

UNR

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de tesis realizado como requisito para acceder al título de
Doctora en Ciencias Veterinarias

**“Estudios de los mecanismos bioquímicos-moleculares
que intervienen en la interacción *Echinococcus* sp.-
hospedador: relación trófica durante el
establecimiento de la echinococcosis”**

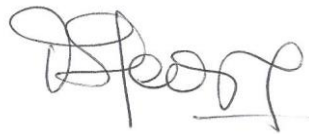
Autora: Esp. Méd. Vet. Prof. Perla Susana Negro

Directora: Dra. Esp. Bioq. Andrea Carina Cumino

Casilda, Argentina

– Diciembre 2022 –

“Estudios de los mecanismos bioquímicos-moleculares
que intervienen en la interacción *Echinococcus* sp.-
hospedador: relación trófica durante el
establecimiento de la echinococcosis”



Perla Susana Negro

Este Trabajo Final es presentado como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctora en Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentado previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. El mismo contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Zoonosis Parasitarias (IIPROSAM), Área Biología Molecular de Helminthos, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Mar del Plata, durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2016 al 20 de diciembre de 2019, bajo la dirección de la Dra. Andrea Carina Cumino.



"Año 2022 – LAS MALVINAS SON ARGENTINAS"

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Bv. Ovidio Lagos y Ruta 33 – C.P. (S2170HGJ) CASILDA
Telefax 03464-420077 / 423377 / 422050 / 423286
E-mail: info-vet@fveter.unr.edu.ar
Prov. de Santa Fe – República Argentina

CASILDA, 30 de septiembre de 2022.-

VISTO que, mediante EXP-UNR CUDI 37704/22, la Secretaría de Estudios de Posgrado y Educación Continua elevó la propuesta de Jurado Evaluador para la Tesis Doctoral "Estudios de los mecanismos bioquímicos-moleculares que intervienen en la interacción Echinococcus sp.-hospedador: relación trófica durante el establecimiento de la echinococcosis", de la doctoranda Esp. Méd. Vet. Perla Susana NEGRO, dirigida por LA Dra. Andrea Carina CUMINO y su Consejera interna Dra. Norma Beatriz PEREYRA;

Atento que se proponen como Titulares a la Dra. Méd. Vet. Viviana Mercedes ORCELLET, a la Dra. Isabel NOCITO y a la Dra. Silvina Edith FRANÇOIS, y como Suplente al Dr. Claudio Luis PIDONE, adjuntándose los CV de los evaluadores externos; y

CONSIDERANDO:

QUE la Comisión de Posgrado recomendó aprobar el jurado propuesto;

QUE los/as Sres./as. Consejeros/as, en la sesión ordinaria del día de la fecha trataron y aprobaron por unanimidad lo dictaminado;

Por ello;

EL CONSEJO DIRECTIVO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS RESUELVE

ARTICULO 1º.- **Designar** a los profesionales que a continuación se mencionan como miembros del **Jurado Evaluador para la Tesis Doctoral de la Esp. Méd. Vet. Perla Susana NEGRO**, titulada "Estudios de los mecanismos bioquímicos-moleculares que intervienen en la interacción Echinococcus sp.-hospedador: relación trófica durante el establecimiento de la echinococcosis"

JURADO EVALUADOR TITULAR

Dra. Méd. Vet. Viviana Mercedes ORCELLET (FCV-UNL)

Dra. Isabel NOCITO (FCM-UNR)

Dra. Silvina Edith FRANÇOIS (FCV-UNR)

SUPLENTES

Dr. Claudio Luis PIDONE (FCV-UNR)

ARTICULO 2º.- Regístrese, comuníquese y archívese.

RESOLUCIÓN C.D. Nº: 230/2022


Med. Vet. Mariano GÁRATE
Decano
Pte. Consejo Directivo
Fac. Cs. Veterinarias - UNR

1 de 1

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a todas las mujeres investigadoras por los aportes que han realizado y realizan a la ciencia.

También a quienes me marcaron un camino y ya no están:

- A mis padres, Dante y Cledi, quienes a pesar de tener solo estudios primarios, siempre me inculcaron la importancia de estudiar en la Universidad.
- Al Dr. Oscar Jacinto Lombardero, a quien considero un “padre” de la Parasitología Argentina.

AGRADECIMIENTOS

“Se puede devolver un préstamo en oro, pero quedas para siempre en deuda, con aquellos que han sido generosos con sus actitudes”.

De la sabiduría oriental.

Agradezco a la Universidad Pública, especialmente a la Facultad de Ciencias Veterinarias – UNR y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – UNMdP, entidades de educación pública que permitieron formarme en este doctorado.

Concretar esta tesis no hubiese sido posible sin la participación de numerosas personas que realizaron valiosos esfuerzos y dedicaron su tiempo para acompañarme en esta instancia tan importante para mí, por lo que agradezco:

- A mi directora, Dra. Andrea C. Cumino por su apoyo, su paciencia, su experiencia, sus sólidos conocimientos intentando permanentemente adecuarlos a mi formación, todo lo expresado constituyó una guía constante y encauzó este trabajo. Mi agradecimiento hacia ella por tanta generosidad es eterno.
- A las Dras. Celeste Nicolao, Julia Loos y Lic. Valeria Dávila del grupo de trabajo del Laboratorio de Zoonosis Parasitarias de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – UNMdP por su ayuda en los trabajos de laboratorio y experimentales y por hacerme sentir una compañera más del equipo.
- Al Dr. Guillermo Denegri por autorizar mi estadía en el Laboratorio de Zoonosis Parasitarias.
- A los Méds. Vets. Ariel Druetta, Rubén Navarro y Héctor Eugenio Camiletti, Jefes de Servicio de Inspección Veterinaria – SENASA, a todo el personal paratécnico que colaboró y a las

autoridades de los frigoríficos Rafaela Alimentos y JBS Argentina, por la obtención y disposición adecuada del material con el que trabajé.

- Al Dr. Ricardo José Di Masso, por haber participado en mi formación académica en este Doctorado (docente de los cursos de Metodología y Taller de Tesis) y por su permanente estímulo para llevar a cabo esta Tesis.

- A la Prof. Lic. Lilian María Anthony por su apoyo incondicional.

-A Diego, Lorenzo, Augusto y Valentina por abrirme las puertas de su casa y hacerme sentir como si estuviera en la mía.

- A Horacio, Julia y Facundo, por comprenderme y apoyarme en la realización de esta Tesis.

- Y a toda persona que me alentó para seguir adelante y concretar esta meta.

Parte de los resultados que se describen en el presente trabajo de Tesis fueron divulgados en las revistas y congresos que se detallan a continuación:

Trabajos publicados:

- ***In vitro* anti-echinococcal activity of octreotide: Additive effect of metformin linked to autophagy.** Loos J. A., Negro P.S., Cumino A.C. Acta Trop. 2020, 203:105312. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.105312.

Trabajos en preparación:

- **Anti-echinococcal effect of metformin in advanced experimental cystic echinococcosis: reprogramed intermediary carbon metabolism in the parasite.** Loos J.A.*, Negro P.S.*, Salerno G.L., Cumino A.C. *Contribuyen igualmente.
- **Insulin signaling in *Echinococcus* larval stage induce the anabolism stimulation of the parasite in mammalian host.** Negro P.S., Loos J.A., Cumino A.C.

Trabajos presentados en Congresos Nacionales:

- **Respuesta metabólica frente a hormonas antagónicas del hospedador en el estadio larvario de *Echinococcus granulosus*.** Negro P. S., Loos J.A., Dávila V. A., Cumino A.C. XXVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología y Enfermedades Parasitarias - Simposio Internacional de Biología Celular y Molecular de la Enfermedad de Chagas 26-28 de noviembre de 2016, Santa Fe, Argentina. Poster.
- **Efectos metabólicos del glucagón y metformina en metacestodes de *Echinococcus granulosus*.** Perla S. Negro, Julia A. Loos, Juan Belloni, Andrea C. Cumino. XXIV Congreso Latinoamericano de Parasitología (FLAP XXIV), 10-17 de diciembre 2017, Santiago de Chile, Chile. Poster.
- **Modificaciones en los niveles de carbohidratos frente al tratamiento con metformina en el estadio larvario de *Echinococcus granulosus*.** Valeria A. Dávila, Perla S. Negro, Julia A. Loos, Gonzalo Caló, Graciela L. Salerno, Andrea C. Cumino. XXIV Congreso Latinoamericano de Parasitología (FLAP XXIV), 10-17 de diciembre 2017, Santiago de Chile, Chile. Poster.
- **Interacción hormonal del hospedador con el sistema de glucosensado en el estado larvario de *Echinococcus granulosus*.** Perla S. Negro, Julia A. Loos, Valeria A. Dávila, Andrea C. Cumino. XX Congreso y XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. “Interacciones entre los seres vivos y agentes/condiciones patogénicas” 27 y 28 de noviembre de 2018, Facultad de Ciencias Médicas, UNR, Santa Fe 3100, Rosario. Poster.
- **Metformin induce autophagy and UPR under intracystic glucose deprivation in *in vitro* metacestodes and *in vivo* experimental models of *Echinococcus granulosus*.** Loos Julia

A, Negro Perla S., Ledo Camila, Nicolao Ma. Celeste, Pavia Natalia, Díaz Malena, Marianela Del Rio, De la Canal Laura, Cumino Andrea C. 17-20 Noviembre 2021, LXVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica(SAIC), Reunión Anual de Sociedades de Biociencias (SAIC-SAI-AAFE-NANOMED.ar) Buenos Aires, Argentina. Poster.

- **TOR biology in *Echinococcus* sp.: Its roles in the cellular coordination of multiple metabolic and trafficking pathways... Huge and Powerful as Thor.** Loos Julia A., Negro Perla S., Cumino Andrea C. IX Congreso Argentino de Parasitología, 1-3 de Junio de 2022, Salta (Argentina). Simposio.
- **Advanced experimental cystic echinococcosis: reprogramming of the intermediary carbon metabolism in the parasite under metformin treatment *in vivo*.** Loos Julia A., Negro Perla S., Graciela L. Salerno, Andrea C. Cumino. LXVII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación Clínica, LXX Reunión anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI), Reunión Anual de Sociedades de Biociencias (SAIC-SAI-FAIC-SAFIS), 16-19 Noviembre 2022, Mar del Plata, Argentina.

Trabajos presentados en Congresos Internacionales:

- **Metabolic impact of host glucose homeostasis controlling hormones on the *Echinococcus* larval stage.** Negro, P.S., Loos, J.A., Dávila, V.A., Cumino, A.C. 28th World Congress of Echinococcosis and 1st Peruvian Congress of Echinococcosis. 29-31 Octubre 2019, Lima, Perú. *Contribuyen igualmente.
- **Regulación farmacológica del eje IGF-AKT-TOR-AMPK-Autofagia en *Echinococcus* sp.** Negro Perla S.*, Loos Julia A.*, Cumino Andrea C. LVIII Jornadas Internacionales de Hidatología 5-7 de octubre del 2022, Puerto Iguazú, Misiones, (Argentina). Simposio. *Contribuyen igualmente.

Participación como co-autora en el capítulo:

- **“Especies y genotipos de *Echinococcus granulosus sensu lato* causantes de equinococosis quística en la Argentina”** en: La hidatidosis en la Argentina. Un abordaje integral de la enfermedad y sus implicancias para las políticas públicas. Cucher, M.; Ávila, H.G.; Macchiaroli, N.; Camicia, F.; Maldonado, L.; Kamenetzky, L.; Rosenzvit, M.; Gutiérrez, A., Jensen, O.; Negro, P.S.; López, R.; Pérez, V. 978-987- 4960-19-1págs: 55-71 Año 2019.

INDICE GENERAL	i-ii
Abreviaturas	iii-vi
Resumen-Abstract	vii-x
1. Introducción General	1
1.1. Clasificación taxonómica	1
1.2. Formas parasitarias y características morfológicas	4
1.3. Hospedador y ciclo biológico	8
1.4. Distribución geográfica y epidemiológica	10
1.5. Echinococcosis como enfermedad crónica	11
1.6. Evidencia evolutiva de la aparición de hormonas de desarrollo e interrelación trófica de los efectos	14
1.7. Características fisiológicas y ultraestructurales de <i>Echinococcus</i> sp.	16
1.8. Características metabólicas de <i>Echinococcus</i> sp., blanco para la actividad terapéutica de fármacos	21
2. Hipótesis y Objetivos	24
2.1. Hipótesis de trabajo	24
2.2. Objetivo general	24
2.3. Objetivos particulares	24
2.4. Hipótesis sustantiva	24
3. Materiales y Métodos	25
3.1. Obtención de muestras biológicas y métodos de cultivo del estadio larvario de <i>Echinococcus</i> sp.	25
3.1.1. Extracción de protoescolices de <i>E. granulosus</i>	25
3.1.2. Obtención de metacestodos de <i>E. granulosus</i>	27
3.1.3. Cultivo in vitro del estadio larvario de <i>E. granulosus</i>	28
3.2. Tratamiento farmacológico in vitro del estadio larvario de <i>E. granulosus</i>	28
3.3. Métodos fluorométricos para determinación de funciones biológicas	30
3.3.1. Evaluación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) en protoescolices de <i>E. granulosus</i>	30
3.3.2. Detección de glucógeno fluorescente <i>in vivo</i> y estimación de la captación de glucosa y tasa de glucólisis en protoescolices de <i>E. granulosus</i>	30
3.4. Estudios de expresión de proteínas	31
3.4.1. Obtención de extractos proteicos	31
3.4.2. Análisis de inmunohistoquímica <i>in toto</i> en protoescolices y metacestodos de <i>E. granulosus</i> .	31
3.4.3. Determinación de actividades enzimáticas y metabolitos a partir de extractos celulares y de líquido hidatídico de metacestodos murinos de <i>E. granulosus</i>	33
3.5. Estudios de expresión génica	35
3.6.1. Extracción y purificación de ARN	35
3.6.2. Detección de transcritos por RT-PCR y PCR en tiempo real (qPCR)	36
3.6. Análisis bioinformático de las secuencias codificantes en <i>E. granulosus</i>	37

4. Capítulo 1. “Impacto anabólico de la insulina del hospedador y la activación de Eg-TOR en el estadio larvario de <i>Echinococcus granulosus</i> ”	39
4.1. Introducción	39
4.2. Resultados	42
4.2.1. Identificación <i>in silico</i> , estudio de expresión transcripcional y estimación de la actividad funcional de transportadores de glucosa tipo GLUT en <i>E. granulosus</i>	42
4.2.2. El almacenamiento de glucosa bajo el efecto de insulina produce inducción en la biosíntesis de glucógeno y lípidos en el estadio larvario de <i>E. granulosus</i>	47
4.2.3. La vía de transducción de señales iniciada por la unión de insulina exógena al receptor del parásito lleva a la fosforilación y activación de Eg-TOR	49
4.3. Discusión	51
5. Capítulo 2. “Efecto metabólico del glucagón del hospedador en el estadio larvario de <i>Echinococcus granulosus</i> ”	56
5.1. Introducción	56
5.2. Resultados	59
5.2.1. Identificación <i>in silico</i> de un receptor putativo para glucagón en <i>E. granulosus</i>	59
5.2.2. Captación de glucosa, expresión de genes <i>Eg-gluts</i> y acumulación de compuestos de reserva de carbono bajo el efecto de glucagón exógeno en el estadio larvario de <i>E. granulosus</i>	59
5.2.3. Efectos de la insulina y el glucagón exógenos en la expresión génica de las enzimas del metabolismo intermediario, la actividad mitocondrial y el flujo glucolítico en metacestodos y protoescólices.	64
5.3. Discusión	67
6. Capítulo 3. “El octreotide y la metformina interfieren el eje Insulina-AKT-AMPK-TOR, inducen autofagia y resultan fármacos antiechinococcósicos en el estadio larvario de <i>E. granulosus</i> ”	72
6.1. Introducción	72
6.2. Resultados	74
6.2.1. Análisis <i>in silico</i> y estudio de la expresión génica de un putativo receptor de somatostatina/altostatina en <i>E. granulosus</i>	74
6.2.2. El octreotide aumentó la expresión de <i>Eg-Atg8</i> , proteína clave en la inducción de la autofagia en el estadio larvario	77
6.2.3. La metformina promovió el catabolismo de carbohidratos y el cambio en la partición de carbono en <i>E. granulosus</i>	77
6.3. Discusión	81
1. Conclusiones	86
2. Bibliografía	88

ABREVIATURAS

A_x: absorbancia a X nm.

ABZ: albendazol.

ABZSO: albendazol sulfóxido.

ADNc : ácido desoxirribonucleico copia.

AKH: adipoquinétina (hormona ortóloga al glucagón en invertebrados).

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

AMPK: proteín-quinasa activada por AMP.

AstC: alatostatina C.

Atgs: genes y/o proteínas relacionados a la autofagia.

ATP: adenosina trifosfato.

BLAST: “*Basic Local Alignment Search Tool”*”

BZMs: benzimidazoles-metil carbamato.

[Ca⁺²]_i: concentración de calcio intracelular.

CaCl₂: cloruro de calcio.

CDD: “*Conserved Domain Database”*”.

D.E.: Desviación Estándar.

DILP: péptido tipo insulina en *Drosophila*.

DMSO: dimetil-sulfóxido.

dNTP: desoxinucleótidos trifosfato.

EDTA: ácido etilendiamino tetracético.

EGF: factor de crecimiento epidérmico

F1,6bp: fructosa 1,6 bisfosfatasa

FDA: “*Food and Drug Aministration”*”.

FGF: factor de crecimiento fibroblástico

FoxO: factor de transcripción “*Forkhead box, class O”*”

G6p: glucosa 6 fosfatasa

GCGR: receptor de glucagón.

GLP-1: péptido tipo glucagón 1.

GLUT: “*Glucose Transporter”*”

GrH: hormona de crecimiento.

h: hora (s).

HCl: ácido clorhídrico.

Hepes: ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N-(2-etanol-sulfónico).

IGF: factores de crecimiento tipo insulina

IL: interlequinas.

kDa: kilo daltons.

KeV: kilo electronvoltio.

LDH: lactato deshidrogenasa

LKB1: “*Liver Kinase B1*”

M: molar.

M199: Medio 199

MAP1-LC3: “*Microtubule-Associated Protein 1-Light Chain 3*”

MAPK: “*Mitogen-Activated Protein Kinase*”.

MDH: malato deshidrogenasa

MEB: microscopía electrónica de barrido.

Met: metformina.

MET: microscopía electrónica de transmisión.

MgCl₂: cloruro de magnesio.

min: minuto (s).

MMLV-RT: transcriptasa reversa del virus de leucemia murina.

MTC: metacestodes.

NaCl: cloruro de sodio.

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido.

NaOH: hidróxido de sodio.

2-NBDG: 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il amino)-2-desoxi-D-glucosa.

NCBI: “*National Center for Biotechnology Information*”

Oct: octreotide

OsO₄: tetróxido de osmio.

p/v: peso/volumen.

pb: pares de bases.

PBS: solución balanceada de fosfato.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PE: fosfatidiletanolamina

PEP: fosfoenolpiruvato.

PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.

PI3K: fosfoinositol-3-quinasa

PI3P: fosfoinositol-3-fosfato

PKA: protein-quinasa A.

PMSF: fluoruro de fenilmetil sulfonilo.

PTS: protoscólicas.

qPCR: retrotranscriptasa- reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

Raptor: “*Regulatory Associated Protein of TOR*”

Rm: rapamicina

RT-PCR: retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa.

s. l.: *sensu lato*.

s. s.: *sensu stricto*.

