



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Predicción de miRNAs de *Taenia solium* ortólogos a *Echinococcus* y sus blancos

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias

PRESENTA:  
ALEJANDRA CORREA PÉREZ

TUTOR PRINCIPAL: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA  
[Facultad de Medicina](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA  
[Facultad de Química](#)  
DR. LUIS PADILLA NORIEGA  
[Facultad de Medicina](#)

Ciudad de México. Marzo, 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*“El fracaso no es fatal. El éxito no es final. Es el coraje para seguir lo que cuenta.”*

- W. Churchill

*A mis padres, Ana Antonia Pérez y Roberto Correa, que me dieron las herramientas, la confianza y la libertad de construir mi propio camino.*

*A Héctor Ceceña, por que se necesitan dos y por hacer de "mi propio camino" "nuestro camino".*

*A la memoria de Don Eulalio Gutiérrez, nuestro ángel guardián. Porque los ángeles no existen, pero de que los hay, los hay.*

## AGRADECIMIENTOS

A mi padres y a mis hermanos, Maricela, Citlalli y Héctor, por su apoyo constante e incondicional.

A Héctor Ceceña, mi compañero de vida y mejor amigo, por las jornadas azimosianas pasadas y las noches del chucrut futuras. Por ser mi apoyo, mi fuerza y mi inspiración. “For giving the good fight”.

A mi tutor, el Dr. Abraham Landa Piedra, por abrirme las puertas del Laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium*. Por brindarme la oportunidad de desarrollarme como estudiante de posgrado.

A Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova y al Dr. Luis Padilla Noriega, integrantes de mi comité tutor, por su apoyo y valiosos comentarios.

A los miembros de mi jurado de titulación, el Dr. Enrique Merino Pérez, el Dr. Juan Miranda Ríos, Dr. Julio César Carrero Sánchez, el Dr. Luis David Alcaraz Peraza y el Dr. Maximino Aldana González. Por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

A la Dra. Layla Michán, por sus revisiones, comentarios y apoyo. Por su contagiosa pasión por la ciencia.

A la Dra. Rosaura Ruiz, a la Dra. Catalina Stern, a Diana Robledo, la Dra. Rosalía Ridaura. Por el consejo y apoyo brindados que me permitieron sortear los obstáculos que me impedían terminar un ciclo y comenzar otro, que culmina con este trabajo.

A Julio Palacios, a la Mtra. Norma Trejo y a Lety, por el apoyo administrativo.

A Magdalena Álvarez, Eduardo Ceceña, Patricia Salinas, Carlos Ceceña y a Catalina Gutiérrez.

A la Mtra. Elena “P. Larú” Pacheco, por su amistad y por los apoyos académicos, económicos y en especie.

A mis compañeros de laboratorio, con especial cariño a la Dra. Lucía Jiménez, a los Mtros. Alicia Ochoa y Omar Xinastle, a Danny y a Mauricio.

Al CEyT. A mi jefe, el Ing. Óscar Pérez. A mis compañeros de trabajo, con especial cariño a Adriana Urrieta, a la Lic. Elizabeth Baca y al Capacitador Bruno Arroyo. A mis alumnos, por las lecciones de paciencia y tolerancia; por los kilos y kilos de dulces compartidos. A Sergio Hernández, por el voto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas y a las Facultades de Medicina y Química.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Abraham Landa Piedra en el Laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium*, Facultad de Medicina, UNAM.

## Contenido

1. ABREVIATURAS.....	1
2. RESUMEN .....	3
3. INTRODUCCIÓN .....	4
3.1. Céstodos ciclofilídidos .....	4
3.2. Familia Taeniida.....	4
3.3. Desarrollo .....	6
3.4. Inmunología .....	7
3.5. <i>Echinococcus</i> y <i>Taenia</i> .....	7
3.6. <i>Taenia solium</i> .....	8
3.6.1. Taeniasis .....	11
3.6.2. Cisticercosis .....	11
3.6.3. La actina de <i>T. solium</i> .....	12
3.7. MicroRNAs.....	14
3.7.1. MiRNAs en <i>T. solium</i> y otros helmintos .....	16
3.8. Herramientas bioinformáticas para la identificación de miRNAs y la predicción de sus blancos .....	18
3.8.1. National Center for Biotechnology Information (NCBI) .....	20
3.8.2. miRBase .....	20
3.8.3. WormBase ParaSite.....	21
3.8.4. Mfold Web Server .....	22
3.8.5. RNAhybrid .....	22
4. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA .....	24
5. HIPÓTESIS.....	26
6. OBJETIVO GENERAL.....	26



7.	OBJETIVOS PARTICULARES .....	26
8.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
8.1.	Identificación de miRNAs y su localización genómica en <i>T. solium</i> .....	27
8.2.	Estructura secundaria de los pre-miRNAs de <i>T. solium</i> .....	27
8.3.	Predicción de blancos putativos de los miRNAs de <i>T. solium</i> .....	28
9.	RESULTADOS .....	31
9.1.	Let-7.....	38
9.2.	miR-9 .....	42
10.	DISCUSIÓN.....	44
11.	CONCLUSIONES .....	50
12.	PERSPECTIVAS .....	52
13.	REFERENCIAS.....	53

## 1. ABREVIATURAS

A	Adenina
ACT1	Actina 1
ADP	Adenosín Difosfato
Ago	Argonauta
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C	Citosina
Cap	Capucha
cDNA	DNA complementario
DOLPP 1	Dilocidil Fosfatasa 1
E	Valor esperado (e-value)
EST	Tag de secuencia expresada
EX/SE	Excreción-secreción
G	Guanina
GO	Gene Ontology
GTS	Glutación-S-Transferasa
kcal	Kilocaloría
LPS	Lipopolisacárido
mfe	Energía libre mínima (minimum free energy)
miR	miRNA maduro
miRNA	microRNA
miRNA*	miRNA pasajero
mRNA	RNA mensajero
NC	Neurocisticercosis
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ncRNA	RNA no codificante
nt	Nucleótido
pb	Pares de bases
pre-miRNA	miRNA precursor
pri-miRNA	miRNA primario
RBP	Proteína de unión a RNA (RNA-Binding Protein)
RISC	Complejo Silenciador Inducido
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA pol II	RNA polimerasa II
rRNA	RNA ribosomal
RRP15	Precursor 15 de la subunidad grande del rRNA
Sap-p	Proteína Relacionada a Saposina
SOD	Superóxido Dismutasa

sRNA	RNA pequeño
SWIP-10	Swimming Induced Paralysis
TGF- $\beta$	Factor de Crecimiento Transformante $\beta$
TLR	Receptor Tipo Toll (Toll-Like Receptor)
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$
tRNA	RNA de transferencia
TrxR1	Tiorredoxin Reductasa 1
U	Uracilo
UTR'3	Región no traducida 3' (Untranslated Region 3')
WASP	Proteína Putativa del Síndrome de Wiskott-Aldrich

## 2. RESUMEN

*Taenia solium* es un céstodo de la Familia Taeniidae cuyo ciclo de vida comprende tres fases: huevo, larva o cisticerco y adulto. La fase de larva causa la cisticercosis en diversos tejidos del ser humano y cerdo, al ingerir los huevos producidos por el adulto. La infección se presentaba en países en vías de desarrollo, sin embargo actualmente los casos han aumentado en países desarrollados. Es la primera causa de epilepsia adquirida, cuando los cisticercos se establecen en el sistema nervioso central (neurocisticercosis).

Los miRNAs son RNAs pequeños no codificantes que regulan negativamente la expresión de genes blancos uniéndose a su mRNA blanco en su región UTR3'. Están altamente conservados en animales y están involucrados en una gran variedad de procesos biológicos. Se ha sugerido que los miRNAs de *T. solium* podrían ser utilizados como blancos de diagnóstico y/o blancos terapéuticos. Sin embargo, los problemas inherentes a la descripción experimental de miRNAs, la escasa y selectiva información de las proteínas expresadas por *T. solium* y la falta de registros de esta especie en bases de datos como miRBase han impedido el rápido incremento de información sobre su miRNoma.

En este trabajo se desarrolló un método *in silico* para la identificación de miRNAs de *T. solium*, ortólogos a dos especies de *Echinococcus* (Familia Taeniida). Se identificaron 16 miRNAs para *T. solium* con diversas funciones, si bien la mayoría de los blancos putativos hallados pertenecen a proteínas no identificadas aún para la especie (se trata de homólogos).

Se pretende que la información aquí presentada pueda ser utilizada para dirigir análisis experimentales sobre la biología de los miRNAs de *Taenia solium*.

### **3. INTRODUCCIÓN**

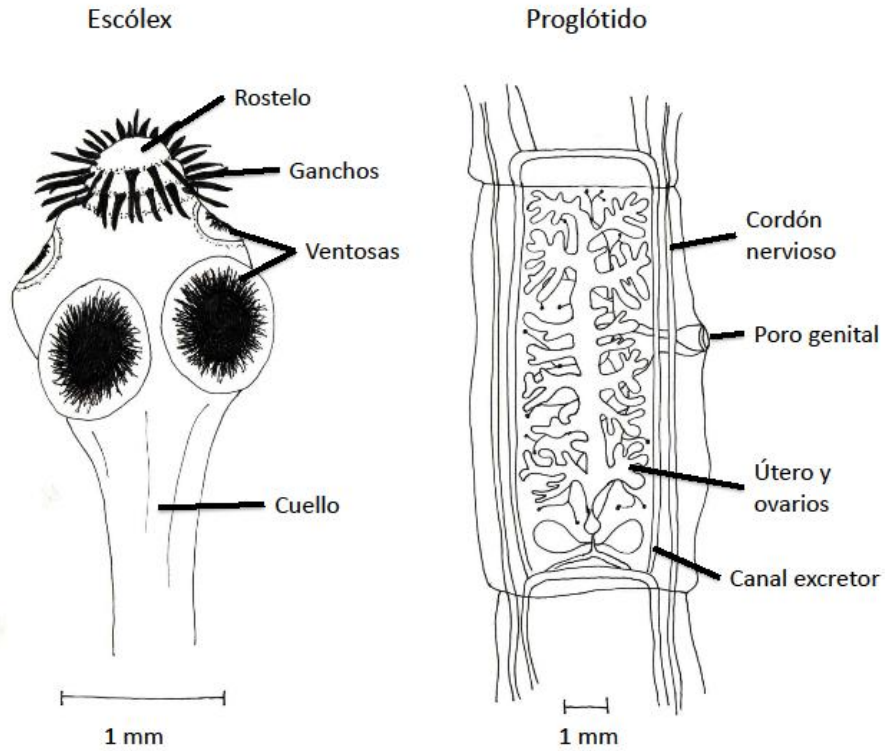
#### **3.1. Céstodos ciclofilídidos**

El orden de céstodos Cyclophyllidea comprende 15 especies de parásitos que se presentan en su forma adulta y/o larvaria en una amplia variedad de huéspedes (aves y mamíferos) y son cosmopolitas. Habitan el tracto digestivo de vertebrados en su estadio adulto y en diversos tejidos en su estadio larvario (Tandon *et al.*, 2011). Los Taeniidos son los céstodos ciclofilídidos mejor conocidos.

#### **3.2. Familia Taeniida**

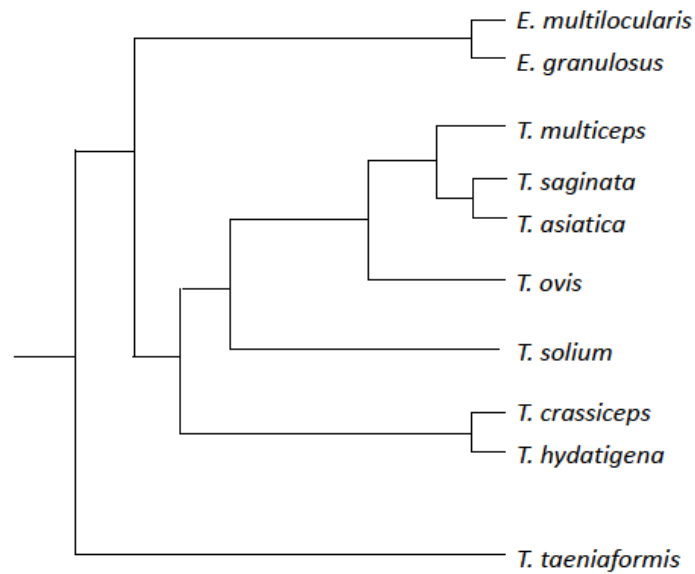
Los céstodos parásitos del humano más importantes pertenecen a la familia Taeniida. La tenia adulta se desarrolla principalmente en mamíferos, pudiendo ser éstos también huéspedes intermediarios. La familia Taeniida es cosmopolita. En su ciclo de vida se presenta la sucesión de tres etapas: huevo u oncosfera, larva o metacéstodo (cisticerco) y adulto (Hoberg, 2006).

La familia Taeniida comprende céstodos ciclofilídidos muy característicos (Fig. 1). En primer lugar, por el aspecto de los órganos de fijación de su escólex, típicamente provisto de un róstelo bien desarrollado y armado casi siempre por una doble corona de ganchos curvos, y de distinto tamaño en cada corona. En segundo lugar, por el aspecto de su útero una vez desarrollado y lleno de huevos, que está constituida por un tubo longitudinal provisto, a ambos lados, de varios ciegos ramificados, en algunas especies reducidos a evaginaciones simples (Hoberg, 1999).



**Fig. 1. Escólex y proglótido de la fase adulta de *T. solium*.** Se muestran las características diagnósticas de la familia Taeniida (modificado de García *et al.*, 2003).

La familia consta del género monofilético *Echinococcus* y del género parafilético *Taenia* (Knapp *et al.*, 2011) (Fig. 2). Los huéspedes definitivos de la familia Taeniida son carnívoros terrestres, es decir, las familias Canidae, Felidae, Mustelidae, Ursidae, Hyaenidae, Procyonidae y Viverridae. Tres especies de Taeniidos infectan al ser humano: *Taenia saginata*, *T. solium* y *T. asiatica*. Los hospederos intermediarios de los Taeniidos son mamíferos –generalmente herbívoros– que forman parte de la cadena alimenticia de los huéspedes definitivos (Hoberg, 2006).



**Fig. 2. Cladograma de la Familia Taeniida.** Relaciones ancestro-descendencia de las especies representativas de la Familia Taeniida. Se muestran los dos géneros que conforman a la familia: el género monofilético *Echinococcus* y el género parafilético *Taenia* (Modificado de Knapp *et al.*, 2011).

### 3.3. Desarrollo

En la mayoría de las especies de Taeniidos, los proglótidos grávidos, producidos en el intestino del huésped a partir del estróbilo, se eliminan por el recto. Permanecen activos por un corto periodo con movimientos musculares para liberar los huevos del proglótido. En los proglótidos con poco movimiento, los huevos permanecen en el interior. Los huevos son capaces de sobrevivir por largos periodos de tiempo y son altamente resistentes a las variables ambientales. Solamente el calor y la desecación son capaces de destruirlos rápidamente. Los huevos son ingeridos entonces por el huésped intermediario, usualmente mediante la contaminación de alimentos de origen vegetal. La oncosfera atraviesa la pared del intestino delgado y es llevada a través del flujo sanguíneo a órganos y tejidos especie-

específicos como el hígado, el músculo, la cavidad corporal, el cerebro o el tejido conectivos, dónde se desarrolla en cisticerco. En aproximadamente un tercio de los Taeniidos, el cisticerco se reproduce asexualmente, como en el caso de ambas especies de *Echinococcus* (*E. granulosus* y *E. multilocularis*) y en *T. crassiceps*, ampliamente utilizado en murinos como modelo de la infección por *T. solium* (Hoberg, 2006).

### **3.4. Inmunología**

La fase adulta de los Taeniidos se considera de baja inmunogenicidad, aunque es bien conocido que son reconocidos por el sistema inmune del huésped. Debido a que su patogenicidad es limitada y son fácilmente eliminados con fármacos, la investigación de la Inmunobiología de los adultos no ha recibido tanta atención como la de otros parásitos. Los metacéstodos solo pueden sobrevivir en los tejidos de su huésped mediante mecanismos de evasión del sistema inmune. Por ejemplo, producen una gran variedad de factores con componentes inhibidores del sistema del complemento. Además, el tegumento de los metacéstodos contiene proteínas como Glutación-S-Transferasas (GTS) y Superóxido Dismutasas (SODs), que son capaces de inactivar las moléculas efectoras del huésped e inhibir la quimiotaxis de los fagocitos y la activación de los linfocitos. El estadio larvario induce en el huésped intermediario una respuesta protectora, que impide el desarrollo de la infección crónica. Por ejemplo, una infección con una única oncosfera de *Hydatigena taeniaformis* produce la respuesta inmune necesaria para proteger al huésped de infecciones subsecuentes. Esta inmunidad es producida por anticuerpos contra proteínas en la superficie de la membrana de la oncosfera (Hein y Harrison, 2005).

