiens.* Además, se expresan en varios estadios de desarrollo de parásitos del género *Echinococcus*, incluyendo el estadio de desarrollo correspondiente a metacestodos, de relevancia clínica en la enfermedad producida en el ser humano. Por último, la SmpHDAC8 representa una enzima ampliamente caracterizada a nivel bioquímico y estructural y validada como blanco farmacológico en *S. mansoni* (Chakrabarti y col., 2015; Marek y col., 2013). Los prometedores resultados reportados para esta enzima parasitaria, se deben a las características estructurales particulares que la diferencian de su ortólogo en *H. sapiens* y que han permitido el diseño de compuestos específicos (Heimburg y col., 2016; Kannan y col., 2014; Marek y col., 2013, 2018). Teniendo en cuenta todo lo mencionado, se caracterizaron las enzimas HDAC8 de *E. canadensis* G7 (EcaHDAC8) y *M. corti* (McoHDAC8), a fin de determinar si comparten diferencias estructurales con la HsaHDAC8 y similitudes estructurales con la SmpHDAC8. En este trabajo se confirmaron por primera vez las secuencias de nucleótidos completas de la HDAC8 de *E. canadensis* G7 y *M. corti,* mediante amplificación por RT-PCR, clonación y secuenciación.

El modelado por homología mostró que las proteínas EcaHDAC8 y McoHDAC8 podrían adoptar la forma canónica de las HDACs; sugiriendo que estas enzimas podrían ser activas. Se encontraron algunas diferencias en estas proteínas con respecto a la HsaHDAC8; que incluyen: i) las presencia de inserciones de varios aminoácidos que se extienden en los bucles de la superficie externas de las HDAC8 parasitarias, ii) el reemplazo de la metionina (M274) de HsaHDAC8 por un residuo de histidina en las HDAC8 de los cestodos analizados, iii) la sustitución del residuo de leucina (L31) de HsaHDAC8 por un residuo de serina, menos voluminoso, en las HDAC8 de

cestodos iv) la presencia de residuos aromáticos formando la estructura conocida como “jaula aromática”. Todas estas características encontradas en EcaHDAC8 y McoHDAC8, también se reportaron en las secuencias predichas de las HDAC8 de *E. granulosus s.s.* G1, *E. multilocularis*, *H. microstoma* y *T. solium*, mediante modelado por homología (Marek y col., 2013; Melesina y col., 2015). Cabe destacar que las características estructurales mencionadas anteriormente también están presentes en SmpHDAC8 y han sido empleadas para el diseño racional de inhibidores selectivos (Heimburg y col., 2016; Marek y col., 2018). Algunos de estos inhibidores, como los de la serie TH (TH65 y TH92), mostraron potentes efectos antihelmínticos en TTy de *M. corti*, lo que sugiere que estos compuestos constituyen potenciales inhibidores de las HDAC8 de cestodos; representando de esta manera fármacos potenciales en la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento farmacológico contra las enfermedades desatendidas causadas por cestodos. Sin embargo, si bien la caracterización de las HDAC8 de cestodos, mediante modelado por homología, aporta datos interesantes en relación a las características estructurales de estas proteínas que nos permiten inferir la interacción con los inhibidores selectivos de la SmpHDAC8; es necesario corroborar estos resultados mediante la caracterización cinética y estructural (por cristalografía y difracción de rayos X) de las HDAC8 de cestodos. Para este fin, resulta imprescindible la obtención de proteínas recombinantes de las HDAC8 parasitarias. Por último, también se demostró la conservación de los residuos implicados en la unión con el inhibidor selectivo de las HDACs de Clase I y II, Tricostatina A; en las proteínas EcaHDAC8 y McoHDAC8; lo que sugiere que el inhibidor de las HDACs TSA podría inhibir también las HDACs de cestodos y se corresponde con la disminución significativa de la viabilidad parasitaria observada en este trabajo.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral sientan una base para el estudio de la regulación transcripcional de la expresión genética a través de enzimas modificadoras de la cromatina en cestodos. Además, contribuyen al desarrollo y a la reutilización de compuestos que afectan su actividad y a la implementación de nuevas alternativas para el tratamiento de enfermedades desatendidas causadas por parásitos cestodos.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis doctoral se muestra la primera caracterización del repertorio completo de genes codificantes de HDACs en varias especies de cestodos, incluyendo tanto especies zoonóticas como así también modelos de laboratorio. Asimismo, se reportó el perfil transcripcional de estos genes en distintos estadios de desarrollo de algunos de estos cestodos. Se pudo determinar que las HDAC8 de cestodos poseen bajos porcentajes de identidad con su ortólogo en *H. sapiens* y mayor expresión en estadios de desarrollo asociados con altos niveles de proliferación y diferenciación celular, así como en el estadio clínicamente relevante en la enfermedad en el ser humano. Por último, se validaron las HDACs de cestodos como potenciales blancos farmacológicos, mediante la determinación del efecto de su inhibición sobre la viabilidad de *M. corti*. El inhibidor selectivo de las HDACs de Clases I y II, Tricostatina A (TSA), produjo una disminución significativa de la viabilidad parasitaria y un aumento en los niveles de acetilación de las proteínas totales, incluyendo la histona H4, en parásitos tratados. Por otra parte, se determinó el perfil de actividad antihelmíntica de un alto número de compuestos con actividad conocida contra diferentes clases de HDACs. Varios de estos compuestos produjeron una disminución de la viabilidad parasitaria y alteraciones en el tegumento y la morfología general de TTy de *M. corti*. Más aún, varios compuestos mostraron un potente efecto antihelmíntico con una disminución del 100% de la viabilidad parasitaria antes de los 9 días de incubación; tal como Entinostat, Mz25, TH65 y TH92 que fueron seleccionados para su caracterización. Estos compuestos mostraron un efecto antihelmíntico dependiente tanto de la dosis como del tiempo de tratamiento, con resultados superiores a los obtenidos con la TSA y la droga antihelmíntica ABZ. Se mostró que el efecto observado para estos compuestos no fue reversible al ser eliminarlos del medio de cultivo. Asimismo, estos compuestos mostraron un efecto potenciador del efecto antihelmíntico cuando fueron utilizados en combinaciones binarias entre ellos y con el ABZ. Las observaciones realizadas por microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido mostraron alteraciones en el tegumento y la morfología de los parásitos tratados. Por último, se confirmaron las secuencias nucleotídicas completas de la HDAC8 de *E. canadensis* G7 (EcaHDAC8) y *M. corti* (McoHDAC8). Se identificó en los modelos de estructura tridimensional de estas proteínas características estructurales particulares que las diferencian de su ortólogo en *H. sapiens*, similares a las reportadas para la HDAC8 de *S. mansoni* que permitieron el diseño de inhibidores selectivos, tales como el TH65 y el TH92. Estos resultados sugieren que las HDAC8 de cestodos representan promisorios blancos farmacológicos en la búsqueda racional de nuevos compuestos con capacidad antihelmíntica. Por último, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral

proporcionan la base para nuevos estudios sobre la actividad y estructura de las HDACs de cestodos, así como también para el descubrimiento de nuevos inhibidores de HDACs para el tratamiento de enfermedades desatendidas causadas por cestodos y su extrapolación hacia otras enfermedades parasitarias.

PERSPECTIVAS

6. PERSPECTIVAS

Como se desprende de lo presentado en este trabajo de tesis doctoral, la investigación en el campo de las enzimas HDACs en cestodos es un área en la que resta mucho por descubrir. Más aún cuando se trata de organismos tales como *Echinococcus* spp. cuya biología aún no se conoce por completo, y cuyo impacto en medicina veterinaria y salud humana son tan importantes. A continuación, se plantean algunos aspectos que sería interesante abarcar en futuras investigaciones, tendientes a ampliar el conocimiento del rol de las HDACs en la biología de parásitos cestodos y la evaluación de su potencial como blancos farmacológicos, en la búsqueda de nuevas alternativas para contribuir al tratamiento farmacológico de enfermedades desatendidas.

- Evaluar el efecto de los inhibidores de las HDACs sobre el cultivo in vitro de parásitos del género *Echinococcus* spp., como protoescólices del *E. canadensis* G7 o metacestodos de *E. multilocularis.*

- Evaluar la eficacia en el tratamiento *in vivo* de los inhibidores de las HDACs, utilizando el modelo murino de infección secundaria de *E. granulosus.*

- Confirmar la secuencia de nucleótidos, mediante RT-PCR, clonado y secuenciación, de otros potenciales blancos farmacológicos como las HDAC6 de cestodos.

- Expresar proteínas recombinantes de los potenciales blancos farmacológicos, como las HDAC8 y HDAC6 de cestodos.

- Caracterizar la interacción de las proteínas recombinantes con los inhibidores de HDACs, mediante análisis de QSAR (del inglés, *Quantitative structure-activity relationship*)

- Validar los potenciales blancos farmacológicos mediante el uso de herramientas como ARNi (ARN interferente), que ha sido recientemente reportada para cultivos primarios de *E. multilocularis*, con resultados promisorios.

- Determinar los cambios en la transcripción de genes y en la acetilación de proteínas producidos al tratar con inhibidores de las HDACs.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referencias Bibliográficas

Alvarez Rojas, C.A., Romig, T., Lightowlers, M.W., 2014. *Echinococcus granulosus* sensu lato genotypes infecting humans - review of current knowledge. Int. J. Parasitol. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.08.008

Andrews, K.T., Haque, A., Jones, M.K., 2012. HDAC inhibitors in parasitic diseases. Immunol. Cell Biol. 90, 66-77. https://doi.org/10.1038/icb.2011.97

Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., Schwede, T., 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. Bioinformatics 22, 195-201. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti770

Avila, H.G., Santos, G.B., Cucher, M.A., Macchiaroli, N., Pérez, M.G., Baldi, G., Jensen, O., Pérez, V., López, R., Negro, P., Scialfa, E., Zaha, A., Ferreira, H.B., Rosenzvit, M., Kamenetzky, L., 2017. Implementation of new tools in molecular epidemiology studies of *Echinococcus granulosus sensu lato* in South America. Parasitol. Int. 66, 250-257. https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.02.001

Bellera, C.L., Sbaraglini, M.L., Talevi, A., 2018. Modern Approaches for the Discovery of Anti-Infectious Drugs for the Treatment of Neglected Diseases. Curr. Top. Med. Chem. 18, 369-381. https://doi.org/10.2174/1568026618666180509151146

Benkert, P., Tosatto, S.C.E., Schomburg, D., 2008. QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. Proteins Struct. Funct. Bioinforma. 71, 261-277. https://doi.org/10.1002/prot.21715

Berrecil Flores, M.A., 2014. Parasitología Médica, 5°. ed.