S/T: serina-treonina.

s: segundo (s).

SDS: dodecil sulfato de sódio.

SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

SFB: suero fetal bovino.

SST: somatostatina.

SSTR: receptor de somatostatina.

Taq polimerasa: polimerasa de *Thermus aquaticus*.

TBS: “*Tris Buffered Saline*”.

TGF- β : factor transformante β

TM: Dominio de transmembrana

TOR: “*Target Of Rapamycin*”.

TORC1: “*TOR Complex I*”

Tris: tris (hidroxietil) aminometano.

TX: tritón X-100.

U/ml: unidades por mililitro.

v/v: volumen/volumen.

V: voltio (s).

xg: por gravedad.

$\Delta\Psi_m$: cambio de potencial de membrana mitocondrial.

μm : micrómetro.

RESUMEN

Echinococcus granulosus, el agente causal de la echinococcosis quística, es un cestodo que completa su ciclo de vida involucrando un hospedador definitivo canino, en el que se desarrolla sexualmente el parásito adulto, y hospedadores intermediarios herbívoros u omnívoros, donde tiene lugar el desarrollo asexual del metacestodo, siendo el protoescólex la estructura larvaria con potencialidad de desarrollo bidireccional dependiendo del tipo de hospedador en que se aloje. Debido a que estos helmintos basan su metabolismo en la captura de glucosa desde el medio extracelular y la acumulación de la misma en forma de glucógeno, es fundamental para el parásito la coordinación de la disponibilidad de este azúcar para garantizar los procesos de desarrollo en el metacestodo. En esta Tesis Doctoral se constata como la insulina, glucagón y somatostatina, tres de las principales hormonas gastro-pancreáticas que regulan la homeostasis de glucosa en mamíferos, impactan directamente el desarrollo y crecimiento del estadio larvario de *E. granulosus*, pudiendo promover la activación metabólica de metacestodos y protoescólices.

Se identificaron en *E. granulosus*, tres transportadores de glucosa tipo GLUTs, capaces de incorporar un derivado fluorescente de 2-D-glucosa, y dos receptores acoplados a la proteína G con alta identidad de secuencia a los receptores de glucagón y de somatostatina humanos, dando cuenta de su expresión transcripcional. En presencia de insulina exógena se indujo la captación intracelular de glucosa a expensas del aumento en la expresión de estos transportadores, conduciendo a un incremento en la acumulación del monosacárido libre y en forma de glucógeno. A su vez frente a insulina, se indujo la degradación de la glucosa incorporada mediante el aumento de la glucólisis y de la fermentación homoláctica, con un aumento en la actividad mitocondrial que permitió la obtención de ATP, poder reductor y esqueletos carbonados para inducir la síntesis de triglicéridos y de gotas lipídicas. Estas actividades anabólicas promovidas por la insulina en el parásito son mediadas entre otras proteínas, por la activación de Eg-TOR, un regulador maestro del crecimiento y proliferación celular.

Por otro lado, el glucagón exógeno también impactó el metabolismo del cestodo, oponiéndose a la insulina en dos aspectos principales, éste induce la degradación del glucógeno y la activación de la autofagia. Aunque de la misma manera que la insulina, aumentó la actividad mitocondrial y la inducción transcripcional de los genes que podrían estar involucrados en la gluconeogénesis (*Eg-pepck*, *Eg-g6p* y *Eg-fl,6bp*). Los corpúsculos calcáreos resultaron ser las células especializadas con mayores cambios registrados en presencia de glucagón, en los cuales se indujo un incremento del potencial de membrana mitocondrial y se aumentó la captación de glucosa desde el medio extracelular,

evidenciando la incorporación de glucosa a través de canales citoplasmáticos que vinculan a estas células directamente con el tegumento.

Finalmente, en presencia de inhibidores de la vía de transducción de señales de insulina (como octreotide, un análogo de somatostatina) e inhibidores indirectos de TOR (como metformina), se puso en evidencia que el parásito induce previo a la muerte, la activación de autofagia y la acumulación de disacáridos no reductores. La síntesis de éstos últimos podría tener lugar a través de la redistribución del carbono celular, mediante un ciclo fútil que implica la síntesis y degradación de glucógeno, trehalosa y sacarosa para sostener la supervivencia del parásito ante la limitación de nutrientes, especialmente debido al déficit de glucosa. Este Trabajo de Tesis aporta evidencias de la relación íntima entre el parásito y los hospedadores, a través de la cual, se moviliza la glucosa hacia y dentro del parásito en respuesta a las hormonas liberadas en el torrente sanguíneo y/o sistema digestivo de los mamíferos que los hospedan. Esta interrelación trófica y metabólica parásito-hospedador, tendría lugar gracias a que el parásito adquiere y preserva durante su evolución, las vías de transducción de señales que mantienen la homeostasis de glucosa en los mamíferos capaces de permitir su desarrollo.

ABSTRACT

Echinococcus granulosus, the causal agent of cystic echinococcosis, is a cestode that involves in its life cycle, carnivorous definitive hosts, in which the adult worm develops sexually, and herbivorous or omnivorous intermediate hosts, where takes place the asexual development of the metacestode, being the protoscolex the larval structure with potential for bidirectional development in both types of hosts. Since these helminths base their metabolism on the capture of glucose from the extracellular medium and its accumulation in the form of glycogen, it is essential for the parasite to coordinate the availability of this sugar to guarantee the development processes in the metacestodes. In this Doctoral Thesis it is verified how insulin, glucagon and somatostatin, three of the main gastro-pancreatic hormones that regulate glucose homeostasis in mammals, directly impact the development and growth of the larval stage of *E. granulosus*, being able to promote metabolic activation of metacestodes and protoscoleces.

Three GLUT-like glucose transporters (capable of incorporating a fluorescent derivative of 2-D-glucose), and two G protein-coupled receptors with high sequence identity to human glucagon and somatostatin receptors, it was identified and verified their transcriptional expression. In the presence of exogenous insulin, it was induced the intracellular glucose uptake at the expense of increased expression of these transporters, leading to an increase in the accumulation of free monosaccharide and in the form of glycogen. In turn, against insulin, the degradation of glucose was increased, inducing the glycolysis and the homolactic fermentation, with an increase in mitochondrial activity that allowed obtaining ATP, reducing power and carbon skeletons to induce the synthesis of triglycerides and lipid droplets. These anabolic activities promoted by insulin in the parasite are mediated, among other proteins, by the activation of Eg-TOR, a master regulator of cell growth and proliferation.

On the other hand, exogenous glucagon also impacted cestode metabolism, opposing insulin in two main aspects, it induced glycogen degradation and autophagy activation. Although in the same manner to insulin, it increased mitochondrial activity and transcriptional induction of genes that could be involved in gluconeogenesis (*Eg-pepck*, *Eg-g6p* and *Eg-fl,6bp*). The calcareous corpuscles turned out to be the specialized cells which registered the greatest changes in the presence of glucagon. They increased the mitochondrial membrane potential and induced the uptake of glucose from the extracellular medium, evidencing the incorporation of glucose through channels cytoplasmic, which link these cells directly to the tegument.

Finally, in the presence of insulin signal transduction pathway inhibitors (such as octreotide, a somatostatin analog) and indirect TOR inhibitors (as metformin), it was shown that the parasite induced prior to death, autophagy activation and the accumulation of non-reducing disaccharides, suggesting that the synthesis of them, takes place by redistribution of cellular carbon, through a futile cycle that involves the synthesis and degradation of glycogen, trehalose and sucrose to sustain survival in the face of nutrient limitation, especially glucose deficit. This Thesis provides evidence of the intimate relationship between the parasite and the hosts, through which glucose is mobilized towards and within the parasite in response to hormones released in the bloodstream and/or digestive system of mammals, who host it. This trophic interaction and metabolic interrelation in host-parasite would take place due to that the parasite acquires and preserves during its evolution, the signal transduction pathways that maintain glucose homeostasis and that guarantee its survival in them.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los parásitos del género *Echinococcus* pertenecen al Filo Platyhelminthes, Clase Cestoda, Orden Cyclophyllidea, Familia Taeniidae. El género *Echinococcus* incluye a las especies: *E. granulosus sensu stricto* (s.s.), *E. equinus*, *E. ortleppi*, *E. canadensis*, *E. felidis* (todos comprenden el complejo de especies denominado *E. granulosus sensu lato –s.l.–*), *E. multilocularis*, *E. shiquicus*, *E. oligarthrus* y *E. vogeli*. Se ha reconocido que hay variantes intra-específicas dentro de la especie *E. granulosus*. Con respecto a las otras especies de *Echinococcus* descritas, no hay pruebas claras de la existencia de genotipos o cepas distintas, aunque se han descrito variaciones regionales a escala continental. No se conoce información sobre la variabilidad de las otras especies mencionadas (Xiao et al., 2005).

1.1. Clasificación taxonómica

Ubicación taxonómica del género *Echinococcus* (Rudolphi, 1801)

Reino: Animalia

Phylum: Platyhelminthes

Clase: Cestoda

Subclase: Eucestoda

Orden: Cyclophyllidea

Familia: Taeniidae

En la base de la radiación de la bilateralidad, los platelmintos se dividen en tres clases: la clase Turbellaria, de vida libre, y dos clases parásitas: Cestoda y Trematoda. Pertenecen al superphylum Lophotrochozoa (Dunn et al., 2008) junto a los filos Annelida y Mollusca, los cuales también comparten características con el superphylum Ecdysozoa que comprende a artrópodos y nematodos, (Parkinson et al., 2012; Elphick et al., 2018) (**Figura 1**).

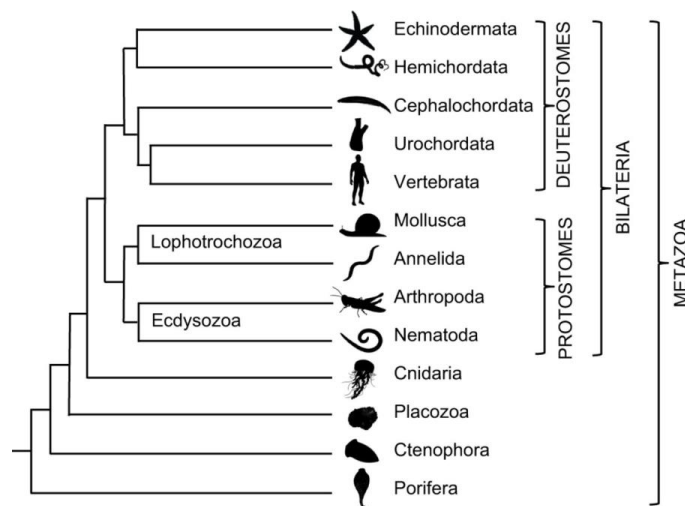


Figura 1. Filogenia animal. Árbol filogenético que muestra las relaciones de los metazoos no bilaterales y bilaterales. Los no bilaterales incluyen filos que carecen de sistemas nerviosos (Porifera y Placozoa) y filos que tienen sistemas nerviosos (Ctenophora y Cnidarios). Los bilaterales comprenden dos super-phyyla: los deuterostomes, que incluyen vertebrados, y los protostomes, que incluyen lótrocozoos (moluscos, platelmintos y anélidos) y ecdisozoos (que incluyen a los artrópodos y nematodos).

Especies reconocidas de *Echinococcus*

- ✓ *E. granulosus* (Batsch, 1786). Distribución cosmopolita. Hospedadores Definitivos: cánidos (principalmente el perro). Hospedadores Intermediarios: ungulados, primates y marsupiales. El metacestodo es de localización visceral, principalmente hígado y pulmones. El ser humano se comporta como Hospedador Intermediario Accidental, desarrollando Echinococcosis Unilocular (Echinococcosis Quística).
- ✓ *E. multilocularis* (Leuckart, 1863). Su distribución geográfica es Centro y Norte de Europa, Asia y América del Norte. Hospedadores Definitivos: principalmente zorros. Hospedadores Intermediarios: roedores. El metacestodo es multivesicular (alveolar) y de localización visceral, principalmente hígado. El ser humano se comporta como Hospedador Intermediario Accidental, la enfermedad se denomina Echinococcosis Alveolar.
- ✓ *E. vogeli* (Rausch y Bernstein, 1972). Su distribución geográfica es América Central y del Sur. Hospedadores Definitivos: zorro pitoco o zorro vinagre (*Speothos venaticus*). Hospedadores Intermediarios: pacas (*Cuniculus paca*). El metacestodo es poliquístico y de localización visceral, principalmente hígado. El ser humano se comporta como Hospedador Intermediario Accidental, causando Echinococcosis Poliquística. Actualmente la enfermedad en humanos es denominada Echinococcosis Neotropical (junto con la causada por *E. oligarthrus*).
- ✓ *E. oligarthrus* (Diesing, 1863). Actualmente designado como *E. oligarthra*. Su distribución geográfica es América Central y del Sur. Hospedadores Definitivos: félidos silvestres. Hospedadores Intermediarios: agutí (*Dasyprocta* spp.), pacas (*C. paca*) y roedores (*Proechimys* spp.). El metacestodo es poliquístico, y es de localización periférica, principalmente muscular, ocasionalmente visceral. Actualmente la enfermedad en humanos es denominada Echinococcosis Neotropical (junto con la causada por *E. vogeli*).
- ✓ *E. shiquicus* (Xiao et al., 2005). Distribución geográfica zona de la meseta de Qinghai-Tibet en la región de Asia Central. Hospedadores Definitivos: zorro del Tibet (*Vulpes ferrilata*). Hospedadores Intermediarios: pika de la meseta (*Ochotona curzoniae*). El metacestodo es unilocular y es de localización visceral. No ha habido reportes de casos humanos.
- ✓ *E. ortleppi* (Lopez-Neyra y Soler Planas, 1943) (Cepa G5). Distribución geográfica: Europa, Sudáfrica, India, América del Sur, Rusia. Hospedadores Definitivos: perros. Hospedadores Intermediarios: bovinos. El metacestodo es unilocular y es de localización visceral. Se conocen casos humanos, pero de muy baja frecuencia.
- ✓ *E. equinus* (Williams y Sweatman, 1963) (Cepa G4). Distribución geográfica: Europa, Sudáfrica, Medio Oriente. Hospedadores Definitivos: perros. Hospedadores Intermediarios: caballos. El metacestodo es unilocular y es de localización visceral. No se ha demostrado aún su potencial zoonótico.
- ✓ *E. felidis* (Ortlepp, 1937). Distribución geográfica: Sudáfrica. Hospedadores Definitivos: leones. Hospedadores Intermediarios: jabalíes e hipopótamos. No han sido registrados casos en humanos.

E. granulosus es un parásito de naturaleza compleja, su fenotipo es el mismo en todos los especímenes salvo las variaciones individuales propias de los seres vivos, sin embargo, es la única especie dentro del género *Echinococcus* que muestra gran diversidad genotípica. Dentro de *E. granulosus* existen variables genéticas que permiten diferenciar distintas cepas por medio de técnicas moleculares. Se les ha asignado un genotipo de acuerdo a su caracterización en base a marcadores moleculares independientes (en especial, genes mitocondriales), determinada por variaciones intraespecíficas en la secuencia nucleotídica del segmento de 366 pares de bases del gen mitocondrial *cox1* que codifica la subunidad 1 de la citocromo- oxidasa y en algunos pares de bases del segmento de 471 pares de bases del gen mitocondrial *nadhgdg* que codifica a la NADH-deshidrogenasa del parásito.

Las cepas se denominan de acuerdo al hospedador intermediario en el cual cada variante desarrolla mayoritariamente quistes fértiles (es decir con presencia de protoescolices). Fueron reconocidos a nivel mundial 10 genotipos diferentes designados como: G1 (cepa oveja común), G2 (cepa oveja de Tasmania), G3 (cepa búfalo), G4 (cepa equina), G5 (cepa vaca), G6 (cepa camello), G7 (cepa cerdo), G8 (cepa cérvido), (McManus et al., 2003), además se ha asignado el genotipo G9 a aislamientos de *Echinococcus* detectados en casos humanos en Polonia (Pawlowski y Stefaniak, 2003; Moro y Schantz, 2009) y el genotipo G10 a aislamientos de cérvidos de Finlandia y Suecia (Thompson, 2008, McManus, 2013). El término *E. granulosus sensu lato* (*E. granulosus s.l.*) puede utilizarse como término general para todos estos genotipos y cepas.

Los genotipos G1 y G2 (cepa oveja) y el genotipo G3 conformarían un clúster que permitiría formar el taxón *Echinococcus granulosus sensu stricto* (*E. granulosus s.s.*). Estas tres variantes tienen una distribución geográfica amplia y una vasta gama de hospedadores, ocurren simpátricamente y son responsables (particularmente el genotipo G1) de la mayoría de los casos humanos de Echinococosis Quística (Carmena y Cardona, 2013; Alvarez Rojas et al., 2014). Se ha propuesto revalidar el estatus específico para los genotipos G4 (cepa equina) y G5 (cepa vaca) retomando versiones de otros autores proponiendo como especie: *E. equinus* para la cepa equina y *E. ortleppi* para la cepa bovina (Thompson y McManus, 2002; Thompson, 2008). Más distantemente relacionado se encontraría el clúster conformado por los genotipos G6 (cepa camello), G7 (cepa cerdo), G8 y G10 (cepas cérvido) que constituirían la especie *E. canadensis*. (Cardona y Carmena, 2013; Alvarez Rojas, et al., 2014). Actualmente G9 es considerada como una microvariante de G7 (Vuitton, et al. 2020).

Según el consenso internacional sobre terminología usada en el campo de la Echinococosis (Vuitton et al., 2020) el término “genotipo” debe reservarse para la caracterización que utiliza biología molecular/secuenciación y “cepa” para la caracterización morfológica y rango de hospedadores. En la República Argentina se han identificado seis genotipos de *E. granulosus*: G1, G2, G3, G5, G6 y G7. Dentro de *E. granulosus s.s.*, el genotipo G1 tiene la distribución más amplia, el mayor número de casos y rango de hospedadores intermediarios (ovejas, vacas, cerdos y cabras) y también se lo halló en humanos. El genotipo G2 fue hallado en ovejas y vacas y el genotipo G3 en ovejas. Le sigue G6 en frecuencia de casos hallados, con dos especies de hospedadores intermediarios (cabras y vacas), el cual también fue registrado en humanos. El genotipo G5 fue identificado en vacas y en el ser humano y G7 solo en cerdos (Kamenetzky et al. 2002; Cucher et al., 2019).

En relación con otras especies de *Echinococcus* en nuestro país, se identificó la especie *E. vogeli* en la provincia de Misiones, en un roedor denominado vulgarmente paca (*C. paca*) (Vizcaychipi et al., 2013). No se realizaron estudios moleculares para confirmar esta especie. También en esta provincia, integrando aspectos morfológicos y moleculares se detectaron dos poblaciones de *E. oligarthrus* mediante estudios realizados en adultos hallados en puma (*Puma concolor*) y ocelote (*Leopardus pardalis*) y en la forma larvaria en un agutí (*Dasyprocta azarae*). Los análisis en base a marcadores moleculares mitocondriales y nucleares mostraron una alta diversidad genética de esta especie (Arrabal et al., 2017). En esta tesis nos referiremos a *E. granulosus s. l.* debido a que no se realizó genotipificación del material biológico.