### **3.5. *Echinococcus* y *Taenia***

El género *Echinococcus* es un grupo monofilético de especies caracterizado por gusanos adultos pequeños y cortos, así como por larvas con grandes tazas de reproducción asexual . Sus huéspedes definitivos son carnívoros, usualmente cánidos o félidos, que adquieren la

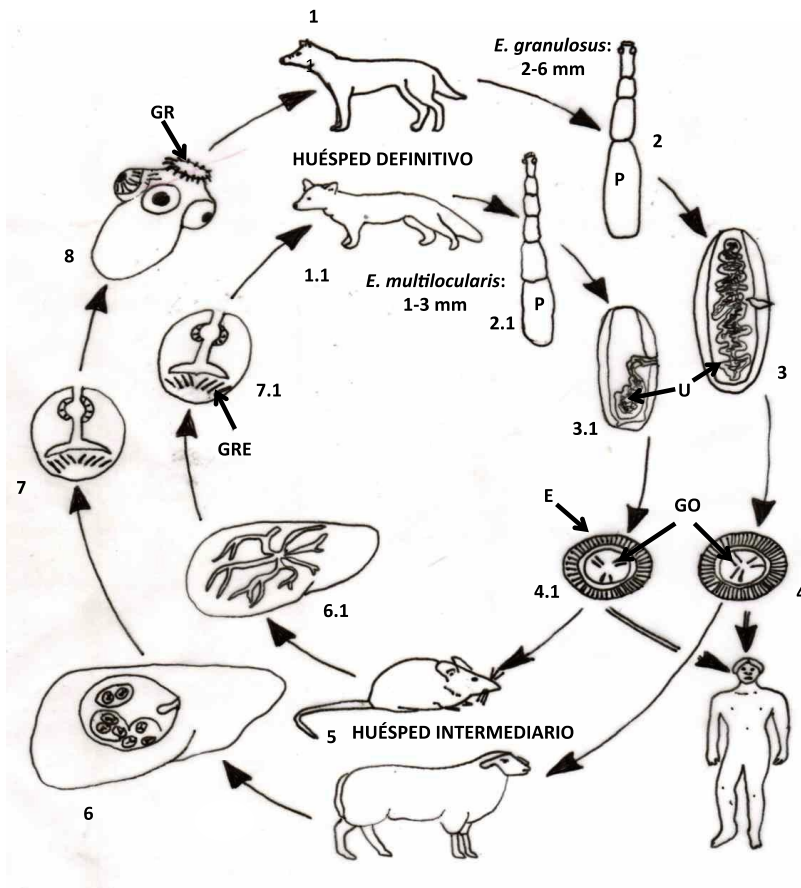


infección al ingerir al huésped intermediario herbívoro (Fig. 3). Los seres humanos pueden actuar como huéspedes intermediarios, en los que se produce una infección conocida como equinococis o hidatidosis. Existen tres tipos diferentes de equinococis, como resultado de la infección con diferentes especies de *Echinococcus* y se nombran de acuerdo a la estructura del metacéstodo: quística, alveolar o poliquística. Las dos primeras representan problemas de salud en diversos países, en los que son reconocidas como zoonosis (Moro y Schantz, 2009; Otero-Abad y Torgerson, 2013).

En contraste, las especies del género *Taenia* conforman un grupo parafilético (Lavikainen *et al.*, 2008). Este género comprende, por lo menos, 42 especies (Loos-Frank, 2000; Hoberg, 2006). Las especies endémicas de *Taenia* son abundantes en África pero raras en las regiones Australiana y Neotropical (Loos-Frank, 2000). Las especies que parasitan comúnmente a perros (por ejemplo, *T. hydatigena* y *T. ovis*) y gatos domésticos (*T. taeniaeformis*) están distribuidas en todo el mundo. Entre los miembros de *Taenia*, solo *T. solium*, *T. saginata* y *T. asiatica* tienen al humano como huésped definitivo, por lo que, en ocasiones, reciben indistintamente la denominación “Tenia del humano” (Knapp *et al.*, 2011).

### **3.6. *Taenia solium***

*T. solium* presenta un ciclo de vida complejo que se desarrolla en dos huéspedes. Los seres humanos son el único huésped definitivo de la fase adulta, mientras que tanto el ser humano como el cerdo pueden actuar como huéspedes intermediarios y presentar la forma larvaria (Fig. 4).



**Fig. 3. Echinococcus.** Ciclo de vida de *E. granulosus* (1-8) y *E. multilocularis* (1.1-7.1). 1, 1.1 El huésped definitivo puede ser el perro, gato o zorro, con preferencia especie-específica. 2-3.1 El gusano adulto, que habita en el intestino delgado del huésped definitivo, puede ser identificado de acuerdo al tamaño de los proglótidos (P), a la forma del útero (UE) y al tamaño de los ganchos del rostelo. 4, 4.1 Los huevos conteniendo a la oncosfera infecciosa o larva son liberados del proglótido arrastrado por las heces del huésped; estos huevos son indistinguibles de los huevos de *Taenia spp.* 5, 5.1 Los huevos son ingeridos por el huésped intermediarios o por el ser humano a través de alimentos contaminados. 6, 6.1 En el interior del intestino del huésped intermediario (incluyendo el ser humano) la oncosfera eclosiona, cruza la pared del intestino y es capaz de migrar (vía el flujo sanguíneo) a varios órganos. Los cisticercos se desarrollan la mayoría de las veces en el hígado y los pulmones. 7-8.1 En las cápsulas de ambas especies se forma el protoescolex, que se puede presentar evaginado (8) en el interior del cisticercos. Evaginado o no, el protoescolex son completamente capaces de infectar al huésped definitivo en cuanto se alimente de los órganos del huésped intermediario. E, embrióforo del huevo; GO, ganchos de la oncosfera; GRE, ganchos rostellares evaginados; P, proglótido, GR, ganchos rostellares; U, útero con huevos (Modificado de Moro y Schantz, 2009).

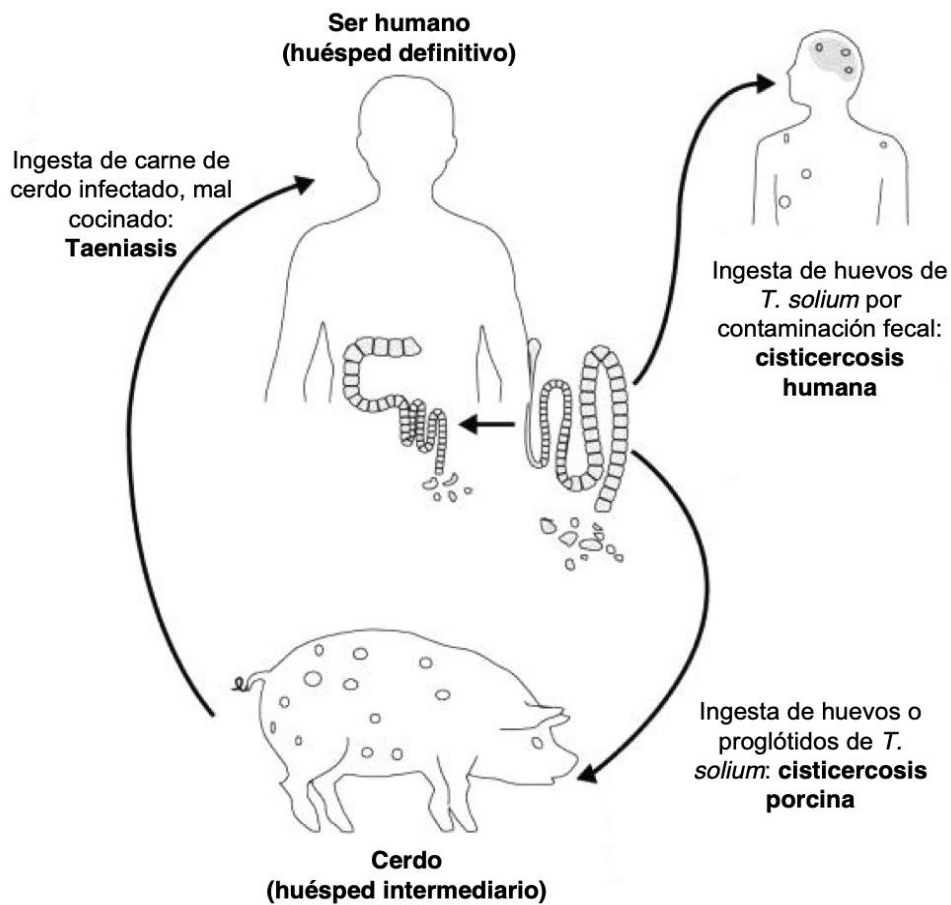


Fig. 4. Ciclo de vida de *T. solium* (modificado de García *et al.*, 2003).

El estadio larvario o cisticerco de *Taenia solium* causa la cisticercosis en humanos y cerdos, mientras que el estadio adulto causa la taeniasis, siendo el humano el único hospedero definitivo (O'Neal *et al.*, 2011). En humanos, el estadio larvario puede parasitar el sistema nervioso central provocando la neurocisticercosis que puede ser asintomática o causarle la muerte al paciente. Este parásito es responsable del 50% de las epilepsias tardías y causa un serio problema de salud pública en países en vías de desarrollo (García *et al.*, 2005; Afonso *et al.*, 2011). La neurocisticercosis es común en América Latina, la mayor parte de Asia, África sub-sahariana y partes de Oceanía. Actualmente, se diagnostica con mayor frecuencia en países desarrollados debido al incremento en la inmigración de los huéspedes desde las zonas endémicas (White A. C., 2000; Schantz *et al.*, 1998).

### **3.6.1. Taeniasis**

La taeniasis ocurre solo en el huésped humano, después de la ingesta de carne mal cocinada de cerdo infectado con cisticercos. Aunque la cisticercosis ha sido conocida desde la antigüedad, su relación con la fase adulta de *T. solium* no estaba clara hasta que fue demostrada por Kuchenmaier en 1855, quien alimentó a prisioneros condenados a la pena capital con un cerdo infectado con cisticercos y recuperó los gusanos adultos en la autopsia (Henneberg, 1936). La larva se evagina en el intestino delgado, la cabeza o escólex se une a la mucosa y comienza a formar segmentos denominados proglótidos. *T. solium* tiene un escólex con cuatro ventosas y un rostelo con una doble corona de ganchos, un cuello delgado y un estróbilo largo de 2-4 m que consiste de varios cientos de proglótidos.

### **3.6.2. Cisticercosis**

El ciclo de vida de *T. solium* involucra un huésped intermediario, normalmente el cerdo, en el que se desarrolla la forma larvaria del parásito; y un huésped definitivo, el ser humano, en el que se desarrolla la fase adulta. Sin embargo, las personas infectadas con los huevos de *T. solium* también pueden actuar como huéspedes accidentales de la forma larvaria. Los cisticercos pueden encontrarse en sistema nervioso central donde causa la neurocisticercosis (NC), en tejido subcutáneo, músculo, ojo (Loo y Braude, 1982; Lozano, 1983) y, más raramente, en otras partes del cuerpo (Andrews y Mason, 1987; McCormick *et al.*, 1982). Muchos factores afectan las manifestaciones clínicas de la NC, incluyendo el número, tamaño, localización y forma de los parásitos, así como la respuesta inmune del huésped. La interacción de estos factores produce un espectro de síntomas neurológicos (Loo y Braude, 1982; Lozano, 1983; Andrews y Mason, 1987; McCormick *et al.*, 1982; Nash y Neva, 1984; Trelles y Trelles, 1987; Rangel *et al.*, 1987; Nava-Segura, 2014; Salazar *et al.*, 1983; Chopra *et al.*, 1981).

### 3.6.3. La actina de *T. solium*

La actina pertenece al grupo de proteínas contráctiles. Está involucrada en procesos como la contracción muscular, movimiento celular, citocinesis, movimiento de organelos y mantenimiento de la forma celular. Se ha conservado con muy pocos cambios durante la evolución de los organismos eucariontes (Vandekerckhove y Weber, 1984; Hightower y Meagher, 1986). La actina, generalmente, está codificada en familias multigénicas (Firtel, 1981). En algunos organismos como las levaduras, la actina está codificada por un solo gen (Ng y Abelson, 1980; Cupples y Pearlman, 1986; Hirono *et al.*, 1987), mientras que existen diferentes isoformas con diversas funciones en organismos multicelulares, como los mamíferos. Es generalmente aceptado que la expresión de los genes de actina es constitutiva y ubiqa, dadas sus funciones fundamentales en la célula eucarionte. No obstante, mediante análisis transcriptómicos, se ha demostrado que un motivo de poliadenilación del mRNA de la actina le permite a la proteína presentarse en el núcleo celular e interactuar con la maquinaria transcripcional (Miralles y Visa, 2006; Bettinger *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2004; Hofmann *et al.*, 2004; Grummt, 2006). Los transcritos que codifican para la misma proteína pero contienen diferentes UTRs 3' pueden diferir en su estabilidad, localización y eficiencia transcripcional, así como en su unión a RNAs pequeños reguladores. El mRNA de una de las isoformas del ratón, la  $\beta$ -actina, contiene en su UTR 3' una secuencia que le transfiere a la actina la capacidad de actuar como regulador de la transcripción. Esta secuencia contiene también un sitio de unión a miR-34a/34b-5p conservado (Ghosh *et al.*, 2008).

Los sistemas musculares del cisticerco de *T. solium* muestran una distribución diferente que los del céstodo adulto. En el adulto consisten en su totalidad de músculo liso (Lumsden y Byram III, 1967; Slais, 1970; Wahlberg, 1998). En contraste, el cisticerco presenta una variedad de fibras musculosas: circulares en el rostelo y las ventosas; circulares, longitudinales y transversales en los tejidos del tegumento; así como una red muscular subcuticular en el canal espiral invaginado. La actina se presenta en delgados miofilamentos y participa en la contracción muscular (Bray, 2001; Lodish *et al.*, 1999;

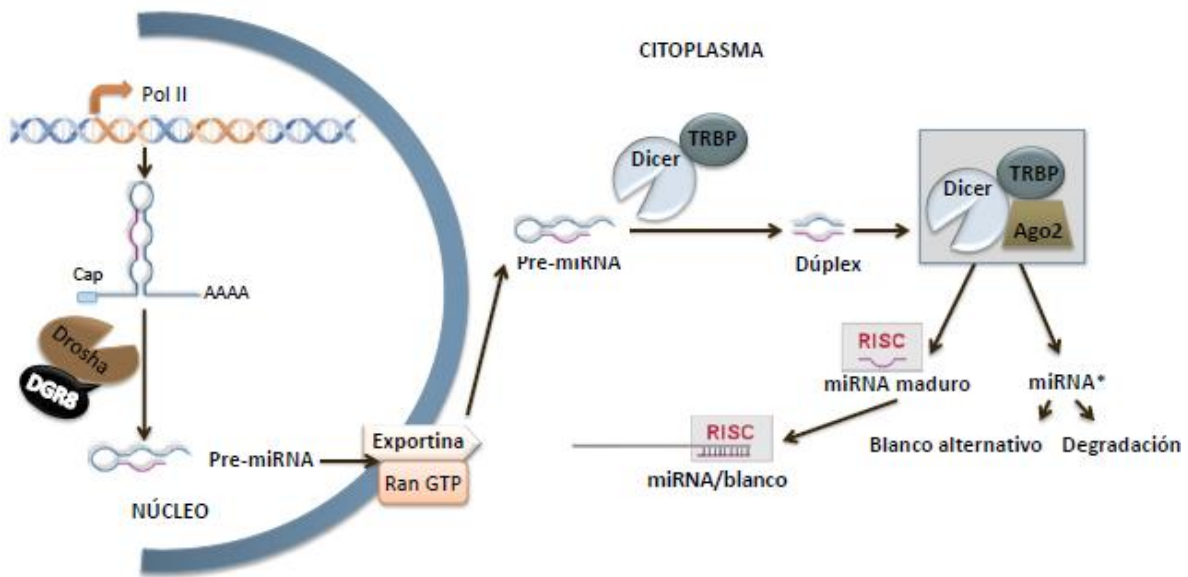
Sheterline *et al.*, 1998). Las fibras musculares de *T. solium* están conformadas por miosina II, paramiosina (Ambrosio *et al.*, 1997; Laclette *et al.*, 1987, 1995) y F-actina (Ambrosio *et al.*, 2003). Estos sistemas musculares podrían definir la dirección del movimiento así como la fuerza requerida en respuesta a diferentes condiciones fisiológicas, como se ha propuesto para otros organismos (Drew y Murphy, 1997; Sheterline *et al.*, 1998; Villanueva *et al.*, 1999; Wahlberg, 1998), y sería de gran importancia en eventos tales como la evaginación del escólex después de la ingestión del cisticerco por parte del huésped (Ambrosio *et al.*, 2003). Este proceso requiere de fuertes y frecuentes movimientos musculares, mientras que cada ventosa lleva a cabo contracciones en su búsqueda de un sitio en el intestino para anclar el escólex (Cañedo *et al.*, 1982; Rabiela *et al.*, 2000; Willms *et al.*, 2001).

Los genes de actina han sido seleccionados como un modelo accesible para el estudio de los genes codificadores de proteínas en *T. solium*. Se han identificado y secuenciado dos genes de actina en este céstodo; si bien en la base de datos WormBase Parasite (Howe *et al.*, 2016) solo se describe uno, ACT1. Ambos genes poseen regiones codificantes de actina idénticas (Campos *et al.*, 1989). La expresión y polimerización de estos dos genes está regulada de acuerdo al estadio de desarrollo, tal como se ha observado en otras familias de genes de actina. Ambrosio *et al.* (2003) demostraron la distribución diferencial de la F-actina en el cisticerco de este céstodo y detectaron sus isoformas. La mayor expresión de actina en *T. solium* se presentó en las ventosas, la base del rostelo y en la pared externa del tegumento. Los genes de actina de *T. solium* tienen un alto grado de similitud con los del céstodo *Diphyllobothrium dendriticum* (Wahlberg, *et al.*, 1994; Wahlberg y Johnson, 1997) y con los del tremátodo *Schistosoma mansoni* (Oliveira y Kemp, 1995). La presencia de isoformas de actina podría estar correlacionada con diferentes patrones de distribución en diversos céstodos (Halton *et al.*, 1998; Wahlberg y Johnson, 1997; Wahlberg, 1998). La expresión diferencial de la actina depende del estadio del desarrollo (Abbas y Cain, 1989; Mair *et al.*, 1988; Wahlberg y Johnson, 1997; Wahlberg, 1998).