Berriman, M., Haas, B.J., LoVerde, P.T., Wilson, R.A., Dillon, G.P., Cerqueira, G.C., Mashiyama, S.T., Al-Lazikani, B., Andrade, L.F., Ashton, P.D., Aslett, M.A., Bartholomeu, D.C., Blandin, G., Caffrey, C.R., Coghlan, A., Coulson, R., Day, T.A., Delcher, A., DeMarco, R., Djikeng, A., Eyre, T., Gamble, J.A., Ghedin, E., Gu, Y., Hertz-Fowler, C., Hirai, H., Hirai, Y., Houston, R., Ivens, A., Johnston, D.A., Lacerda, D., Macedo, C.D., McVeigh, P., Ning, Z., Oliveira, G., Overington, J.P., Parkhill, J., Pertea, M., Pierce, R.J., Protasio, A. V., Quail, M.A., Rajandream, M.-A., Rogers, J., Sajid, M., Salzberg, S.L., Stanke, M., Tivey, A.R., White, O., Williams, D.L., Wortman, J., Wu, W., Zamanian, M., Zerlotini, A., Fraser-Liggett, C.M., Barrell, B.G., El-Sayed, N.M., 2009. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. Nature 460, 352-358. https://doi.org/10.1038/nature08160

Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Cassarino, T.G., Bertoni, M., Bordoli, L., Schwede, T., 2014. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. Nucleic Acids Res. 42, W252-W258. https://doi.org/10.1093/nar/gku340

Bogitsh, B.B., Carter, C.E., Oeltmann, T.T., 2013. Human Parasitology, Human Parasitology. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/C2010-0-65681-1

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-54.

Brunmeir, R., Lagger, S., Seiser, C., 2009. Histone deacetylase HDAC1/HDAC2-controlled embryonic development and cell differentiation. Int. J. Dev. Biol. 53, 275-289. https://doi.org/10.1387/ijdb.082649rb

Burnette, W.N., 1981. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal. Biochem. 112, 195-203.

Cabezas-Cruz, A., Lancelot, J., Caby, S., Oliveira, G., Pierce, R.J., 2014. Epigenetic control of gene function in schistosomes: a source of therapeutic targets? Front. Genet. 5, 317. https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00317

Camicia, F., Celentano, A.M., Johns, M.E., Chan, J.D., Maldonado, L., Vaca, H., Di Siervi, N., Kamentezky, L., Gamo, A.M., Ortega-Gutierrez, S., Martin-Fontecha, M., Davio, C., Marchant, J.S., Rosenzvit, M.C., 2018. Unique pharmacological properties of serotoninergic G-protein coupled receptors from cestodes. PLoS Negl. Trop. Dis. 12, e0006267. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006267

Camicia, F., Herz, M., Prada, L.C., Kamenetzky, L., Simonetta, S.H., Cucher, M.A., Bianchi, J.I., Fernández, C., Brehm, K., Rosenzvit, M.C., 2013. The nervous and prenervous roles of serotonin in *Echinococcus spp*. Int. J. Parasitol. 43, 647-659. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.03.006

Campo, V.A., 2017. Comparative effects of histone deacetylases inhibitors and resveratrol on *Trypanosoma cruzi* replication, differentiation, infectivity and gene expression. Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist. 7, 23-33. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2016.12.003

Casulli, A., Barth, T.F.E., Tamarozzi, F., 2019. *Echinococcus multilocularis*. Trends Parasitol. https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.05.005

Chai, J.-Y., 2013. Praziquantel Treatment in Trematode and Cestode Infections: An Update. Infect. Chemother. 45, 32. https://doi.org/10.3947/ic.2013.45.1.32

Chakrabarti, A., Oehme, I., Witt, O., Oliveira, G., Sippl, W., Romier, C., Pierce, R.J., Jung, M., 2015. HDAC8: a multifaceted target for therapeutic interventions. Trends Pharmacol. Sci. 36, 481-492. https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2015.04.013

Chua, M.J., Arnold, M.S.J., Xu, W., Lancelot, J., Lamotte, S., Späth, G.F., Prina, E., Pierce, R.J., Fairlie, D.P., Skinner-Adams, T.S., Andrews, K.T., 2017. Effect of clinically approved HDAC inhibitors on *Plasmodium*, *Leishmania* and *Schistosoma* parasite growth. Int. J. Parasitol. Drugs drug Resist. 7, 42-50. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2016.12.005

Chuang, D.M., Leng, Y., Marinova, Z., Kim, H.J., Chiu, C.T., 2009. Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions. Trends Neurosci. https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.06.002

Collins, J.J., 2017. Platyhelminthes. Curr. Biol. 27, R252-R256. https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.016

Combet, C., Jambon, M., Deléage, G., Geourjon, C., 2002. Geno3D: Automatic comparative molecular modelling of protein. Bioinformatics 18, 213-214. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.1.213

Coral-Almeida, M., Gabriël, S., Abatih, E.N., Praet, N., Benitez, W., Dorny, P., 2015. *Taenia solium* Human Cysticercosis: A Systematic Review of Sero-epidemiological Data from Endemic Zones around the World. PLoS Negl. Trop. Dis. 9, e0003919. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003919

Cucher, M., Mourglia-Ettlin, G., Prada, L., Costa, H., Kamenetzky, L., Poncini, C., Dematteis, S., Rosenzvit, M.C., 2013. *Echinococcus granulosus* pig strain (G7 genotype) protoscoleces did not develop secondary hydatid cysts in mice. Vet. Parasitol. 193, 185-192. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.027

Cucher, M.A., Macchiaroli, N., Baldi, G., Camicia, F., Prada, L., Maldonado, L., Avila, H.G., Fox, A., Gutiérrez, A., Negro, P., López, R., Jensen, O., Rosenzvit, M., Kamenetzky, L., 2016. Cystic echinococcosis in South America: systematic review of species and genotypes of *Echinococcus granulosus sensu lato* in humans and natural domestic hosts. Trop. Med. Int. Heal. https://doi.org/10.1111/tmi.12647

de Ruijter, A.J.M., van Gennip, A.H., Caron, H.N., Kemp, S., van Kuilenburg, A.B.P., 2003. Characterization of the classical HDAC family. Biochem. J. 370, 737-49. https://doi.org/10.1042/BJ20021321

Debiaggi, M.F., Soriano, S.V., Pierangeli, N.B., Lazzarini, L.E., Pianciola, L.A., Mazzeo, M.L., Moguillansky, S., Farjat, J.A.B., 2017. Genetic characterization of human hydatid cysts shows coinfection by *Echinococcus canadensis* G7 and *Echinococcus granulosus* sensu stricto G1 in Argentina. Parasitol. Res. 116, 2599-2604. https://doi.org/10.1007/s00436-017-5555-2

Drummond, D.C., Noble, C.O., Kirpotin, D.B., Guo, Z., Scott, G.K., Benz, C.C., 2005. CLINICAL DEVELOPMENT OF HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS AS ANTICANCER AGENTS. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 45, 495-528. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095825

Dubois, F., Caby, S., Oger, F., Cosseau, C., Capron, M., Grunau, C., Dissous, C., Pierce, R.J., 2009. Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis, histone hyperacetylation and up-regulation of gene transcription in *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasitol. 168, 7-15. https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.06.001

Dybicz, M., Gierczak, A., Dąbrowska, J., Rdzanek, Ł., Michałowicz, B., 2013. Molecular diagnosis of cystic echinococcosis in humans from central Poland. Parasitol. Int. 62, 364-7. https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.03.005

Eckert, J., Deplazes, P., 2004. Biological, Epidemiological, and Clinical Aspects of Echinococcosis, a Zoonosis of Increasing Concern. Clin. Microbiol. Rev. https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.107-135.2004

Engel, J.A., Jones, A.J., Avery, V.M., Sumanadasa, S.D.M., Ng, S.S., Fairlie, D.P., Adams, T.S., Andrews, K.T., 2015. Profiling the anti-protozoal activity of anti-cancer HDAC inhibitors against *Plasmodium* and *Trypanosoma* parasites. Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist. 5. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2015.05.004

Falkenberg, K.J., Johnstone, R.W., 2014. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. Nat. Rev. Drug Discov. https://doi.org/10.1038/nrd4360

Flisser, A., Sarti, E., Lightowlers, M., Schantz, P., 2003. Neurocysticercosis: Regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas, en: Acta Tropica. Elsevier, pp. 43-51. https://doi.org/10.1016/S0001-706X(03)00054-8

Fogang, Y.F., Savadogo, A.A., Camara, M., Toffa, D.H., Basse, A., Sow, A.D., Ndiaye, M.M., 2015. Managing neurocysticercosis: challenges and solutions. Int. J. Gen. Med. 8, 333-44. https://doi.org/10.2147/IJGM.S73249

Garcia, H.H., Moro, P.L., Schantz, P.M., 2007. Zoonotic helminth infections of humans: Echinococcosis, cysticercosis and fascioliasis. Curr. Opin. Infect. Dis. https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3282a95e39

Garcia, H.H., Nash, T.E., Del Brutto, O.H., 2014. Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. Lancet Neurol. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70094-8

Geyer, K.K., Hoffmann, K.F., 2012. Epigenetics: A key regulator of platyhelminth developmental

biology? Int. J. Parasitol. 42, 221-224. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.02.003

Gordon, D., Abajian, C., Green, P., 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. Genome Res. 8, 195-202.