1.2. Formas parasitarias y características morfológicas

Adulto

El estadio adulto de este cestodo se localiza en el intestino delgado de los cánidos. La longitud del adulto es de 2 a 11 mm y el número de proglótidos oscila entre 2 a 7, con un promedio de 3 (**Figura 2**). El tegumento presenta microtriquias (evaginaciones) que favorecen la amplificación de la superficie de absorción y la adhesión a la superficie intestinal del hospedador. Presenta un escólex que mide 300 μm con 4 ventosas de 140 μm cada una y una doble corona de ganchos, los ganchos miden aproximadamente 30 μm . Posee un rostelo cónico, hemisférico, hueco, en cuyo perímetro se encuentran los ganchos. Le sigue un cuello considerado la zona generatriz de los proglótidos. Esta región estaría formada por células somáticas totipotentes, denominadas neoblastos o células germinales. Estas células se encontrarían además en las oncosferas y en la membrana germinal del quiste hidatídico (Sakamoto y Sugimura, 1970). Las células totipotentes representarían las únicas células proliferativas siendo las responsables del crecimiento y regeneración del parásito (Koziol y Brehm, 2015). A continuación del cuello se presenta la estróbila formada por un conjunto de segmentos denominados proglótidos. En general el primer proglótido está conformado por una masa germinal y mide aproximadamente 240 – 260 μm . El segundo proglótido posee los dos sexos o sea que es hermafrodita y en el tercer proglótido se reabsorbe el aparato reproductor masculino y el útero se llena de embriones encapsulados. El número de huevos que pueden hallarse en el proglótido puede variar entre 100 a 1.500 (Head y Lawrence, 1991). Debido a que el útero no posee una salida al exterior, los huevos quedan dentro del proglótido y salen por ruptura o desintegración de este último (Lombardero, 1983; Thompson, 1995). Al ser hermafroditas pueden presentar tanto fecundación cruzada como autofecundación, siendo este proceso posiblemente el de mayor ocurrencia (Kumaratilake et al., 1986).

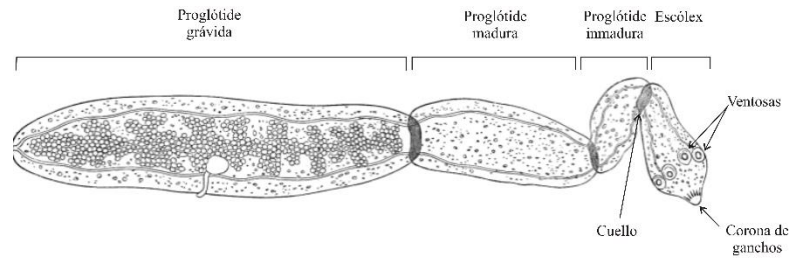


Figura 2. Parásito adulto de *Echinococcus* spp. (Adaptado de Thompson, 1995). *E. granulosus*: Escólex mostrando ventosas y corona de ganchos. Primer proglótido (inmaduro). Tercer proglótido grávido cargado de huevos. Modificado de Cobbold (1879).

Huevo

Esta estructura parasitaria es el estadio del parásito que se encuentra en el ambiente. Los huevos son esféricos o elipsoidales. El tamaño oscila entre 30 a 50 μm y 22 a 44 μm en sus dos diámetros (**Figura 3**). Los huevos de *E. granulosus* son morfológicamente indistinguibles al microscopio óptico de otros huevos de cestodos que afectan a los perros como *Taenia* spp. y *E. multilocularis* (Khalil, Jones y Bray 2006). En la estructura del huevo se presentan varias capas: la embriófora es la envoltura externa y es la principal capa que le proporciona protección física al embrión, es relativamente delgada e impermeable, consta de bloques poligonales compuestos de queratina, los cuales están unidos por una sustancia cementante. En el proglótido, rodeando a la embriófora se forma la capa vitelina, la cual desaparece antes de que el huevo sea eliminado con la materia fecal. En el interior se encuentra la oncosfera o embrión hexacanto formada por células glandulares, musculares y germinales. Presenta seis ganchos de 10 a 12 μm de longitud, los cuales se distribuyen un par en posición intermedia y dos pares en posición lateral, en estos últimos el gancho de posición dorsal es levemente mayor que el de posición ventral (Swiderski, 1983). El huevo de *Echinococcus* es extremadamente resistente lo que le permite tolerar un amplio margen de temperaturas ambientales.

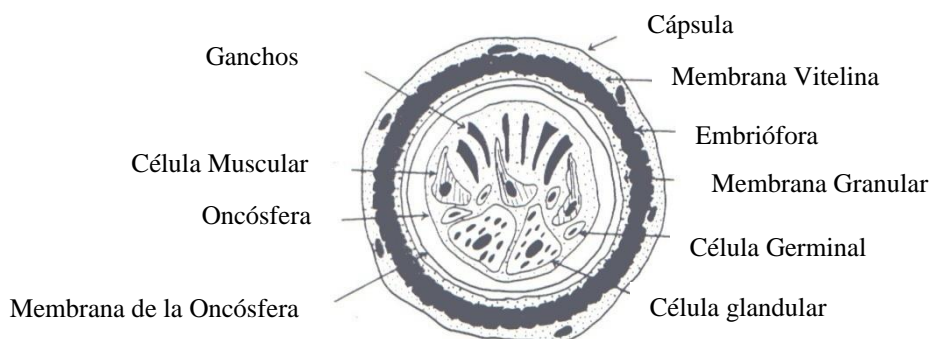


Figura 3. Estructura del huevo de *Echinococcus* spp. (según Thompson and Lymbery, 1995).

Metacestodo

El metacestodo es la designación científica que se le asigna a *Echinococcus* spp. en su hospedador intermediario. Se lo define como la forma de reproducción asexual del cestodo en estos hospedadores, siendo la segunda fase de desarrollo que incluye todas las etapas desde la post-oncosférica hasta la etapa fértil (Vuitton et al., 2020). El quiste hidatídico es una entidad anatómica producida por el crecimiento del metacestodo de *Echinococcus* spp. Incluye desde afuera hacia dentro: capa adventicia, originada por el hospedador; capas laminar y germinal originadas por el parásito y líquido del quiste y su contenido originados tanto por el parásito como por el hospedador (Vuitton et al. 2020) (**Figura 4**). La capa adventicia externa, es producto de la reacción inflamatoria del hospedador conformada por eosinófilos, linfocitos, células gigantes multinucleadas y vasos sanguíneos neoformados. La capa laminar intermedia, de 200 μm a 1 cm, es anucleada, blanda, elástica, quitinosa, rica en mucinas y polisacáridos con residuos de galactosa (Diaz et al., 2011). La capa más interna de células proliferativas, germinal o prolígera, presenta células totipotentes, con alta tasa metabólica y en continua división celular que originan a la capa laminar y mediante brotación, a las cápsulas prolíferas (dentro de las cuales se desarrollan los protoescólices) constituyendo la “arena hidatídica” (Thompson et al, 1995). Estas últimas dos capas producidas por el parásito están involucradas en eventos esenciales para el desarrollo, son ricas en glicoconjugados antigénicos y median los procesos de modulación de la respuesta inmune del hospedador (Diaz et al., 2015). Por engrosamiento y protrusión de la capa germinativa se forman hacia la cavidad quística las cápsulas de cría o vesículas prolíferas de 200 a 500 μm que contienen de 1 a 120 protoescólices, estas vesículas están unidas por un pequeño pedúnculo o tallo a la membrana que le dio origen (**Figura 4**).

Teniendo en cuenta el estado evolutivo del quiste hidatídico, éste puede ser hialino si presentan líquido transparente, con membrana germinativa blanquecina, brillante y elástica; caseificado si contiene un material espeso, friable, algo granular y amarillento; calcificado cuando no presenta líquido hidatídico y en su interior el contenido es amorfo, con granulaciones de tamaño variable y de consistencia firme y; hemorrágico si presenta un líquido hidatídico turbio y rojizo (sanguinolento) (Sakamoto y Cabrera, 2003). Según la presencia o ausencia de protoescólices, el metacestodo se puede clasificar como fértil cuando presenta protoescólices, y en el caso contrario quiste infértil o acefaloquiste.

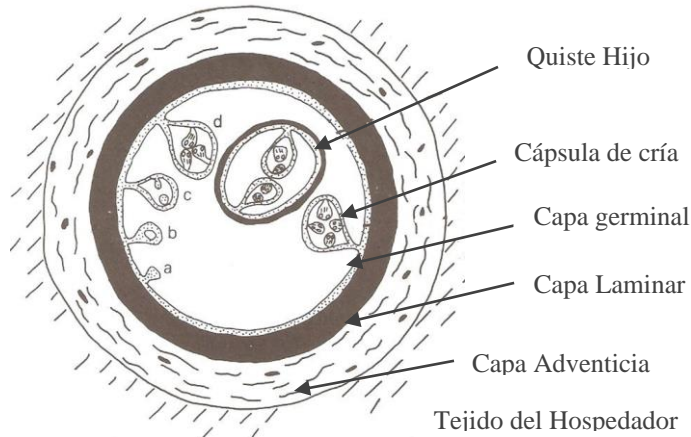


Figura 4. Estructura del quiste hidatídico de *E. granulosus*. (a-d) Secuencia de formación de la cápsula de cría en la capa germinal. Engrosamiento y protrusión de la capa germinal hacia la cavidad quística (a); desarrollo de un tallo y vacuolización (b); formación de protoescólex (c); formación de la cápsula de cría (d). La cápsula de cría se puede separar del quiste principal y liberar los protoescólices los cuales formarán la arenilla hidatídica. La cápsula de cría puede desarrollar una capa laminar y transformarse en un quiste hijo. Modificado de Thompson, 1995.

Los protoescólices poseen un rol clave en el ciclo de vida del parásito, ya que tienen la potencialidad de convertirse en gusanos adultos en el intestino de los hospedadores definitivos cuando estos han ingerido un quiste hidatídico, de-diferenciarse en quistes secundarios por vesicularización ectogénica cuando son liberados luego de una ruptura quística en los hospedadores intermediarios o de desarrollar quistes hijos por vesicularización endogénica dentro del quiste materno, diferenciándose de las cápsulas prolíferas por poseer capa laminar (Thompson, 1995). Los protoescólices poseen un tamaño aproximado de 200 μm y presentan cuatro regiones morfológicas en el eje antero-posterior correspondientes al rostelo, ventosas, cuello y cuerpo, pero dado a los movimientos de evaginación-invaginación, las tres primeras estructuras son solo evidentes en la forma evaginada (**Figura 5**).

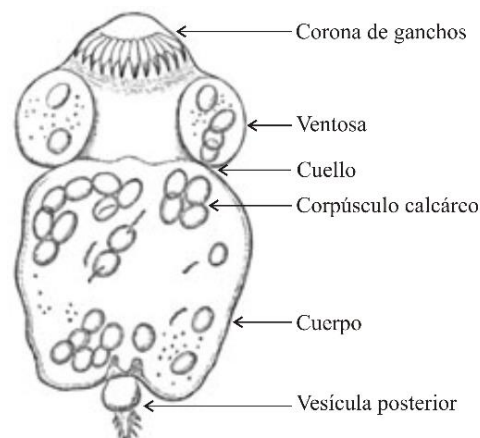


Figura 5. Protoescólex evaginado de *E. granulosus*. Modificado de Cobbold (1879).

Un proceso de gemación análogo, conduce a la formación de protoescólices dentro de cada cápsula de cría. La cápsula de cría o vesícula prolígera puede separarse del quiste principal si el tallo se rompe, en este caso puede nadar libremente en la cavidad o romperse para liberar los protoescólices, los cuales, generalmente asientan en el fondo del quiste. El crecimiento del quiste es de tipo concéntrico y expansivo, esto puede provocar estrangulamientos que originan cámaras secundarias intercomunicadas con la cavidad central, en algunos casos, separadas por septos incompletos o septos completos (Vanek, 1980; Lombardero, 1983).

1.3. Hospedador y ciclo biológico

Los hospedadores definitivos principales de *E. granulosus* son los representantes de la familia Canidae, también se citan en esta categoría de hospedador a la hiena manchada (*Crocuta crocuta*), de la familia Hyaenidae y al león (*Panthera leo*) representante de la familia Felidae (Eckert et al., 2001). El gato doméstico (*Felis catus*) sería refractario a la infección con *E. granulosus*. Estudios llevados a cabo en laboratorio y a campo han determinado que el gato no juega un rol como hospedador definitivo. Se ha demostrado que el parásito puede iniciar su desarrollo en el intestino, pero no puede completarlo hasta estadio adulto (Thompson, 1977; Thompson, 2008).

En los hospedadores intermediarios se desarrolla la forma larvaria, la cual ha sido hallada en numerosas especies animales incluyendo a los integrantes de las siguientes familias: Bovidae, Cervidae, Suidae, Equidae, Camelidae, Giraffidae, Elephantidae, Hippopotamidae y Leporidae y de los órdenes: marsupiales y primates. El ser humano participa en un ciclo yuxtapuesto que está sometido a los mismos factores de riesgo que emanan del ambiente contaminado, contrae hidatidosis al ingerir huevos del ambiente y desarrolla quiste hidatídico en distintos órganos, sin embargo, por ser un hospedador terminal o accidental no participa en la continuidad del ciclo (Eckert et al., 2001).

El ciclo biológico es de tipo indirecto, a partir de la ingesta del estadio larvario de *Echinococcus* spp. por un hospedador definitivo (carnívoros cánidos tales como perro, zorro, lobo), el cestodo adulto se desarrolla y vive adherido a la mucosa del intestino delgado con sus cuatro ventosas y una corona de ganchos queratínicos. El cuerpo o estróbilo se segmenta y el proglótido grávido se desprende y es eliminado al ambiente a partir del hospedador definitivo. Como el ciclo de transmisión es indirecto, los huevos ingeridos por los hospedadores intermediarios (-oveja, vaca, cabra, cerdo, camello, hombre) dan origen al estado larvario que crece por proliferación asexual. El embrión se libera en el estómago e intestino de un hospedador intermediario en presencia de proteínas proteolíticas y ácidos biliares, entra por las venas o los vasos linfáticos mesentéricos y se aloja en hígado, pulmón y otros órganos, estableciendo una infección denominada echinococcosis primaria. Ante una ruptura quística, los protoescólices se liberan al torrente sanguíneo del hospedador intermediario y desarrollan nuevos quistes en diferentes órganos estableciendo una infección denominada echinococcosis secundaria.

El ciclo ancestral está representado en un ciclo selvático que involucra a lobos y a cérvidos, sin embargo, la importancia de la echinococcosis producida por *E. granulosus* está directamente atribuida a factores humanos, los cuales han permitido la interacción entre el ciclo natural (selvático) y el ciclo doméstico (Eckert et al., 2001),

lo que se traduce en una perpetuación del *E. granulosus* en la variedad doméstica (**Figura 6**). El ciclo doméstico, en donde participan el perro y el ovino, es el más importante para el mantenimiento del parasitismo en las áreas endémicas de la parte meridional de América del Sur y de muchas áreas del mundo (Acha y Szyfres, 2003). El ovino es el hospedador intermediario más importante de la Echinococosis Quística, entre varias razones debido a la alta tasa de infección que caracteriza a la especie, a la elevada fertilidad de los quistes (igual o mayor al 90%), a la estrecha relación que mantiene la especie con los perros y al tipo de faena a campo abierto que se practica generalmente para consumo familiar del ganado ovino, momento en el que las vísceras suelen quedar a disposición de los perros. En América Latina, además, juegan un papel importante en el ciclo, las especies bovina, porcina y caprina debido a que también presentan tasas altas de prevalencia de quistes hidatídicos.

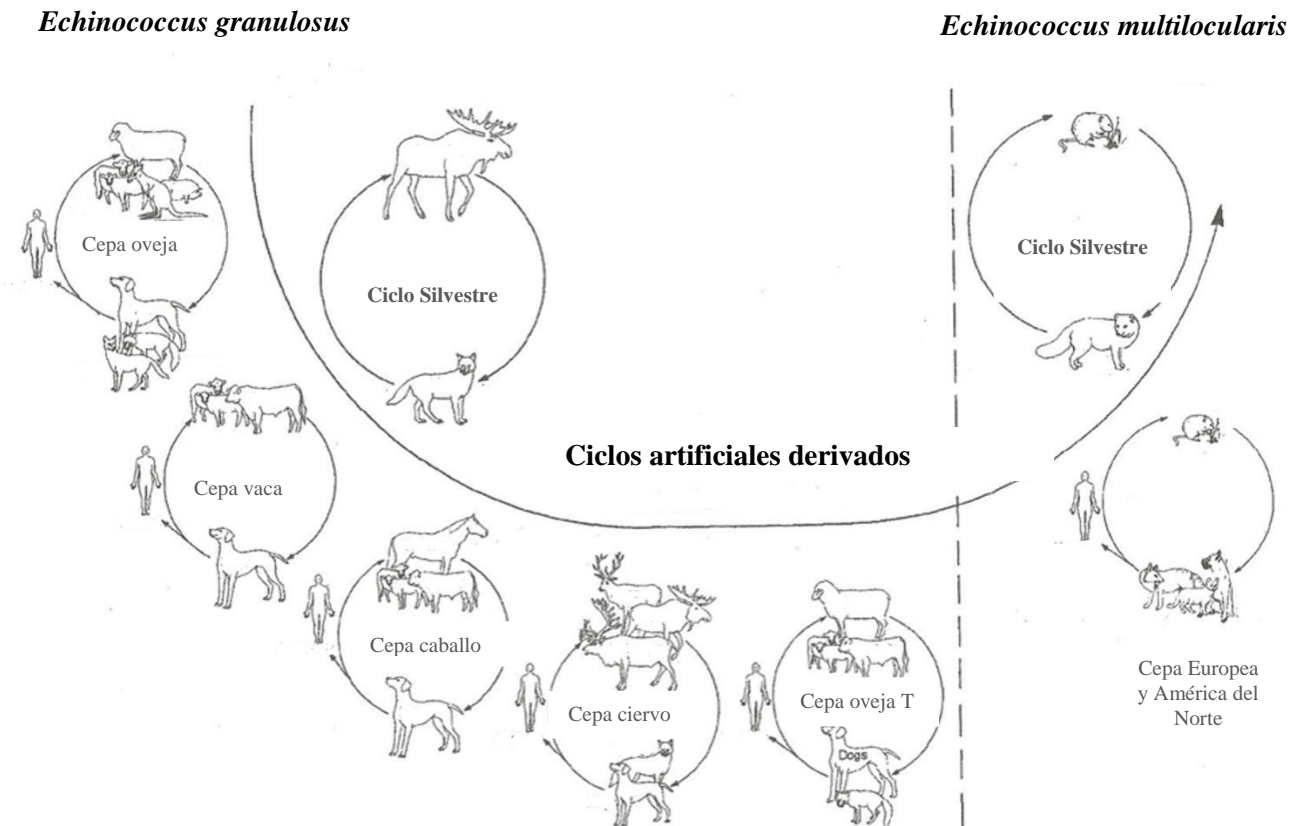


Figura 6. Ciclo silvestre y ciclos domésticos de *E. granulosus* y *E. multilocularis*. (Extraído de Eckert et al, 2001).

En el territorio argentino, el perro es el principal hospedador definitivo y junto con el ovino, instalan fuertemente el ciclo doméstico. Sin embargo, se han identificado áreas (sur de Santa Fe y Córdoba) donde el binomio más importante es el perro - cerdo; en la zona pre-cordillerana el ciclo se mantiene entre el perro y cabras, y en el área de la Puna, se presenta un ciclo entre el perro y las llamas (Guarnera, 1998). El ciclo silvestre de *E. granulosus* parecería no ser significativo, dado que la mayoría de las formas de echinococosis quística se

transmite en ciclos biológicos domésticos en los que están integrados los perros y el ganado (Beck y Pantchev, 2010).