### 3.7. MicroRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son un tipo de RNA no codificante (ncRNA, por sus siglas en inglés) cuyo producto final es una molécula funcional de RNA de ~22 nucleótidos (nt). Los miRNAs son producidos a partir de RNAs precursores no codificantes que forman horquillas con complementariedad imperfecta (Grishok *et al.*, 2001; Hutvagner *et al.*, 2001; Ketting *et al.*, 2001). La biogénesis de los miRNAs ha sido descrita recientemente (Kim, 2005) (Fig. 5). Los genes de miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II que forma los miRNAs primarios (pri-miRNAs) con capucha (Cap) y poliadenilados, tal como los mRNAs (Lee *et al.*, 2002). En animales, los pri-miRNAs son procesados en el núcleo en intermediarios conocidos como miRNAs precursores (pre-miRNAs), por medio de la enzima RNasa Drosha (Lee *et al.*, 2003). Éstos son transportados al citoplasma y procesados por la enzima Dicer para producir los miRNAs maduros (frecuentemente designados como miR). La secuencia del pre-miRNA complementaria al miRNA maduro (miRNA pasajero, miRNA\* o miRNA star) puede ser degradada o ejercer una función por sí misma (Kim, 2005). La función de los miRNAs depende de su unión al complejo RISC formado por proteínas de unión de RNA (RBPs, RNA-Binding Proteins). Una de ellas, Argonata (Ago), brinda accesibilidad al sitio de unión al blanco, modulando la regulación por sRNAs.

Los miRNAs regulan a sus genes blanco al unirse a regiones complementarias en sus transcritos (RNA mensajeros, mRNAs) en secuencias conservadas, principalmente en el extremo UTR3' (Untranslated Region 3'), reprimiendo la transcripción, regulando su degradación, o una combinación de ambos (Bartel, 2004; Filipowicz *et al.*, 2005; Pillai, 2005; Sontheimer y Carthew, 2005). En plantas, los miRNAs se unen a sus blancos por complementariedad completa o casi completa (Jones-Rodes y Bartel, 2004). En contraste, los miRNAs de animales son parcialmente complementarios a sus mRNAs blanco. La mayor complementariedad se localiza en la región “semilla”, conformada por parejas de Watson-Crick consecutivas en las posiciones 2 a 7 del extremo 5' del miRNA (Krek *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2005).



**Fig. 5. Biogénesis de miRNAs.** Los genes de miRNAs son transcritos por la RNA pol II, formando el transcrito primario (pri-miRNA), que posteriormente es poliadenilado. El pri-miRNA es procesado por la enzima RNAsa Drosha, produciendo el miRNA precursor (pre-miRNA), con 70-110 nt. Éste es procesado en el citoplasma por la RNAsa Dicer produciendo la secuencia madura de miRNA y, en ocasiones, un miRNA\* funcional. Los miRNAs maduros y los miRNA\*s funcionales se unen al complejo RISC (Induced Silencing Complex), que les permite asociarse a secuencias parcialmente complementarias en el UTR 3' de sus mRNAs blanco.

Un creciente número de evidencias ha mostrado que los miRNAs juegan papeles importantes en la diferenciación celular, proliferación, crecimiento, movilidad, secreción de hormonas, respuesta inmune y apoptosis, entre otros (Ambros, 2004; Du y Zamore, 2007; Poy *et al.*, 2004; Leaman *et al.*, 2005; Stark *et al.*, 2003; Bushati y Cohen, 2006). Desde el descubrimiento de los primeros miRNAs, lin-4 y let-7 en *Caenorhabditis elegans* (Pasquinelli *et al.*, 2000), cientos de secuencias de miRNAs han sido descritas en vertebrados, moscas, gusanos, plantas y virus (Poy *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2010; Weber *et al.*, 2005; Basika *et al.*, 2004; Cucher *et al.*, 2011; Bartel, 2004; Li *et al.*, 2006; Stark *et al.*, 2007a).



Los miRNAs generalmente están conservados en especies estrechamente relacionadas filogenéticamente e incluso, entre aquellas más lejanas (Pasquinelli *et al.*, 2000). Alrededor de 10% de los miRNAs identificados en invertebrados están también conservados en mamíferos y otros vertebrados, sugiriendo una conservación interespecífica de sus funciones regulatorias (Weber, 2005). Además, una importante cantidad de sus funciones han sido ya determinadas experimentalmente.

Un miRNA maduro debe cumplir los criterios: 1) ser expresado como un transcrito maduro de ~22 nt detectable por Northern blot u otros medios experimentales como bibliotecas de RNAs pequeños; 2) debe originarse de un precursor con estructura secundaria característica -una horquilla-; y 3) ser procesado por Dicer, esto suele determinarse por el incremento en la acumulación del precursor en mutantes deficientes de Dicer (Lee *et al.*, 2002; Ambros, 2004). Un criterio opcional también utilizado comúnmente es que la secuencia del miRNA maduro y la estructura predicha de la horquilla deben estar conservadas. En la práctica, es posible hallar variaciones, pero como mínimo la expresión de la forma de ~22 nt y la presencia de una horquilla precursora deben ser demostrados para clasificar una secuencia como miRNA. Los homólogos de otras especies pueden ser considerados como miRNAs ortólogos sin validación experimental, al cumplir con el criterio del precursor conservado (Kim, 2005).

### **3.7.1. MiRNAs en *T. solium* y otros helmintos**

Los miRNAs secretados por helmintos parásitos y detectados en la sangre de sus huéspedes representan candidatos prometedores como biomarcadores para diagnóstico (Cheng *et al.*, 2013; Tritten *et al.*, 2014; Quintana *et al.*, 2015). Por otra parte, se ha sugerido que los miRNAs secretados por nemátodos (Buck *et al.*, 2014) y tremátodos parásitos (Fromm *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2016), juegan un papel importante en las interacciones huésped-parásito, específicamente en la modulación del sistema inmune. Recientemente, se han reportado varios miRNAs de helmintos parásitos, que proveen nueva información sobre los fundamentos de la biología y patología de este grupo de invertebrados (Cai *et al.*, 2016).

Posterior a la infección, la oncosfera de *T. solium* migra a través del flujo sanguíneo y, si evita su destrucción por el sistema inmune, se desarrolla en un cisticerco viable (García *et al.*, 2003). Si alcanzan el cerebro, los cisticercos viables producen una inflamación nula o escasa en los tejidos circundantes, permaneciendo sin detección por parte del sistema inmune (Sikasunge *et al.*, 2009). Esta observación ha sugerido por mucho tiempo la existencia de mecanismos moduladores o atenuadores derivados del parásito, tales como la síntesis de proteínas similares a las del huésped (Flisser *et al.*, 1986; White *et al.*, 1997). Se ha demostrado que diversos extractos de excreción-secreción (EX/SE) por el parásito son capaces de limitar la viabilidad de linfocitos *in vitro* (Molinari *et al.*, 2000), inducir apoptosis (Solano *et al.*, 2006) e inhibir la expresión de citocinas inflamatorias (Arechavaleta *et al.*, 1998). Estas propiedades se pierden cuando los extractos de EX/SE de los cisticercos son tratados con RNAsas (Tato *et al.*, 1995). Estas evidencias apoyan la hipótesis de que los agentes inmunomoduladores del parásito podrían ser RNAs pequeños; no obstante, esto sigue sin dilucidarse.

Recientemente, se han descrito miRNAs de *E. multilocularis*, *E. granulosus*, *E. canadensis*, *T. saginata*, *T. asiatica*, *T. solium* y *T. multiceps* mediante aproximaciones experimentales y/o computacionales (Cucher *et al.*, 2011 y 2015; Macchiaroli *et al.*, 2015; Ai *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013; Bai *et al.*, 2014). Estos datos representan también una buena fuente de información para llevar a cabo análisis comparativos con otros céstodos. Además, análisis de secuenciación masiva en larvas de *T. ovis* han llevado a la identificación de 33 secuencias conocidas de miRNAs y al reconocimiento del cluster miR-71/2b/2c, que está conservado en otras seis especies de céstodos (Zheng, 2017). En *E. multilocularis*, miR-71 es capaz de modular la producción de óxido nítrico en macrófagos, sugiriendo su participación en las interacciones huésped-parásito (Zheng *et al.*, 2016). De manera similar, el miR-71 del parásito *Onchocerca volvulus* ha sido detectado en el suero de individuos infectados (Quintana *et al.*, 2015) sugiriendo su potencial como un biomarcador en el diagnóstico.

Un análisis comparativo de los perfiles de miRNAs de los adultos de *T. asiatica* y *T. solium* reveló una gran similitud entre éstas dos especies, probablemente debida a su cercanía filogenética, con una expresión predominante de miR-7-5p, miR-71, miR-277, miR-219-5p y miR-2b-3p. Resultó de interés que miR-10-5p fue una lectura única para *T. solium* y estuvo ausente en el perfil de miRNAs de *T. asiatica* (Lin *et al.*, 2014). Se ha sugerido que este hecho refleja diferencias en su fisiología o su ciclo de vida (Gutiérrez-Loli *et al.*, 2017). Cabe señalar que este estudio fue realizado mediante secuenciación masiva de RNA total. Este tipo de aproximaciones experimentales es capaz de producir extensas bibliotecas de RNAs, cuyos resultados están sujetos a las variaciones espacio-temporales en la expresión de los miRNAs. Se reportó previamente la expresión de miR-10 en otras especies de céstodos, además de la mencionada *T. solium*, en *E. granulosus*, *E. multilocularis* e incluso en *T. saginata* (Ai *et al.*, 2012) y *T. multiceps* (Wu *et al.*, 2013).

No obstante, dadas las estrictas condiciones requeridas por una secuencia de sRNA para ser considerada como un miRNA, solamente las secuencias reportadas para *E. granulosus* y *E. multilocularis* (Cucher *et al.*, 2011 y 2011) se encuentran incluidas en miRBase (Griffiths-Jones *et al.*, 2006 y 2007), la base de datos de miRNAs más completa en la actualidad.

### **3.8. Herramientas bioinformáticas para la identificación de miRNAs y la predicción de sus blancos**

En los métodos experimentales para el descubrimiento de miRNAs, primero se establece la expresión de sRNAs y posteriormente se utilizan herramientas bioinformáticas para identificar los RNAs que cumplen los requerimientos estructurales y termodinámicos (Cheng *et al.*, 2013; Cucher *et al.*, 2011 y 2015; Lin *et al.*, 2014; Macchiaroli *et al.*, 2015). En las aproximaciones computacionales, los candidatos a miRNAs son primero predichos en secuencias genómicas con base en sus características estructurales y posteriormente se utilizan técnicas experimentales para validar esas predicciones, demostrando así la expresión de dichas secuencias (Berezikov *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010).

La identificación experimental de miRNAs y sus blancos requiere de purificación de RNA total, enriquecimiento de sRNAs, secuenciación y construcción de bibliotecas, Northern blots, etc. (Poy *et al.*, 2004; Shibata *et al.*, 2008). Este tipo de aproximaciones presentan un sesgo debido a la expresión diferencial temporal y espacial de los miRNAs: se reportan con mayor frecuencia miRNAs altamente expresados y en condiciones y tejidos específicos.

Con el objetivo de describir aquellos miRNAs -y sus blancos- que no son detectados de manera experimental, varios métodos computacionales han sido desarrollados y empleados para la identificación de este y otros tipos de ncRNAs. Existe ya una variedad de trabajos enfocados en el descubrimiento de miRNAs a través del análisis de genomas completos (Bentwich *et al.*, 2005; Berezikov *et al.*, 2005) y en la predicción de blancos putativos (Krek *et al.*, 2005). Entre las diferentes aproximaciones que son utilizadas para la predicción de miRNAs y sus blancos, aquellas basadas en la conservación filogenética entre varias especies han producido predicciones confiables de miRNAs funcionales (Wang *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2005; Stark *et al.*, 2007a, b).

La secuenciación de bibliotecas de RNAs pequeños representa una herramienta poderosa para la identificación *de novo* de miRNAs, así como para otros procedimientos experimentales. No obstante, no siempre es posible el uso de esta técnica, especialmente para grupos de investigación en las regiones endémicas de enfermedades parasíticas producidas por céstodos o tremátodos, donde los recursos frecuentemente son limitados.

En este escenario, la bioinformática es un recurso invaluable para la identificación de nuevos miRNAs. Los métodos para la predicción computacional de secuencias potencialmente pertenecientes a miRNAs se han incrementado y sofisticado los últimos años, y permiten el uso de datos genómicos de *T. solium* disponibles en la actualidad para llevar a cabo el mapeo homólogo basado en poblaciones helmínticas de miRNAs, ya descritos. A continuación, se describen a detalle las herramientas bioinformáticas utilizadas en este trabajo.

### **3.8.1. National Center for Biotechnology Information (NCBI)**

El repositorio del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) con tiene gran variedad de datos como artículos y sus resúmenes; así como relaciones filogenéticas y secuencias de genomas completos, transcritos y proteínas de diferentes y variados organismos. En este trabajo se consultaron dos bases de datos de *T. solium*: 1) la secuencia de su genoma completo y 2) las secuencias de Tags de Secuencias Expresadas (Expressed Sequence Tags, ESTs).

En diversos estudios experimentales en los que requiere la creación de bibliotecas de RNA, la comprobación de la expresión de determinados genes mediante la detección de sus transcritos, o el análisis de modificaciones post-transcripcionales, por mencionar algunos, se aíslan gran cantidad de transcritos. La mayoría de ellos son de escasa o nula utilidad para los estudios en cuestión. El NCBI se ha dado a la tarea de recabar estas secuencias que pueden proveer de información relevante en otro tipo de aproximaciones. En este trabajo se utilizó el repositorio de ESTs de *T. solium* para determinar si los miRNAs maduros hallados son capaces de unirse a ellos, estableciendo así interacciones miRNA/blanco. El uso de estas secuencias permite analizar dúplex miRNA/blanco aun en secuencias de proteínas cuya descripción especie específica está aún por determinar, y predecir secuencias blanco de genes ortólogos.

### **3.8.2. miRBase**

Al día de hoy, miRBase (<http://www.mirbase.org/>) es probablemente el repositorio de datos de miRNAs más completo. Proporciona acceso libre a información sobre lecturas de miRNAs, así como secuencias confirmadas experimentalmente. Contiene datos de nomenclatura, secuencias, registro y predicción de blancos. La versión actual (22) contiene secuencias de miRNAs de 271 organismos: 38,589 secuencias de pre-miRNAs y 48,860 secuencias de miRNAs maduros (Kozomara *et al.*, 2019). miRBase provee datos que facilitan los estudios genómicos de los miRNAs al mostrar los loci de las secuencias

reportadas y los clusters de miRNAs. Describe también aquellas secuencias de miRNAs sobrelapadas a transcritos previamente reportados (codificantes y no codificantes para proteínas), así como información gráfica sobre los loci y la predicción de blancos de gran cantidad de miRNAs (Griffiths-Jones *et al.*, 2007; Kozomara y Griffiths-Jones, 2014).

Lanzado en 2002 (llamado entonces The microRNA Registry), miRBase es responsable determinar la nomenclatura de los genes codificantes de miRNAs (Griffiths-Jones *et al.*, 2006). Dicha nomenclatura comprende: 1) género (primera letra) y especie (dos primeras letras) a las que pertenece el miRNA (emu, para *E. multilocularis*; egr, para *E. granulosus*); 2) un número que identifique una secuencia particular de miRNA (se conserva el número en caso de tratarse de miRNAs ortólogos, se designa uno nuevo en el caso contrario), y 3) se asigna la terminación 3p o 5p señalando el brazo del pre-miRNA del que procede un miRNA maduro, solo en caso de que produzca 2 miRNAs maduros funcionales (uno de cada brazo). Esta nomenclatura fue utilizada para nombrar a los miRNAs putativos de *T. solium* hallados en este trabajo.

### **3.8.3. WormBase ParaSite**

WormBase Parasite ([parasite.wormbase.org](http://parasite.wormbase.org)) es una plataforma que contiene un repositorio de genomas de especies de los Phyla Nematoda y Plathelmintha, así como las herramientas de alineamiento de secuencias BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990) y Blastn (semejante a BLAST, para alineamientos de secuencias cortas). Actualmente, WormBase ParaSite incluye datos genómicos de 137 especies (131 nemátodos y 36 platelmintos), incluyendo anotaciones funcionales, análisis comparativos de genes, así como análisis de expresión génica. La búsqueda y exploración de la información incluye la búsqueda por especie, gen y secuencia. Wormbase ParaSite es actualizado de tres a seis veces por año.