Gordon, D., Desmarais, C., Green, P., 2001. Automated Finishing with Autofinish. Genome Res. 11, 614-625. https://doi.org/10.1101/gr.171401

Gottstein, B., Stojkovic, M., Vuitton, D.A., Millon, L., Marcinkute, A., Deplazes, P., 2015. Threat of alveolar echinococcosis to public health – a challenge for Europe. Trends Parasitol. 31, 407-412. https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.06.001

Gray, S.G., Ekström, T.J., 2001. The Human Histone Deacetylase Family. Exp. Cell Res. 262, 75-83. https://doi.org/10.1006/excr.2000.5080

Gregoretti, I., Lee, Y.-M., Goodson, H. V, 2004. Molecular Evolution of the Histone Deacetylase Family: Functional Implications of Phylogenetic Analysis. J. Mol. Biol. 338, 17-31. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.02.006

Gripper, L.B., Welburn, S.C., 2017. Neurocysticercosis infection and disease–A review. Acta Trop. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.015

Hailu, G.S., Robaa, D., Forgione, M., Sippl, W., Rotili, D., Mai, A., 2017. Lysine Deacetylase Inhibitors in Parasites: Past, Present, and Future Perspectives. J. Med. Chem. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01595

He, F., 2011. Laemmli-SDS-PAGE. BIO-PROTOCOL 1. https://doi.org/10.21769/BioProtoc.80

Heimburg, T., Chakrabarti, A., Lancelot, J., Marek, M., Melesina, J., Hauser, A.-T., Shaik, T.B., Duclaud, S., Robaa, D., Erdmann, F., Schmidt, M., Romier, C., Pierce, R.J., Jung, M., Sippl, W., 2016. Structure-Based Design and Synthesis of Novel Inhibitors Targeting HDAC8 from *Schistosoma mansoni* for the Treatment of Schistosomiasis. J. Med. Chem. 59, 2423-2435. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01478

Helin, K., Dhanak, D., 2013. Chromatin proteins and modifications as drug targets. Nature 502, 480-488. https://doi.org/10.1038/nature12751

Hemphill, A., 2010. Development and applications of cestode and trematode laboratory models. Parasitology 137, 329. https://doi.org/10.1017/S0031182010000132

Hemphill, A., Stadelmann, B., Rufener, R., Spiliotis, M., Boubaker, G., Müller, J., Müller, N., Gorgas, D., Gottstein, B., 2014. Treatment of echinococcosis: albendazole and mebendazole – what else? Parasite 21, 70. https://doi.org/10.1051/parasite/2014073

Horton, R.., 1997. Albendazole in treatment of human cystic echinococcosis: 12 years of experience. Acta Trop. 64, 79-93. https://doi.org/10.1016/S0001-706X(96)00640-7

Howe, K.L., Bolt, B.J., Cain, S., Chan, J., Chen, W.J., Davis, P., Done, J., Down, T., Gao, S., Grove, C., Harris, T.W., Kishore, R., Lee, R., Lomax, J., Li, Y., Muller, H.-M., Nakamura, C., Nuin, P., Paulini, M., Raciti, D., Schindelman, G., Stanley, E., Tuli, M.A., Van Auken, K., Wang, D., Wang, X., Williams, G., Wright, A., Yook, K., Berriman, M., Kersey, P., Schedl, T., Stein, L., Sternberg, P.W., 2016. WormBase 2016: expanding to enable helminth genomic research. Nucleic Acids Res. 44, D774-80. https://doi.org/10.1093/nar/gkv1217

Howe, K.L., Bolt, B.J., Shafie, M., Kersey, P., Berriman, M., 2017. WormBase ParaSite - a comprehensive resource for helminth genomics. Mol. Biochem. Parasitol. 215, 2-10. https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.11.005

Hu, E., Dul, E., Sung, C.M., Chen, Z., Kirkpatrick, R., Zhang, G.F., Johanson, K., Liu, R., Lago, A., Hofmann, G., Macarron, R., De los Frailes, M., Perez, P., Krawiec, J., Winkler, J., Jaye, M.,

2003. Identification of Novel Isoform-Selective Inhibitors within Class I Histone Deacetylases. J. Pharmacol. Exp. Ther. 307, 720-728. https://doi.org/10.1124/jpet.103.055541

Huang, F., Dang, Z., Suzuki, Y., Horiuchi, T., Yagi, K., Kouguchi, H., Irie, T., Kim, K., Oku, Y., 2016. Analysis on Gene Expression Profile in Oncospheres and Early Stage Metacestodes from *Echinococcus multilocularis*. PLoS Negl. Trop. Dis. 10, e0004634. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004634

International Helminth Genomes Consortium, 2017. Comparative genomics of the major parasitic worms International Helminth Genomes Consortium. bioRxiv 236539. https://doi.org/10.1101/236539

Jabbar, A., Jenkins, D.J., Crawford, S., Walduck, A.K., Gauci, C.G., Lightowlers, M.W., 2011. Oncospheral penetration glands are the source of the EG95 vaccine antigen against cystic hydatid disease. Parasitology 138, 89-99. https://doi.org/10.1017/S0031182010001034

Kalin, J.H., Bergman, J.A., 2013. Development and therapeutic implications of selective histone deacetylase 6 inhibitors. J. Med. Chem. 56, 6297-313. https://doi.org/10.1021/jm4001659

Kamenetzky, L., Gutierrez, A.M., Canova, S.G., Haag, K.L., Guarnera, E.A., Parra, A., García, G.E., Rosenzvit, M.C., 2002. Several strains of *Echinococcus granulosus* infect livestock and humans in Argentina. Infect. Genet. Evol. 2, 129-136. https://doi.org/10.1016/S1567-1348(02)00131-4

Kannan, S., Melesina, J., Hauser, A.-T., Chakrabarti, A., Heimburg, T., Schmidtkunz, K., Walter, A., Marek, M., Pierce, R.J., Romier, C., Jung, M., Sippl, W., 2014. Discovery of Inhibitors of *Schistosoma mansoni* HDAC8 by Combining Homology Modeling, Virtual Screening, and in Vitro Validation. J. Chem. Inf. Model. 54, 3005-3019. https://doi.org/10.1021/ci5004653

Kelley, J.M., Elliott, T.P., Beddoe, T., Anderson, G., Skuce, P., Spithill, T.W., 2016. Current Threat of Triclabendazole Resistance in *Fasciola hepatica*. Trends Parasitol. 32, 458-469. https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.03.002

Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., Sternberg, M.J.E., 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. Nat. Protoc. 10, 845-58. https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053

King, K., Hauser, A.-T., Melesina, J., Sippl, W., Jung, M., 2018. Carbamates as Potential Prodrugs and a New Warhead for HDAC Inhibition. Molecules 23, 321. https://doi.org/10.3390/molecules23020321

Koziol, U., Rauschendorfer, T., Zanon Rodríguez, L., Krohne, G., Brehm, K., 2014. The unique stem cell sysem of the immortal larva of the human parasite *Echinococcus multilocularis*. Evodevo 5, 10. https://doi.org/10.1186/2041-9139-5-10

Kyung, S.Y., Cho, Y.K., Kim, Y.J., Park, J.-W., Jeong, S.H., Lee, J.-I., Sung, Y.M., Lee, S.P., 2011. A Paragonimiasis Patient with Allergic Reaction to Praziquantel and Resistance to Triclabendazole: Successful Treatment after Desensitization to Praziquantel. Korean J. Parasitol. 49, 73. https://doi.org/10.3347/kjp.2011.49.1.73

Lancelot, J., Caby, S., Dubois-Abdesselem, F., Vanderstraete, M., Trolet, J., Oliveira, G., Bracher, F., Jung, M., Pierce, R.J., 2013. *Schistosoma mansoni* Sirtuins: Characterization and Potential as Chemotherapeutic Targets. PLoS Negl. Trop. Dis. 7, e2428. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002428

Lee, J.-M., Lim, H.-S., Hong, S.-T., 2011. Hypersensitive reaction to praziquantel in a clonorchiasis patient. Korean J. Parasitol. 49, 273-5. https://doi.org/10.3347/kjp.2011.49.3.273

Maggiore, M., Elissondo, M.C., 2014. *In Vitro* Cestocidal Activity of Thymol on *Mesocestoides corti*

Tetrathyridia and Adult Worms. Interdiscip. Perspect. Infect. Dis. 2014, 1-8. https://doi.org/10.1155/2014/268135

Maldonado, L.L., Assis, J., Araújo, F.M.G., Salim, A.C.M., Macchiaroli, N., Cucher, M., Camicia, F., Fox, A., Rosenzvit, M., Oliveira, G., Kamenetzky, L., 2017. The *Echinococcus canadensis* (G7) genome: a key knowledge of parasitic platyhelminth human diseases. BMC Genomics 18, 204. https://doi.org/10.1186/s12864-017-3574-0

Marek, M., Kannan, S., Hauser, A.-T., Moraes Mourão, M., Caby, S., Cura, V., Stolfa, D.A., Schmidtkunz, K., Lancelot, J., Andrade, L., Renaud, J.-P., Oliveira, G., Sippl, W., Jung, M., Cavarelli, J., Pierce, R.J., Romier, C., 2013. Structural Basis for the Inhibition of Histone Deacetylase 8 (HDAC8), a Key Epigenetic Player in the Blood Fluke *Schistosoma mansoni*. PLoS Pathog. 9, e1003645. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003645

Marek, M., Oliveira, G., Pierce, R.J., Jung, M., Sippl, W., Romier, C., 2015. Drugging the schistosome zinc-dependent HDACs: current progress and future perspectives. Future Med. Chem. 7, 783-800. https://doi.org/10.4155/fmc.15.25

Marek, M., Shaik, T.B., Heimburg, T., Chakrabarti, A., Lancelot, J., Ramos-Morales, E., Da Veiga, C., Kalinin, D., Melesina, J., Robaa, D., Schmidtkunz, K., Suzuki, T., Holl, R., Ennifar, E., Pierce, R.J., Jung, M., Sippl, W., Romier, C., 2018. Characterization of Histone Deacetylase 8 (HDAC8) Selective Inhibition Reveals Specific Active Site Structural and Functional Determinants. J. Med. Chem. 61, 10000-10016. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01087

Markoski, M.M., Bizarro, C. V, Farias, S., Espinoza, I., Galanti, N., Zaha, A., Ferreira, H.B., 2003. In vitro segmentation induction of *Mesocestoides corti* (Cestoda) tetrathyridia. J. Parasitol. 89, 27-34. https://doi.org/10.1645/0022-3395(2003)089[0027:IVSIOM]2.0.CO;2

Markoski, M.M., Trindade, E.S., Cabrera, G., Laschuk, A., Galanti, N., Zaha, A., Nader, H.B., Ferreira, H.B., 2006. Praziquantel and albendazole damaging action on in vitro developing *Mesocestoides corti* (Platyhelminthes: Cestoda). Parasitol. Int. 55, 51-61. https://doi.org/10.1016/j.parint.2005.09.005

McGuffin, L.J., Bryson, K., Jones, D.T., 2000. The PSIPRED protein structure prediction server. Bioinformatics 16, 404-405. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.4.404

McManus, D.P., Gray, D.J., Zhang, W., Yang, Y., 2012. Diagnosis, treatment, and management of echinococcosis. BMJ. https://doi.org/10.1136/bmj.e3866

Melesina, J., Robaa, D., Pierce, R.J., Romier, C., Sippl, W., 2015. Homology modeling of parasite histone deacetylases to guide the structure-based design of selective inhibitors. J. Mol. Graph. Model. 62, 342-361. https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2015.10.006

Moguel, B., Bobes, R.J., Carrero, J.C., Laclette, J.P., 2015. Transfection of Platyhelminthes. Biomed Res. Int. 2015, 1-9. https://doi.org/10.1155/2015/206161

Moral, M., 2012. Enfermedades Infecciosas Hidatidosis. Diagnóstico de hidatidosis. Guia para el equipo de salud Nro 11.