En la naturaleza el ciclo de transmisión de *E. multilocularis* es focal y depende de la intensidad de la relación entre el zorro y el roedor. Entre los animales domésticos, solo el perro, es de fundamental importancia en la transmisión de *E. multilocularis* a las personas.

1.4. Distribución geográfica y epidemiología

La echinococcosis quística presenta una vasta distribución geográfica, con focos endémicos en todos los continentes habitados. La mayor prevalencia de esta enfermedad se presenta en zonas templadas de varias regiones de Eurasia (países mediterráneos, sur y centro de Rusia, Asia Central y China), Australia, regiones de América (especialmente Sudamérica) y norte y este de África (Grosso, et al., 2012). Si bien la echinococcosis quística se distribuye espacialmente en casi todo el territorio argentino, la distribución es heterogénea, dado que el ciclo del parásito se encuentra fuertemente establecido en seis hábitats principales. En los espacios inter - hábitats del país, la zoonosis es de baja prevalencia y se manifiesta en casos aislados (De la Sota et al., 2006). Las zonas con mayor capacidad de transmisión se consideran como focos endémicos mayores y los espacios geográficos que separan a los focos mayores constituirían las áreas endémicas menores (**Figura 7**). La diversidad geográfica y climática de los focos, ratifica que *E. granulosus* es un parásito versátil que se adapta a condiciones muy diversas de vida. Las seis áreas endémicas o focos endémicos mayores se distribuyen como:

- Foco Patagónico: incluye a las provincias de Tierra del Fuego, Santa Cruz, Chubut, Río Negro y Neuquén;
- Foco de la Pampa Húmeda: se extiende por toda la provincia de Buenos Aires, sur de Santa Fe y Córdoba;
- Foco Mesopotámico: incorpora el territorio de Corrientes ubicado al sur del río Corrientes y el norte de Entre Ríos, ubicado hasta el eje de la Paz, Federal y Concordia;
- Foco Mediterráneo: comprende a las provincias de Córdoba, Santiago del Estero y San Luis;
- Foco Cuyano: abarca toda la provincia de Mendoza y el este de San Juan; y
- Foco de Alta Montaña: comprende el área endémica de las provincias de Tucumán, Salta, Jujuy y noroeste de Catamarca (Alloa et al., 2009).

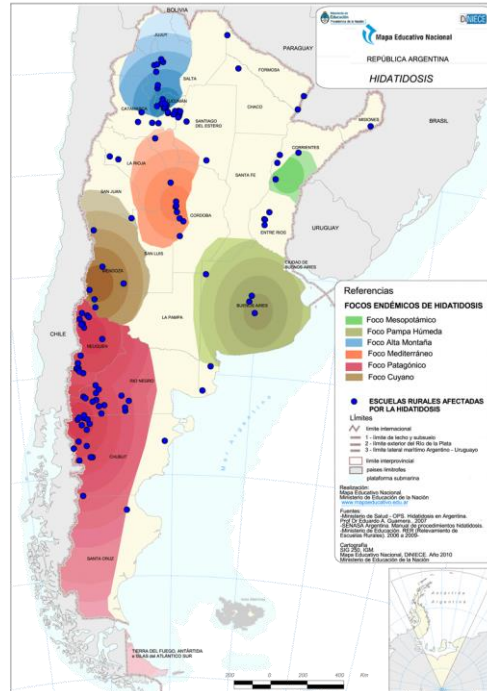


Figura 7. Focos endémicos mayores de Hidatidosis en Argentina. (Ministerio de Educación de la Nación).

La epidemiología de esta enfermedad está determinada por las condiciones propias de cada nicho ecológico, aunque la amplia adaptabilidad del parásito, así como las migraciones del hombre y de los animales, contribuye a que esta parasitosis tenga una distribución cosmopolita. Los factores epidemiológicos esenciales para el mantenimiento del ciclo estarían determinados por la presencia de hospedadores definitivos e intermediarios interactuando en una relación predador - presa, y la presencia del parásito en sus diferentes estadios. La permanencia del ciclo del parásito también depende de condiciones bioecológicas, económicas y culturales (Denegri y Cabrera Stábile, 2013).

Por otro lado, la distribución geográfica de *E. multilocularis* incluye la mayor parte del hemisferio norte con predominio de Eurasia, al este, desde Europa central hasta el estrecho de Bering, desde la costa ártica de Rusia hasta el norte de India y posiblemente el norte de África. En América del Norte, se ha establecido en doce estados contiguos y en tres provincias adyacentes de Canadá, también se han observado áreas altamente endémicas en China (D'Alessandro y Vizcaychipi, 2019).

1.5. La Echinococcosis como enfermedad crónica

Echinococcosis intestinal en los hospedadores definitivos

La presencia del *Echinococcus* spp. en general, no causa efectos en la salud de los hospedadores definitivos, incluso en individuos con infestaciones masivas (Eckert et al., 2001). Existen escasos reportes de casos clínicos de Echinococcosis en caninos y son principalmente descripciones derivadas de observaciones de

infecciones experimentales relacionadas con el estudio de la biología del parásito. *E. granulosus* penetra profundamente en las criptas de Lieberkühn adhiriéndose con sus ventosas y ganchos rostelares al epitelio intestinal de los cánidos. Se pueden presentar alteraciones menores tales como un achatamiento de las células epiteliales, infiltración celular de la mucosa y un incremento en la producción de mucus. Los productos de excreción-secreción son liberados desde la región del escólex del parásito y pueden inducir la producción de anticuerpos circulantes. Los gusanos adultos maduros se encuentran predominantemente en la porción anterior del intestino delgado de los hospedadores definitivos contrariamente a las preferencias de *E. multilocularis* que se encuentran en la región posterior. Sin embargo, en infestaciones significativas, los parásitos pueden estar distribuidos a lo largo de todas las secciones del intestino delgado. Se presume que las infestaciones masivas podrían ocasionar enteritis (Acha y Szyfres, 2003).

Echinococcosis en hospedadores intermediarios animales

Tanto en *E. granulosus* como en *E. multilocularis* la reorganización inicial de la oncosfera y la formación de las capas germinal y laminar ocurren rápidamente (aproximadamente dentro de los 14 días), la velocidad de desarrollo posterior de los metacestodos difiere marcadamente. En *E. granulosus* es lenta y variable dependiendo de factores como el genotipo del parásito, tipo de hospedador y grado de infección. Los quistes crecen en promedio de 3 a 5 cm por año (Health, 1971). El tiempo para la formación de las cápsulas de crías es variable, en ratones es de 195 días, en cerdos 10 a 12 meses, y en ovejas se reportaron rangos de 10 meses a 4 años (Gemmell, Lawson, Roberts, 1986). Los quistes hidatídicos se desarrollan en el hospedador intermediario principalmente en el hígado y los pulmones, pero pueden hallarse también en otros órganos internos incluyendo al sistema nervioso central y a los huesos. La localización y morfología del quiste hidatídico está determinada no solo por factores del hospedador sino también por factores relacionados con el parásito como la cepa involucrada. Basados en el conocimiento de la echinococcosis quística en humanos se asume que los animales pueden presentar cambios desde el punto de vista patológico relacionados con varios factores tales como, el órgano involucrado, el número y tamaño de los quistes como así también, la interacción de las estructuras adyacentes, en particular, conductos biliares, sistema vascular y árbol bronquial entre otros.

Debido a los bajos casos de presentación sintomática de echinococcosis quística en los animales, la mayoría de los metacestodos se detectan en la inspección veterinaria en los frigoríficos, en las necropsias que realizan los médicos veterinarios para identificar lesiones de algunas patologías o bien en faenas domiciliarias de los animales que se comportan como hospedadores intermediarios.

En contraste a lo que ocurre con *E. granulosus*, en *E. multilocularis* el metacestodo desarrolla rápidamente en su hospedador intermediario natural, produciendo protoescólices dentro de los 2 a 4 meses en adaptación al corto período de vida de los roedores arvicólicos que utiliza como hospedadores intermediarios. Después de esta etapa, la proliferación de las vesículas es reducida y prácticamente no hay aumento del tamaño.

Echinococcosis en humanos: diagnóstico y tratamiento

El contagio se produce por la ingestión de huevos de *E. granulosus* desde un ambiente contaminado y en el hombre se desarrolla la forma larvaria, la cual puede ubicarse virtualmente en todos los sitios anatómicos siguiendo la ingestión oral de huevos; el hígado y el pulmón son los órganos más frecuentemente afectados y más raramente, el corazón, riñón, bazo, cerebro, tiroides (0,2-2,4%) o tejido óseo (1-2,5 %) (Eckert et al., 2000). La fase inicial de la infección es casi siempre asintomática. Los quistes pequeños, bien encapsulados o calcificados en general no inducen patogenia y permanecen asintomáticos por años o de por vida. Después de un tiempo variable de incubación, en un período que puede ser de meses a años, la infección puede manifestarse y la sintomatología dependerá entre otros factores de la localización y tamaño del quiste, reportándose casos de crecimiento de hasta 50 cm, conteniendo 16 litros de líquido hidatídico (Soulsby, 1982). El cuadro clínico estará marcado por el crecimiento de los quistes y su exigencia de espacio. En caso de ruptura de los quistes hidatídicos puede producirse una dispersión del contenido de los mismos, con reacciones alérgicas que pueden conducir a un choque anafiláctico, pero a veces también puede presentar una cura espontánea (Beck y Pantchev, 2010). Está descrito que una forma de resolución espontánea puede ocurrir en el caso de ruptura de quistes hepáticos hacia las vías biliares, se origina un cuadro clínico de ictericia obstructiva por retención de vesículas y de membranas en el colédoco, pudiendo éstas pasar al intestino y salir con las heces al exterior.

El diagnóstico de hidatidosis se realiza mediante examen clínico y antecedentes epidemiológicos, técnicas de imágenes, serología o por visualización directa de protoescolices por microscopía (Brunetti et al., 2010; Mc Manus et al., 2012, Wen et al., 2019). La ecografía es el método más utilizado para el diagnóstico de la hidatidosis abdominal por su bajo costo, accesibilidad y permite la clasificación de los quistes en base al estadio evolutivo del mismo determinado por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2003). Otras técnicas de imágenes que se utilizan menos frecuentemente para el diagnóstico son la radiografía, la resonancia magnética y la tomografía computada. Si bien, las pruebas serológicas (hemoaglutinación indirecta, ELISA –*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*– y Western Blot) se utilizan ampliamente para el diagnóstico de la hidatidosis, su uso es controvertido ya que se ha reportado reacción cruzada con antígenos propios de otras helmintiasis, cirrosis hepática y ciertos tipos de neoplasias, lo cual pone en duda su especificidad (Brunetti et al., 2010; Wen et al., 2019). Por este motivo, sigue siendo necesario el desarrollo y mejoramiento de los sistemas de diagnóstico como también la identificación de nuevos biomarcadores para esta parasitosis (Vuitton et al., 2014).

Actualmente existen cuatro alternativas de tratamiento en humanos: cirugía (central en las lesiones quísticas complicadas), PAIR (Punción y Aspiración del contenido intraquístico monitoreado por ecografía, Inyección de una sustancia escolicida y Re-aspiración del líquido hidatídico inactivado), quimioterapia con benzimidazoles-metil carbamato (BZMs) y, para quistes inactivos, la modalidad de observar y esperar ("*Watch and Wait*") (Rinaldi et al., 2014). El tratamiento clínico con BZMs está indicado para los quistes inoperables, múltiples, peritoneales, diseminados y como tratamiento pre-quirúrgico para disminuir el riesgo de recidivas y facilitar la cirugía por reducción de la presión intraquística. El albendazol (ABZ), su principal metabolito

albendazol sulfóxido (ABZSO), y el mebendazol son los únicos fármacos aprobados por la FDA (“*Food and Drug Administration*”, USA), con limitaciones en su efectividad. La eficacia de estos fármacos no supera el 40%, teniendo impedimentos para el tratamiento de quistes mayores a 10 cm de diámetro y generando diferentes efectos adversos en particular durante su uso prolongado (Brunetti et al., 2010). Estos fármacos se unen directamente a la β -tubulina (Lacey, 1990) impidiendo su polimerización y causando disminución en la absorción de glucosa y depleción de glucógeno (Van den Bossche, 1986; Küster et al., 2014). La elección del tratamiento con un BZM dado o combinaciones de los mismos depende de factores como: el tamaño y localización del quiste, la viabilidad del mismo, la interacción con los tejidos del hospedador, la presencia de infecciones fúngicas y bacterianas, y la posible ruptura del quiste y consecuente diseminación de protoescolices. En las últimas dos décadas el uso del tratamiento quimioterapéutico se ha incrementado, sin embargo, debido a la baja efectividad de los BZMs en el tratamiento de este cestodo, es necesario continuar con la investigación de alternativas terapéuticas (McManus et al., 2012; Hemphill et al., 2014; Siles-Lucas et al., 2018) sumado al desafío de dilucidar procesos biológico-moleculares básicos en la biología y desarrollo del parásito que permitan proponer nuevos blancos terapéuticos.

1.6. Evidencia evolutiva de la aparición de hormonas de desarrollo e interrelación trófica de los efectos de las mismas en *Echinococcus* y el hospedador mamífero

Un ejemplo clave en la relación interespecífica parásito-hospedador, reside en el vínculo trófico que los parásitos establecen con estos organismos donde cumplen parte de su ciclo de vida. Está descrito que ciertos bio-reguladores fisiológicos como hormonas, feromonas y péptidos neuroactivos y sus correspondientes receptores y/o transductores, evolucionaron desde los organismos unicelulares (con acción autócrina y parácrina) hasta los pluricelulares (con actividad exócrina y endócrina, Stoka, 1999). Sin embargo, tanto los parásitos helmintos como los protozoos expresan solamente los receptores para ciertas hormonas presentes en los hospedadores. Esta estrategia adaptativa les permite llevar a cabo ciertas etapas fisiológicas mientras residen en el organismo que los hospeda. Las hormonas que participan en este binomio ligando-receptor parasitario, son consideradas “ancestrales” y califican como factores promotores del crecimiento en los parásitos y hospederos. Entre ellas se encuentran, moléculas lipídicas como esteroides y esteroides (estrógenos, testosterona, cortisona) y, péptidos como la insulina, glucagón, prolactina y somatomedinas. A modo de ejemplo, podemos citar, como desde un punto de vista funcional, la unidad de prolactina/receptor de prolactina ha evolucionado rápidamente sólo en vertebrados, describiéndose efectos que van desde su acción osmorreguladora en peces, promotora del crecimiento en tetrápodos, inductora de la metamorfosis en anfibios y activadora de la actividad lactogénica en mamíferos (Stoka, 1999, **Figura 8** –columna 3). En cambio, la unidad glucagón/receptor de glucagón evolucionó, con elevada especificidad entre el ligando y el receptor, entre los organismos invertebrados y vertebrados (Blundell y Humbel 1980, Stoka 1999, **Figura 8** – columna 2). Por otro lado, excluyendo sólo a los organismos autotróficos, el módulo insulina/receptor de insulina estaría presente desde procariotas a vertebrados, marcando una lenta evolución de su actividad trófica, donde un ligero cambio estructural en la hormona conlleva a cambios notables de afinidad en el

receptor de vertebrados (Stoka 1999) (**Figura 8**, columna 1). Particularmente, considerando organismos unicelulares y pluricelulares también es evidente el desarrollo a través de la somatostatina (**Figura 8**, columna 9). Al momento de esta Tesis Doctoral se desconoce la actividad funcional de estas hormonas primitivas en el estadio larvario de *E. granulosus*, desarrollándose en los tres sucesivos capítulos el efecto directo de la insulina y el glucagón e indirecto de la somatostatina humanas en el parásito.

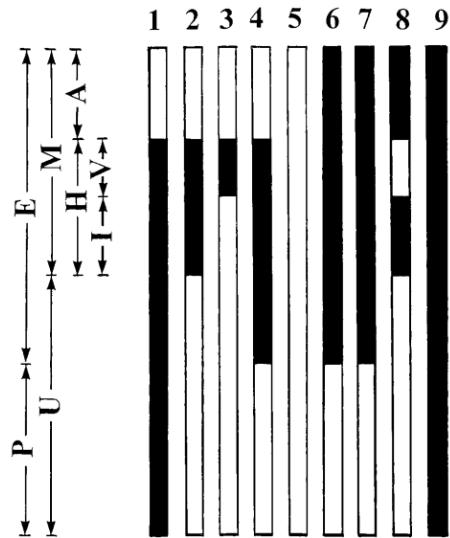


Figura 8. Distribución evolutiva de diferentes biorreguladores de desarrollo a través de los principales niveles taxonómicos. 1, insulina; 2, glucagón; 3, prolactina; 4, noradrenalina; 5, biorreguladores potenciales; 6, hormonas juveniles; 7, estradiol; 8, 20-hidroxiecdisona; 9, somatostatina. P, procariotas; E, eucariotas; U, unicelular; M, multicelular; H, heterótrofos; A, autótrofos; I, invertebrados; V, vertebrados. Barras blancas corresponde a Extinto o vías no expresadas y barras negras corresponde a la expresión de los diferentes biorreguladores a través de los niveles taxonómicos. Tomado y traducido de Stoka (1999).

Para el caso de *Echinococcus* sp., el tracto gastrointestinal de mamíferos representa un ambiente trófico común y fundamental para el desarrollo de diferentes etapas del ciclo de vida tanto en el hospedador definitivo como intermediario. De hecho, este cestodo podría aprovechar para su propio desarrollo el mismo, hormonas y productos de secreción del tracto digestivo del hospedador, incluyendo factores de crecimiento peptídico. Estos factores de crecimiento del sistema gastrointestinal modulan el desarrollo y diferenciación, actúan como mitógenos a través de la estimulación de receptores específicos sobre la superficie celular e inducen la transcripción de genes específicos en las células con dichos receptores (Podolsky, 1997). Entre ellos se incluyen miembros similares a la insulina (factores de crecimiento tipo insulina -IGF1 e IGF2-) y factores de crecimiento específicos: epidérmico (EGF), fibroblástico (FGF), del hepatocito (HGF), factor transformante β (TGF- β) y citoquinas (IL-1, IL-2, IL-4, IL-15 e interferón gamma). Dichos factores de crecimiento no están codificados en el genoma de *Echinococcus* sp. (Tsai et al., 2013; Zheng et al., 2013) pero sí se identificaron en el genoma los genes que codificarían para los receptores específicos de estos ligandos peptídicos (Konrad et al., 2003; Spiliotis et al., 2006) los cuales fueron propuestos como blancos terapéuticos en ensayos de farmacología experimental (Hemer y Brehm, 2012; Zheng et al., 2013). En línea con estos antecedentes, receptores nucleares involucrados en las vías de señalización sensibles a esteroides se conservan desde invertebrados hasta los mamíferos y regulan el metabolismo y desarrollo de estos

organismos (Tzertzinis, et al. 2010; Romano y Gorelick, 2018). De hecho, en este grupo de trabajo, se ha demostrado la acción antiechinococcósica del tamoxifeno, un antagonista competitivo de receptores de estrógeno, asociándose dicho efecto farmacológico a la interrupción de las vías de señalización a través de receptores esteroideos presentes en protoescólices y metacestodos de *E. granulosus* (Nicolao et al., 2014). Por otro lado, debe destacarse que el parásito cuenta con vías de transducción de señales que promueven su desarrollo como ErbB, Wnt, Notch y Hedgehog (Zheng et al., 2013, Sikes y Newmark, 2013), igualmente favorecidas por el intercambio de señales tróficas recibidas desde el hospedador de la misma manera que fue descrito para *Schistosoma japonicum* (Zheng et al., 2013).