### 3.8.4. Mfold Web Server

Mfold Web Server es una plataforma on-line para la predicción de la estructura secundaria de ácidos nucleicos monocatenarios disponible en <http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>. Cuenta con una interfaz visual capaz de mostrar estructuras secundarias y gráficas de frecuencia de nucleótidos en una cadena (Zuker, 2003).

El software “mfold” para el plegamiento de RNA fue desarrollado a finales de 1980 (Zuker, 1989). El algoritmo central predice una energía libre mínima (mfe),  $\Delta G$ , para plegamientos particulares, así como mfes para aquellos en los que están forzadas las uniones de ciertas bases de nt en particular. Para determinar la estabilidad de los pares de bases, utiliza una función castigo para las uniones de pares de bases no complementarias.

### 3.8.5. RNAhybrid

Los miRNAs se unen a sus mRNAs blanco mediante el apareamiento de bases complementarias principalmente en el extremo UTR3' del mensajero. Generalmente, los nucleótidos del miRNA que participan en esta unión son aquellos que se encuentran en la región de la semilla, secuencia encontrada en los nucleótidos 2-7. Las herramientas computacionales disponibles para la predicción de blancos están basadas en esta característica. Para ello, requieren contar con una amplia base de datos de secuencias de mRNAs con las cuales verificar si la unión es posible, y cuál es la estructura de los dúplex miRNA/mRNA. No obstante, este tipo de servicios o programas suelen contener en su base de datos únicamente secuencias de organismos modelo.

RNAhybrid (Rehmsmeier *et al.*, 2004) es un programa para el sistema operativo Linux que permite al usuario ingresar el conjunto de datos de su interés. RNAhybrid requiere dos grupos de datos de entrada: 1) secuencias maduras de miRNAs y 2) secuencias de mRNAs (blancos a probar). Como información de salida, RNAhybrid muestra la

estructura de los dúplex formados, con las uniones de nt complementarios. A partir de dichos dúplex, evalúa: 1) el número de uniones complementarias, 2) la fuerza de cada unión (a partir de la formación de puentes de hidrógeno entre las bases A-U y C-G), así como su sumatoria; 3) la distancia en nt entre las uniones y 4) el número de uniones adyacentes. Las variables anteriores, en combinación con una función castigo a uniones que no se encuentran en la región de la semilla, permiten a RNAhybrid proporcionar el estadístico p, p-value, y el valor esperado (e-value, E) de los dúplex mRNA/miRNA. Un dúplex formado por la unión exacta y precisa de todos los nt de una secuencia de miRNA, tendría un e-value de cero. Por tanto, a menores valores de valor esperado, se incrementa la posibilidad de formación de dicho dúplex y, por tanto, la posibilidad de regulación post-transcripcional. Dada la naturaleza de las variables consideradas por RNAhybrid para calcular el valor esperado, este tiene una cota inferior (cero) pero carece de cota superior. Valores de  $E < 0.01$  se consideran adecuados en la predicción de blancos de miRNAs (Rehmsmeier *et al.*, 2004).



#### 4. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

*T. solium* es un céstodo parásito cuyo ciclo de vida comprende tres fases: huevo, larva o cisticerco y adulto. La fase de larva causa la cisticercosis en diversos tejidos del ser humano y cerdo, al ingerir los huevos producidos por el adulto. La infección se presentaba en países en vías de desarrollo, sin embargo actualmente los casos han aumentado en países desarrollados (Schantz *et al.*, 1998). Es la primera causa de epilepsia adquirida, cuando los cisticercos se establecen en el sistema nervioso central (neurocisticercosis) (O’Neal *et al.*, 2011). El control, diagnóstico y terapia de esta parasitosis de importancia médica, veterinaria y económica dependen en gran medida del conocimiento de la biología del céstodo (Nash y García, 2011).

En los últimos años, los miRNAs han cobrado relevancia en el estudio de la regulación post-transcripcional. Estas moléculas de ncRNA están altamente conservadas en animales y están involucrados en una gran variedad de procesos biológicos. Son capaces de regular gran cantidad de transcriptos relacionados con diversas funciones, incluso, de manera interespecífica.

Se han reportado previamente secuencias de miRNAs en el adulto de *T. solium*, que han sido detectadas a través de secuenciación masiva (Lin *et al.*, 2014), si bien estos análisis han carecido de la robustez requerida para ser incluidas en miRBase. No existen, al día de hoy, análisis funcionales de ninguna secuencia de miRNA de *T. solium*. Se ha sugerido que los miRNAs del cisticerco de *T. solium* podrían modular la respuesta inmune de su huésped, así como representar blancos terapéuticos y de diagnóstico, dados los reportes de la presencia de este tipo de moléculas de otras especies en suero de sus huéspedes (Gutiérrez-Loli *et al.*, 2017). Sin embargo, los problemas inherentes a la descripción experimental de miRNAs y la falta de registros de esta especie en bases de datos como miRBase han impedido dilucidar su participación en la cisticercosis.

En este trabajo se desarrolló un método *in silico* para la identificación de miRNAs de *T. solium* y sus blancos putativos. Se identificaron 16 miRNAs para *T. solium* con diversas

funciones, se detallan aquellos cuyas proteínas blanco han sido descritas para la especie (let-7 y miR-9, relacionados con el citoesqueleto de actina). La información obtenida podría ser utilizada para dirigir estudios experimentales sobre la biología de este organismo, así como el papel de los miRNAs la relación huésped-parásito, evitando la necesidad de desarrollar una costosa infraestructura de construcción de bibliotecas de RNAs pequeños para cada estadio de vida y/o condición infecciosa.

## **5. HIPÓTESIS**

La alta conservación en estructura y función de los miRNAs en la familia Taeniida, así como las herramientas bioinformáticas y bases de datos como miRBase y NCBI permitirán identificar miRNAs ortólogos y sus blancos en *T. solium*.

## **6. OBJETIVO GENERAL**

Identificar miRNAs ortólogos al género *Echinococcus* en *T. solium* y determinar sus blancos mediante análisis bioinformáticos.

## **7. OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1.- Identificar los genes que codifican a los pre-miRNAs de *T. solium* y determinar su localización genómica.
- 2.- Determinar la estructura secundaria de los pre-miRNAs hallados.
- 3.- Identificar sus blancos putativos y sus funciones.

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1. Identificación de miRNAs y su localización genómica en *T. solium*

Debido a la ausencia de secuencias de *Taenia* en miRBase (Kozomara y Griffiths-Jones, 2014), se eligieron las dos especies más cercanas filogenéticamente a *T. solium* con registros en dicha base de datos (*E. granulosus* y *E. multilocularis*) para realizar los análisis comparativos e identificar miRNAs ortólogos en *T. solium*. Se obtuvieron 24 registros de pre-miRNAs, con sus miRNAs maduros correspondientes de *E. granulosus* y 22 de *E. multilocularis* en miRbase (Cucher *et al.*, 2011). Se determinó la presencia de homólogos de dichas secuencias en *T. solium* mediante BLASTNs contra secuencias genómicas en la base de datos WormBase ParaSite (Howe *et al.*, 2016). Los parámetros de los BLASTNs utilizados fueron los siguientes: corte en el valor de  $E \leq 1 \times 10^{-2}$ , castigo de -3 por cada par de nucleótidos no correspondientes, castigo de 5 por cada nucleótido ausente en la secuencia génica y castigo de 2 por deleciones de 2 o más nucleótidos. Las secuencias homólogas obtenidas a los miRNAs con  $E \leq 1 \times 10^{-4}$  y contenidas en las secuencias homólogas de pre-miRNAs con  $E \leq 1 \times 10^{-4}$  fueron consideradas como posibles genes de miRNA. Mediante el programa AliView (Larson, 2014) se realizaron alineamientos de los ESTs y las secuencias obtenidas de posibles miRNAs y pre-miRNAs de *T. solium* para comprobar que no pertenecen a otros tipos de RNA (tRNAs, rRNAs, mRNA; secuencias obtenidas de los repositorios de RNAs codificantes del NCBI) (Fig. 6).

### 8.2. Estructura secundaria de los pre-miRNAs de *T. solium*

Para determinar la formación de horquillas a partir de las secuencias obtenidas se utilizó el programa Mfold (Zuker, 2003) que permite calcular el estadístico p del apareamiento de las bases nucleotídicas, calcular el  $\Delta G$  de formación de la horquilla y proporciona una estructura secundaria bidimensional de acuerdo a parámetros determinados (porcentaje de

apareamiento de bases complementarias, longitud de loops formados debido a la falta de este apareamiento, entre otros). Las estructuras secundarias de los posibles pre-miRNAs se compararon con las estructuras secundarias de los miRNAs de *Echinococcus* para verificar si se trataba de estructuras conservadas (Fig. 6).

### **8.3. Predicción de blancos putativos de los miRNAs de *T. solium***

Se determinaron posibles mRNAs blanco mediante el programa RNAhybrid (Rehmsmeier *et al.*, 2004), utilizando secuencias de mRNA de *T. solium* extraídas del repositorio de EST del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (EST [Internet]. Bethesda (MC): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/?term=taenia+solium>). Se utilizaron ESTs en lugar de mRNAs codificantes para proteínas debido a la escasa información de proteínas expresadas en *T. solium*, permitiendo identificar la modulación por miRNAs de proteínas homólogas aun sin caracterizar en la especie.

Se forzó la unión de los nucleótidos 2-7 de los miRNAs a la secuencias de ESTs. Se seleccionaron los dúplex miRNA/EST con menores valores de mfe ( $\Delta G \leq -18$  kcal/mol) y valores de  $p \leq 0.05$ . Se comprobó si las secuencias de EST seleccionadas pertenecen a exones del extremo UTR3' de los transcritos de genes de *T. solium*, mediante BLAST en Wormbase Parasite, comprobando que dichos transcritos se expresan como mRNAs. Se reportan los dúplex miRNA/mRNA con los menores valores de  $p$  y mfe cuyos mRNAs pertenecen a regiones codificantes para proteínas de *T. solium* o a otros organismos (consideradas como homólogos) (Fig. 6). Adicionalmente, se realizó un control interno, con los mismos parámetros descritos arriba, analizando las formaciones de dúplex miRNA/EST utilizando permutaciones de las secuencias de blancos putativos.

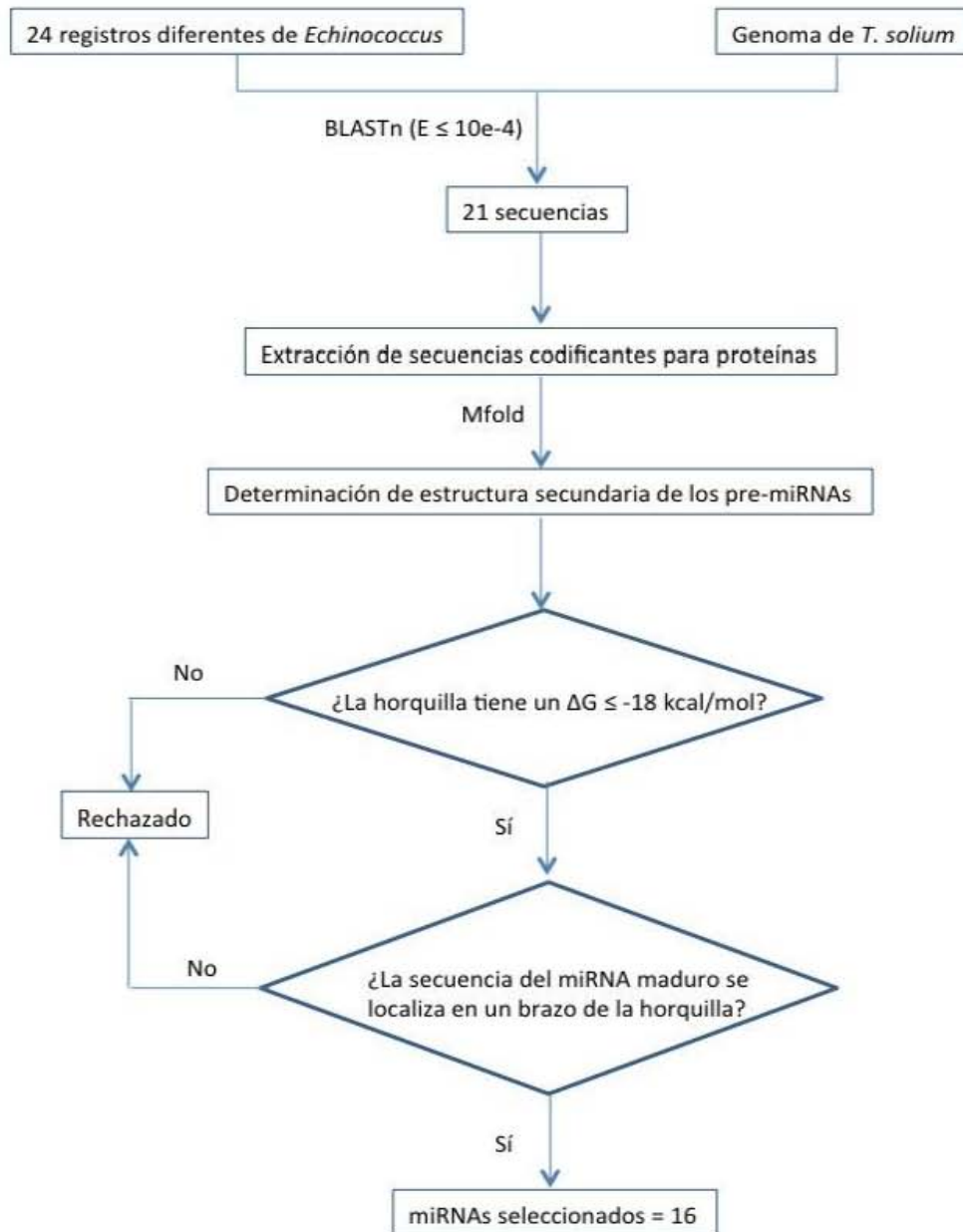


Fig. 6. Pasos para la identificación de miRNAs homólogos en *T. solium*.

Las funciones de las proteínas producidas por los mRNAs reportados como blancos putativos se determinaron en WormBase Parasite y se confirmaron en UniProt (base de datos de proteínas, incluye nombre, sinonimia, secuencia de aminoácidos, términos GO – Gene Ontology- y localización celular; disponible en <https://www.uniprot.org/>).

## 9. RESULTADOS

Se encontraron en miRBase 46 registros de miRNAs (Tabla 1), y sus pre-miRNAs, de *E. granulosus* (24 registros) y *E. multilocularis* (22 registros). De éstos, 21 secuencias son compartidas en ambas especies, dos son únicas para *E. granulosus* (miR-1990 y miR-1991, esta última con dos copias y, en consecuencia, dos registros independientes), una es única para *E. multilocularis* –miR-96- y dos pre-miRNAs que producen dos secuencias maduras cada uno (miR-2c y miR-87). Las secuencias reportadas en miRBase fueron comprobadas experimentalmente para *E. granulosus* (*egr*) y reportadas como ortólogos sin confirmación experimental en el caso de *E. multilocularis* (*emu*) (Cucher *et al.*, 2011). En todos los casos, se hallaron homólogos en el genoma de *T. solium* mediante BLAST; si bien no se reportan en este trabajo secuencias localizadas en regiones codificantes para proteínas. Una de ellas, mir-4990, se encuentra en la región codificante del gen homólogo de la proteína tipo RRP15, que codifica para un precursor de la subunidad grande del rRNA (Marchis *et al.*, 2005).

Se obtuvieron 16 secuencias homólogas –a ambas especies de *Echinococcus*- de miRNAs de *T. solium* con 19-23 nt de longitud, 3 de ellas (miR-87-3p, miR-87-5p y miR-125) con dos copias idénticas cada una (sugiriendo representar funciones relevantes en el organismo). Nueve de éstas secuencias se encontraron en el brazo 3' de su precursor y 10 en el brazo 5' del mismo (Tabla 2). Los pre-miRNAs correspondientes tienen una longitud de 67-93 nt y todos tienen la capacidad termodinámica de formar estructuras tipo horquilla, con valores de mfe ( $\Delta G$  de formación) entre -41.60 y -24.40 kcal/mol. Los genes correspondientes a estas secuencias se hallaron en 15 diferentes contigs (unidades de secuenciación de *T. solium*). Ninguna de estas secuencias corresponde a tRNAs, rRNAs ni mRNAs. Las secuencias se nombraron de acuerdo a las convenciones de miRBase: tres letras que identifiquen la especie de procedencia, con género y especie –“tso” para *T. solium*- el número de miRNA (se mantuvieron los números de *Echinococcus*, al tratarse de ortólogos) y el brazo en el que se localiza el miRNA maduro en el pre-miRNA, en caso de producir dos secuencias maduras (-3p o -5p).



**Tabla 1. miRNAs de *E. granulosus*, *E. multilocularis* y *T. solium*.** Se muestran los miRNAs de *Echinococcus* reportados en miRBase, así como los miRNAs homólogos de *T. solium* hallados en este trabajo.

miRNA	<i>E. granulosus</i>	<i>E. multilocularis</i>	<i>T. solium</i>
let-7	✓	✓	✓
miR-1	✓	✓	✓
miR-2a	✓	✓	✓
miR-2b	✓	✓	✓
miR-2c	✓ *	✓ *	✓ *
miR-7	✓	✓	
miR-8	✓	✓	
miR-9	✓	✓	✓
miR-10	✓	✓	✓
miR-71	✓	✓	
miR-87	✓ *	✓ *	✓ * <sup>+</sup>
miR-96		✓	
miR-124a	✓	✓	✓
miR-124b	✓	✓	
miR-125	✓	✓	✓ <sup>+</sup>
miR-153	✓	✓	✓
miR-190	✓	✓	✓
miR-219	✓	✓	
miR-277	✓	✓	
miR-745	✓	✓	
miR-4988	✓	✓	✓
miR-4989	✓	✓	✓
miR-4990	✓		
miR-4991	✓ <sup>+</sup>		

\* 2 miRNAs provenientes de un solo pre-miR, -3p y -5p.