Moro, P., Schantz, P.M., 2009. Echinococcosis: a review. Int. J. Infect. Dis. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2008.03.037

Mottamal, M., Zheng, S., Huang, T., Wang, G., 2015. Histone Deacetylase Inhibitors in Clinical Studies as Templates for New Anticancer Agents. Molecules 20, 3898-3941. https://doi.org/10.3390/molecules20033898

Mruk, D.D., Cheng, C.Y., 2011. Enhanced chemiluminescence (ECL) for routine immunoblotting. Spermatogenesis 1, 121-122. https://doi.org/10.4161/spmg.1.2.16606

Nakao, M., Lavikainen, A., Yanagida, T., Ito, A., 2013. Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). Int. J. Parasitol. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.06.002

Nakao, M., McManus, D.P., Schantz, P.M., Craig, P.S., Ito, A., 2007. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. Parasitology 134, 713-22. https://doi.org/10.1017/S0031182006001934

Napper, A.D., Hixon, J., McDonagh, T., Keavey, K., Pons, J.F., Barker, J., Yau, W.T., Amouzegh, P., Flegg, A., Hamelin, E., Thomas, R.J., Kates, M., Jones, S., Navia, M.A., Saunders, J.O., DiStefano, P.S., Curtis, R., 2005. Discovery of indoles as potent and selective inhibitors of the deacetylase SIRT1. J. Med. Chem. 48, 8045-8054. https://doi.org/10.1021/jm050522v

Oger, F., Dubois, F., Caby, S., Noël, C., Cornette, J., Bertin, B., Capron, M., Pierce, R.J., 2008. The class I histone deacetylases of the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 377, 1079-1084. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.10.090

Outeiro, T.F., Kontopoulos, E., Altmann, S.M., Kufareva, I., Strathearn, K.E., Amore, A.M., Volk, C.B., Maxwell, M.M., Rochet, J.C., McLean, P.J., Young, A.B., Abagyan, R., Feany, M.B., Hyman, B.T., Kazantsev, A.G., 2007. Sirtuin 2 inhibitors rescue α-synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease. Science (80-.). 317, 516-519. https://doi.org/10.1126/science.1143780

Pérez, M.G., 2020. microRNAs de parásitos cestodos: identificación, análisis de expresión, estudios funcionales y evaluación de su potencial como nuevos blancos quimioterapéuticos de enfermedades desatendidas. Universidad de Buenos Aires.

Pierce, R.J., Dubois-Abdesselem, F., Lancelot, J., Andrade, L., Oliveira, G., 2012. Targeting schistosome histone modifying enzymes for drug development. Curr. Pharm. Des. 18, 3567-78.

Planer, J.D., Hulverson, M.A., Arif, J.A., Ranade, R.M., Don, R., Buckner, F.S., 2014. Synergy Testing of FDA-Approved Drugs Identifies Potent Drug Combinations against *Trypanosoma cruzi*. PLoS Negl. Trop. Dis. 8. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002977

Protasio, A. V., Tsai, I.J., Babbage, A., Nichol, S., Hunt, M., Aslett, M.A., De Silva, N., Velarde, G.S., Anderson, T.J.C., Clark, R.C., Davidson, C., Dillon, G.P., Holroyd, N.E., LoVerde, P.T., Lloyd, C., McQuillan, J., Oliveira, G., Otto, T.D., Parker-Manuel, S.J., Quail, M.A., Wilson, R.A., Zerlotini, A., Dunne, D.W., Berriman, M., 2012. A Systematically Improved High Quality Genome and Transcriptome of the Human Blood Fluke *Schistosoma mansoni*. PLoS Negl. Trop. Dis. 6, e1455. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001455

Reuter, M., Kreshchenko, N., 2004. Flatworm asexual multiplication implicates stem cells and regeneration. Can. J. Zool. 82, 334-356. https://doi.org/10.1139/z03-219

Robb, S.M.C., Alvarado, A.S., 2014. Histone Modifications and Regeneration in the Planarian *Schmidtea mediterranea*, en: Current topics in developmental biology. Academic Press Inc., pp. 71-93. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391498-9.00004-8

Rodríguez de Lera, Á., 2016. Epigenética y modulación química de la transcripción génica con productos naturales. An. Química 112, 151-170.

Rosenzvit, M.C., Zhang, L.H., Kamenetzky, L., Canova, S.G., Guarnera, E.A., McManus, D.P., 1999. Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. Parasitology 118 (Pt 5), 523-30. https://doi.org/10.1017/s0031182099004035

Rufener, R., Dick, L., D'Ascoli, L., Ritler, D., Hizem, A., Wells, T.N.C., Hemphill, A., Lundström-Stadelmann, B., 2018. Repurposing of an old drug: *In vitro* and <i>in vivo</I> efficacies of

buparvaquone against *Echinococcus multilocularis*. Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist. 8, 440-450. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.10.011

Rumpf, T., Schiedel, M., Karaman, B., Roessler, C., North, B.J., Lehotzky, A., Oláh, J., Ladwein, K.I., Schmidtkunz, K., Gajer, M., Pannek, M., Steegborn, C., Sinclair, D.A., Gerhardt, S., Ovádi, J., Schutkowski, M., Sippl, W., Einsle, O., Jung, M., 2015. Selective Sirt2 inhibition by ligand-induced rearrangement of the active site. Nat. Commun. 6, 6263. https://doi.org/10.1038/ncomms7263

Schäfer, S., Saunders, L., Eliseeva, E., Velena, A., Jung, Mira, Schwienhorst, A., Strasser, A., Dickmanns, A., Ficner, R., Schlimme, S., Sippl, W., Verdin, E., Jung, Manfred, 2008. Phenylalanine-containing hydroxamic acids as selective inhibitors of class IIb histone deacetylases (HDACs). Bioorg. Med. Chem. 16, 2011-2033. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.10.092

Schiedel, M., Rumpf, T., Karaman, B., Lehotzky, A., Gerhardt, S., Ovádi, J., Sippl, W., Einsle, O., Jung, M., 2016. Structure-Based Development of an Affinity Probe for Sirtuin 2. Angew. Chemie Int. Ed. 55, 2252-2256. https://doi.org/10.1002/anie.201509843

Schneider, R., Gollackner, B., Schindl, M., Tucek, G., Auer, H., 2010. *Echinococcus canadensis* G7 (pig strain): An underestimated cause of Cystic Echinococcosis in Austria. Am. J. Trop. Med. Hyg. 82, 871-874. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0639

Scholte, L.L.S., Mourão, M.M., Pais, F.S.-M., Melesina, J., Robaa, D., Volpini, A.C., Sippl, W., Pierce, R.J., Oliveira, G., Nahum, L.A., 2017. Evolutionary relationships among protein lysine deacetylases of parasites causing neglected diseases. Infect. Genet. Evol. 53, 175-188. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.05.011

Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., Peitsch, M.C., 2003. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. Nucleic Acids Res. 31, 3381-3385. https://doi.org/10.1093/nar/gkg520

Senger, J., Melesina, J., Marek, M., Romier, C., Oehme, I., Witt, O., Sippl, W., Jung, M., 2016. Synthesis and Biological Investigation of Oxazole Hydroxamates as Highly Selective Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Inhibitors. J. Med. Chem. 59, 1545-1555. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01493

Shankar, S., Srivastava, R.K., 2008. Histone deacetylase inhibitors: mechanisms and clinical significance in cancer: HDAC inhibitor-induced apoptosis. Adv. Exp. Med. Biol. 615, 261-98. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6554-5_13

Simonetta, S.H., Golombek, D.A., 2007. An automated tracking system for *Caenorhabditis elegans* locomotor behavior and circadian studies application. J. Neurosci. Methods 161, 273-280. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.11.015

Sinha, S., Sharma, B.S., 2009. Neurocysticercosis: a review of current status and management. J. Clin. Neurosci. 16, 867-76. https://doi.org/10.1016/j.jocn.2008.10.030

Smyth, J.D. (James D., McManus, D.P. (Donald P., 2007. The physiology and biochemistry of cestodes. Cambridge University Press.

Smyth, J.D., McManus, D.P., 1989. The physiology and biochemistry of cestodes, The physiology and biochemistry of cestodes. Cambridge University Press. https://doi.org/10.1017/cbo9780511525841

Somoza, J.R., Skene, R.J., Katz, B.A., Mol, C., Ho, J.D., Jennings, A.J., Luong, C., Arvai, A., Buggy, J.J., Chi, E., Tang, J., Sang, B.-C., Verner, E., Wynands, R., Leahy, E.M., Dougan, D.R., Snell, G., Navre, M., Knuth, M.W., Swanson, R. V, McRee, D.E., Tari, L.W., 2004. Structural Snapshots

of Human HDAC8 Provide Insights into the Class I Histone Deacetylases. Structure 12, 1325-1334. https://doi.org/10.1016/j.str.2004.04.012

Specht, D., Voge, M., 1965. Asexual multiplication of mesocestoides tetrathyridia in laboratory animals. J. Parasitol. 51, 268-72.

Stadelmann, B., Rufener, R., Aeschbacher, D., Spiliotis, M., Gottstein, B., Hemphill, A., 2016. Screening of the Open Source Malaria Box Reveals an Early Lead Compound for the Treatment of Alveolar Echinococcosis. PLoS Negl. Trop. Dis. 10, e0004535. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004535

Stanke, M., Keller, O., Gunduz, I., Hayes, A., Waack, S., Morgenstern, B., 2006. AUGUSTUS: ab initio prediction of alternative transcripts. Nucleic Acids Res. 34, W435-W439. https://doi.org/10.1093/nar/gkl200

Takemura, R., Okabe, S., Umeyama, T., Kanai, Y., Cowan, N.J., Hirokawa, N., 1992. Increased microtubule stability and alpha tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or tau. J. Cell Sci. 103, 953-964.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Mol. Biol. Evol. 28, 2731-2739. https://doi.org/10.1093/molbev/msr121

Thaler, F., Mercurio, C., 2014. Towards selective inhibition of histone deacetylase isoforms: what has been achieved, where we are and what will be next. ChemMedChem 9, 523-6. https://doi.org/10.1002/cmdc.201300413

Thompson, R., McManus, D.P., 2001. Aetiology: parasites and life-cycles.