Tanto en el hospedador mamífero como en los parásitos, estas hormonas se vinculan con sus receptores, los cuales al ser activados ponen en marcha una serie de pasos que transmiten señales de cambio a la célula. Estos cambios intracelulares se denominan vías de transducción de señales, y componen una cascada secuencial de modificaciones bioquímicas y moleculares que activan o inhiben cambios metabólicos y génicos mediados por proteínas, reacciones de fosforilación/desfosforilación y cambios en mensajeros secundarios como el AMPc, los derivados de fosfolípidos (fosfatidil-inosítidos), y el ión calcio. Estas reacciones en cadena conducen finalmente a una respuesta celular que implica un cambio en las características o el comportamiento de la célula.

1.7. Características fisiológicas y ultraestructurales de *Echinococcus*

El parasitismo de los platelmintos está basado en una interacción nutricional entre el hospedador y el parásito que involucra una transferencia unidireccional de nutrientes a través de la superficie externa o tegumento sincicial. Este cestodo se desarrolla en un individuo adulto en presencia de altas concentraciones de ácidos biliares y hormonas gastrointestinales, condición que se cumple en el intestino de los cánidos carnívoros (Clarkson y Walters, 1991; Constantine et al., 1998). El tegumento, presente tanto en las formas adultas como larvarias (protoescólices y metacestodos), es de fundamental importancia fisiológica para el parásito, ya que permite no sólo la captación de nutrientes sino también la eliminación de desechos (**Figura 9**).

En protoescólices, el tegumento está organizado en dos zonas separadas por una lámina basal, el citoplasma distal superficial con numerosas mitocondrias, gránulos y vesículas, que dan cuenta del activo proceso de endocitosis y exocitosis a nivel transcelular, y el citoplasma perinuclear, más interno que contiene cuerpos lipídicos, grandes depósitos de glucógeno, aparato de Golgi y el retículo endoplasmático rodeando a los núcleos (**Figura 9A**). Por debajo del citoplasma distal, se observan capas musculares longitudinales y circulares y a continuación la zona citoplasmática perinuclear. Ambas regiones del tegumento son responsables de la generación de las vesículas y gránulos y de la coordinación en la comunicación con el hospedador (Oaks y Holy, 1994). En la larva, la membrana plasmática apical del tegumento está compuesta por microtriquias, que son evaginaciones de la membrana externa y el citoesqueleto, de número y forma variable, especializadas en la amplificación de la superficie de absorción y digestión. Cubriendo externamente el tegumento, es evidente una capa de mucopolisacáridos y glicoproteínas producido por el parásito denominada glicocáliz, con capacidad de concentrar

iones permitiendo la unión y activación de enzimas del hospedador (como amilasas, que permiten la degradación de azúcares complejos) y del parásito (fosfatasa ácida y alcalina, disacaridasas y esterasas) que participan en la digestión de macromoléculas desde el exterior del cuerpo del parásito (Rosenzvit et al., 2006).

En el caso de los metacestodos, el tegumento sincicial es la parte más externa de la capa germinal, constituye la interfaz entre la capa germinal y laminar, y también representa un sitio de intercambio con el hospedador. La capa germinal expone hacia el exterior la membrana plasmática apical del tegumento, con microtriquias truncadas (**Figura 9B**) incrustadas hacia la capa laminar, y hacia interior del quiste posee tejido conectivo y células no sinciciales, especialmente células indiferenciadas, células de almacenamiento de glucógeno (GSC “*Glycogen-Storage Cells*”) y musculares, que se organizan hacia el interior del quiste sin complejos de unión intercelulares (**Figura 10**), de forma tal que el líquido intercelular continúa con el líquido intraquístico (Lascano et al., 1975; Siracusano et al., 2012). Se ha descrito la liberación de pequeñas vesículas a partir de estas microtriquias mediante microscopía electrónica de transmisión (**Figura 9C**, Lascano et al., 1975), y también se constató la generación de nanovesículas tipo exosomas que pudieron atravesar la capa laminar de metacestodos de *E. granulosus* (Nicolao et al., 2019), ambos tipos de vesículas parasitarias podrían estar involucradas en la liberación o captación de metabolitos, proteínas y ARN en la interfase parásito-hospedador.

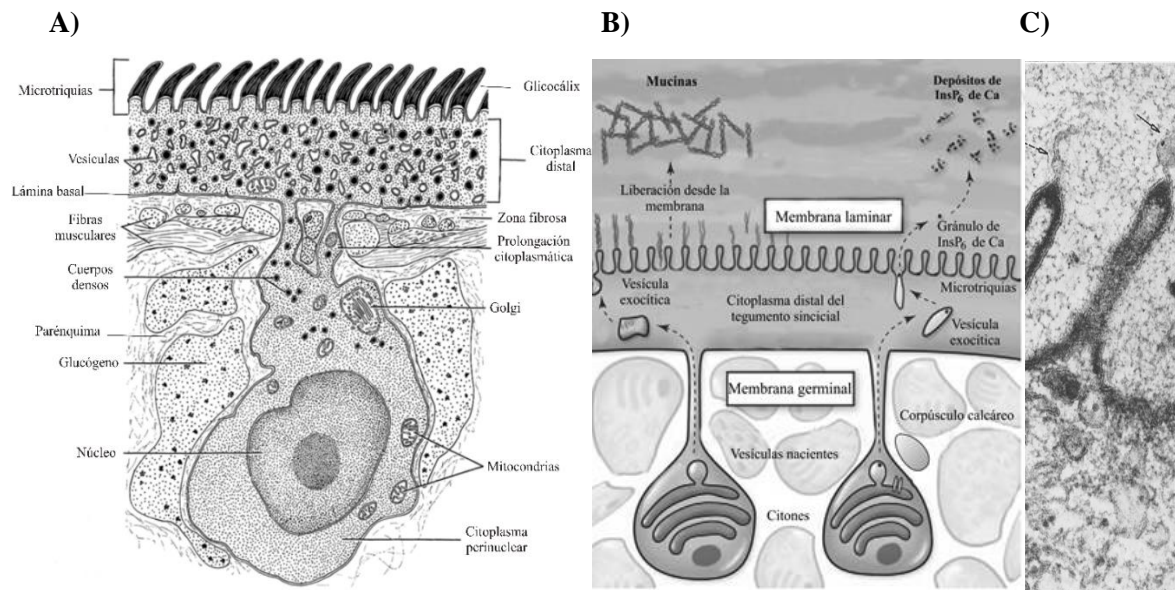


Figura 9. Esquema de la ultraestructura del tegumento sincicial de los cestodos. A) Tegumento de protoescólices. B) Metacestodos. C) Vesícula parasitaria protruyendo del extremo de microtriquias hacia la capa laminar. El tegumento, constituido por células sinciciales, presenta un citoplasma distal rico en mitocondrias y vesículas de transporte, y un citoplasma proximal con núcleos, organelas, corpúsculos calcáreos, y depósitos de glucógeno. A- Modificado de Morseth (1967). B- Modificado de Díaz et al. (2011). C- Tomado de Lascano et al. 1975.

El parásito captura diferentes tipos de macromoléculas del hospedador a través del tegumento, el cual cuenta con alta densidad de transportadores de aminoácidos, nucleósidos, ácidos grasos, colesterol, monosacáridos, factores de crecimiento y de diferenciación celular. De esta forma varios transportadores aniónicos, receptores

nucleares y de membrana del parásito participan de las señales celulares mediadas por compuestos lipofílicos y peptídicos del hospedador, los cuales podrían contribuir al desarrollo parasitario (Zheng et al., 2013).

Un aspecto central en la biología y fisiología de los cestodos es la presencia de una población de células somáticas totipotentes denominadas neoblastos o células germinales, las cuales representan la única población de células proliferativas responsables del crecimiento, regeneración y plasticidad de estos parásitos (**Figura 10**; Koziol et al., 2014). Se toma como referencia la imagen de *E. multilocularis* dado que es en la especie que fue detalladamente estudiado. Estas células indiferenciadas son las más pequeñas de la capa germinal (5-10 μm), poseen 1-3 nucléolos, se consideran centrales en las transiciones entre las diferentes formas desarrolladas mediante proliferación asexual, y han sido localizadas en la capa germinal de los metacestodos (donde permitirían la formación de protoescólices), en el cuello de los parásitos adultos (las cuales dan lugar a los proglótidos nuevos) y en las oncósferas (Sakamoto y Sugimura, 1970; Swiderski, 1983; Koziol et al., 2014).

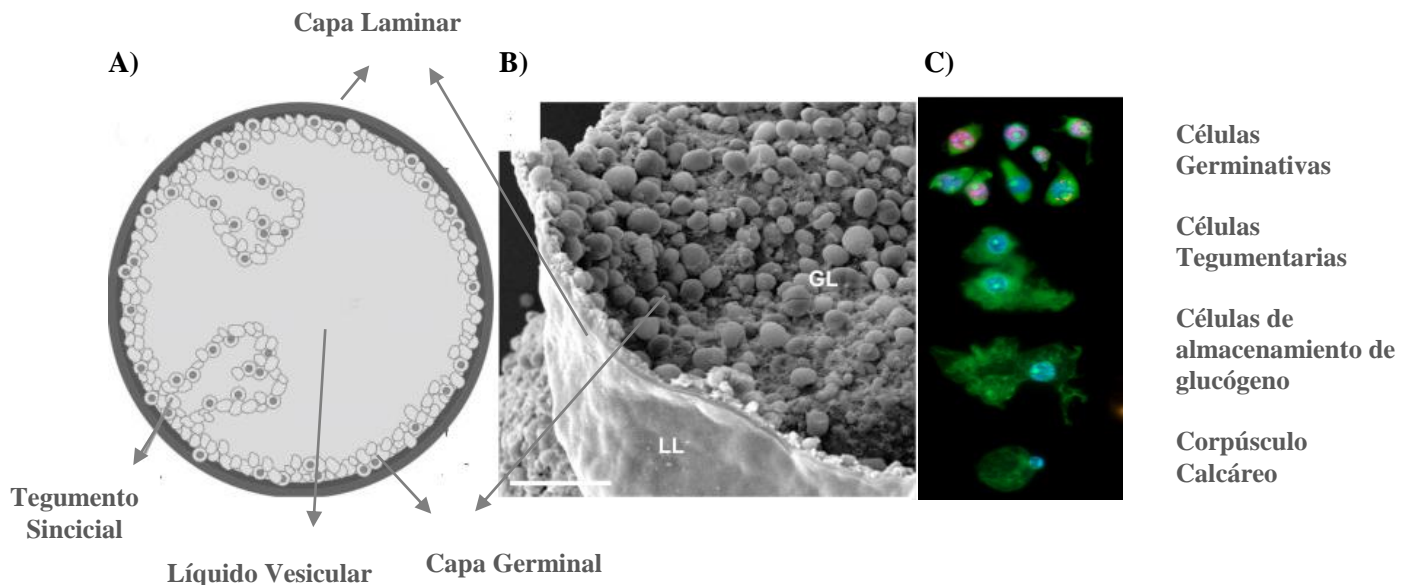


Figura 10. Estructura de los metacestodos de *E. multilocularis*. A) Representación esquemática de un metacestodo. B) Micrografías electrónicas de barrido de metacestodos de *E. Multilocularis* identificando la capa germinal (GL) y la capa laminar (LL). Tomado de Lundström-Stadelmann et al., 2019. C) Tipos celulares identificados mediante histoquímica a partir de cultivos primarios de células de la capa germinal (Tomado de Koziol et al., 2014). Núcleos teñidos de azul (4',6-diamidino-2-fenilindol –DAPI–, que tiñe específicamente el ADN) y citoplasmas de verde (Thermo Scientific Cellomics™ -WCS-).

Recientemente, se demostró que las células germinales de metacestodos de *E. multilocularis* son similares en función y morfología a los neoblastos de otros plathelminths, pero poseen diferencias significativas en el patrón de expresión de genes y en la pérdida de reguladores típicos de células madres, sugiriéndose que existen diferencias importantes en su fisiología y que podrían estar relacionadas a la biología exclusiva del estadio larvario (Koziol et al., 2014). Si bien no han sido identificadas las células a partir de las cuales se produce la de-diferenciación de los protoescólices hacia la forma quística, se conoce que este proceso puede darse tanto por la vesicularización de protoescólices (invaginados o evaginados), como a partir de las vesículas posteriores derivadas del pedúnculo que une los protoescólices a la vesícula prolífera o inclusive de las cápsulas prolíferas invertidas (**Figura 11**; Rogan

y Richards, 1986). La totipotencialidad de las células de la capa germinal de metacestodos también ha sido puesta en evidencia tanto en *E. multilocularis* como en *E. granulosus*, a través del establecimiento de cultivos primarios a partir de células de la capa germinal, pudiéndose generar metacestodos completos o agregados celulares, respectivamente (Spiliotis et al., 2008; Albani et al., 2010).

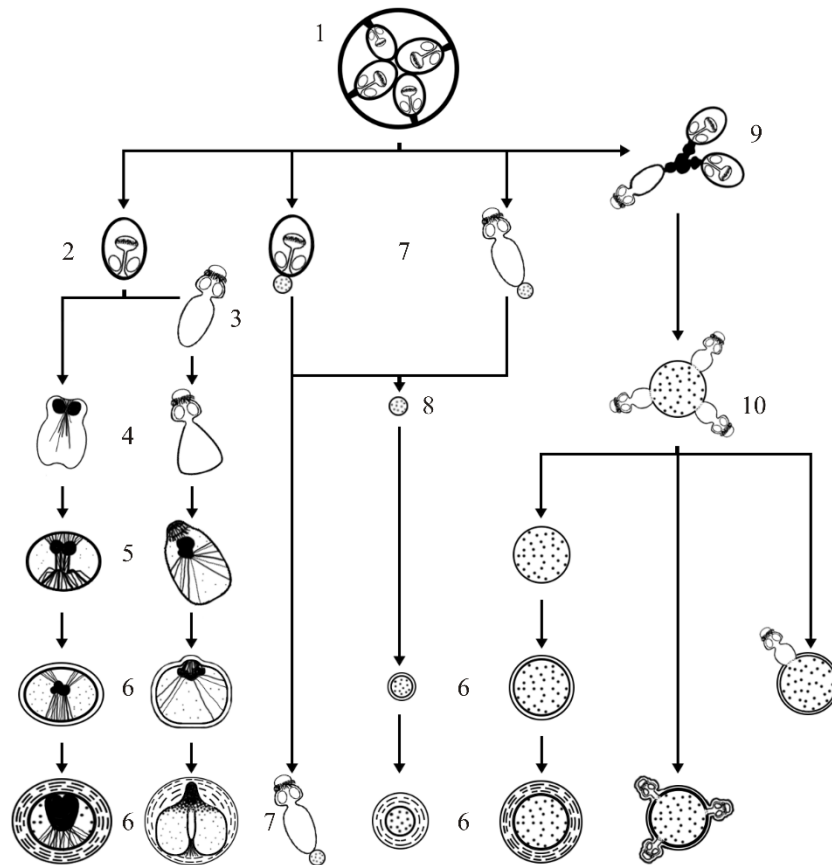


Figura 11. Diagrama de los distintos mecanismos involucrados en el desarrollo de quistes durante el cultivo de protoescólices de *E. granulosus*. 1. Cápsula prolífera con protoescólices. 2. Protoescólex invaginado. 3. Protoescólex evaginado. 4. Protoescólices vesicularizados. 5. Pre-microquistes. 6. Microquistes. 7. Protoescólices con vesícula posterior. 8. Vesícula suelta. 9. Protoescólices unidos por el pedúnculo a la cápsula prolífera invertida. 10. Protoescólices unidos a cápsula prolífera invertida y regenerada. Modificado de Rogan y Richards (1986).

El desarrollo bidireccional característico de las larvas o protoescólices de *Echinococcus* sp., demuestra la capacidad de originar por vía sexual un individuo adulto en el tracto gastrointestinal del hospedador definitivo, y por vía asexual, un quiste secundario en el hospedador intermediario, ambos procesos promovidos por acción de componentes identificados en el hospedero mamífero como los ácidos biliares (Smyth, 1990; Jura et al., 1996), estímulo de receptores nucleares específicos (Zheng et al., 2013) y acción trófica de hormonas y citoquinas (Brehm y Koziol, 2017).

Otro rasgo característico de los cestodos es la presencia de células parenquimáticas altamente diferenciadas denominadas “corpúsculos calcáreos”, las cuales representan el 14% del peso seco del estadio larvario y desaparecen durante el proceso de desarrollo del adulto en los primeros días de infección. Estas células

se caracterizan por el depósito de calcio, magnesio y fosfato en láminas concéntricas, constituyendo estructuras biomineralizadas cuya función aún no ha sido establecida. Sin embargo, se ha sugerido que los mismos podrían estar involucrados en la bioacumulación y detoxificación de metales pesados, en la protección del tejido del cestodo contra la calcificación, como también en el reservorio de calcio y fosfato como fuente de energía (McCullough y Fairweather, 1987; Smith y Richards, 1993; Chalar et al., 2013). Resulta interesante destacar, que ha sido propuesto mediante observaciones por microscopía electrónica que la formación de corpúsculos calcáreos en cestodos sería generada por actividad autofágica (**Figura 12**) (Rogan y Richards, 1986; McCullough y Fairweather, 1987) estos resultados fueron confirmados por inmunolocalización de la proteína Atg8, marcador del proceso de autofagia por Loos et al., 2014.

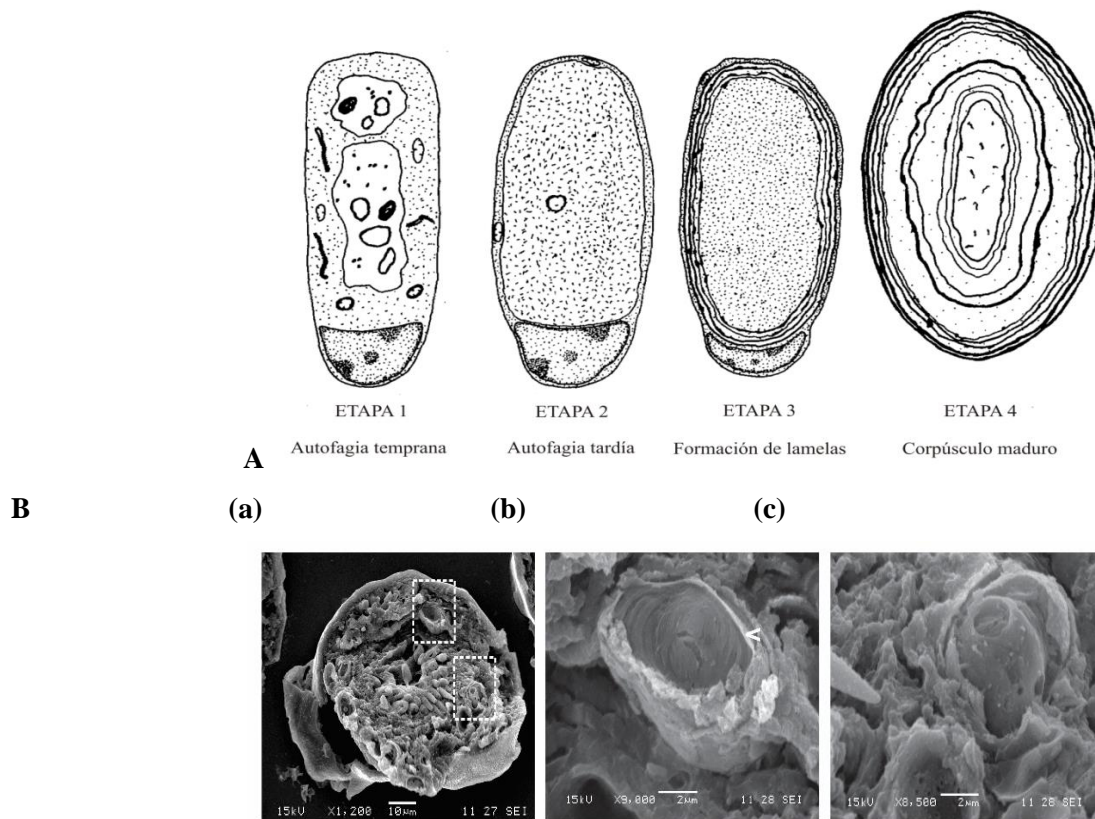


Figura 12. A. Etapas de la formación de los corpúsculos calcáreos. La primera etapa comienza con la digestión por autofagia del citoplasma de una célula parenquimática, produciendo, una vacuola central. En la segunda etapa se observa una capa fina de citoplasma y núcleo marginal. En la tercera etapa, el Ca^{+2} se deposita sobre las lamelas concéntricas hasta que se pierden el citoplasma y el núcleo, dando lugar a la última etapa correspondiente al corpúsculo maduro. Tomado y traducido de McCullough y Fairweather (1987). B. Ultraestructura de corpúsculos calcáreos de protoescólices de *E. granulosis*. (Los recuadros son las magnificaciones de b) y c)). Imágenes de microscopía electrónica de barrido de (a) un protoescólex seccionado transversalmente y sus corpúsculos calcáreos en diferentes etapas del desarrollo: (b), células en estado inicial de desarrollo con una cavidad central que ocupa toda la célula (indicada con punta de flecha) y en (c), corpúsculo maduro con membranas concéntricas. Tomado de Loos et al., 2014.