<sup>+</sup> miRNAs con 2 copias génicas.

**Tabla 2. miRNAs de *T. solium* y sus características.** Se muestran los nombres de los miRNAs ortólogos en *Echinococcus*; su longitud en pares de bases (pb), localización en el brazo 3' o 5' del precursor, la secuencia del pre-miRNA y el miRNA maduro (en negritas), el mfe de formación de la horquilla y su localización en el genoma.

miRNA	Longitud (pb)	Localización en la horquilla	pre-miRNA putativo (5'-3')	mfe (kcal/mol)	Localización genómica
let-7	22	5'	UGCUGACAAUGUGAGGUAGUGUUUCGAAUG UCUCUGGCACUAGCGACAUCCGUUUCACUAU CUGCAUAUUGCGGCGC	-35.20	pathogen_TSM_contig_01305 3766 a 3842 (-)
miR-1	20	3'	GCUUCCCAAUAGGCCAUAGAGUAAGUCCCUA CAUCUACGGGAAUCUAUGGAAUGUUGUGAA GUAUGU	-24.40	pathogen_TSM_contig_00015 112217 a 112283 (+)
miR-2a	22	3'	CUUCGAACCUCCUACGUUCCAAGGGGAUGU GAGUUUAUAGAGCCUAUGAAUCACAGCCCU GCUUGGAACCAACGGAGCUUCUU	-33.90	pathogen_TSM_contig_00316 47890 a 47971 (+)
miR-2b	22	3'	UGUCAGUCGGUGUCCCAAGGGUGGUGAUCUA CUCAGUGGGAGUAUCACAGCCUGCUUGGG ACACAUGCUGGCAGC	-41.60	pathogen_TSM_contig_01703 2342 a 2424
miR-2c-3p	20	3'	GGGCGUUGUUCGUCGUACAACAUUGCCUGUAG	-34.80	pathogen_TSM_contig_01703

			ACAUGGGUUGATAUGUCACAGCCAAUUAUUG AUGAACGAGUCACGUCU		2236 a 2320
miR-2c-5p	22	5'	GGGCGUUGUUCGUCGUCAACAUUGCCUGUA GACAUGGGUUGAUUAUGUCACAGCCAAUUAUUG AUGAACGAGUCACGUCU	-34.80	pathogen_TSM_contig_01703 2236 a 2320
miR-9	21	5'	UAGUUGCCAUUCUUGCUUAUCAGCUGUGU GAUGUUUAGCUUCAGACAGCUCUUAUUUUC CAAGGCUAGAUUCCAAACAAACGCACCUGA	-31.40	pathogen_TSM_contig_00972 16091 a 16183 (-)
miR-10	22	5'	CACCCUGUAGACCCGAGUUUGAGUGCCUAG CGUACGUCCCACCGUGCGGAUCCCCAAGCUC GUGUCUUCAAGGAAUCA	-25.70	pathogen_TSM_contig_00001 733529 a 733606 (-)
miR-87-3p (copia 1)	20	3'	CCGCCUGUCAUUUUGCUCGAACCAGAGUUAU UCUUGGCGUCAUCCAUCUUCUCGAAGGAUGU UUGCUCAGGUUGGUGAGCAAAGUUUCAGGUG U	-39.40	pathogen_TSM_contig_00046 219681 a 219734
miR-87-3p (copia 2)	20	3'	CCGCCUGUCAUUUUGCUCGAACCAGAGUUAU UCUUGGCGUCAUCCAUCUUCUCGAAGGAUGU UUGCUCAGGUUGGUGAGCAAAGUUUCAGGUG U	-39.40	pathogen_TSM_contig_00046 219642 a 219724 (-)

miR-87-5p (copia 1)	23	5'	<b>CCACCUGUCAUUUUGCUCGAACCAGAGUUA</b> UUCUUGGCGUCAUCCAUCUUCUCGAAGGAUG UUUGCAGGUUGGUGAGCAAAGUUUCAGGUG U	-39.40	pathogen_TSM_contig_00046 219681 a 219734
miR-87-5p (copia 2)	23	5'	<b>CCACCUGUCAUUUUGCUCGAACCAGAGUUA</b> UUCUUGGCGUCAUCCAUCUUCUCGAAGGAUG UUUGCAGGUUGGUGAGCAAAGUUUCAGGUG U	-39.40	pathogen_TSM_contig_00046 219681 a 219734
miR-124a	21	3'	AAGCACGUGAAAUGGCGUUCAACCUCGGAGC CUUUGUUAGCAAUUGAAUUAAGGCACGCGG <b>UGAAUGCCAAAUGCGUUG</b>	-28.60	pathogen_TSM_contig_02167 4295 a 4377 (+)
miR-124b	20	3'	GUGAAUUUGGUAUUCUGCGCGAUGUCUUGGU GCGAGUUGACACUAAGGCACGCGGUGAAUA <b>CCAAGGUCC</b>	-33.70	pathogen_TSM_contig_00021 132911 a 132980 (-)
miR-125 (copia 1)	22	5'	CAUGUCCCUGAGACCCUAGAGUUGUCCGGA AUUUGCAUAUCCACAUUUCUCACGUGGCAAC UCUAAUGUCCCCGGGUUAUGGG	-27.30	pathogen_TSM_contig_00925 18167 a 18248 (-)
miR-125 (copia 2)	22	5'	CAUGUCCCUGAGACCCUAGAGUUGUCCGGA AUUUGCAUAUCCACAUUUCUCACGUGGCAAC	-27.30	pathogen_TSM_contig_00587 14115 a 14196 (+)

			UCUAAUGUCCCGGGUUAUGGG		
miR-153	22	3'	CGUCGUAAAUGCUUACGAGACUUGCACUCCA GUUGAAAUGGUUGUUAACUACCUUGUGGAUU <b>GCAUAGUCUCAUAAGUGCCAUCGACU</b>	-28.50	pathogen_TSM_contig_00050 147624 a 147720
miR-190	23	5'	UCGACAAUGAGAU AUGUUUGGGUACUUGG <b>UGCUGUACUCUCUGCUCUACACCAGUGACC</b> AAACAUAUUCACAUGUU	-28.90	pathogen_TSM_contig_00076 133356 a 133434 (-)
miR-4988	19	5'	UCCACAUCUUA <b>AAACCUAUCACACUUCAGU</b> <b>CCAGUACGAAUUUGUAUGGGACGGAAGUCU</b> GAAAGGUUAAACUUGUG	-33.90	pathogen_TSM_contig_00173 108715 a 108801
miR-4989	22	3'	ACGCUGGGUAGUCGUUGCAUUCCACACUGC UGC <u>UAGGUUGCAGCCAAAAGAGGGUGAAAAU</u> <b>GCACCAACUAUCUGAGAC</b>	-25.90	pathogen_TSM_contig_00002 355524 a 355603 (+)

Se utilizaron las 75,483 secuencias de ESTs de *T. solium* halladas en el repositorio del NCBI para formar dúplex miRNA/EST. Al analizar ESTs fue posible describir blancos de proteínas que, aun sin haber sido descritas específicamente para *T. solium*, sí lo han sido en otros organismos (consideradas como ortólogos). En cuanto a la predicción de blancos, se eligieron los dúplex miRNA/blanco potencial con los menores de valores de mfe y p-value; menores a -18.0 kcal/mol y 0.05, respectivamente, en todos los casos. Como resultado de dicho análisis, se encontraron blancos para cada una de las secuencias elegidas. Éstos blancos putativos presentaron valores de mfe entre -26.0 y -37.1 kcal/mol y valores de p entre 0.00715 y 0.01070. Los dúplex miRNAs permutados/EST utilizados como controles internos no presentaron valores de p significativos ( $p > 0.05$ ).

El procedimiento llevado a cabo en este estudio resultó validado al hallarse como blancos de tso-miR-1 a la Dilocidil Fosfatasa 1 (DOLPP 1) y la Proteína Relacionada a Saposina (Sap-p), blancos que previamente se han descrito en otros organismos para este miRNA conservado.

La formación del dúplex con el mRNA de la DOLPP 1 tiene un mfe de -28 kcal/mol y un valor p de 0.002446. DOLPP 1 es requerida para una N-glicosilación eficiente, así como para mantener niveles óptimos de oligosacáridos N-ligados transportados por dolicol (lípidos de la bicapa de la membrana del retículo endoplásmico). Su función es transportar oligosacáridos N-ligados hasta las proteínas sintetizadas en el retículo endoplásmico que lo requieran en su proceso de modificación post-traduccional. Yamasaki *et al.* (2012) reportaron la disminución de expresión de DOLPP 1 en la línea celular T24 transfectada con miR-1.

El dúplex formado por tso-miR-1 y Sap-r tiene un mfe de -26 kcal/mol y un valor p de 0.071961. Si bien este estadístico no es suficientemente bajo para reflejar que la formación del dúplex tiene una significancia estadística, se reporta en este trabajo dado que se ha demostrado (Nakahara y Carthew, 2004) que el mRNA de Sap-r es blanco de miR-1 en *Drosophila melanogaster*. Esta proteína es reguladora clave de la homeostasis de lípidos en el lisosoma.

La mayor parte de los blancos hallados (blancos putativos, hasta su validación experimental) proceden de secuencias de EST reportadas para la fase larvaria de *T. solium*, ya que el repositorio de EST del NCBI contiene, en su mayoría, secuencias de este estadio. Las funciones de los blancos putativos pertenecientes a proteínas aun sin caracterizar en *Taenia* (homólogas a diversos organismos como *T. saginata*, *Echinococcus*, *Clonorchis cinensis*, *Schistosoma*, *C. elegans*, *Haemunchus*, *Crassostrea*, *Drosophila*, *Ixodes*, *Homo sapiens*) incluyen modulación y edición de aminoácidos, regulación transcripcional y epigenética, transporte y translocación de oligosacáridos y fosfolípidos, apoptosis, liberación de vesículas y regulación del citoesqueleto, así como funciones involucradas en la respuesta inmune (Tabla 3). Los únicos blancos hallados que producen proteínas con expresión confirmada experimentalmente en *T. solium* fueron los mRNAs de la actina (ACT1) y de H17g, un antígeno del tegumento cuya función se desconoce. En este trabajo, se reporta a tso-miR-9 y tso-let-7, como miRNAs que podrían regular a ACT1 y H17g, respectivamente.

A continuación se detallan los resultados de aquellos miRNAs putativos de *T. solium* cuyos blancos potenciales pertenecen a proteínas con expresión confirmada para la especie. Se pretende profundizar la valiosa información restante (blancos de proteínas ortólogas con expresión aún por confirmar) en un trabajo posterior.

### **9.1. Let-7**

Los pre-miRNAs y los miRNAs maduros de let-7 de *E. granulosus* y *E. multilocularis* (encontrados en abundancia en las fases larvarias) son idénticos en su secuencia y estructura secundaria. El pre-miRNA de *T. solium* presenta sustituciones en los nucleótidos 7 y 8, que no afectan a la secuencia del miRNA maduro ni la formación de la horquilla (Fig. 7, A y B), con una identidad de 97.4% entre ambas secuencias. Esta identidad y la estructura secundaria conservada sugieren que la secuencia de *T. solium*, tso-let-7, es un miRNA homólogo conservado.

En los análisis de formación de dúplex miRNA/mRNA se hallaron cinco secuencias de ESTs capaces de unirse a tso-let-7 con los valores de mfe y valor de p establecidos anteriormente. De éstas, cuatro -Proteína tipo  $\beta$ -lactamasa, Swimming Induced Paralysis (SWIP-10), el factor de transcripción 4F y una tirosín cinasa sin caracterizar- pertenecen a proteínas ortólogas inferidas de otros organismos (*Equinococcus*, *Ixodes*, *C. elegans* y *S. mansoni*, respectivamente). El EST restante, corresponde a la secuencia genómica codificante para la proteína H17g, un antígeno del tegumento expresada en *T. solium* y otras especies del género.

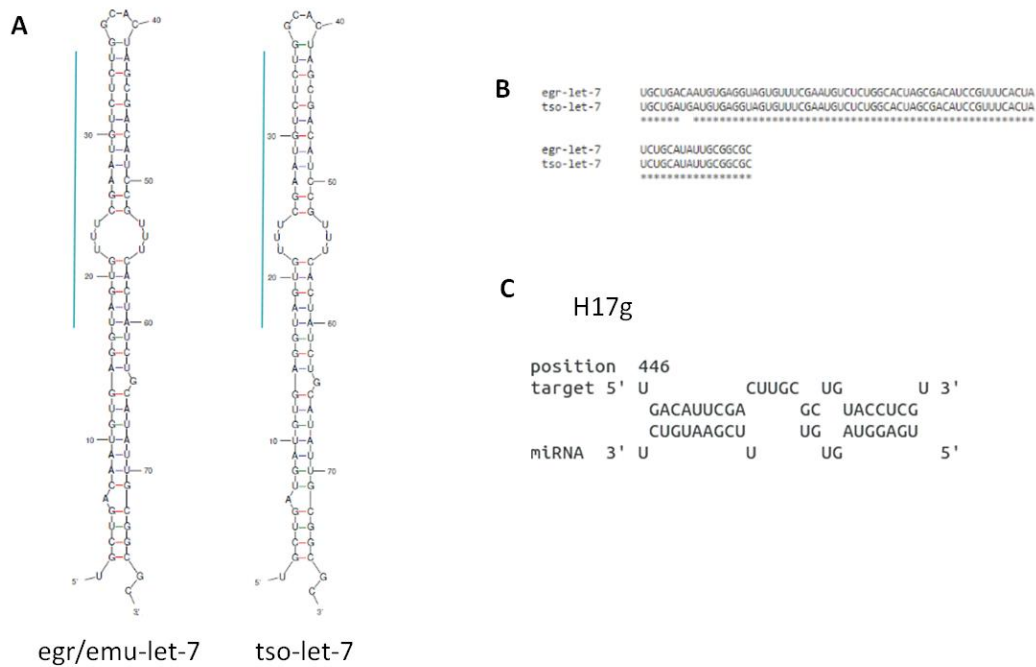


**Tabla 3. Blancos y funciones de los miRNAs putativos de *T. solium*.** Se agrupan por funciones de los blancos putativos. Se incluyen los valores de mfe y los valores p de formación de los dúplex mRNA/miRNA. Se muestran en negritas los blancos con expresión probada experimentalmente en la especie.

Tipo	miRNA	Blanco	Función	mfe (kcal/mol)	valor p
Previamente reportados	tso-miR-1	Dilocidilfosfatasa (DOLPP 1)*	Transporte de oligosacáridos N-ligados.	-28	0.002446
		Proteína Relacionada a Saposina (Sap-r)*	Regulación de la homeostasis de lípidos en el lisosoma	-26	0.071961
Relacionadas a Azufre	tso-miR-2b	Factor de Ensamblaje Citosólico del Cluster Hierro/Azufre (Nubp2)	Maduración citosólica de proteínas Fe/S	-34.2	0.003083
	tso-miR-124a	Cisteín-desulfurasa Mitocondrial (NFS1)	Remoción del Azufre de la cisteína	-36.1	0.000867
Posibles funciones inmunológicas	tso-miR-10	Carboxipeptidasa C (CPC)	Degradación de neutrófilos y presentación de antígeno	-37.1	0.000715
	tso-miR-87-3p	Tioredoxin Reductasa 1 (Trx-R1, inferida por homología con la proteína de <i>C. elegans</i> )	Respuesta a estrés oxidante	-31.1	0.005457
	tso-miR-87-5p	Péptido 2 Enriquecido de Repeticiones de Leucina de Interacción con Flightless (LRRFIP2)	Regulación de NK- $\kappa$ B	-36.5	0.001083
	tso-miR-153	Rudhira	Regulación de la respuesta Th1	-34.3	0.001596
		TGF- $\beta$	Regulación de la respuesta Th1	-31.8	0.005964
Citoesqueleto	<b>tso-miR-9</b>	<b>Actina</b>	<b>Formación de fibras musculares, mantenimiento de forma celular</b>	<b>-30.5</b>	<b>0.01133</b>
	tso-miR-2a	Factor 6 de ADP-Ribosilación (ARF6) (Expresión reportada en el adulto).	Reorganización del citoesqueleto de actina	-32	0.008302

	tso-miR-125	Proteína Putativa del Síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP)	Regulación del citoesqueleto de actina	-34.8	0.001596
	tso-miR-4989	Subunidad $\delta$ de la Proteína 1 del Complejo T (TCP-1- $\delta$ )**	Plegamiento de proteínas del citoesqueleto.	-31.8	0.005964
Factores de transcripción	tso-miR-190	BUGZ-1	Factor de transcripción durante la mitosis.	-34.6	0.001376
		Xfin	Factor de transcripción durante el desarrollo embrionario.	-30.2	0.001376
	tso-miR-2c-5p	Subunidad 5 del Factor de Transcripción General IIIH (p52)	Transcripción y reparación del DNA	-29.4	0.009245
Varios	<b>tso-let-7</b>	<b>Antígeno tegumentario H17g</b>	<b>Desconocida</b>	<b>-31.8</b>	<b>0.006562</b>
	tso-miR-2c-3p	Sinaptobrevina (IMP-25)	Liberación de vesículas	-29.4	0.009245
	tso-miR-4988	Flipasa translocadora de fosfolípidos**	Translocación de fosfolípidos	-30.4	0.010707

\*Función reportada previamente en otras especies. \*\*Primer reporte de blancos para el miRNA.