Thompson, R.C.A., 2017. Biology and Systematics of *Echinococcus*. Adv. Parasitol. 95, 65-109. https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.07.001

Thompson, R.C.A., Jue Sue, L.P., Buckley, S.J., 1982. In vitro development of the strobilar stage of *Mesocestoides corti*. Int. J. Parasitol. 12, 303-314. https://doi.org/10.1016/0020-7519(82)90033-9

Thompson, R.C.A., McManus, D.P., 2002. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. Trends Parasitol. https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02358-9

Tsai, I.J., Zarowiecki, M., Holroyd, N., Garciarrubio, A., Sanchez-Flores, A., Brooks, K.L., Tracey, A., Bobes, R.J., Fragoso, G., Sciutto, E., Aslett, M., Beasley, H., Bennett, H.M., Cai, J., Camicia, F., Clark, R., Cucher, M., De Silva, N., Day, T.A., Deplazes, P., Estrada, K., Fernández, C., Holland, P.W.H., Hou, J., Hu, S., Huckvale, T., Hung, S.S., Kamenetzky, L., Keane, J.A., Kiss, F., Koziol, U., Lambert, O., Liu, K., Luo, X., Luo, Y., Macchiaroli, N., Nichol, S., Paps, J., Parkinson, J., Pouchkina-Stantcheva, N., Riddiford, N., Rosenzvit, M., Salinas, G., Wasmuth, J.D., Zamanian, M., Zheng, Y., Garciarrubio, A., Bobes, R.J., Fragoso, G., Sánchez-Flores, A., Estrada, K., Cevallos, M.A., Morett, E., González, V., Portillo, T., Ochoa-Leyva, A., José, M. V., Sciutto, E., Landa, A., Jiménez, L., Valdés, V., Carrero, J.C., Larralde, C., Morales-Montor, J., Limón-Lason, J., Soberón, X., Laclette, J.P., Cai, X., Soberón, X., Olson, P.D., Laclette, J.P., Brehm, K., Berriman, M., 2013. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. Nature 496, 57-63. https://doi.org/10.1038/nature12031

Vannini, A., Volpari, C., Gallinari, P., Jones, P., Mattu, M., Carfí, A., De Francesco, R., Steinkühler, C., Di Marco, S., 2007. Substrate binding to histone deacetylases as shown by the crystal structure of the HDAC8-substrate complex. EMBO Rep. 8, 879-84. https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401047

Wang, Shuai, Wang, Sen, Luo, Y., Xiao, L., Luo, X., Gao, S., Dou, Y., Zhang, H., Guo, A., Meng, Q., Hou, J., Zhang, B., Zhang, S., Yang, M., Meng, X., Mei, H., Li, H., He, Z., Zhu, Xueliang, Tan, X., Zhu, Xing-quan, Yu, J., Cai, J., Zhu, G., Hu, S., Cai, X., 2016. Comparative genomics reveals adaptive evolution of Asian tapeworm in switching to a new intermediate host. Nat. Commun. 7, 12845. https://doi.org/10.1038/ncomms12845

Wen, H., Vuitton, L., Tuxun, T., Li, J., Vuitton, D.A., Zhang, W., McManus, D.P., 2019. Echinococcosis: Advances in the 21st century. Clin. Microbiol. Rev. https://doi.org/10.1128/CMR.00075-18

WHO/Department of control of neglected tropical diseases, 2013. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Second WHO report on neglected tropical diseases, WHO. World Health Organization.

WHO, 2016. Taenia solium: WHO endemicity map update. Relev. Epidemiol. Hebd. 91, 595-599.

WHO, 2012. Accelerating Work To Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: a roadmap for implementation: executive summary. Geneva World Heal. Organ. 15 p. https://doi.org/WHO/HTM/NTD/2012.1

Yao, T.-P., Seto, E. (Eds.), 2011. Histone Deacetylases: the Biology and Clinical Implication, Handbook of Experimental Pharmacology. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-21631-2

Zheng, H., Zhang, W., Zhang, L., Zhang, Z., Li, J., Lu, G., Zhu, Y., Wang, Y., Huang, Y., Liu, J., Kang, H., Chen, J., Wang, L., Chen, A., Yu, S., Gao, Z., Jin, L., Gu, W., Wang, Z., Zhao, L., Shi, B., Wen, H., Lin, R., Jones, M.K., Brejova, B., Vinar, T., Zhao, G., McManus, D.P., Chen, Z., Zhou, Y., Wang, S., 2013. The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. Nat. Genet. 45, 1168-1175. https://doi.org/10.1038/ng.2757

ANEXOS

8. ANEXOS

A1. Medios y soluciones tampón

A1.1. Medio Mco-RPMI 1640

El medio Mco-RPMI 1640 corresponde al medio empleado en este trabajo para el cultivo *in vitro* de material parasitario. El mismo, consiste en el medio modificado RPMI 1640 sin rojo fenol (Sigma-Aldrich, U.S.A) pH 7,2 al cual se le añadió 2,4 g/L de HEPES (Sigma-Aldrich, U.S.A), 2 g/L de $NaHCO_3$ (Sigma-Aldrich, U.S.A) y se lo suplementó con 2,5 g/L (concentración final 4,5 g/L) de glucosa (Britania, Argentina), 10 % de suero fetal bovino (Internegocios) inactivado por calor y antibióticos: 20 μg/mL de levofloxacina y 1% de penicilina/estreptomicina (100 U/mL penicilina y 100 μg/mL estreptomicina; Thermo Fisher Scientific, U.S.A.))

A1.2. Solución Tampón RIPA

La solución Tampón RIPA (del inglés, *Radioimmunoprecipitation Assay*) corresponde a la solución de lisis celular empleada para obtener los homogenatos para la técnica de Western Blot. Esta solución contiene cada 100 mL:

Reactivos	Volumen	Concentración Final
NaCl 5 M	3 mL	150 mM
EDTA 0,5 M, pH 8.0	1 mL	5 mM
Solución Tris 1 M, pH 8.0	5 mL	50 mM
Triton-X100	1 mL	1.00%
Deoxicolato de sodio 10%	5 mL	0.50%
SDS 10%	1 mL	0.10%
$H2O_d$	84 mL	

Además, se utilizó el cóctel de inhibidores de proteasas INH P8340 (Sigma-Aldrich, U.S.A.), 1 mL cada 100 mL de la solución tampón RIPA.

A1.3. Soluciones para SDS-PAGE

A continuación, se detallan las soluciones empleadas para la técnica de SDS-PAGE.

A1.3.1. Solución Tampón de Corrida

La solución Tampón de Corrida corresponde a la solución empleada para correr los geles de SDS-PAGE. Esta solución se prepara a 10X y se debe diluir en agua destilada al momento de usar. La solución 10X contiene:

Reactivos	1 L (10X)	500 mL (10X)
Tris-Base	30,3 gr	15,15 gr
Glicina	144 gr	72 gr
SDS	10 gr	5 gr

Completar con agua destilada. Ajustar pH a 8,3 con HCl (5 ml de HCL fumante).

Conservar a 4°C.

A1.3.2. Solución Tampón de Transferencia

La solución Tampón de Transferencia corresponde a la solución empleada para transferir los geles de SDS-PAGE a la membrana de nitrocelulosa. Esta solución contiene se prepara a 10X:

Reactivos	1 litro (10X)	500 ml (10X)
Tris-Base	30,3 gr	15,15 gr
Glicina	144 gr	72 gr

Preparar 100 mL de solución tampón de transferencia se agregan 10 mL de solución 10X, 70 mL de H_2O_d y 20 mL de Metanol.

Conservar a 4°C.

A1.3.3. Solución Tampón de Carga

La solución Tampón de Carga corresponde a la solución empleada para sembrar las muestran en los geles de SDS-PAGE. Esta solución se prepara a 5X:

Reactivos	Concentracion Final	10 mL
Tris HCl 0,5 M, pH 6,8	50 mM	2,5 mL
Glicerol	25%	0,25 gr
SDS	10%	1g
DTT (1M) o β-Mercaptoetanol*	100 mM DTT	1 mL DTT / 250 µL β-Me
Azul de bromofenol 1%	0.05%	500 µL
H_2O_{dd}		Csp 10 mL

*Se puede agregar fresco a un volumen de la solución tampón de carga sin agente reductor (por ej. 25 µL de β-Mercaptoetanol a 975 µL de solución tampón de carga).

Preparar alícuotas de 1 mL y conservar a -20°C.

A1.3.4. Solución Acrilamida/Bisacrilamida (30:0,9)

La solución de acrilamida/bisacrilamida contiene:

Reactivos	100 mL
Acrilamida	30 gr
Bisacrilamida	0,9 gr
H_2O_{dd}	Csp 100 mL

Conservar a 4°C.

A1.3.5. Solución Tampón *STACKING* (500 mL de solución TRIS- HCl 0,5 M pH 6,8)

Tris Base 30,25 gr

Llevar a pH con HCl.

Conservar a 4°C.

A1.3.6. Solución Tampón *RUNNING* (500 mL de solución TRIS-HCl 1,5 M pH 8,8)

Tris Base 90,75 gr

Levar a pH con HCl.

Conservar a 4°C.

A1.3.7. Gel de poliacrilamida al 15%

***Running* gel al 15%**

Reactivos	1 gel
Acril-Bisacril	5 mL
Buffer pH 8,8	2,5 mL
SDS 10%	100 µL
H_2O	2,5 ml
PSA 10%	75 µL
TEMED	10 µL

***Stacking* gel**

Reactivos	1 gel
Acril-Bisacril	650 µL
Buffer pH 6,8	1,25 mL
SDS 10%	50 µL
H_2O	3,05 mL
PSA 10%	75 µL
TEMED	10 µL

A1.4. Soluciones para Western Blot

A1.4.1. Solución Tampón TBS

La solución tampón TBS se prepara a 10X, al momento de usar necesita ser diluida en agua destilada. La solución 10X contiene para 1 L:

24 gr de Tris base

88 gr de NaCl

Disolver en 900 mL de agua destilada

Levar a pH 7,6 con HCl 12 N

Añadir agua destilada hasta completar 1 L de solución.

Para preparar la solución tampón TBS (1X) se necesita disolver 1 parte de solución 10X en 9 partes de agua destilada y ajustar el pH a 7,6. La concentración final de la solución tampón TBS es Tris 20 mM y NaCl 150 mM

A1.4.2. Solución Tampón TBS-T (Solución salina Tris, 0,1 % Tween 20)

Para preparar la solución tampón TBS-T (1X) se necesita disolver 100 mL de solución tampón TBS 10X en 889 mL de agua destilada y 1 mL de Tween 20.

Ajustar el pH a 7,6.

A1.4.3. Solución Tampón TBS-T leche (Solución salina Tris, 0,1 % Tween 20 y 5% p/v leche)

Para preparar la solución tampón TBS-T leche se necesita disolver 100 mL de solución tampón TBS 10X en 889 mL de agua destilada, 1 mL de Tween 20 y 5 gr de leche en polvo descremada.

Ajustar el pH a 7,6.

A1.5. Soluciones para ECL

Consta de 2 soluciones (Solución I y II).

Solución I

Solución de Luminol (A): Se disuelven 22,5 mg de luminol en 0,5 mL de DMSO y se agrega a 50 mL de Tris-HCl 0,1 M pH 8.

Solución de enhancer (B): Se disuelven 18,5 mg de ácido p-coumarico en 1,25 mL de DMSO (lo que sobra de la solución I se puede guardar en la heladera).

Se mezclan 220 µL de solución B con los 50 mL de la solución A. Se pueden preparar alícuotas de esta solución de 1 mL en eppendorf envueltos en aluminio (en oscuridad). Almacenar a -20°C.

Solución II

Se mezcla 102 µL de H_2O_2 9% (10 volúmenes) con 50 mL de Tris-HCl 0,1 M pH 8. Se guarda envuelto en aluminio a 4°C.