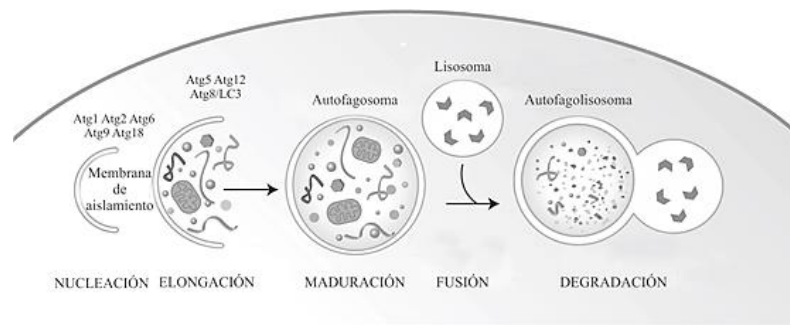
1.8. Características metabólicas de *Echinococcus* sp., blanco para la actividad terapéutica de fármacos

A lo largo de la evolución, los cestodos también han experimentado una extensa reducción en la capacidad metabólica en general, al tiempo que han adquirido una mayor capacidad para absorber nutrientes en comparación con organismos de vida libre (Tsai et al., 2013). Estos parásitos helmintos poseen caminos enzimáticos abreviados, son anaerobios facultativos y cuentan con un sistema de oxidación incompleta de carbohidratos (McManus y Smyth, 1982). Sus logros energéticos son mínimos y excretan grandes cantidades de ácidos orgánicos parcialmente oxidados (tales como lactato, propionato, etanol, succinato, acetato y piruvato) que acidifican el lumen intestinal, favoreciendo la captura de hexosas respecto del hospedador (Agosin y Repetto 1961, McManus y Bryant, 1995, Ritler et al., 2019). La glucosa es absorbida activamente por el tegumento y convertida en glucógeno o metabolizada directamente por la vía glucolítica de Embden-Meyerhof a fosfoenolpiruvato (PEP), el cual puede ser reducido por fermentación homoláctica o dismutación málica (Agosin y Repetto, 1961, Agüero et al., 2004; Cui et al., 2013) (**Figura 13**). El ciclo de ácidos tricarboxílicos es poco activo, y las enzimas lactato-dehidrogenasa (LDH, por la fermentación homoláctica) y malato-dehidrogenasa NAD-dependiente (MDH, responsable de la dismutación málica) son las enzimas limitantes en el metabolismo intermediario de estos helmintos (Barrett, 1981; Agüero et al., 2004). A expensas de la dismutación málica (que cataliza reacciones inversas al ciclo de los ácidos tricarboxílicos), estos parásitos pueden obtener una producción neta de ATP mayor que la obtenida por la fermentación homoláctica. En este sentido, una de las características más sobresalientes del metabolismo energético de los cestodos es la coexistencia de fermentación y respiración aeróbica dada la presencia de los complejos respiratorios I, II, III y IV, (Bryant, 1993, Parkinson et al., 2012, Enkai et al. 2020). Particularmente, la capa germinal posee una alta actividad metabólica, implicada en la producción de la capa laminar y cápsulas prolíferas, sostiene un metabolismo basado en la fermentación homoláctica y dismutación málica con grandes demandas de energía y metabolitos, provistos principalmente por el efecto Warburg, mediante el cual las células en proliferación facilitan la captación e incorporación de nutrientes a la biomasa (Parkinson et al., 2012; Enkai et al., 2021).

En *Echinococcus* sp., el almacenamiento de hidratos de carbono constituye la base metabólica para la producción de energía (McManus y Smyth, 1982). El glucógeno es el principal polisacárido utilizado tanto en células parenquimáticas y musculares del parásito adulto (20-50% del peso seco) como de las formas larvarias (Xiao et al., 1994) y la glucosa es el metabolito de mayor consumo, tanto para protoescolices como para metacestodos (Ritler et al., 2019), pero se desconocen al momento, los mecanismos implicados en el control del metabolismo basal del carbono en cestodos. Estos parásitos también poseen un sistema de transporte de glucosa muy activo, con transportadores capaces de captar el monosacárido incluso a concentraciones muy bajas.

levaduras, de los cuales 18 (Atg1-18) son altamente conservados con los metazoos superiores incluido *Echinococcus* sp., constituyendo la maquinaria básica para la biogénesis de la vesícula de degradación (Loos et al., 2014). Este grupo de investigación describió el proceso autofágico a nivel basal en el estadio larvario de *E. granulosus* y la inducción farmacológica permanente del flujo autofágico (bajo tratamiento con trióxido de arsénico, rapálogos, inhibidores de PI3K e inhibidores del proteasoma) con consecuente inducción de mortalidad en el cestodo, dando cuenta del solapamiento entre las vías de señalización que regulan la autofagia con el control del crecimiento celular, la proliferación, supervivencia y muerte celular. Este proceso degradativo es clave en el mantenimiento de la homeostasis intracelular durante la privación de nutrientes y en situaciones de estrés (particularmente en células quiescentes) porque está involucrado en el reciclaje de los componentes celulares para compensar la limitación de metabolitos y energía. Por todo lo expuesto, tanto la glucosa, como el glucógeno y la actividad autofágica son fundamentales para sostener el metabolismo parasitario en *Echinococcus* permitiendo su desarrollo (Loos et al., 2021).

A



B

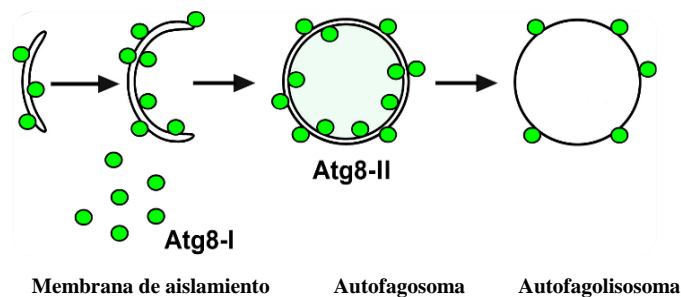


Figura 14. Representación esquemática de las etapas de la autofagia y seguimiento por microscopía confocal. A. En la etapa de iniciación del proceso autofágico se induce la formación de la membrana de aislamiento involucrando a proteínas regulatorias tales como Atg1, Atg2, Atg6, Atg9 y Atg18. Seguidamente la formación de complejos proteicos que involucran a las proteínas Atg5-Atg12 y Atg8/LC3 necesarias para la expansión de la membrana autofagosomal y fusión con el lisosoma. En esta etapa se induce la asociación de Atg8/LC3 a la membrana autofágica en expansión (Atg8II/LC3II). El autofagosoma conteniendo porciones de citoplasma y organelas dañadas se fusiona con un lisosoma dando lugar al autofagolisosoma donde ocurre la degradación y reciclado del contenido de la vesícula. Modificado de http://www.wormbook.org/chapters/www_autophagy/autophagy.html. B. Marcación y seguimiento por inmunofluorescencia indirecta mediante microscopía confocal *in situ* (*in toto*) de la proteína LC3=Atg8, cuyo aumento o patrón de fluorescencia se utiliza como marcador de inducción de autofagia. Detalle del procesamiento de Atg8-I (LC3-I) hasta su lipidación como Atg8-II (LC3-II), se elonga la membrana de aislamiento rodeada de Atg8-II hasta envolver todo el contenido citoplasmático a degradar. Un paso clave en este proceso es la fusión del lisosoma con el autofagosoma generando el autofagolisosoma, vesícula en la que por la acción de hidrolasas ácidas ocurre la degradación de macromoléculas y su reciclado.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Estudiar la interrelación parásito-hospedador involucrada en el desarrollo de la forma larvaria de *Echinococcus* sp. durante el establecimiento de la echinococcosis secundaria, considerando el efecto trófico de los factores de crecimiento y hormonas gastrointestinales recibidas desde el hospedador que pudieran modificar la división y diferenciación celular, como también la capacidad de utilización de glucosa por parte del parásito.

2.2. Objetivos particulares

- A- Evaluar los efectos de diferentes factores de crecimiento peptídicos sobre el grado de vitalidad, los cambios a nivel ultraestructural y el estado metabólico de protoescolices y quistes de *E. granulosus*, durante el tratamiento farmacológico *in vitro*.
- B- Analizar la modificación en la expresión de proteínas estructurales, metabólicas e involucradas en vías de señalización intracelular dependientes de la homeostasis energética de glucosa frente a la modulación exógena con hormonas antagónicas (insulina/glucagón), y su relación con el nivel de los metabolitos de reserva (glucógeno y lípidos) en el parásito.
- C- Describir las vías de señalización celular involucradas en el desarrollo larvario de *Echinococcus* sp. en sistemas libres de células del hospedador (protoescolices y metacestodos), a partir de la identificación de los pares funcionales hormona trófica del hospedador-receptor específico del parásito.

2.3. Hipótesis sustantiva

La hipótesis sustantiva de este trabajo está contemplada en la formulación del objetivo general y contenida en su totalidad en las dos primeras hipótesis de trabajo. Por lo que podemos enunciarla de la siguiente manera: La interrelación biológica de *Echinococcus* sp. con sus hospedadores mamíferos, establece en primer término una dependencia directa de componentes tróficos y de desarrollo provistos por el hospedador sumado a una adaptación metabólica del parásito para regular la captura de nutrientes y la generación de energía a expensas del entorno celular del órgano blanco, el cual a su vez se ve afectado por la secreción/excreción de macromoléculas del parásito requeridas para modular los procesos antedichos.

2.4. Hipótesis de trabajo

- i) El parásito utiliza los componentes tróficos del hospedador para su desarrollo, proliferación y diferenciación.
- ii) Las vías de señalización involucradas en el desarrollo y crecimiento parasitario dependen de la regulación y del control metabólico del cestodo a expensas de nutrientes claves provistos por el hospedador.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención de muestras biológicas y métodos de cultivo del estadio larvario de *Echinococcus* sp.

3.1.1. Extracción de protoescólices de *E. granulosus*

Los protoescólices de *E. granulosus* fueron recolectados a partir de quistes hidatídicos de pulmón y/o hígado de bovinos (*Bos taurus*). El material biológico fue suministrado por frigoríficos ubicados en el Partido de General Pueyrredón y en la ciudad de Casilda (Departamento Caseros) de las provincias de Buenos Aires y Santa Fe, respectivamente. Las vísceras fueron recogidas el mismo día de la faena y transportadas al laboratorio dentro de un plazo no mayor a 3 h. La manipulación de las vísceras se realizó de acuerdo a normas de bioseguridad de nivel 1, como internacionalmente se establece para el estadio larvario de cestodos (EPA/530-5W-86-014) y bajo condiciones de estricta esterilidad (Aprobación Cicual UNMDP RD 2555/08/14, RD 483/17, RD 80/22). En el laboratorio se realizó la desinfección con alcohol yodado del sector del órgano donde se encontraba el metacestodo y se procedió a la divulsión del mismo para separarlo del tejido pulmonar o hepático (**Figura 15 A**), posteriormente se realizó punción y extracción del líquido hidatídico con aguja y jeringa (**Figura 15 B**) reduciendo el contenido líquido del quiste (Cumino et al., 2009).

A)



B)

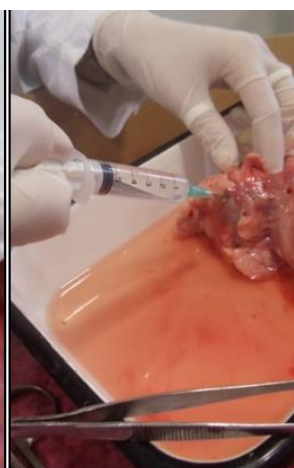


Figura 15. Quiste hidatídico divulsionado de pulmón (A). Obtención del líquido hidatídico (B).

A continuación, se procedió a la incisión de la capa laminar mediante el uso de bisturí o tijeras y a la extracción de la membrana germinativa utilizando pinzas (**Figura 16 A-B**).

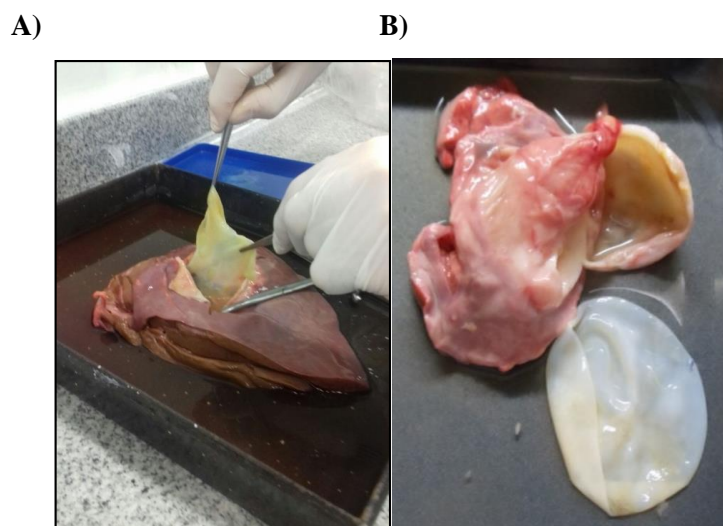


Figura 16. Extracción de la capa germinativa de un quiste hidatídico de hígado (A) y de pulmón (B).

En todos los casos, la membrana germinativa fue colocada en placas de Petri (**Figura 17**) para poder obtener la mayor cantidad de protoescolices, los cuales fueron lavados varias veces con PBS (pH 7,5 a 4°C), recogiendo aquellos que sedimentaron rápidamente (3 a 5 min), debido a que los protoescolices muertos demoran su sedimentación y son eliminados en el sobrenadante.

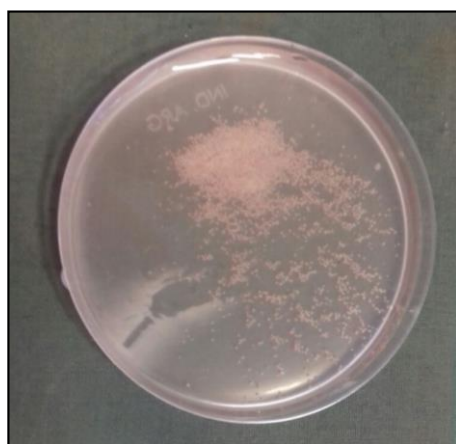


Figura17. Líquido hidatídico con numerosos protoescolices (arena hidatídica).

La vitalidad de los protoescolices fue evaluada mediante observación al microscopio invertido, considerando conservación de morfología, integridad de membranas, presencia de abundantes corpúsculos calcáreos y movilidad. También se realizó tinción vital con azul de metileno (se agregó 50 µl de azul de metileno -0,01% p/v disuelto en agua- a 50 µl de suspensión de protoescolices) durante 2-3 min (Pauluzzi, et al., 1964; Elissondo et al., 2004; Cumino et al., 2009) (**Figura 18**).

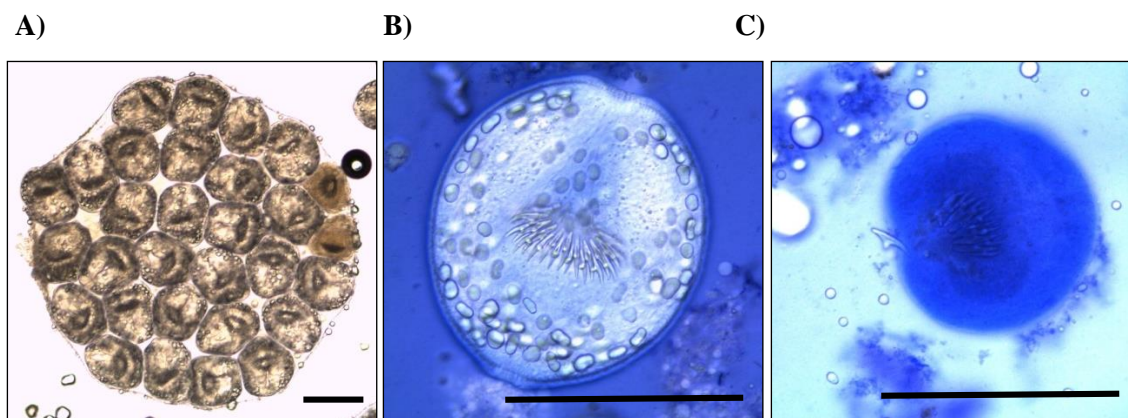


Figura 18. Cápsula de cría con protoescólices con morfología conservada y refringencia de corpúsculos calcáreos X 100(A). Protoescólex vital X 400 (B). Protoescólex no vital X 400 (C). Barra 200 μ m.

3.1.2. Obtención de metacestodos de *E. granulosus*

La obtención de metacestodos de *E. granulosus* se realizó posteriormente al establecimiento de hidatidosis secundaria en ratones CF-1 (modelo animal para enfermedades infecciosas). Cada ratón fue infectado intraperitonealmente con 1500 protoescólices en 0,5 ml de PBS suplementado con antibióticos (Loos et al., 2014). Los animales fueron mantenidos en el bioterio bajo condiciones ambientales controladas hasta el desarrollo de los quistes (6 meses post-infección). Inmediatamente se realizó la necropsia, los quistes presentes en la cavidad peritoneal fueron removidos cuidadosamente y mantenidos en cultivo *in vitro* para posteriores experimentos farmacológicos o bioquímico-moleculares (**Figura 19**). La viabilidad de los quistes fue evaluada mediante observación al microscopio invertido, considerando como criterio de viabilidad la turgencia del quiste y la integridad de la capa germinal.