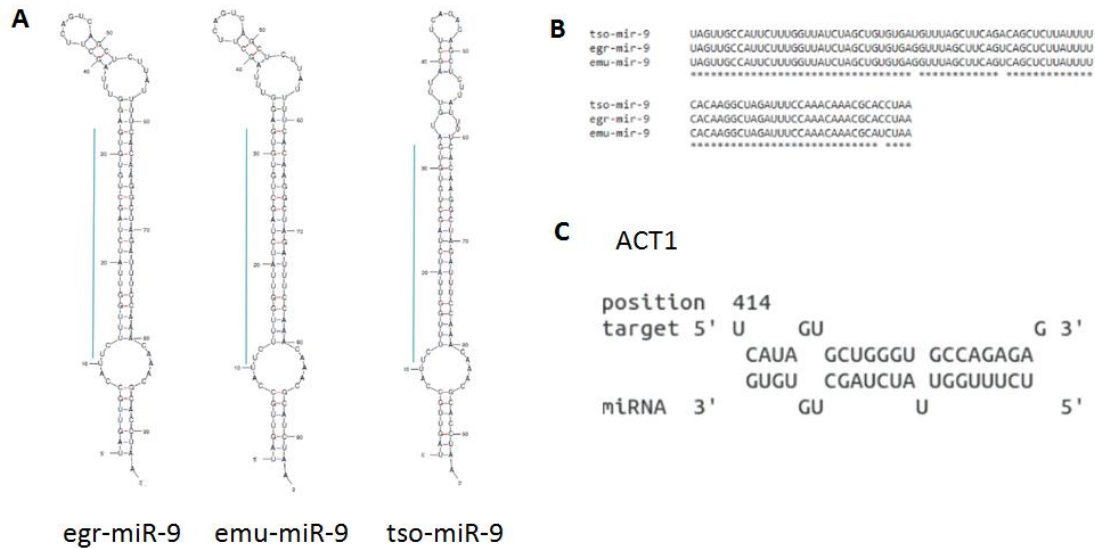
**Fig. 7. let-7.** **A.** Estructura secundaria de las horquillas de let-7 en *E. granulosus*, *E. multilocularis* y *T. solium*, la línea azul muestra la secuencia del miRNA maduro. **B.** Alineamiento de las secuencias (se muestra la de *E. granulosus*, idéntica a la de *E. multilocularis*), los asteriscos muestran la coincidencia de bases. **C.** Dúplex let-7/H17g.

El dúplex formado por tso-let-7 y el mRNA de la proteína H17g, tuvo un mfe de -31.8 y un valor p de 0.006562. Actualmente, se carece de reportes de SWIP-10 y H17g como blancos de miRNAs.

## 9.2. miR-9

Las estructuras secundarias predichas para el pre-miRNA putativo de tso-miR-9 y sus homólogos en *Echinococcus* se muestran en la figura 8A. Las horquillas halladas presentaron mfes entre -41.60 y -24.40. Los pre-miRNAs de las especies de *Echinococcus* difieren solamente en el nt 5 del brazo 3': *E. granulosus* contiene Cisteína (C), mientras

que *E. multilocularis* presenta Uracilo (U). El pre-miRNA de *T. solium* presenta sustituciones en los nucleótidos 7 y 8, que no afectan a la secuencia del miRNA maduro ni la formación de la horquilla (Fig. 8, A y B). La secuencia del pre-miRNA de *T. solium* tuvo una identidad de 92% con su homólogo de *E. multilocularis*, al presentar 3 sustituciones; mientras que con la secuencia del pre-miRNA de *E. granulosus* solo difirió en 2 nt (ambas secuencias presentan U en el nt 5 del brazo 3') (Fig. 8B). Estas semejanzas en sus estructuras primaria y secundaria sugieren miR-9 es un miRNA homólogo conservado en las tres especies.



**Fig. 8. miR-9.** **A.** Estructura secundaria de las horquillas de miR-9 en *E. granulosus*, *E. multilocularis* y *T. solium*, la línea azul muestra le secuencia del miRNA maduro. **B.** Alineamiento de las secuencias, los asteriscos muestran la coincidencia de bases. **C.** Dúplex miR-9/ACT1.

miR-9 fue capaz de formar una unión estable con una secuencia de EST correspondiente a cDNA de secuencias exónicas del gen de la ACT1 en *T. solium* (Fig. 8C). El dúplex miRNA/mRNA tuvo un valor de mfe de -30.5 kcal/mol y un valor de p de 0.01133.

## 10.DISCUSIÓN

El descubrimiento y descripción de miRNAs basados en métodos experimentales requieren de la extracción de RNA total, purificación de secuencias cortas, clonación y secuenciación (Cucher *et al.*, 2011; Grad *et al.*, 2003). En las primeras aproximaciones, mediante las técnicas disponibles de clonación y secuenciación, los miRNAs nuevos fueron difíciles de detectar en células debido a su pequeño tamaño y escasez (Ambros, 2004; Lagos-Quintana *et al.*, 2001). Posteriormente, el desarrollo de la secuenciación de segunda generación –o secuenciación masiva- facilitó la clonación de secuencias cortas, así como la detección de secuencias poco representadas en una muestra (Cucher *et al.*, 2015; Arora *et al.*, 2017; Basika *et al.*, 2016). La gran cantidad de secuencias obtenidas –lecturas- mediante esta técnica, es posteriormente sometida a análisis bioinformáticos (Ai *et al.*, 2012; Heng *et al.*, 2013). Éstos últimos, son requeridos para agrupar lecturas que corresponden a la misma secuencia, descartar aquellas que correspondan a otros tipos de RNA, localizarlas en el genoma, etc.

Los métodos experimentales requieren de la creación de bibliotecas de RNA expresado, que presenta variaciones entre tejidos, estadios de vida y condiciones experimentales, entre otros (Bai *et al.*, 2014; Lai *et al.*, 2003). Las aproximaciones computacionales han demostrado su utilidad al predecir secuencias de miRNAs, para luego ser confirmada su expresión mediante técnicas experimentales (Bentwich *et al.*, 2005; Berezikov *et al.*, 2005; Kim, 2005; Prochnik *et al.*, 2006; Weber, 2005). Además, la predicción de blancos de miRNAs, puede ser capaz de proporcionar claves sobre las condiciones experimentales y estadio de vida en las cuales pudiera expresarse un miRNA en particular (Lai *et al.*, 2003; Grad *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004; Berezikov *et al.*, 2005; Rajewsky, 2005; Rehmsmeier *et al.*, 2004; Nakahara y Carthew, 2004; Sontheimer y Carthew, 2005). La descripción *in silico* de los miRNAs en *T. solium* facilitará estudios posteriores sobre la biología del parásito, la relación huésped-parásito, búsqueda de blancos potenciales para el diagnóstico y/o el control de las parasitosis que ocasiona, así como en estudios de la regulación transcripcional de sus genes.

Los análisis in silico de miRNAs y sus blancos potenciales son frecuentes en determinadas especies (*H. sapiens*, *D. melanogaster*, *C. elegans*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Cannis familiaris*, *Gallus gallus*, *Danio rerio*, *Arabidopsis thaliana*) para las que existen actualmente numerosas herramientas y bases de datos. No obstante, las herramientas existentes para el análisis y predicciones de miRNAs y sus blancos para otras especies, incluyendo a las del género *Taenia*, son escasas. Sin embargo, el reporte reciente del genoma de *T. solium* (Tsai *et al.*, 2013), los reportes de miRNAs de *E. granulosus* y *E. multilocularis* en miRBase, la base de datos de ESTs de *T. solium* en GeneBank, el servicio on-line de plegamiento de horquillas de pre-miRNAs, mFold, y el programa para el sistema operativo Linux, RNAhybrid, permitieron la identificación de miRNAs putativos en *T. solium*. El procedimiento utilizado en este trabajo quedó validado por el hallazgo de dos blancos potenciales previamente reportados, a DOLPP 1 y Sap-r, blancos de miR-1 en otros organismos, con validación experimental.

En este trabajo se reportan 16 secuencias ortólogas de miRNAs de *T. solium*, así como sus precursores y blancos potenciales. Se reportan miRNAs con funciones congruentes a las reportadas previamente: función en la embriogénesis de miR-10 (Mansfield *et al.*, 2004); crecimiento, proliferación y diferenciación celular de miR-125 (Bousquet *et al.*, 2012), así como la modulación de factores de transcripción por parte de miR-190 (Almog *et al.*, 2013). De la misma manera, se reportan funciones potenciales nuevas: modulación de glutamato por tso-let-7; formación o liberación de vesículas por tso-miR-2c y tso-miR-153; metabolismo de lípidos por tso-miR-87-5p, y regulación de Azufre inorgánico celular por tso-miR-2b y tso-miR-124a, entre otros.

No obstante, estos blancos potenciales pertenecen a secuencias génicas predichas solamente por homología en *T. solium* con otras especies, tanto de platelmintos, helmintos, artrópodos e, incluso con el ser humano. Únicamente se hallaron dos blancos potenciales cuya expresión ha sido demostrada experimentalmente en *T. solium*: el antígeno tegumentario H17g y la ACT1.

El cDNA de H17g formó un dúplex estable con tso-let-7. Este miRNA ha sido detectado en grandes cantidades en el cisticerco de *T. solium* y de *T. crassiceps*. En esta última, también se reportó su pre-miRNA (Pérez *et al.*, 2017), que tiene homología en sus estructuras primaria y secundaria con las de *T. solium* presentadas en este trabajo. Ai y colaboradores (2012) reportaron la ausencia de let-7 en *T. saginata* al realizar un análisis experimental mediante secuenciación de RNA del céstodo adulto. En contraste, Wu y colaboradores (2013) lo detectaron en pequeñas cantidades en *T. multiceps* y sugirieron que su expresión es estadio-dependiente. Let-7 ha sido reportado como uno de los miRNAs de mayor expresión en otros céstodos, sugiriendo que lleva a cabo importantes funciones en este grupo (Cucher *et al.*, 2015; Macchiaroli *et al.*, 2015; Basika *et al.*, 2016). Let-7 es conocido ampliamente tanto por su función en el control del desarrollo (división y diferenciación de células madre) como por su secuencia y función altamente conservados (Pasquinel *et al.*, 2000). Se ha reportado, además, su función inmunorreguladora en los parásitos *S. japonicum*, *E. granulosus*, *Mesocestoides corti* y *Trichinella spiralis* (Arora *et al.*, 2017). Al formar un dúplex estable, tso-let-7 tendría las mismas funciones reguladoras reportadas previamente unirse al cDNA de H17g. Esta proteína tiene la capacidad de unirse a actina, si bien su función aun está por dilucidar. Es ortóloga a la proteína ERM-1 de *C. elegans*, involucrada en el desarrollo larvario, organización de los filamentos de actina y en la morfogénesis epitelial. Se describe como antígeno tegumentario debido a su localización en *T. solium* y *T. crassiceps* y a su actividad proinflamatoria en células dendríticas activadas por lipo-polisacáridos (LPS). Impide la maduración (mediante SOCS1) de células dendríticas y la secreción de citocinas proinflamatorias (Terrazas *et al.*, 2013). H17g ha sido propuesto como blanco potencial para el tratamiento de la helmintiasis humana y animal.

Varios miRNAs, incluyendo miR-9, están involucrados en la respuesta inflamatoria de los macrófagos y son expresados por el huésped rápidamente después de la activación de TLRs y el receptor de TNF- $\alpha$  (Taganov *et al.*, 2006; Tili *et al.*, 2007; Ceppi *et al.*, 2009). Bazzoni y colaboradores reportaron la inducción y función regulatoria de de miR-9 en monocitos y neutrófilos humanos expuestos a señales proinflamatorias. De esta manera, si miRNAs como miR-9 son liberados por el parásito por medio de microvesículas –como se

ha propuesto (Arora *et al.*, 2017; Gutiérrez-Loli *et al.*, 2017)-, éstos pudieran regular las respuestas inmunes del huésped.

Tso-miR-9 formó un dúplex estable con el mRNA de la actina 1 de *T. solium*. La significancia funcional de miR-9 durante la evolución está evidenciada por su conservación, al nivel de secuencia de nucleótidos, en vertebrados e invertebrados; no así sus patrones de expresión diversos (Li *et al.*, 2006; Bonev *et al.*, 2010; Leucht *et al.*, 2008). Estudios recientes en diferentes organismos demostraron que miR-9 regula la neurogénesis, actuando en linajes celulares neurales y no neurales (Shibata *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2009, Delaloy *et al.*, 2010). En algunos casos, miR-9 tiene un papel importante durante el desarrollo mediante la supresión de la apoptosis (Bejarano *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012). MiR-9 es un regulador del desarrollo muy importante gracias a su habilidad de modular diferentes blancos de manera dependiente del estadio del desarrollo y del contexto celular (Laneve *et al.*, 2010).

La actina es una de las proteínas estructurales de mayor expresión y abundancia en células eucariontes y participa en la contracción muscular y en el movimiento celular (Khaitlina, 2001; Mounier y Sparrow, 1997). Se ha demostrado recientemente que miR-24, miR-143, miR-145 y miR-200c tienen como blancos a diversas proteínas reguladoras del citoesqueleto de actina (Amelio *et al.*, 2012; Xin *et al.*, 2009; Jumeister *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2013). En particular, entre otros blancos relacionados con la polimerización, activación y remodelación del citoesqueleto de actina, miR-145 se une a los transcritos de la  $\beta$ -actina y la  $\gamma$ -actina del ratón, estando involucrado en la respuesta a daño y remodelación de tejido muscular (Xin *et al.*, 2009). De esta manera, los miRNAs serían capaces de regular tanto la migración, diferenciación y adhesión celular, como la función y dinámica de la actina como parte integral del tejido muscular, en función de la isoforma a la que se unan. El cDNA de ACT1 fue detectado en la larva de *T. solium* y su expresión en este estadio se ha sido descrita y localizada en tejidos relacionados con la evaginación del escólex al cambiar su morfología en el intestino del huésped definitivo (Ambrosio *et al.*, 1997 y 2003).



La actina es una proteína utilizada ampliamente como modelo de expresión génica, por lo que es común su caracterización en gran variedad de organismos. Por otra parte, el antígeno tegumentario H17g cuenta con un interés particular al producir una respuesta inmune en el huésped y por tratarse de una proteína expresada solamente por el parásito; por lo que ha sido considerado un prometedor blanco de diagnóstico. Dadas estas características, ACT1y H17g fueron las únicas proteínas de *T. solium*, con expresión comprobada experimentalmente, con posible regulación por parte de miRNAs. Lo anterior no debe considerarse como reflejo de la escasa participación de los miRNAs como elementos regulatorios en *T. solium*. En su lugar, estos resultados muestran que existe un sesgo en el tipo de proteínas que son del interés de la comunidad científica que estudia este organismo, hacia proteínas con funciones modelo y/o funciones involucradas en la relación huésped-parásito.

Este trabajo incluye, por vez primera, blancos putativos de miR-4988 y miR-4989 (únicos en helmintos, con uso potencial como herramienta de diagnóstico y/o tratamiento): una flipasa translocadora de fosfolípidos y la subunidad de la proteína 1 del complejo T, respectivamente. Estos miRNAs fueron reportados por Cucher y sus colaboradores (2011) como miRNAs nuevos en *Echinococcus spp*, con validación experimental en *E. granulosus* y considerado ortólogo en *E. multilocularis*.

En el mismo trabajo, se reporta también la detección mediante clonación de egr-miR-4990 y egr-miR-4991. En cuanto a los genes de estos miRNAs en *E. multilocularis*, uno de ellas –miR-4990- no fue capaz de producir horquillas estables durante su fase de pre-miR, la otra –miR-4991- no se localizó. En este trabajo se reporta la ausencia de miR-4991 en el genoma de *T. solium*. Además, la secuencia de miR-4990 se encontró en una secuencia exónica de un homólogo de la proteína tipo RRP15, un precursor de la subunidad grande del rRNA. Dichas secuencias se encuentran reportadas como miRNAs de *E. granulosus* en miRBase, por lo que pudiera ser que produzcan miRNAs funcionales únicos para la especie. Por otra parte, carecen de denominación como miRNAs en WormBase ParaSite, donde, incluso, la secuencia genómica de miR-1990 corresponde a un intrón de RRP15, como en *T. solium*. Cabe señalar que el gen de RRP15 se reporta como homólogo a otras

especies. Este caso particular refleja la escasez de datos proteómicos de helmintos así como deficiencias de consenso en las diferentes bases de datos disponibles en la actualidad.