Tener alícuotas de H_2O_2 al momento de revelar.

Al revelar: Descongelar 1 eppendorf de la solución I, la solución II y el H_2O_2. Preparar 1 mL de la **solución II** + 20 µL de **H_2O_2** + 1 mL de **solución I**, cubrir la membrana y esperar 1 minuto.

A1.6. Solución Tampón Fosfato 0,1M pH 7,2

La solución tampón fosfato es empleada para conservar las muestras para microscopia electrónica de barrido. La misma se prepara disolviendo 13,61 gr de Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) 0,1M y 17,8 gr de Fosfato disódico ($Na_2HPO_412H_2O$) 0,1M en 1 L de agua destilada.

A2. Secuencias

A2.1. Secuencia de la HDAC8 de *Echinococcus canadensis* G7 (EcaHDAC8) en nucleótidos y aminoácidos

>EcaHDAC8 [nucleótidos]

ATGCCCTCTCCCGTTGGTATTGTGTATTCAAGTGAAATCCACCGCCTTTCCGGTCTGTCTCCAAAATATGAAAATCGCTT
CTCTCTTGTTATGGGTCTAACATTTGCATATGGCTTGGCGAAAAAGCTTCTGAGGATTCCGCCACTGGAATGGTGCCCT
TCAAAAGAAATGGAGCTTTTGACACAATTTCATAGTGAAGACTACATAAAGGCTCTGCAGCTCCTGGATAGCTTCTACA
CATTGGATGACGAGCCAAACATTCCTGATGACATATCCGAACATCTTAATGGTTTTGGCCTCAGTTACGATTGCAACGG
GTTCAGAGGTGTATATGGCTACGCCCTTTCCGCTGTTCGGGGGACCTTAGCCGCTGTCGATTCCTTGGTCGATTCCCAG
TGTAAGATCGCGATCAACTGGGCAGGGGGTTGGATCATGCCAAGCGCTCCGAGGCTTCAGGTTTTTGCTACCTAAATG
ACATTGTTTTGGGGGCTCAGCGTCTCCTCTCCTCACCCAAATTCTCTTCGGGTCCATTGCTCTACATTGACCTTGACCTTC
ACCACGGCGATGGTGTGGAGGAGGCTTTCGCATACACCTCGCGCGTTGTCACATTTTCCGTTCATCACGGTACCCGTG
GATTTTTTCCTGGCTCAGGAGTGCCTGATGTAATCACTGGCGACTACTTTAGGGGAGCACGTGGTGGTCAATTTTCGTG
TTTCAATTTACCTTTGGCCGAAGGAGCTGACGACCACCTGTGGTGGTCCGCAGTAGAGCCCGTTCTCGTATCCCTCCAT
CAGTCCACAAAACCTATCGCTGTCTTTATCCAATGCGGGGCTGATGCTCTTTCAACTGATCCACATCGGATTTTCAATTT
ATCCGCCTCTCTCACTTCCAATCAATCCGCCTATGTTTCGACCCTAAAGTTGGTGCTAAGCTGGGGTCTTCCTACTCTAG
TATTGGGTGGAGGTGGGTACCACCTTGCGGACACAGCTCGACTTTGGTTAATACTGACAGCCGTCGCTATCTCCTGTG
GAACCGGTGAAGAGATTTTTCTCGAACAAGACATTCCAGACCACTCGAATCTTTCTTCATTTGGGCCCGATTTCACTCTA
GACGTGAGGCCTTCCATGCTGCTGAATCGGAATTCAAGCGAGGCCGTTTCTCAGGCTGTCGATCGACTTCTTCGTCAAA
TTGATGACTATTGTGCCTTTAACCGCGTTTAA

>EcaHDAC8 [aminoácidos]

MPSPVGIVYSSEIHRLSGLSPKYENRFSLVMGLTFAYGLAKKLLRIPPLEWCPSKEMELLTQFHSEDYIKALQLLDSFYTLDDEP
NIPDDISEHLNGFGLSYDCNGFRGVYGYALSAVRGTLAAVDSLVDSQCKIAINWAGGWHHAKRSEASGFCYLNDIVLGAQR
LLSSPKFSSGPLLYIDLDLHHGDGVEEAFAYTSRVVTFSVHHGTRGFFPGSGVPDVITGDYFRGARGGQFSCFNLPLAEGADD
HLWWSAVEPVLVSLHQSTKPIAVFIQCGADALSTDPHRIFNLSASLTSNQSAYVSTLKLVLSWGLPTLVLGGGGYHLADTAR
LWLILTAVAISCGTGEEIFLEQDIPDHSNLSSFGPDFTLDVRPSMLLNRNSSEAVSQAVDRLLRQIDDYCAFNRV

A2.2. Secuencia de la HDAC8 de *Mesocestoides corti* (McoHDAC8) en nucleótidos y aminoácidos

>McoHDAC8 [nucleótidos]

ATGCCTTCGCGAGTTGGCATTGTGTATTCTGATGAATTAAACAAACACTCTTGCCGGTCTCCTAAATATGGAAATCGTTT
TTCACTTGTTATGAGCCTGATTTATGCCTACAAATTGACAAAGAAAATGTTCAGGATACCACCTCTGGAACGATGCCAT
CTCCTCGAAAAGCAGTACCTTACGACATTCCACTGCAAGGATTATATCGAAGCTTTGCAGTTTTTGGATGATCTTCACTC
TGAGAATGAAGAGCCAGATGTTACTGATGATGTTTCCGAATTTTTGGACAACTTTGGTCTTAGCTACGATTGCCAGGGT
TTTCCTGGAGTGTATGAGTACGCATTATCGGCTGTTAGAGGAACTTTGGCCGCTGTTGACTGTTTGATTAATTCCCAAT
GTCGGGTTGCTATCAACTGGGCAGGGGGGTGGCACCATGCAAAGCGGGCCGAGGCATCCGGATTTTGCTATCTTAAT
GACATTGTTCTGGGCGCACAGCGTCTCCTATCTTCCCCCAGTTTTTCTATGGGCCCCTTGTTATATATTGACCTTGATCTT
CATCATGGTGACGGCGTCGAGGAGGCATTCGCATGCACATCACGCGTTATTACCTTCTCAGTCCATCATGCCTCTGCGG
GTTTTTTCCCAGGCACTGGTGTAACGAATGAGTCAAATGGTGCTTATTTCACAGGTGTCCGTGGTGGTCGGTTCTCGTG
TTTCAATCTTCCCTTGGCTGAAGGCGCAGACGACCAAACCTGGTGGTCTGCCGTAGAACCTGTTCTCAGAGCCCTTCAT
CGGTCAGTAAAACCAATCGCCATTTTTATTCAGTGCGGAGCTGACGCCCTTTCCTCTGACCCACATCGAATTTTTAACTT
ATCGGCTTCGACCGTCACTCACAAATCGGCTTACATCTCTGCGCTCGAGTTAGTGCTCAACTGGCATCTCCCTACCCTTA
TTTTTGGTGGTGGCGGCTACCACTTTGGTGACACTGCGCGTCTGTGGACGATGTTGACTGCCGTAGCGCTCTCTTGCTC
CAGCGAAGAGAAAATTGAACTGGACCAAGACATCCCAGACCACGCGAATCTGGTCTCGTTTGGCCCCGATTTTACTCT
GGACGTGCGGCCTTCGATGCGACTAAACAAAAATACTGAGGATGTCGTTTCCCAACATGTTGAGCGACTTCTCCGTCA
GATTGACGATTACTGTTCGTTCAATCGCCTGGGTCCATAG

>McoHDAC8 [aminoácidos]

MPSRVGIVYSDELNKHSCRSPKYGNRFSLVMSLIYAYKLTKKMFRIPPLERCHLLEKQYLTTFHCKDYIEALQFLDDLHSENEE
PDVTDDVSEFLDNFGLSYDCQGFPGVYEYALSAVRGTLAAVDCLINSQCRVAINWAGGWHHAKRAEASGFCYLNDIVLGA
QRLLSSPSFSMGPLLYIDLDLHHGDGVEEAFACTSRVITFSVHHASAGFFPGTGVTNESNGAYFTGVRGGRFSCFNLPLAEG
ADDQTWWSAVEPVLRALHRSVKPIAIFIQCGADALSSDPHRIFNLSASTVTHKSAYISALELVLNWHLPTLIFGGGGYHFGDT
ARLWTMLTAVALSCSSEEKIELDQDIPDHANLVSFGPDFTLDVRPSMRLNKNTEDVVSQHVERLLRQIDDYCSFNRLGP

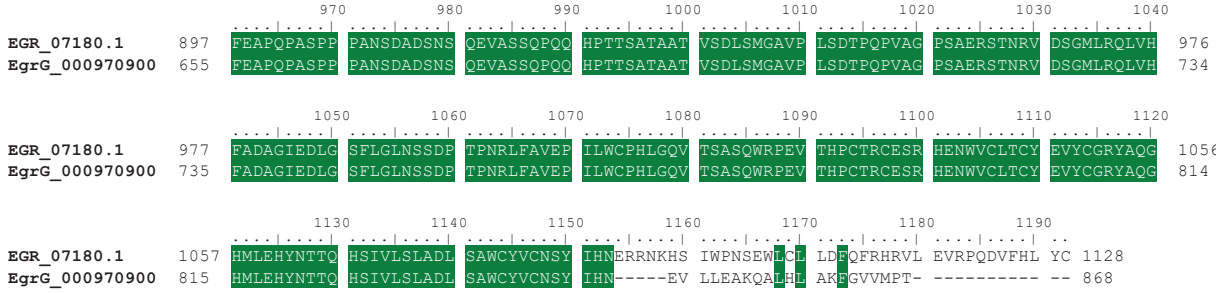
A3. Comparación de los genes de HDACs identificados en los genomas disponibles para *Echinococcus granulosus sensu stricto* G1, que mostraron ortología con la HDAC6 y HDAC10 de *Homo sapiens*