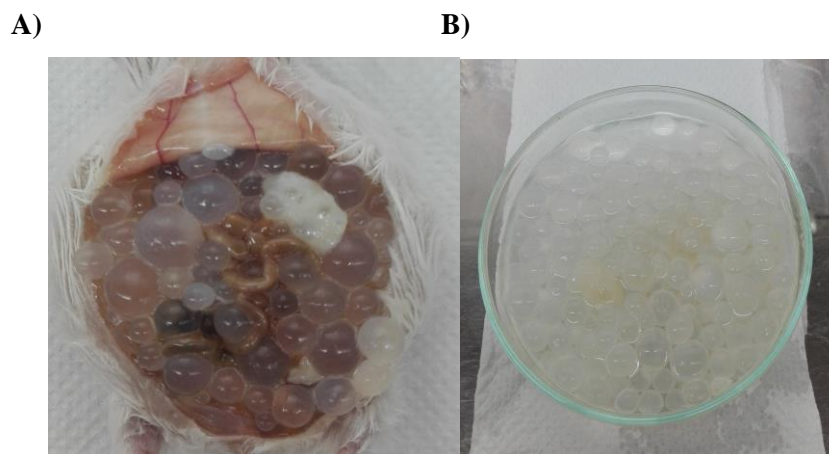


Figura 19. Quistes hidatídicos desarrollados en cavidad peritoneal y abdominal de un ratón (A). Placa de Petri con la totalidad de quistes separados del ratón y lavados con PBS (B).

3.1.3. Cultivo *in vitro* del estadio larvario de *E. granulosus*

El medio de cultivo utilizado para mantenimiento de los protoescólices y metacestodos fue M199 (Gibco), suplementado con estreptomicina 100 $\mu\text{g/ml}$, gentamicina 50 $\mu\text{g/ml}$, penicilina 60 $\mu\text{g/ml}$, glucosa 4 mg/ml (25 mM) y HEPES 100 mM pH 7,5. Los parásitos fueron distribuidos en alícuotas de 3000 protoescólices (20 μl) por cada 2 ml de medio de cultivo (Cumino et al., 2009; 2010). Por otro lado, metacestodos de 3 a 8 mm fueron distribuidos en tubos Leighton de vidrio con tapón de goma. Por cada 10 ml de medio de cultivo se colocaron 10 a 15 quistes. Las pruebas de mantenimiento se llevaron a cabo en placas multipozos (24 pocillos) o en tubos Leighton de vidrio con tapón de goma (**Figura 20**). El mantenimiento del estadio larvario se realizó a 37° C en condiciones estables de pH 7-7,4. El medio de cultivo fue renovado cada 3-4 días para eliminar los desechos tóxicos excretados por los parásitos, reemplazar los nutrientes y renovar el fármaco durante los tratamientos farmacológicos prolongados (Loos et al., 2014).

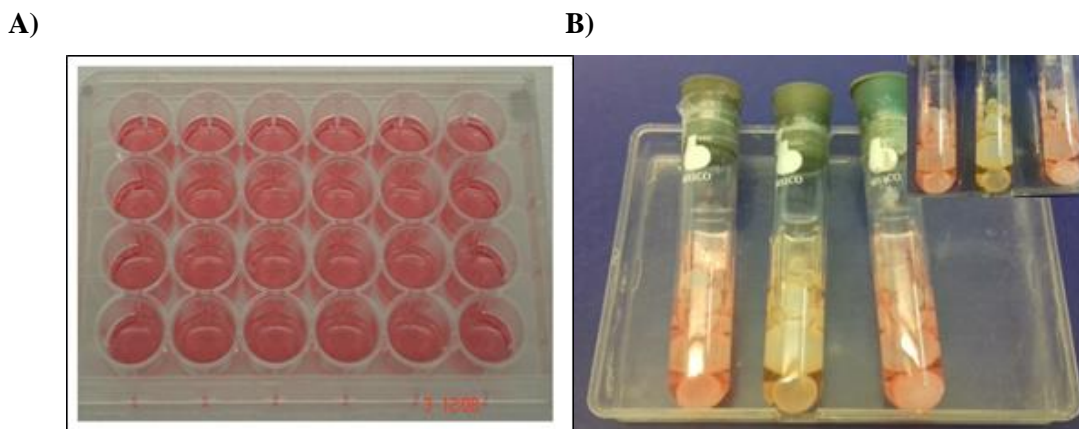


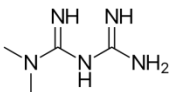
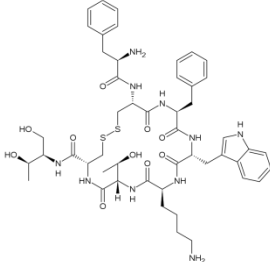
Figura 20. Mantenimiento *in vitro* de protoescólices en placa multipozos (A) y metacestodos en tubos Leighton (B).

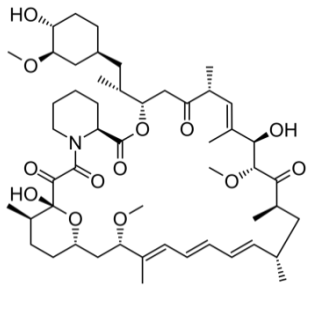
3.2. Tratamiento farmacológico *in vitro* del estadio larvario de *E. granulosus*

Los protoescólices y metacestodos mantenidos *in vitro* recibieron tratamientos con diferentes fármacos u hormonas del hospedador durante 24 h a 72 h a 37° C. Fueron ensayadas hormonas que en el hospedador participan de la modulación de glucosa celular como: insulina (0,1 UI/ml, regulador del estado de exceso de nutrientes, anabólica, hipoglucemiante y lipogénica) y glucagón (0,05 $\mu\text{g/ml}$, regulador durante la privación de nutrientes, hiperglucemiante, lipolítico y catabólico). Los fármacos ensayados fueron metformina (Met, 1, 5 y 10 mM, un agente antihiper glucémico oral), octreotide (Oct, 1, 5, 10, 50 y 100 μM , un análogo de somatostatina) y como control experimental de autofagia se utilizó rapamicina (Rm, 50 μM ; inductor de autofagia) (**Tabla 1**) (Loos y Cumino, 2015). El seguimiento del efecto de estos compuestos se realizó mediante el registro de las alteraciones morfológicas (tinción vital con azul de metileno, microscopía óptica invertida, microscopía electrónica de barrido –MEB– y transmisión –MET–), alteraciones funcionales y en la expresión de genes y proteínas (microscopía confocal, RT-PCR y determinación de actividades enzimáticas a partir de extractos celulares). Fueron realizados

tres experimentos independientes y en cada experimento tres réplicas de cada fármaco ensayado. Los cultivos *in vitro* de las formas larvarias control y con tratamiento farmacológico fueron utilizados en estudios posteriores de expresión de genes y proteínas de interés (Cumino et al., 2010; Loos y Cumino, 2015).

Tabla 1. Compuestos utilizados en esta tesis.

Denominación genérica	Denominación científica y descripción	Fórmula química	Estructura Química
Metformina	3-(diaminometiliden)-1,1-dimetilguanidina	$C_4H_{11}N_5$	
Octreotide	Octapéptido derivado de la somatostatina de origen natural	$C_{49}PrH_{66}N_{10}O_{10}S_2$	
Insulina humana	Hormona peptídica de 51 residuos, heterodimérica compuesta por dos cadenas A y B unidas por un puente disulfuro. PM 5,8 Kda. Actualmente se produce por técnicas de ADN recombinante. Activa el anabolismo e inhibe el catabolismo, permitiendo la captación de glucosa.	$C_{25}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$	NH ₂ -Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys(1)-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys(2)-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr-OH.H-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys(3)-Cys(1)-Thr-Ser-Ile-Cys(3)-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys(2)-Asn-COOH
Glucagón	Hormona peptídica de 29 residuos, con PM de 3,5 Kda. Actualmente se produce por técnicas de ADN recombinante. Activa el catabolismo celular e inhibe el anabolismo, aumentando la disponibilidad celular de glucosa.	$C_{153}H_{225}N_{43}O_{49}S$	NH ₂ -His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-COOH
Rapamicina	Producto natural aislado de un microorganismo del suelo de la Isla de	$C_{51}H_{79}NO_{13}$	

	<p>Pascua ("Rapa Nui", Rapamune) que contiene el principio activo sirolimus. Fármaco inmunosupresor, antiproliferativo e inhibidor del regulador central celular TOR ("Target of Rapamycin"), por ende activador de autofagia.</p>	
--	--	---

3.3. Métodos fluorométricos para determinación de funciones biológicas

3.3.1. Evaluación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) en protoescolices de *E. granulosus*

Los protoescolices control o tratados farmacológicamente durante diferentes períodos de tiempo (6, 12, 24, 36 o 48 h) fueron incubados con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del colorante JC-1 por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, los parásitos fueron lavados con tampón Hepes 20 mM, pH 7,2 y se tomaron imágenes con el microscopio confocal (Nikon Eclipse C1 Plus). Las intensidades de fluorescencia verde (longitudes de onda de excitación/emisión = 485/538) y roja (longitudes de onda de excitación/emisión = 485/590) fueron analizadas para 20 protoescolices de cada muestra. La relación de fluorescencia roja/verde fue calculada utilizando el software Image J (*National Institutes of Health*–NIH–) (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Los núcleos fueron coloreados con DAPI (azul) según la combinación de sondas utilizadas. Las muestras fueron visualizadas mediante microscopía confocal (microscopio confocal Olympus IX80 FV1000) con láseres apropiados. La autofluorescencia de los parásitos intactos fue sustraída según protocolos establecidos en el laboratorio (Cumino et al., 2009).

3.3.2. Detección de glucógeno fluorescente *in vivo* y estimación de la captación de glucosa y tasa de glucólisis en protoescolices de *E. granulosus*

Protoescolices control y tratados con 10 mM de metformina, 0,1 U/ml de insulina y 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de glucagón durante 24 h fueron incubados en constante agitación, con 500 μM de 2-NBDG (2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il amino)]-2-desoxi-D-glucosa, Life Technologies #N13195) en 500 μl de Hepes 10 mM pH 7,5 estéril (libre de iones sodio), a 37°C protegidos de la luz y durante 15, 30, y 60 min para ensayos de captura de glucosa y por 4 y 6 h para estimar la acumulación de glucógeno *in situ*. Las muestras fueron lavadas tres veces con Hepes 10 mM pH 7,5 y se visualizaron mediante microscopía confocal (excitación: 480 nm y emisión: 535 nm). El 2-NBDG es un derivado fluorescente de la D-glucosa que no es permeable a las células, sino que ingresa a través de los transportadores de D-glucosa tipo GLUTs (de manera dependiente del tiempo, de la temperatura y de la concentración de glucosa, Yamada et al., 2000). Una vez en el interior de las células, el compuesto es fosforilado por la hexoquinasa y transformado en un metabolito que conserva la fluorescencia verde, y puede acumularse en

células vivas permitiendo estimar *in vivo* reacciones de captación y metabolización de glucosa (Yamada et al., 2000; 2007), como acumulación en glucógeno (Louzao et al., 2008; Pelletier et al., 2013), lo cual permite la detección no invasiva de este polisacárido evitando la fijación de células. Finalmente, la tasa de flujo glucolítico fue calculada en función de la incorporación/metabolización de glucosa y la liberación de lactato en protoescolices de *E. granulosus*. Las determinaciones fluorométricas con 2-NBDG fueron realizadas a diferentes tiempos de metabolización de la hexosa acompañada de la determinación de lactato (TeSlaa y Teitell, 2014).

3.4. Estudios de expresión de proteínas

3.4.1. Obtención de extractos proteicos

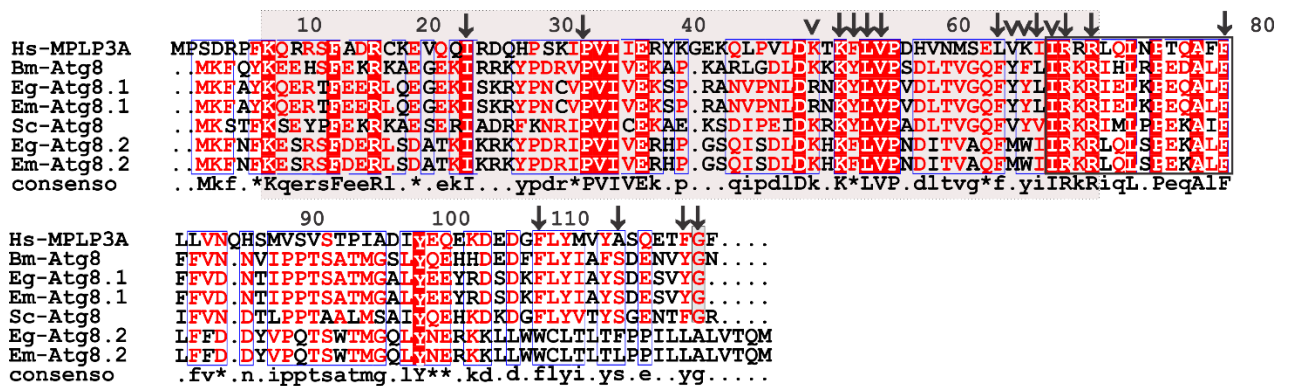
Para realizar los extractos de proteínas a partir de muestras de *E. granulosus* se utilizaron aproximadamente 100 µl de protoescolices o 10 a 15 quistes controles y tratados con diferentes fármacos. Los protoescolices fueron lavados 3 veces con PBS y resuspendidos en una proporción de 1:2 v/v con el tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 mM PMSF) (Cumino et al., 2007; 2009; 2010). Por su parte, los metacestodos fueron seccionados a la mitad, las capas germinales fueron extraídas y posteriormente resuspendidas en el mismo tampón de lisis con el agregado de polvo de vidrio. La suspensión resultante de ambos tipos de muestras fue congelada en nitrógeno líquido y descongelada a 37°C por 3 ciclos y fue sometida a 3 ciclos de ruptura mediante congelamiento en nitrógeno líquido y procesamiento con un homogeneizador de tejidos. Posteriormente se centrifugó el lisado de células de parásitos a 20000xg durante 45 min a 4°C para remover los restos celulares. El sobrenadante resultante fue considerado como extracto crudo de proteínas proveniente de protoescolices o células de la capa germinal. El extracto proteico generado fue utilizado inmediatamente para determinaciones de actividad enzimática. La concentración de proteínas solubles en los distintos extractos proteicos fue determinada espectrofotométricamente por el método de Bradford utilizando una solución patrón de albúmina bovina (BSA, Fracción V, Sigma). La concentración de la solución patrón fue determinada por espectrofotometría utilizando un valor de $A_{280\text{nm}}$ de 0,665 para una solución de 0,1% p/v de BSA.

3.4.2. Análisis de inmunohistoquímica “*in toto*” en protoescolices y metacestodos de *E. granulosus*

Para la determinación de la localización, nivel de expresión y estado de activación de las proteínas de interés (Atg8-I/Atg8-II y TOR en su estado funcional -fosforilada en el residuo de Serina³¹²²⁻) se realizaron ensayos de inmunohistoquímica *in situ* (detección directa en el tejido parasitario) en el estadio larvario. Para ello, protoescolices y metacestodos de *E. granulosus* fueron fijados en 4% p/v de paraformaldehído durante 4 h a 4° C (Loos et al., 2014; 2018). Luego, fueron permeabilizados durante 24 h a 4° C en una solución de PBS con 0,3% v/v de tritón X-100 y 0,1% de BSA (PBS/TX-100/BSA). Posteriormente se incubaron de 2 a 4 días a 4° C en una dilución 1/50 de anticuerpo primario en PBS/TX-100/BSA. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: un

anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra el extremo N-terminal de la proteína Atg8 o LC3 humana (MAP LC3clon H-50, sc-28266; Santa Cruz Biotechnology, EEUU.) o anticuerpo monoclonal de conejo dirigido contra TOR humano fosforilado (fosfo-mTOR-Ser²⁴⁴⁸ [D9C2] MAb 5536; Cell Signalling). A continuación, los parásitos fueron lavados durante 24 h en PBS a 4° C y luego incubados durante 24 h a 4° C con un anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo conjugado con Alexa-488) dilución 1/250 en PBS/TX-100/BSA en oscuridad (Loos et al., 2014; 2018). El anticuerpo primario se une específicamente a un epítipo de éstas proteínas de interés, y posteriormente la incubación con un anticuerpo secundario marcado en forma fluorescente, permite detectar a los anticuerpos primarios unidos específicamente a las proteínas estudiadas. Finalmente, fueron lavados 24 h en PBS a 4° C, los núcleos fueron contra-coloreados con 2 µg/ml de yoduro de propidio (Molecular Probes P-3566) durante 10 min a temperatura ambiente en oscuridad, lavados cuatro veces con PBS y observados en un microscopio confocal invertido Nikon, Confocal Microscope C1. Los controles negativos consistieron en la omisión de anticuerpo primario. Los anticuerpos anti-Atg8 y anti-TOR utilizados en estos ensayos están dirigidos contra epítopes que mostraron un 50% y 30% de identidad de aminoácidos con los ortólogos de Atg8 y TOR en *Echinococcus* sp. como se observan en la **Figura 21 A-B**. Las imágenes de inmunofluorescencia se adquirieron utilizando un microscopio de barrido láser confocal invertido (Confocal C1 Nikon) con una longitud de onda de excitación / emisión de 494/517 nm para anticuerpos conjugados con Alexa-488 y de 536/617 nm para núcleos teñidos con yoduro de propidio. La intensidad de la fluorescencia se midió utilizando el software ImageJ (NIH, <https://imagej.nih.gov/ij/>; 74) en secciones elegidas al azar de control y muestras tratadas farmacológicamente. Se analizaron diferentes regiones de interés (ROI) para obtener los valores medios de intensidad (Loos et al., 2014; 2018). Un total de 10 fotografías fueron adquiridas por condición y se analizaron imágenes de 2 experimentos independientes.

A)



B)

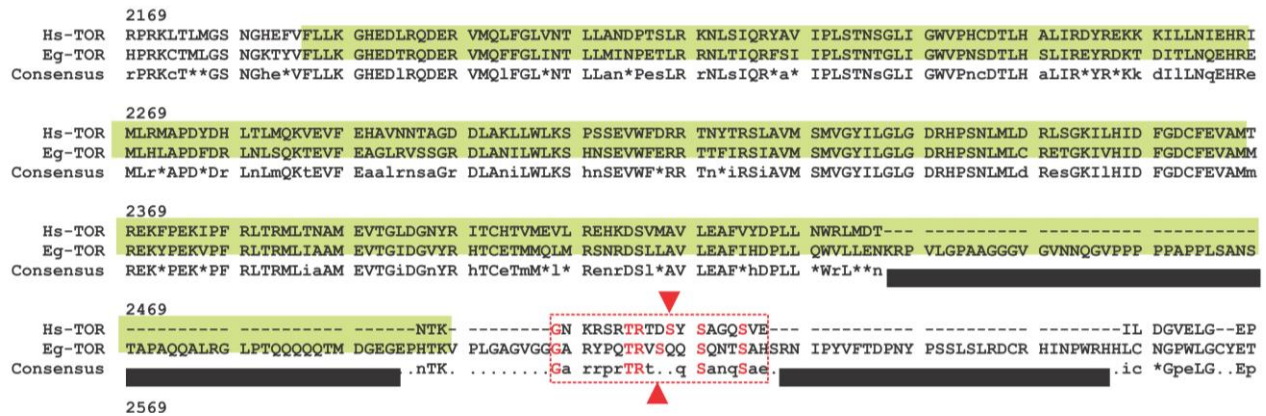


Figura 21. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de Atg8 y TOR en metazoos y reconocimiento de los anticuerpos primarios generados contra las proteínas de origen humano que reconocen a las proteínas de *Echinococcus* sp. El consenso entre las secuencias de aminoácidos de las proteínas se indica en la última línea [consenso total (mayúsculas) y consenso parcial (minúsculas)], cambios conservativos (asteriscos), sin consenso (puntos) y espacios introducidos para maximizar el alineamiento (guiones). **A)** Las proteínas de la familia de Atg8 constan de un dominio N-terminal conservado. Este dominio es fundamental para inducir autofagia ya que tiene capacidad de conjugarse a fosfolípidos, y es hacia el cual están dirigidos los anticuerpos anti-LC3 β utilizados para experimentos de inmunodetección de la proteína (recuadro en gris, Nakatogawa et al. 2007). Los números de acceso de GenBank de las proteínas Atg8 son: Bm, *Bombix mori* (NP_001040244), Hs, *Homo sapiens* (Q9H492), Eg, *E. granulosus* (AER10558) y (EgrG_001158000) y Em, *E. multilocularis* (EmuJ_000551400 y EmuJ_001158000). Las secuencias de Atg8 de *Echinococcus* sp. fueron identificadas e ingresadas por este grupo de investigación al GenBank (Loos et al., 2014). **B)** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los extremos carboxilo terminal de las proteínas TOR de *H. sapiens* y *E. granulosus*. El sitio de unión al anticuerpo se indica con un recuadro rojo. El aminoácido serina fosforilable (Ser³¹²²) se indica con una cabeza de flecha roja. Las secuencias de aminoácidos exclusivamente encontrada en *Echinococcus* y otros helmintos parásitos se indica con una barra negra. Los números de acceso de GenBank para las secuencias de TOR son: Hs, *H. sapiens* (P42345) y *E. granulosus* (CDS15479.1).