## 11. CONCLUSIONES

Este trabajo presenta una secuencia de procedimientos llevados a cabo mediante diversas herramientas bioinformáticas que permitieron la identificación de miRNAs ortólogos a *Equinococcus* y sus blancos en *T. solium*. Dichas herramientas se encuentran actualmente disponibles de forma integral en plataformas específicas para especies modelo como *H. sapiens*, *D. rerio*, *C. elegans*, *M. musculus*, *R. norvegicus*, *A. thaliana*, etc. Sin embargo, para la mayoría de las especies, no existen dichas herramientas, tal es el caso de *T. solium*. Esta situación obstaculiza el desarrollo de descripciones de miRNAs y sus blancos en estas especies. La secuencia de pasos y herramientas reportados en este trabajo facilitan el uso de dichas aproximaciones. El método llevado a cabo, basado en las herramientas *in silico* existentes, puede ser utilizado en otras especies de céstodos con su genoma secuenciado. Su utilidad quedó evidenciada al permitir el reporte, por vez primera de blancos de dos miRNAs únicos de céstodos. Además, la validez del procedimiento se vio reflejada en su capacidad de detectar blancos de miRNAs previamente reportados, así como en la conservación de las secuencias de miRNAs ortólogos.

Si bien requieren aun de validación experimental, se predijeron 16 secuencias de miRNAs ortólogos y sus blancos putativos en *T. solium*. Estos datos permitirán guiar la descripción experimental de miRNAs en esta especie, al dar pistas sobre las condiciones en las que estas secuencias pudieran ser expresadas. Lo anterior cobra especial relevancia, dados la expresión diferencial de miRNAs y los diferentes ciclos de vida de la especie, así como a las adaptaciones al parasitismo que presenta.

El enfoque computacional utilizado en este trabajo se apoyó en diversas herramientas como bases de datos y programas de alineamiento y plegamiento. El procedimiento llevado a cabo resultó validado al hallar dúplex mRNA/miRNA previamente reportados.

Este trabajo se reporta, por vez primera, blancos putativos de miRNAs únicos de céstodos, que, una vez confirmados experimentalmente, permitirían guiar el estudio de

miRNAs como potenciales marcadores de diagnóstico o terapéuticos este grupo de organismos.

En la actualidad, existen plataformas que reúnen diversos datos de miRNAs, sobre todo, en organismos modelo. No obstante, los datos sobre miRNAs de otros organismos, incluyendo los del género *Taenia*, son escasos y fragmentados. Este trabajo pone de manifiesto la necesidad de herramientas in silico, como bases de datos que reúnan y amplíen dicha información. Una herramienta como esta permitiría acelerar el conocimiento del miRNoma en especies que representan un problema de salud mundial.

## 12.PERSPECTIVAS

Al día presente, miRBase carece de registros del género *Taenia*. Una vez validados experimentalmente, los miRNAs putativos de *T. solium* presentados en este trabajo cumplirán con los criterios para ser incluidos en dicha base datos.

Por otra parte, la validación experimental de los blancos reportados, permitirá ampliar la información sobre las funciones *in vivo* que llevan a cabo los miRNAs en *T. solium*. Esto contribuirá a profundizar el conocimiento de los aspectos moleculares en la relación parásito-huésped en esta especie.

La perspectiva de mayor alcance, a la vista, producto de este trabajo es la creación e implementación de una base de datos que reúna y sintetice información de miRNAs en *T. solium* y, quizá, en céstodos.

### 13.REFERENCIAS

- Abbas, M. K. y Cain, G. D. (1989). Analysis of isoforms of actin from *Schistosoma mansoni* by two-dimensional gel electrophoresis. *Parasitol. Res.*, 76: 178-180.
- Afonso, S. M. S., Vaz, Y., Neves, L., Pondja, A., Dias, G., Willingham, A. L., y Noormahomed, E. V. (2011). Human and porcine *Taenia solium* infections in Mozambique: identifying research priorities. *Anim. Health Res. Rev.*, 12(1), 123-129.
- Ai, L., Xu, M. J., Chen, M. X., Zhang, Y. N., Chen, S. H., Guo, J., Cai, Y. C., Zhou, X. N., Zhu, X. Q. y Chen, J. X. (2012). Characterization of microRNAs in *Taenia saginata* of zoonotic significance by Solexa deep sequencing and bioinformatics analysis. *Parasitol. Res.*, 110, 2373-2378.
- Almog, N., Briggs, C., Beheshti, A., Ma, L., Wilkie, K. P., Rietman, E. y Hlatki, L. (2012). Transcriptional changes induced by the tumor dormancy-associated microRNA-190. *Transcription*, 4(4): 177-191.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410.
- Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431(7006), 350-355.
- Ambrosio, J., Cruz-Rivera, M., Allan, J., Moran, E., Ersfeld, K. y Flisser, A. (1997). Identification and partial characterization of a myosin-like protein from cysticerci and adults of *Taenia solium* using a monoclonal antibody. *Parasitol.*, 114: 545-453.
- Ambrosio, J., Reynoso-Ducoing, O., Hernández-Sánchez, H., Correa-Piña, D., González-Malerva, L., Cruz-Rivera, M. y Flisser, A. (2003). Actin expression in *Taenia solium* cysticerci (Cestoda): tisular distribution and detection of isoforms. *Cell Biol. Int.*, 27: 727-733.
- Amelio, I., Lena, A. M., Viticchie, G., Shalom-Feuerstein, F., Terrioni, A. y Dinsdale, D. (2012). miR-24 triggers epidermal differentiation by controlling actin adhesion and cell migration. *J. Cell Biol.*, 199: 347-363.
- Andrews, R., y Mason, W. (1987). Cysticercosis presenting as acute scrotal pain and swelling. *The Pediatr. Infect. Dis.*, 6(10), 942.

- Arechavaleta, F., Molinari, J. L., & Tato, P. (1998). A *Taenia solium* metacestode factor nonspecifically inhibits cytokine production. *Parasitol. Res.*, 84(2), 117-122.
- Arora, N., Tripathi, S., Singh, A. K., Mondal, P., Mishra, A. y Prasad, A. (2017). Micromanagment of immune system: role of miRNAs in helminthic infections. *Front. Microbiol.*, 8: 586.
- Bai, Y., Zhang, Z., Jin, L., Kang, H., Zhu, Y. y Zhang, L. (2014). Genome-wide sequencing of small RNAs reveals a tissue-specific loss of conserved microRNA families in *Echinococcus granulosus*. *BMN Genomics*, 15: 736-746.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281-297.
- Basika, T., Macchiaroli, N., Cucher, M., Espinola, S., Kamenetzky, L. y Zaha, A. (2016). Identification and profiling of microRNAs in two developmental stages of the model cestode parasite *Mesocestoides corti*. *Mol. Chem. Parasitol.*, 210, 37-49.
- Bazzoni, F., Rossato, M., Fabbri, M., Gaudosi, D., Mirolo, M. y Mori, L. (2009). Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106: 5282-5287.
- Bejarano, F., Smibert, P. y Lai, E. C. (2010) miR-9a prevents apoptosis during wing development by repressing *Drosophila* LIM-only. *Dev. Biol.* 338: 63-73.
- Bentwich, I., Avniel, A., Karov, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad, O., Barzilai, A., Einat, P., Einav, U., Meiri, E., Spector, Y. y Sharon, E. (2005). Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat. Gen.*, 37(7): 766-770.
- Berezikov, E., Guryev, V., van de Belt, J., Wienholds, E., Plasterk, R. H., & Cuppen, E. (2005). Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell*, 120(1): 21-24.
- Bettinger, B. T., Gilbert, D. M. y Amberg, D. C. (2004). Actin up in the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5: 410-415.
- Bonev, B., Pisco, A. y Papalopulu, N. (2010) MicroRNA-9 reveals regional diversity of neural progenitors along the anterior-posterior axis. *Dev. Cell.* 20: 19-32.
- Bousquet, M., Nguyen. D., Chen. C., Shields. L. y Lodish. H. F. (2012). MicroRNA-125b transforms myeloid cell lines by repressing multiple mRNA. *Haematologica*, 97: 1713-1721.

- Bray, D. (2001). Cell movements. From molecules to motility. Segunda edición. Capítulos 5 y 6. Actin Filaments. Garland Publishing. USA. 63-101.
- Buck, A. H., Coakley, G., Simbari, F., McSorley, H. J., Quintana, J. F. y Le Bihan, T. (2014). Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nat. Commun.*, 5, 5488-5494.
- Bushati, N. y Cohen, S. M. (2007). MicroRNA functions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 23, 175-205.
- Cai, P., Gobert, G. N., y McManus, D. P. (2016). MicroRNAs in parasitic helminthiasis: current status and future perspectives. *Trends Parasitol.*, 32(1), 71-86.
- Campos, A., Bernard, P., Fauconnier, A., Landa, A., Gómez, E. y Hernández, R. Cloning and sequencing of two actin genes from *Taenia solium* (Cestoda). (1989). *Mol. Biochem. Parasitol.*, 40: 87-94.
- Cañedo, L., Laclette, J. P. y Morales, E. (1982). Evagination of the metacestode of *Taenia solium*. En: Flisser, A., Willms, K., Laclette, J. P., Larralde, C., Ridaura, C., Beltrán, F., eds. Cysticercosis, present state of knowledge and perspectives. Nueva York: Academic Press, 373 pp.
- Ceppi, M., Pereira, P. M., Dunand-Sauthier, I., Barras, E., Reith, W. y Santos, M. A. (2009). MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106: 2735-2740.
- Cheng, G., Luo, R., Hu, C., Cao, J. y Jin, Y. (2013). Deep-sequencing-based identification of pathogenic-specific microRNAs in the plasma of rabbits infected with *Schistosoma japonicum*. *Parasitol.*, 140, 1751-1761.
- Chopra, J. S., Kaur, U., y Mahajan, R. C. (1981). Cysticercosis and epilepsy: a clinical and serological study. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 75(4), 518-520.
- Cucher, M., MacChiaroli, N., Kamenetzky, I., Maldonado, L., Brehm, K. y Rosenzvit, M. C. (2015). High-throughput characterization of *Echinococcus spp.* metacestode miRNomes. *Int. J. Parasitol.*, 45, 253-267.
- Cucher, M., Prada, L., Mourglia-Ettlin, G., Dematteis, S., Camicia, F., Asurmendi, S. y Rosenzvit, M. (2011). Identification of *Echinococcus granulosus* microRNAs and



- their expression in different life cycle stages and parasite genotypes. *Internat. J. Parasitol.*, 41(3), 439-448.
- Cupples, C. G. y Pearlman, R. E. (1986). Isolation and characterization of the actin gene from *Tetrahymena thermophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 5160-5164.
- Delaloy C., Liu, L., Lee, J. A., Su, H., Shen, F., Yang, G. Y., et al. (2010). MicroRNA-9 coordinates proliferation and migration of human embryonic stem cell-derived neural progenitors. *Stem Cell.* 6: 323-335.
- Drew, J. S. y Murphy, R. A. (1997). Actin isoform expression, celular heterogeneity, and contractile function in smooth muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 75: 869-877.
- Du, T. y Zamore, P. D. (2007). Beginning to understand microRNA function. *Cell Res.*, 17(8), 661-664.
- Filipowicz, W., Jakiewicz, L., Kolb, F. A. y Pillai, R. S. (2005). Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 15, 331-341.
- Firtel, R. A. (1981). Multigene families encoding actin and tubulin. *Cell* 24: 6-7.
- Flisser, A., Espinoza, B., Tovar, A., Plancarte, A. y Correa, D. (1986). Host-parasite relationship in cysticercosis: immunologic study in different compartments of the host. *Vet. Parasitol.*, 20, 95-102.
- Fromm, B., Ovchinnikov, V., Hoye, E., Bernal, D., Hackenberg, M. y Marcilla A. (2017). On the presence and immunoregulatory functions of extracellular microRNAs in the trematode *Fasciola hepatica*. *Parasite Immunol.*, 39, 12399-12405.
- García, H. H., Del Brutto, O. H., Nash, T. E., White Jr, A. C., Tsang, V. C., y Gilman, R. H. (2005). New concepts in the diagnosis and management of neurocysticercosis (*Taenia solium*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 72(1), 3-9.
- García, H. H., Gonzalez, A. E., Evans, C. A., Gilman, R. H., y Cysticercosis Working Group in Peru. (2003). *Taenia solium* cysticercosis. *The Lancet*, 362(9383), 547-556.
- Ghosh, T., Soni, K., Scaria, V., Halimani, M., Bhattacharjee, C. y Pillai, B. (2008). MicroRNA-mediated up-regulation of an alternatively polyadenylated variant of the mouse cytoplasmatic  $\beta$ -actin gene. *Nuc. Ac. Res.* (36), 19: 6318-6332.

- Grad, Y., Aach, J., Hayes, G. D., Reinhart, B. J., Church, G. M., Ruvkun, G., y Kim, J. (2003). Computational and experimental identification of *C. elegans* microRNAs. *Mol. Cell*, 11(5): 1253-1263.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R. J., Van Dongen, S., Bateman, A., y Enright, A. J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nuc. Ac. Res.*, 34 (1): 140-144.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., van Dongen, S., y Enright, A. J. (2007). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nuc. Ac. Res.*, 36(1): 154-158.
- Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S. y Ha, I. (2001) Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, 106, 23-34.
- Grummt, I. (2006) Actin and myosin as transcription factors. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 6: 191-196.
- Gutiérrez-Loli, R., Orrego, M. A., Sevillano-Quispe, O. G., Herrera-Arrasco, L. y Guerra-Giraldez, C. (2017). MicroRNAs in *Taenia solium* cysticercosis: insights as promising agents in host-parasite interaction and their potential as biomarkers. *Front. Microbiol.*, 8: 1905.
- Halton, D. W., Maule, A. G., Mair, G. R., Shaw, C. (1998). Monogenean neuromusculature: some structural and functional correlates. *Int. J. Parasitol.*, 28: 1609-1623.
- Hein, W. R., & Harrison, G. B. L. (2005). Vaccines against veterinary helminths. *Vet. Parasitol.*, 132(3-4), 217-222.
- Henneberg, R. (1936). Die tierischen Parasiten des Zentralnervensystems. En Raumbeengende Prozesse (pp. 286-352). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Hightower, R. C. y Meagher, R. B. (1986). The molecular evolution of actin. *Genetics* 114: 315-332.
- Hirono, M., Endoh, H., Okada, N., Numata, O. y Watanabe, Y. (1987). Cloning and sequencing of the *Tetrahymena* actin gene and identification of its gene product. *J. Mol. Biol.*, 194: 181-192.

- Hoberg, E. P. (1999). Phylogenetic analysis among the families of the Cyclophyllidea (Eucestoda) based on comparative morphology, with new hypothesis for co-evolution in vertebrates. *Systematic Parasitology*, 42(1), 51-73.
- Hoberg, E. P. (2006). Phylogeny of *Taenia*: species definitions and origins of human parasites. *Parasitol. Internat.*, 55, S23-S30.
- Hofmann, W. A., Stojiljkovic, L., Fuchsova, B., Vargas, G. M., Mavrommatis, E., Philimonenko, V., Kysela, K., Gooderich, J. A., Lessard, J. L. y Hope, T. J. (2004). Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nat. Cell Biol.*, 6: 1094-1101.
- Howe, K. L., Bolt, B. J., Cain, S., Chan, J., Chen, W. J., Davis, P., y Harris, T. W. (2016). WormBase 2016: expanding to enable helminth genomic research. *Nucl. Acids Res.*, 44(1): 774-780.
- Hu, P., Wu, S. y Hernández, N. (2004). A role for beta-actin in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev.*, 18: 3010-3015.
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A. E., Balint, E., Tuschl, T. y Zamore, P. D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, 293: 834-838.
- Jones-Rhoades, M. W. y Bartel, D. P. (2004). Computational identification of plant microRNAs and their target, including a stress-induced miRNA. *Mol. Cell*, 14: 787-799.
- Jursmeister, S., Baumann, M., Balwierz, A., Keklikoglou, I., Ward, A., Uhlmann, S., Zhang, J. D., Wiemann, S. y Sahin, O. (2011). MicroRNA-200c represses migration and invasion of breast cancer cells by targeting actin-regulatory proteins FHOD1 y PPM1F. *Mol. Cell. Biol.*, 3: 633-651.
- Khaitlina, S. Y. (2001). Functional specificity of actin isoforms. *Int. Rev. Cytol.*, 202: 35-98.
- Ketting, R. F., Fischer, S. E., Berstein, E., Sijen, T., Hannon, G. J. y Plasterk, R. H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.*, 15, 2654-2659.
- Kim, H. J., Cui, X. S., Kim, E. J., Kim, W. J. y Kim, N. H. (2006). New porcine microRNA genes found by homology search. *Genome*, 49, 1283-1286.