A3.1. Alineamiento de secuencias de los genes EGR_07178.1 y EgrG_000970800

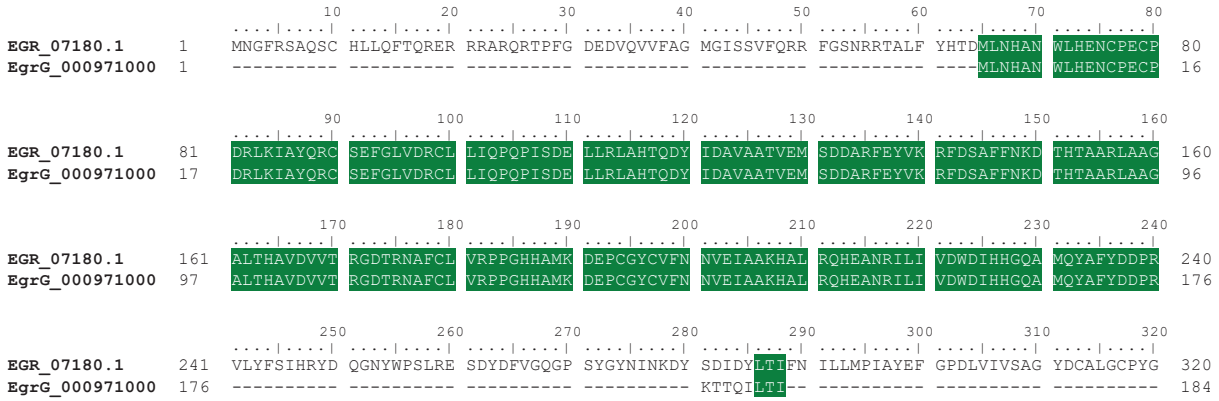
```
                    250         260         270         280         290         300         310         320
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
EGR_07178         1 ---------- ---------- ---------- -------MTD SDYLAIFHTL IMPVAYEFDP EIVLVSSGFD AAIGDAEAGN  43
EgrG_000970800  241 RYEGRKFWPN LREGDFDFIG DGSGRGFNIN IPLNKTGMTD SDYLAIFHTL IMPVAYEFDP EIVLVSSGFD AAIGDAEG--  318

                    330         340         350         360         370         380         390         400
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
EGR_07178        44 HLCTNQVKVD AFICGCSFQG KMWLSPACYG HMTHQLRTLA GGKLVVVLE- --FVLSFKS- ---------- ----------  99
EgrG_000970800  318 ---------- ---------- KMWLSPACYG HMTHQLRTLA GGKLVVVLEG GYFVDSLERG CIHVLKSLLG DHVPSLQAQD  378

                    410         420         430         440         450         460         470         480
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
EGR_07178        99 ---------- ---------- ---------- -------TSK FY-------- ---------- ---------- ----------  104
EgrG_000970800  379 PPSKSVQRTI SSSIVALRQY WKCLNVVGLS RTIPRPDVSR FPSVSWPSVK VVNWPERNPT LSKSAMAFSQ KLLRKLSKPL  458
```

A3.2. Alineamiento de secuencias de los genes EGR_07180.1 y EgrG_000970900

```
                    250         260         270         280         290         300         310         320
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
EGR_07180.1     241 VLYFSIHRYD QGNYWPSLRE SDYDFVGQGP SYGYNINKDY SDIDYLTIFN ILLMPIAYEF GPDLVIVSAG YDCALGCPYG  320
EgrG_000970900    1 ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---MPIAYEF GPDLVIVSAG YDCALGCPYG  27

                    330         340         350         360         370         380         390         400
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
EGR_07180.1     321 CFSLSPAVFA HLTNRLMVLA DGNVIVALEG GYNVESLSDG VAHTISALLG DPLPSLESLK PVLSGTKEAI RKCVSVLRTK  400
EgrG_000970900   28 CFSLSPAVFA HLTNRLMVLA DGNVIVALEG GYNVESLSDG VAHTISALLG DPLPSLESLK PVLSGTKEAI RKCVSVLRTK  107

                    410         420         430         440         450         460         470         480
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
EGR_07180.1     401 WKSLNIFPIK QALSPKDMSG LSTNTWKTVM VPTTDVEPCR RSEDEVAAAN KKLADLRRIC SFTEMTDQQR ACLVYDSRME  480
EgrG_000970900  108 WKSLNIFPIK QALSPKDMSG LSTNTWKTVM VPTTDVEPCR RSEDEVAAAN KKLADLRRIC SFTEMTDQQR ACLVYDSRME  187

                    490         500         510         520         530         540         550         560
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
EGR_07180.1     481 NHKSELERQQ PECPARTRRA YELLEEYGLA RRCKRTEARV ASEEELLRIH SQEYIDALKN TATMPQAAIN EFAERFQS--  558
EgrG_000970900  188 NHKSELERQQ PECPARTRRA YELLEEYGLA RRCKRTEARV ASEEELLRIH SQEYIDALKN TATMPQAAIN EFAERFQSVF  267

                    570         580         590         600         610         620         630         640
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
EGR_07180.1     558 ---------- ---------- HTYDSASLAA GSLLSVVDDI CSGEALHGVA VIRPPGHHAE YDRCMGFCFF NNVALAVRHA  618
EgrG_000970900  268 LNKARLIQWK KERSFFLKLT HTYDSASLAA GSLLSVVDDI CSGEALHGVA VIRPPGHHAE YDRCMGFCFF NNVALAVRHA  347

                    650         660         670         680         690         700         710         720
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
EGR_07180.1     619 QESHGLKKIA VIDWDIHHGN GLQHIFEMDP NLPMAIDLAF HDFSVLCLSI HRFDEGRYFP NSPDADTAFC GDGEGVGKTV  698
EgrG_000970900  348 QESHGLKKIA VIDWDIHHGN GLQHIFEMDP ---------- ---NVLCLSI HRFDEGRYFP NSPDADTAFC GDGEGVGKTV  414

                    730         740         750         760         770         780         790         800
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
EGR_07180.1     699 NIPWNG---- ---------- ---------- ---------- --------GG VGISMECFGH LTHLLVATST LNNPVEAETE  736
EgrG_000970900  415 NIPWNGRPIR DGDYLSVFLH VVLPILYEFR AELTIVAAGF DAARGDHLGG VGISMECFGH LTHLLVATST LNNPVEAETE  494

                    810         820         830         840         850         860         870         880
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
EGR_07180.1     737 RRRRGVILAL EGGYNLTATA EGLSHCVATL LSDTCLRLPS GLAPTDKGAA TIRRVVEVQK NHWTSLFDYS PMACHLDQLT  816
EgrG_000970900  495 RRRRGVILAL EGGYNLTATA EGLSHCVATL LSDTCLRLPS GLAPTDKGAA TIRRVVEVQK NHWTSLFDYS PMACHLDQLT  574

                    890         900         910         920         930         940         950         960
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
EGR_07180.1     817 NTRLQAVTTS SITAATPTTQ ASTENHTGTE ATVAATTNVA TGVSFDSTSS ASLFSPYVSL STTTIQAELS IPAAQEVVMA  896
EgrG_000970900  575 NTRLQAVTTS SITAATPTTQ ASTENHTGTE ATVAATTNVA TGVSFDSTSS ASLFSPYVSL STTTIQAELS IPAAQEVVMA  654

                    970         980         990         1000        1010        1020        1030        1040
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
EGR_07180.1     897 FEAPQPASPP PANSDADSNS QEVASSQPQQ HPTTSATAAT VSDLSMGAVP LSDTPQPVAG PSAERSTNRV DSGMLRQLVH  976
EgrG_000970900  655 FEAPQPASPP PANSDADSNS QEVASSQPQQ HPTTSATAAT VSDLSMGAVP LSDTPQPVAG PSAERSTNRV DSGMLRQLVH  734
```

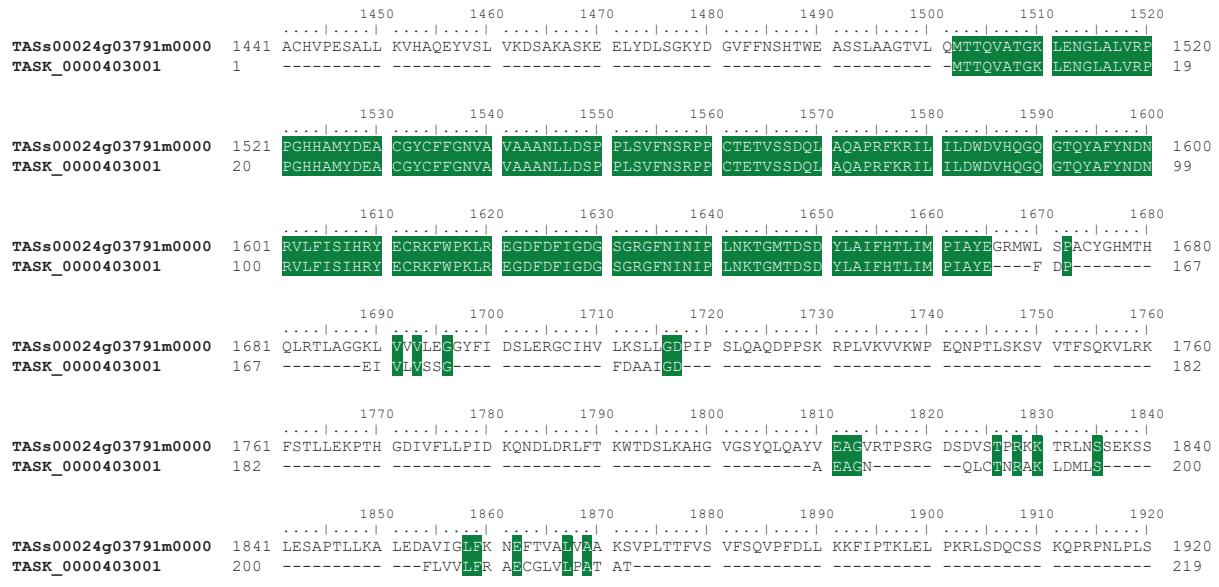


A3.3. Alineamiento de secuencias de los genes EGR_07180.1 y EgrG_000971000

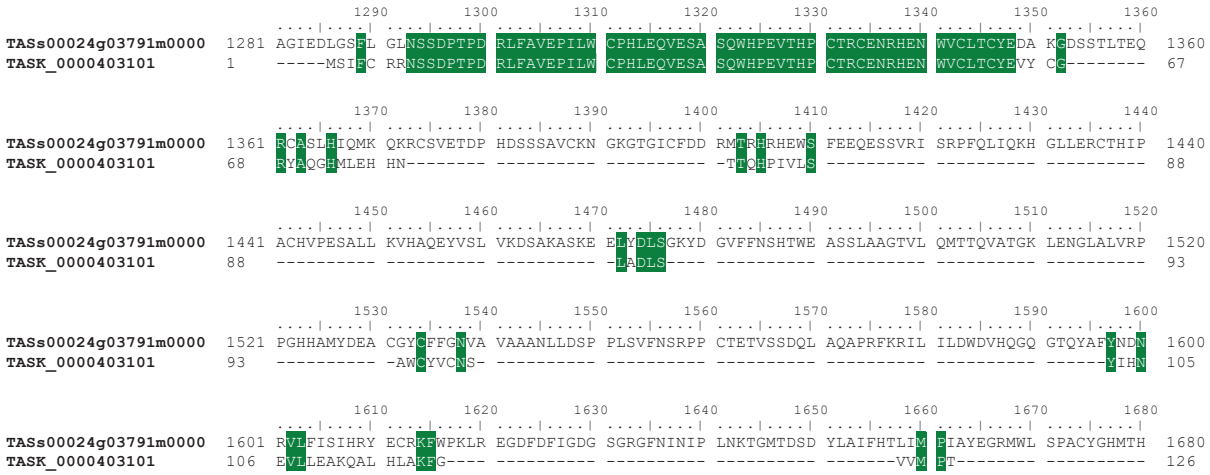


A4. Comparación de los genes de HDACs identificados en los genomas disponibles para *Taenia asiatica*, que mostraron ortología con la HDAC6 y HDAC10 de *Homo sapiens*

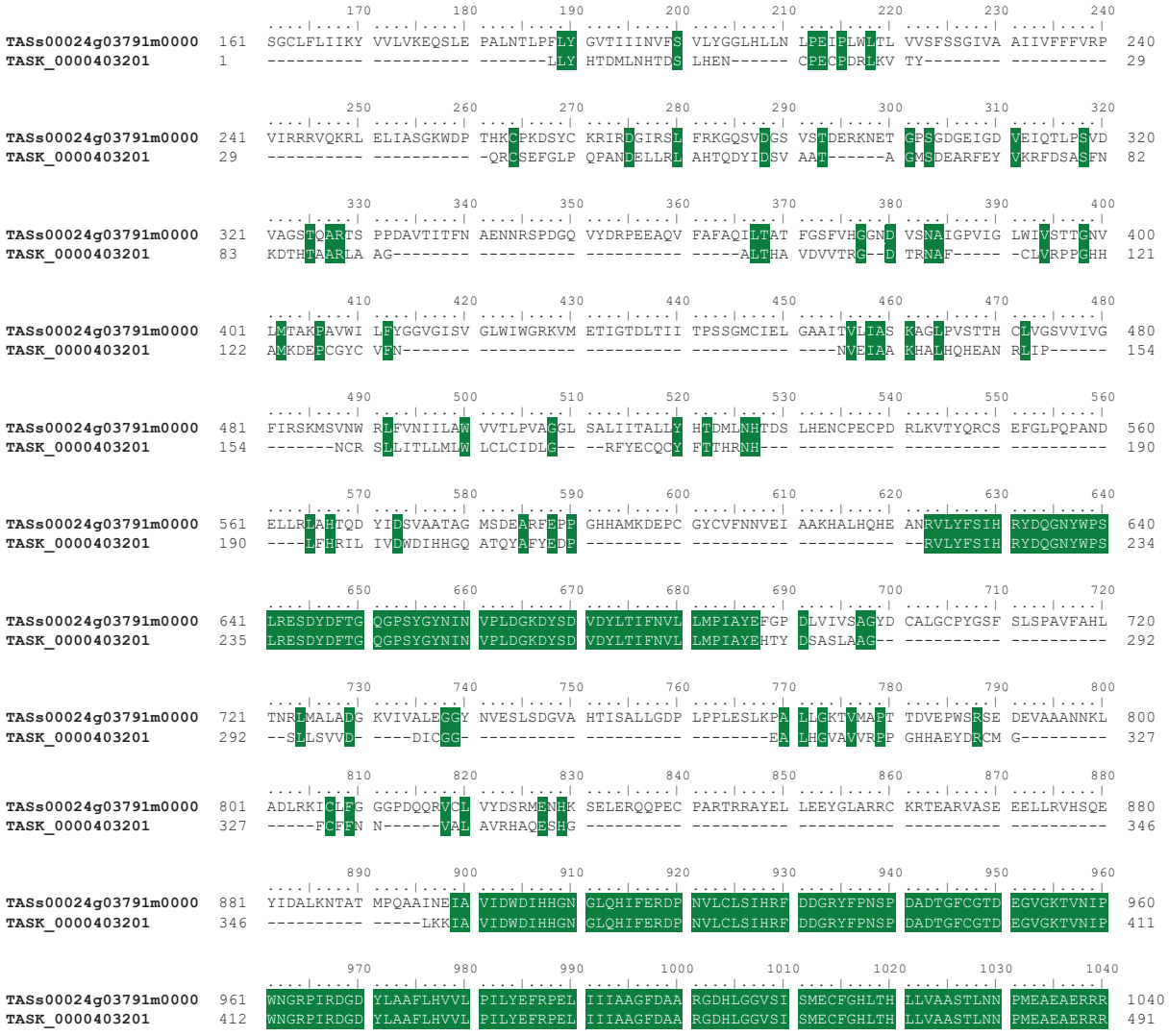
A4.1. Alineamiento de secuencias de los genes TASs00024g03791m00001 TASK_0000403001

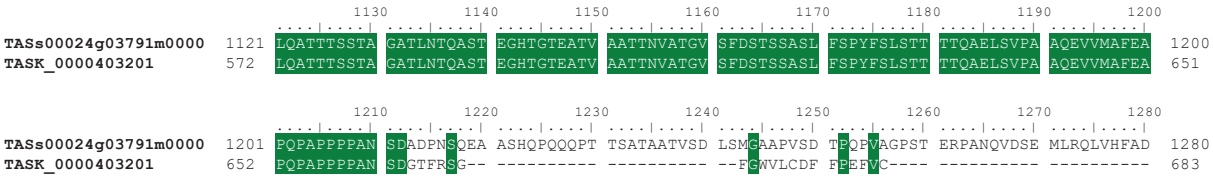


A4.2. Alineamiento de secuencias de los genes TASs00024g03791m00001 y TASK_0000403101



A4.2. Alineamiento de secuencias de los genes TASs00024g03791m00001 y TASK_0000403201





A5. Genes codificantes de enzimas Sirtuinas (o HDACs de Clase III) en *Echinococcus granulosus sensu stricto G1 y Echinococcus multilocularis*

Los genes codificantes de Sirtuinas en parásitos cestodos se identificaron mediante búsquedas por homología en los genomas de *Echinococcus granulosus sensu stricto* (*s.s.*) G1 y *E. multilocularis*, disponibles en la base de datos WormBase ParaSite (Howe y col., 2016, 2017) (https://parasite.wormbase.org/index.html); usando la herramienta BLASTp y como secuencias carnadas (o *query*) las secuencias canónicas de aminoácidos correspondientes a las Sirtuina1-7 de *H. sapiens*. Las secuencias parasitarias obtenidas con un valor de E ≤ 0,00001, en las búsquedas por homología, se emplearon para realizar un análisis de BLASTp recíproco contra el proteoma de *H. sapiens* (https://www.uniprot.org/proteomes/UP000005640).

En la Tabla A.1 se muestran todos los genes codificantes de Sirtuinas identificados en los genomas de *E. granulosus s.s.* G1 y *E. multilocularis*. En las columnas se muestran los códigos de identificación (Gen ID) para cada gen codificante de Sirtuinas identificado, de acuerdo a la WormBase ParaSite. También se muestran, para cada gen de Sirtuina, el tamaño en aminoácidos (aa) y su ortólogo más cercano en *H. sapiens* con sus correspondientes valores de E y porcentajes de identidad global.

Tabla A1. Genes codificantes de enzimas Sirtuinas identificados en los genomas de los parásitos cestodos *Echinococcus granulosus sensu stricto* G1 y *E. multilocularis*

Especies	Gen ID[a]	Tamaño (aa)	Ortólogo más cercano en *Homo sapiens*		
			Sirtuina	Valor de E	% de Identidad
Echinococcus granulosus sensu stricto G1	EgrG_000698900	740	Sirtuina1	$7{,}0e^{-122}$	45
	EgrG_001176600	433	Sirtuina3	$8{,}0e^{-99}$	54
	EgrG_001065100	389	Sirtuina2	$1{,}0e^{-123}$	43
	EgrG_000740200	517	Sirtuina7	$6{,}0e^{-34}$	49
	EgrG_000908100	523	Sirtuina6	$1{,}0e^{-79}$	53

Continua en la página siguiente

Continua de la página anterior

Echinococcus multilocularis	EmuJ_000698900	740	Sirtuina1	$1,0e^{-120}$	42
	EmuJ_001065100	333	Sirtuina3	$1,0e^{-96}$	47
	EmuJ_001176600	433	Sirtuina2	$2,0e^{-98}$	54
	EmuJ_000740200	523	Sirtuina7	$5,0e^{-34}$	50
	EmuJ_000908100	514	Sirtuina6	$3,0e^{-83}$	54

[a] Gen ID de acuerdo a la anotación genómica en la base de datos WormBase ParaSite
[b] Genes predichos mediante el predictor de genes Agustus
[c] Genes validados mediante clonado y secuenciación del ADNc

A6. PCR

A6.1. PCR para amplificar los genes EcaHDAC8 y McoHDAC8

La mezcla de reacción de la PCR contiene:

Reactivo	Volumen [µL]
H_2O_d	16,25
Buffer Kapa 5x	5
dNTPs [10 mM] Mix	0,75
Primer F [10 uM]	0,75
Primer R [10 uM]	0,75
DNApolimerasa KAPA HiFi [1U/uL]	0,5
Molde de ADNc	1
Volumen final	25

Programa del termociclador

Paso 1: Desnaturalización inicial 95°C por 3 min
Paso 2: 35 ciclos
Desnaturalización 98°C por 20 segundos
Hibridación 60°C por 30 segundos
Extensión 72°C por 120 segundos
Paso 3: Extensión 72°C por 2 minutos

A6.2. PCR de colonia

La mezcla de reacción de la PCR contiene:

Reactivo	Volumen [µL]
H_2O	7,2
Buffer 10X	2,0
dNTP mix [10 mM c/u]	0,4
MgCl [50 mM]	0,6
Primer 5´ M13 [20 µM]	0,4
Primer 3´ M13 [20 µM]	0,4
Taq Pegasus	0,2

Rotular tubos de 0,2 mL (para PCR) y adicionar 12,4 µL de la mezcla de reacción de PCR.

Identificar las colonias formadas.

Rotular por colonia un tubo eppendorff de 0,5 mL con 16 µL de H_2O calidad biología molecular.

Pinchar cada colonia y mezclar bien en el tubo correspondiente.

Tomar 7,6 µL y adicionar a cada tuvo correspondiente de la PCR (Volumen final 20 µL).

Correr el termociclador

Programa del termociclador

Paso 1: Desnaturalización inicial	95°C	por	5 minutos
Paso 2: 35 ciclos de			
Desnaturalización	95°C	por	15 segundos
Hibridación	55°C a 65°C	por	15 segundos
Extensión	72°C	por	150 segundos
Paso 3: Extensión	72°C	por	5 minutos

El presente ejemplar corresponde a la versión final del trabajo de tesis para optar al título de Doctor en Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad Nacional de San Martín.

TÍTULO

Estudio de enzimas histonas deacetilasas de cestodos y su evaluación como potenciales blancos farmacológicos en enfermedades parasitarias desatendidas

Autor: Hugo Rolando Vaca

Directora: Mara Cecilia Rosenzvit

Codirector: Federico Camicia