- Kim, V. N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 19, 376-385.
- Knapp, J., Nakao, M., Yanagida, T., Okamoto, M., Saarma, U., Lavikainen, A., e Ito, A. (2011). Phylogenetic relationships within *Echinococcus* and *Taenia* tapeworms (Cestoda: Taeniidae): an inference from nuclear protein-coding genes. *Mol. Phylogen. Evol.*, 61(3), 628-638.
- Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S. (2014). MiRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nuc. Ac. Res.*, 42(1): 68-73.
- Kozomara, A., Birgaoanu, M y Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nuc. Ac. Res.* 47: 155-162.
- Krek, A., Grün, D., Poy, M. N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E. J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K. C., Stoffel, M., y Rajewsky, N. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat. Gen.*, 37(5): 495-500.
- Laclette, J. P., Merchant, M. T. y Willms, K. (1987). Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of *Taenia solium*. *J. Parasitol.*, 76: 121-129.
- Laclette, J. P., Skelly, P. J., Merchant, M. T. y Shoemaker, C. B. (1995). Aldehyde fixation dramatically alters the immunolocalization pattern of paramiosin in platyhelminth parasites. *Exp. Parasitol.*, 81: 140-143.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., y Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294(5543): 853-858.
- Lai, E. C., Tomancak, P., Williams, R. W., y Rubin, G. M. (2003). Computational identification of *Drosophila* microRNA genes. *Gen. Biol.*, 4(7): 42-58.
- Laneve, P., Gioia, U., Andriotto, A., Moretti, F., Bozzoni, I. y Caffarelli, E. (2010) A minicircuitry involving REST and CREB controls miR-9-2 expression during human neural differentiation. *Nucl. Ac. Res.*, 38: 6896-6905.
- Larson, A. (2014). Aliview: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large data sets. *Bioinformatics* 30(22): 3276-3278.
- Lavikainen, A., Haukisalmi, V., Lehtinen, M. J., Henttonen, H., Oksanen, A., y Meri, S. (2008). A phylogeny of members of the family Taeniidae based on the mitochondrial cox1 and nad1 gene data. *Parasitol.*, 135(12), 1457-1467.

- Leaman, D., Chen, P. Y., Fak, J., Yalcin, A., Pearce, M. y Unnerstall, U. (2005) Antisense-mediated depletion reveals essential and specific functions of microRNAs in *Drosophila* development. *Cell*, 121, 1097-1108.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J. y Yim, J. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425, 415-419.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J. T., Kim, S., & Kim, V. N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.*, 21(17), 4663-4670.
- Leucht, C., Stigloher, C., Winzenmann, A., Klafke, R., Folchert, A. y Bally-Cuif, L., (2008) MicroRNA-9 directs late organizer activity of the midbrain-hindbrain boundary. *Nat. Neurosci.* 11: 641-648.
- Lewis, B. P., Burge, C. B. y Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120: 15-20.
- Li, S. C., Chan, W. C., Hu, L. Y., Lai C. H., Hsu, C. N. y Lin, W. C. (2010) Identification of homologous microRNAs in 56 animal genomes. *Genomics*, 96(1), 1-9.
- Li, Y., Wang, F., Lee, J. A. y Gao, F. B. (2006) MicroRNA-9a ensures the precise specification of sensory organ precursors in *Drosophila*. *Genes Dev.* 20, 2793-2805.
- Lim, L. P., Lau, N. C., Garret-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J. M. y Castle, J. (2005). Microarray analyses shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 433: 769-773.
- Lin, A., Mu-Xin, C., Yong-Nian, Z., Shao-Hong, C., Xiao-Nong, Z. y Jia-Xu, C. (2014). Comparative analysis of the miRNA profiles from *Taenia solium* and *Taenia asiatica* adult. *Af. J. Microbiol. Res.*, 8, 895-902.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. y Darnell, J. (1999). *Molecular Cell Biology*. 4ª. Edición. Capítulo 18. Cell motility and shape I: microfilaments. WH Freeman and Company. 751-794.
- Loo, L., y Braude, A. (1982). Cerebral cysticercosis in San Diego: a report of 23 cases and a review of the literature. *Med.*, 61(6), 341-359.
- Loos-Frank, B. (2000). An up-date of Verster's (1969). Taxonomic revision of the genus *Taenia* Linnaeus'(Cestoda) in table format. *Syst. Parasitol.*, 45(3), 155-184.

- Lozano-Elizondo, D. (1983). Ophthalmic cysticercosis. Cysticercosis of the central nervous system. Charles C. Thomas ed., 84-100.
- Lumsden, R. D. y Byram, J. III. (1967). The ultrastructure of cestode muscle. *J. Parasitol.*, 53: 326-342.
- Macchiaroli, N., Cucher, M., Zarowiecki, M., Maldonado, L., Kametzy, L., Rosenzvit, M. C. (2015). microRNA profiling in the zoonotic parasite *Echinococcus canadensis* using a high-throughput approach. *Par. Vect.*, 8, 83-72.
- Mair, G. R., Maule, A. G., Shaw, C. y Halton, D. W. (1998). Muscling in on parasitic flatworms. *Parasitol. Today*, 14: 73-76.
- Mansfield J. H., Harfe, B. D., Nissen, R., Obenauer, J., Srineel, J., Chaudhuri, A, Farzan-Kashani, R., Zuker, M., Pasquinelli, A. E., Ruvkun, G., Sharp, P. A., Tabin, C. J. y McManus, M. T. (2004). MicroRNA-responsive “sensor” transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. *Nat. Gen.* 36(10): 1079-1083.
- Marchis, M. L., Giorgi, A., Schinina, M. A., Bozzoni, I. y Fatica, A., (2005). Rrp15p a novel component of pre-ribosomal particles required for 60S ribosome subunit maturation. *RNA*, 11(4): 495-502.
- McCormick, G. F., Zee, C. S., y Heiden, J. (1982). Cysticercosis cerebri: Review of 127 cases. *Arch. Neurol.*, 39(9), 534-539.
- Miralles, F. y Visa, N. (2006). Actin in transcription and transcription regulation. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 18: 261-166.
- Molinari, J. L., Mejía, H., White, A. C., Garrido, E., Borgonio, V. M. y Baig, S. (2000). *Taenia solium*: a cysteine protease secreted by metacestodes depletes human CD4 lymphocytes in vitro. *Exp. Parasitol.*, 94, 133-142.
- Moro, P., y Schantz, P. M. (2009). Echinococcosis: a review. *Int. J. Infect. Dis.*, 13(2), 125-133.
- Mounier, N. y Sparrow, J. C. (1997). Structural comparison of muscle and non-muscle actins gives insights into the evolution of their functional differences. *J. Mol. Evol.*, 44: 89-98.
- Nakahara, K. y Carthew, R. W. (2004). Expanding roles for miRNAs and siRNAs in cell regulation. *Curr. Op. Cell Biol.*, 16: 127-133.

- Nash, T. E. y García, H. H. (2011). Diagnosis and treatment of neurocysticercosis. *Nat. Rev. Neurol.*, 7: 584-594.
- Nash, T. E., y Neva, F. A. (1984). Recent advances in the diagnosis and treatment of cerebral cysticercosis. *N. Engl. J. Med.*, 311(23): 1492-1496.
- Nava-Segura, J. (2014). La cisticercosis del sistema nervioso central. *Salud Pública de México*, 25(3), 297-300.
- Ng, R. y Abelson, J. (1980). Isolation and sequence of the gene for actin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77: 3912-3916.
- Oliveira, G. C. y Kemp, W. M. (1995). Cloning of two actin genes from *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 75: 119-122.
- O'Neal, S., Noh, J., Wilkins, P., Keene, W., Lambert, W., Anderson, J., y Townes, J. (2011). *Taenia solium* tapeworm infection, Oregon, 2006–2009. *Emerg. Infect. Dis.*, 17(6), 1030.
- Otero-Abad, B., & Torgerson, P. R. (2013). A systematic review of the epidemiology of echinococcosis in domestic and wild animals. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(6), e2249.
- Pasquineli, A., Reinhart, B., Slack, F., Maller, B. y Ruvkun, G. (2000) Conservation across animal phylogeny of the sequence and temporal regulation of the 21 nucleotide *C. elegans* let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 406, 86-89.
- Pillai, R. S. (2005). MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA* 11, 1753-1761.
- Poy, M. N., Eliasson, L., Krutzfeldt, J., Kuwajima, S., Ma, X. y Maodonald, P. E. (2004). A pancreatic islet-specific microRNA regulated insulin secretion. *Nature*, 432, 226-230.
- Prochnik, S. E., Rokhsar, D. S. y Aboobaker, A. A. (2006). Evidence for a microRNA expansion in the bilaterian ancestor. *Develop. Gen. Evol.* 217(1): 73-77.
- Quintana, J. F., Makepeace, G. L., Babayan, S. A., Ivens, A., Pfarr, K. M. y Blaxter, M. (2015). Extracellular onchocerca-derived small RNAs in host nodules and blood. *Parasit. Vectors*, 8, 58-64.

- Rabiela, M. T., Hornelas, Y., García-Allan, C., Rodríguez-del-Rosal, E. y Flisser, A. (2000). Evagination of *Taenia solium* cysticerci: a histological and electron microscopy study. *Arch. Med. Res.*, 605-607.
- Rangel, R., Torres, B., Del Bruto, O., y Sotelo, J. (1987). Cysticercotic encephalitis: a severe form in young females. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 36(2), 387-392.
- Rehmsmeier, M., Steffen, P., Hochsmann, M., Giegerich, R., (2004). Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA*, 10(10): 1507-1517.
- Salazar, A., Sotelo, J., Martínez, H., y Escobedo, F. (1983). Differential diagnosis between ventriculitis and fourth ventricle cyst in neurocysticercosis. *J. Neurosurg.*, 59(4), 660-663.
- Schantz, P. M., Wilkins, P. P. y Tsang, V. C. W. (1998). Immigrants, imaging and immunoblots: the emergence of neurocysticercosis as a significant public health problem. En: Scheld, W. M., Craig, W. A., Hughes, J. M., eds. *Emerging infections 2*. ASM Press; Washington. 241 pp.
- Sheterline, P., Clayton, J., Sparrow, J. C. Actin. Series protein profile. 4ª edición. Oxford (UK). Oxford University Press, 1998.
- Shibata, M., Kurokawa, D., Nakao, H., Ohmura, T. y Aizawa, S. (2008). MicroRNA-9 modulates Cajal-Retzius cell differentiation by suppressing Foxg1 expression in mouse medial pallium. *J. Neurosci.* 28, 10415-10421.
- Sikasunge, C. S., Johansen, V. M., Phiri, I. K., Willingham, A. I. y Leifsson, P. S. (2009). The immune response in *Taenia solium* neurocysticercosis in pigs is associated with astrogliosis, axonal degeneration and altered blood-brain barrier permeability. *Vet. Parasitol.* 160, 242-250.
- Slais, J. The morphology and pathogenicity of the bladder worms. Praga (Checoslovaquia): Academia, 1970.
- Solano, S., Cortés, I. M., Copitin, N. I., Tato, P. y Molinari, J. L. (2006). Lymphocyte apoptosis in the inflammatory reaction around *Taenia solium* metacestodes in porcine cysticercosis. *Vet. Parasitol.*, 140, 171-176.
- Sontheimer, E. J. y Carthew, R. W. (2005). Silence from within: endogenous siRNAs and miRNAs. *Cell*, 122, 9-12.



- Stark, A., Brennecke, J., Russell, R. B. y Cohen, S. M. (2003). Identification of *Drosophila* microRNA targets. *PLoS Biol.*, 1, E60.
- Stark, A., Kheradpour, R., Parts, L., Brennecke, J., Hodges, E. y Hannon, G. J. (2007a). Systematic discovery and characterization of fly microRNAs using 12 *Drosophila* genomes. *Genome Res.*, 17, 1865-1879.
- Stark, A., Lin, M. F., Kheradpour, P., Pedersen, J. S., Parts, L. y Carlson, J. W. (2007b). Discovery of functional elements in 12 *Drosophila* genomes using evolutionary signatures. *Nature*, 450, 219-232.
- Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K. J. y Baltimore, D. (2006). NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 103, 12481-12486.
- Tandon, V., Biswal, D. K., Prasad, P. K. y Malsawmtluangi, C. Reconstructing the phylogenetic relationships of the cyclophyllidean cestodes: a case study using ITS2 rDNA and sequence-structure alignment. En: Biomedical Engineering systems and technologies. Eds. Ana Fred, Joaquim Filipe, Hugo Gamboa. Springer Science & Business Media, 2011 – 408 pp.
- Tato, P., Castro, A. M., Rodríguez, D., Soto, R., Arechavaleta, F. y Molinari, J. L. (1995). Suppression of murine lymphocyte proliferation induced by a small RNA purified from the *Taenia solium* metacestode. *Parasitol. Res.*, 81, 181-187.
- Terrazas, L. I., Bojalil, R., Govezensky, T., y Larralde, C. (1998). Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.*, 84(1): 74-81.
- Tili, E., Michaille, J. J., Cimino, A., Costinean, S., Dumitru, C. D. y Adair, B. (2007). Modulation of miR-155 and miR-125-b levels following Lipopolysaccharide/TNF- $\alpha$  stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J. Immunol.*, 179: 5082-5089.
- Trelles, J. O. y Trelles, L. (1978). Cysticercosis of the Nervous system. En: Wynken, P. J., Cruyn, G. W., editores. Handbook of clinical neurology. Vol. 35. North Holland Publishing; Amsterdam. 291-320.

- Tritten, L., Burkman, E., Moorhead, A., Satti, M., Geary, J. y Mackenzie, C. (2014). Detection of circulating parasite-derived microRNAs in filarial infections. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 8: 2971-2979.
- Tsai, I. J., Zarowiecki, M., Holroyd, N., Garcarrubio, A., Sanchez-Flores, A., Brooks, K. L., y Aslett, M. (2013). The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature*, 496(7443): 57-63.
- Vanderkerckhove, J. y Weber, K. (1984). Chordate muscle actins differ distinctly from invertebrate muscle actins. *The evolution of the different vertebrate muscle actins. J. Mol. Biol.*, 179: 391-413.
- Villanueva, M. A., Campos, F., Díaz, C., Colmenero-Flores, J. M., Dantán, E. y Sánchez, F. (1999). Actin expression in germinating seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta*, 207: 582-589.
- Wahlberg, M. H. (1998). The distribution of F-actin during the development of *Diphyllobothrium dendriticum* (Cestoda). *Cell Tiss. Res.*, 291: 561-570.
- Wahlberg, M. H. y Johnson, M. S. (1997). Isolation and characterization of 5 actin cDNAs from the cestode *Diphyllobothrium dendriticum*: a phylogenetic study of the multigene family. *J. Mol. Evol.*, 159-168.
- Wahlberg, M. H., Karlstedt, K. A. y Paatero, G. (1994). Cloning, sequencing and characterization of an actin cDNA in *Diphyllobothrium dendriticum* tapeworm (Cestoda). *Mol. Biochem. Parasitol.* 65: 357-360.
- Wang, X. J., Reyes, J. L., Chua, N. H., & Gaasterland, T. (2004). Prediction and identification of *Arabidopsis thaliana* microRNAs and their mRNA targets. *Gen. Biol.*, 5(9): 65-70.
- Weber, M. J. (2005). New human and mouse microRNA genes found by homology search. *Febs J.*, 272, 59-73.
- White, A. C. (2000). Neurocysticercosis: updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. *Annu. Rev. Med.*, 51(1), 187-206.
- White, A. C., Robinson, P. y Kuhn, R. (1997). *Taenia solium* cysticercosis: host-parasite interactions and the immune response. *Chem. Immunol.*, 66, 209-230.
- Willms, K., Merchant, M. T., Gómez, M. y Robert, L. (2001). *Taenia solium*: germinal cell precursors in tapeworms grown in hamster intestine. *Arch. Med. Res.*, 32: 1-7.

- Wu, X., Fu, Y., Yang, D., Xie, Y., Zhang, R. y Zheng, W. (2013). Identification of neglected cestode *Taenia multiceps* microRNAs by illumina sequencing and bioinformatics analysis. *BMC Vet. Res.*, 9, 162.
- Xin, M., Small, E. M., Sutherland, L. B., Qi, X., McAnally, J., Plato, C. F., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R. y Olson, E. N. (2009). MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle to injury. *Genes Dev.*, 23: 2166-2178.
- Yamasaki, T., Yoshino, H., Enokida, H., Hidaka, H., Chiyomaru, T., Nohata, N., Kinoshita, T., Fuse, M. y Nakagawa, M., (2012). Novel molecular targets regulated by tumor suppressors *microRNA-1* and *microRNA-133a* in bladder cancer. *In. J. Oncol.*, 40: 1821-1830.
- Yang, G., Yang, L., Zhao, Z., Wang, J. y Zhang, X. (2012). Signature miRNAs involved in the innate immunity of invertebrates. *PLoS One*, 7(6): 39015-39024.
- Zhao, C., Sun, G., Li, S. y Shi, Y. (2009). A feedback regulatory loop involving microRNA-9 and nuclear receptor TLX in neural stem fate determination. *Nt. Struct. Mol. Biol.* 16: 365-371.
- Zheng, Y. (2017). High-throughput identification of miRNAs of *Taenia ovis*, a cestode threatening sheep industry. *Infect. Genet. E*, 51: 98-100.
- Zheng, Y. Guo, X., Shao, Z. y Zhang, J. (2016). Effects of *Echinococcus multilocularis* miR-71 mimics on murine macrophage RAW264.7 cells. *Int. Immunopharmacol.*, 34: 259-262.
- Zhou, Q., Anderson, C. y Zhang, H. (2013). Repression of choroidal neovascularization through actin cytoskeleton pathways by microRNA-24. *Mol. Ther.*, 10: 243-248.
- Zhu, I., Liu, J., Dao, J., Lu, K. y Li, H. (2016). Molecular characterization of *S. japonicum* exosome-like vesicles reveals their regulatory roles in parasite-host interactions. *Sci. Rep.*, 6: 258-264.
- Zuker, M. (1989). On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science*, 244: 48–52.
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nuc. Ac. Res.*, 31(13): 3406-3415.