3.4.3 Determinación de actividades enzimáticas y metabolitos a partir de extractos celulares y de líquido hidatídico de metacestodos murinos de *E. granulosus*

De acuerdo al protocolo indicado en el apartado 3.5.1 se obtuvieron extractos proteicos provenientes de células de capas germinales de metacestodos, los cuales fueron utilizados para determinación de actividades enzimáticas. También se determinaron actividades enzimáticas y metabolitos a partir de líquido hidatídico de metacestodos murinos. Para ello, los quistes control o tratados farmacológicamente con un diámetro ≥ 5 mm fueron lavados con PBS estéril y posteriormente colocados en placas de Petri secas y estériles. Luego, el líquido hidatídico se extrajo en forma estéril con una jeringa de 1 ml y una aguja hipodérmica (0,5 \times 16 mm 25 G 5/8), se recogió en tubos eppendorf estériles previamente enfriados en hielo.

La actividad de la enzima LDH fue analizada a partir de 50 μ l de extractos proteicos de parásitos control y tratados farmacológicamente. La LDH fue determinada usando como sustrato piruvato (1,6 mmol/l) y acoplado la reacción al consumo de NADH (0,2 mmol/l) que se registró con la disminución de absorbancia a 340 nm. Los triglicéridos fueron analizados a partir de 100 μ l de muestra mediante el método colorimétrico en presencia de 4-

aminofenazona y clorofenol (pH 7.5), que determina el contenido de glicerol en forma equimolar a la cantidad de triglicérido hidrolizados enzimáticamente (mediante la combinación de lipo-protein-lipasa, glicerol-quinasa, glicerol-fosfato oxidasa y peroxidasa) (Naito, 1990).

Para cuantificar los azúcares solubles de metacestodos se procedió directamente con su determinación analítica mediante métodos colorimétricos y enzimáticos a partir de líquido hidatídico, y previo a ello se realizó una extracción de azúcares cuando se partió de células de la capa germinal. Para extraer azúcares solubles a partir de células de la capa germinal se partió de 300-500 mg de peso fresco de metacestodos sin líquido hidatídico. Los azúcares se extrajeron o bien con etanol 80% (v/v) a 80 °C por 5 min, o bien con agua amoniacal (pH 9,0) por 10 min a 100°C, con disgregación mecánica y agitación permanente (Cumino et al., 2007). Esta operación fue repetida 3 veces y las extracciones etanólicas fueron colectadas y evaporadas; en cambio, las extracciones acuosas fueron concentradas por liofilización. Se realizaron dos extracciones etanólicas y dos en medio amoniacal siendo comparables los resultados obtenidos entre ellas. El residuo seco, en ambos casos, fue resuspendido en agua para realizar las determinaciones analíticas. La concentración de azúcares solubles totales (monosacáridos y oligosacáridos) se determinó con el método de antrona (9,10-dihidro-9-oxoantraceno) que induce la deshidratación del hidrato de carbono por acción del ácido sulfúrico formando un furfural, que al condensar con el reactivo de antrona produce complejos coloreados (Porchia et al., 1999). Los azúcares solubles reductores se determinaron con el método de Somogyi-Nelson, en el cual la glucosa u otro azúcar reductor induce la reducción de un reactivo cúprico (en medio alcalino y calor) dando el óxido cuproso que en presencia del reactivo arseno-molibdico de Nelson, forma un complejo de óxido de molibdeno azul estable. Los azúcares no reductores, que incluyen sacarosa y trehalosa, se determinaron enzimáticamente y mediante la sustracción de [Azúcares Reductores] a los [Azúcares Totales]. Se cuantificó la sacarosa (disacárido no reductor de glucosa y fructosa, α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fructofuranósido) y trehalosa (disacárido no reductor de glucosa, α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 1)- α -D-glucopiranosido) midiendo los azúcares reductores con el reactivo de Somogyi y Nelson antes y después de la acción hidrolítica de las enzimas: invertasa (I4504-Sigma, EC 3.2.1.26, que genera por cada molécula de sacarosa, una molécula de glucosa y otra de fructosa) y trehalasa (T8778-Sigma, EC 3.2.1.28, que hidroliza al disacárido trehalosa en dos moléculas de glucosa), respectivamente. Para determinar la concentración de disacáridos no reductores, a 40 μ l de solución a cuantificar se le adicionaron 5 μ l de las enzimas correspondientes (SIGMA, 7 U/ml) y 5 μ l de tampón NaAc 1 M pH 4,5 y se incubó a 37°C por 30 min. Se detuvo la reacción por agregado de 500 μ l de reactivo de Somogyi, se hirvió durante 20 min y luego de enfriar, se adicionaron 800 μ l de reactivo de Nelson, leyéndose la absorbancia a 520 nm. Utilizando un método enzimático acoplado y un método colorimétrico con ácido tiobarbitúrico también se determinó específicamente la glucosa y fructosa generadas por la hidrólisis de trehalosa y sacarosa, respectivamente (Cumino et al., 2007). La concentración de glucosa también fue constatada por el método de la glucosa oxidasa en un analizador de glucosa (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA, EEUU.) tanto de extractos celulares como del líquido hidatídico murino.

La determinación de glucógeno fue realizada según una modificación del método de Warr modificado (Cumino et al., 2007). Los parásitos (100-200 mg de peso fresco) fueron tratados con 1 volumen de agua amoniacal

(pH 9,0), hervidos durante 5 min y centrifugados a 20.000xg por 10 min, quedando los monosacáridos y disacáridos libres en la fracción sobrenadante. El primer precipitado fue tratado con etanol 80% durante 24 h a 4°C, para solubilizar oligosacáridos de 10-15 unidades. El segundo precipitado conteniendo el glucógeno, fue tratado con 0,9 ml de KOH 33 % (p/v), calentado por 20 min a 100°C y centrifugado a 20.000xg durante 15 min. Se descartaron los sobrenadantes y se agregó al precipitado 1,3 ml de etanol 96%, se hirvió la muestra por 10 min y se la enfrió inmediatamente en hielo para provocar la precipitación del glucógeno. Después de centrifugar, se descartó el sobrenadante y se recuperó el precipitado conteniendo el glucógeno, que fue neutralizado con 200 µl de una solución de NH₄Cl saturado. Después de hervir durante 5 min, se recuperó por centrifugación y el precipitado fue disuelto con 100-300 µl de agua. La cuantificación del glucógeno se llevó a cabo por una reacción colorimétrica, con el agregado de 2,6 ml de reactivo I₂/I⁻ [130 ml de CaCl₂ saturado y 0,5 ml de mezcla iodo-ioduro de potasio (26 mg I₂ y 26 mg IK en 1 ml de agua)] y medidos a una absorbancia de 460 nm.

3.5. Estudios de expresión génica

3.5.1. Extracción y purificación de ARN

Los procedimientos que se describen a continuación se realizaron evitando la contaminación con ARNasa utilizando material descartable estéril libre de nucleasas o material de vidrio tratado con 0,4 N NaOH, abundante agua destilada, etanol al 70% y autoclavado. Todas las soluciones fueron realizadas con agua libre de nucleasas (Biodynamics).

El ARN total de muestras de *E. granulosus* fue extraído a partir de 100 µl de protoescolices o de 10 a 15 quistes controles y tratados farmacológicamente. Los protoescolices fueron cosechados, lavados y preservados a -20° C en tubos de plástico de 1,5 ml sin sobrenadante. Mientras que en el caso de los metacestodos, primero fue aspirado el líquido hidatídico y posteriormente se inyectó y re-aspiró varias veces Trizol (Invitrogen, reactivo con fenol y ácido guanidinio) para obtener el ARN del parásito libre de contaminación con el ARN del hospedador presente en las células murinas adheridas externamente al quiste. Ambos tipos de muestras fueron homogeneizadas en 1000 µl de Trizol con vórtex durante 1 min y sometidas a 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento (nitrógeno líquido y 65° C) y se procedió con protocolos establecidos en el laboratorio (Cumino et al., 2007; 2009; 2010; Loos et al., 2014). Se continuó con una ruptura mecánica de la muestra congelada utilizando un homogeneizador de tejidos y se centrifugó a 20000xg durante 5 min a 4° C, transfiriendo el sobrenadante a un tubo limpio para purificar el ARN obtenido. Después de la extracción orgánica de lípidos con 200 µl de cloroformo se incubó durante 5 min a temperatura ambiente para favorecer la disociación del ARN de los complejos de ribonucleoproteínas. Seguidamente la muestra se centrifugó durante 15 min a 20000xg a 4° C y se precipitó el ARN con citrato de sodio 0,8 M /NaCl 1,5 M e isopropanol, durante 2 h a -20° C en el caso de los protoescolices y durante 12 h a -20° C en el caso de los metacestodos. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a 20000xg por 30 min a 4° C y el ARN precipitado fue lavado con etanol 75% v/v. El precipitado se resuspendió en agua libre

de nucleasas, se solubilizó a 60°C durante 10 min, y se estimó la calidad y cantidad de ARN mediante geles nativos de agarosa al 1% teñidos con SYBR Gold (Invitrogen) y analíticamente mediante el uso de un nanodrop por la relación de $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$, respectivamente.

3.5.2. Detección de transcritos por RT-PCR y PCR en tiempo real (qPCR)

A partir de cantidades iguales de ARN (5-10 μg) para cada una de las condiciones de análisis estudiadas se realizó la síntesis de ADNc comenzando con la desnaturalización del ARN (10 min a 70° C) en presencia de 30 pmoles del oligo-dT, 2,5 mM mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTP) y 200 U/ μl de transcriptasa reversa MMLV (Promega) en su correspondiente tampón de reacción, incubándose la mezcla durante 1 h a 40-42° C. El 10% del ADNc (2,5 μl) fue amplificado mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos para los genes que seguidamente serán enunciados, 2,5 mM de dNTPs y Taq polimerasa (Invitrogen) bajo condiciones estándares de reacción (Cumino et al., 2009). Las reacciones de PCR fueron realizadas en un ciclador térmico PCR Sprint (Thermo Corporation) con el siguiente programa: 1 ciclo de 94° C (5 min); 30 ciclos de 94° C (30 s), 46-50° C (1 min), 72° C (1 min) y un ciclo adicional de amplificación de 72° C (5 min). Posteriormente, los productos de amplificación fueron separados electroforéticamente en geles de agarosa 1-1,5% p/v, visualizados con SYBR Gold y fotografiados con digitalizador de imágenes (G Box ChemiSystems, Syngene, UK).

Las determinaciones del nivel de transcritos fueron realizadas mediante qPCR con un equipo StepOne (AppliedBiosystems) previa síntesis del ADNc de manera idéntica a lo indicado anteriormente. La amplificación de los genes fue realizada en un volumen final de 25 μl , utilizando 0,5 μl de ADNc, 12,5 μl de master mix Biodynamics (Taq polimerasa, dNTPs, MgCl_2 , tampón de la Taq polimerasa y SYBR® Green™) y 50 pmol de cada oligonucleótido específico (Tabla 2). El programa de PCR fue el siguiente: 1 ciclo de 94° C (10 min) y 35 ciclos de 94° C (15 s), 50° C (30 s), 72° C (30 s). Los productos fueron confirmados analizando las curvas de melting y visualizados en geles de agarosa. La cantidad relativa de cada ADNc se normalizó utilizando al gen actinal. El análisis de los datos para una cuantificación relativa de la expresión génica se realizó con el método comparativo CT (“threshold cycle”) utilizando el software StepOne.

Los oligonucleótidos específicos fueron diseñados basados en el apilamiento en el genoma de *E. granulosus* (<http://www.sanger.ac.uk/Projects>). En la **Tabla 2** se enumeran los genes involucrados en dichos procesos, los pares de oligonucleótidos diseñados y los tamaños de los amplicones generados. El análisis termodinámico de los oligonucleótidos fue realizado con el programa OligoTech y el software DNASTar.

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos específicos utilizados en este trabajo. * Diseñados en esta Tesis.

Nombre del gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplicón (pb)
Eg- <i>g6p</i>	Eg- <i>g6p</i> -Fw	5' -ATGGAGTGTATCTACCTTTATGGTGCTAAG-3'	555
	Eg- <i>g6p</i> -Rv	5' -CAGTGTGTACCGCATCGTCCATTGATAGAAG-3'	
Eg- <i>f16b</i>	Eg- <i>f16b</i> -Fw	5' -GAAGAAGTGAAGAAGCTAGATGTCATTTCC-3'	445
	Eg- <i>f16b</i> -Rv	5' -CTTCGTTAATGGAGTAAATTTTGCCGCGTTTG-3'	
Eg- <i>pepck</i>	Eg- <i>pepck</i> -Fw	5' -CCGAAGCCGATAAGATCACTGACGAAC TTC-3'	800
	Eg- <i>pepck</i> -Rv	5' -CACGCAATGTCATCACCAACACACATAACC-3'	
Eg- <i>mdhc</i>	Eg- <i>mdhc</i> -Fw	5' -ATCTGTTTCGGCAAAGACCAGCAGATCATTCTCCACCTC-3'	776
	Eg- <i>mdhc</i> -Rv	5' -GAAGTAGATGTCCTTGGGGCCACCATAGTGAT-3'	
Eg- <i>atg8</i>	Eg- <i>atg8</i> -Fw	5' -GAAATTTGCCTACAAACAGGAGCGCACCTTC -3'	346
	Eg- <i>atg8</i> -Rv	5' -GCCGTAGACACTTTCATCGCTGTAGGCAATG -3'	
*Eg- <i>glut-1/4</i>	Eg- <i>glut1567</i> -Fw	5' -CAAAAGGTTTTTGGTTGGCTACTAC-3'	336
	Eg- <i>glut1567</i> -Rv	5' -GTGAGCACATAGGAGATGAGAATG-3'	
*Eg- <i>glut-14</i>	Eg- <i>glut2557</i> -Fw	5' -CATTCTGGTTTTCCCAAATCCTCGGTTT -3'	546
	Eg- <i>glut2557</i> -R1	5' -CAAAGCATCATACTGAGACCGCCTATAAG -3'	
*Eg- <i>glut-1</i>	Eg- <i>glut1566</i> -Fw	5' -GAACACCGTAATTGGTCTACTTGGTGCGA -3'	394
	Eg- <i>glut1566</i> -Rv	5' -CTTTCAGGACACAGAGGTAGGAGAACAAGG -3'	
*Eg- <i>s/ast-1</i>	Eg- <i>s/ast</i> -Fw	5' -GTTTTGGATCGGTTTTCTAGCTGTGGTTTATC-3'	440
	Eg- <i>s/ast</i> -Rv	5' -GACAATAACCACCACAATGACTAGTTTAG-3'	
Eg- <i>actI</i>	Eg- <i>act</i> -Fw	5' -GCGATGTATGTAGCTATCCAGGCAGTGCTCTCGCT-3'	633
	Eg- <i>act</i> -Rv	5' -CAATCCAGACAGAGTATTTGCGTTCCGGAGGA-3'	

3.6 Análisis bioinformático de las secuencias codificantes en *E. granulosus*

Se identificaron secuencias homólogas a las proteínas de interés utilizando Bases de Datos Públicas no redundantes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y el genoma de *E. granulosus* (<http://www.sanger.ac.uk/Projects>, <http://www.genedb.org/Homepage/Egranulosus> y <https://parasite.wormbase.org/index.html>). Las posibles proteínas ortólogas fueron identificadas mediante BLAST (“*Basic Local Alignment Search Tool*”) utilizando como corte un valor E (“*e-value*”, valor esperado) igual o menor a e^{-25} (Doolittle, 1995).

El análisis de comparación de secuencias de proteínas y los estudios de dominios estructurales fueron realizados con el software Clustal X (Thomson et al., 1997) y el software CDD (“*Conserved Domain Database*”; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>), respectivamente. Las predicciones de estructura

secundaria, dominios de transmembrana y plegamiento tridimensional fueron realizados con el programa Gen-THREADER-MEMSAT (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>), TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) y SACS HMMTOP (<http://www.sacs.ucsf.edu/cgi-bin/hmmtop.py>; Emanuelsson et al., 2007).

Capítulo 1

Impacto anabólico de la insulina del hospedador y la activación de Eg-TOR en el estadio larvario de *Echinococcus granulosus*

4.1. INTRODUCCIÓN

La función fisiológica y la relevancia clínica de la insulina generalmente se asocian con su actividad en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. Sin embargo, la insulina es una hormona metabólica, especialmente anabólica, que estimula un gran número de respuestas celulares, incluyendo la proliferación celular, la promoción de la síntesis de todas las macromoléculas que forman las estructuras celulares y la inhibición del reciclado celular dependiente de autofagia (Kolb et al., 2020). En 1922, investigadores canadienses fueron los primeros en demostrar una respuesta fisiológica a la insulina animal inyectada en un paciente con diabetes tipo 1, y en 1955, ésta fue la primera proteína en ser completamente secuenciada. La molécula de insulina es sintetizada por las células β pancreáticas, y posteriormente liberada por exocitosis a la circulación. Esta hormona está compuesta por 51 aminoácidos dispuestos en dos cadenas, una cadena A (21 aminoácidos) y una cadena B (30 aminoácidos) que están unidas por dos enlaces disulfuro. Las secuencias de aminoácidos de las insulinas de una amplia gama de vertebrados mamíferos y no mamíferos (reptiles, aves y peces) están fuertemente conservadas durante la evolución y poseen aminoácidos claves que participan en alcanzar una conformación espacial adecuada (IleA2, ValA3, TyrA19, LeuB6, GlyB8, LeuB11, GluB13, GlyB23, PheB24 y PheB25) para preservar la unión al receptor de insulina y así mantener la relación entre su estructura y la actividad biológica (Conlon 2001).

La unión de la insulina a su receptor dimérico en la superficie de células sensibles a la hormona, provoca un cambio conformacional en éste, que lleva a la activación de su actividad de tirosina-quinasa e inicia una cascada de eventos de fosforilación de sustratos del receptor de insulina (IRS). La fosforilación de IRS permite la unión de la enzima fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y la síntesis de fosfatidil-inositol-(3,4,5)-trifosfato (PIP3), que conduce a la fosforilación y activación de la proteína quinasa B o AKT. Tras la activación, AKT interactúa con diversos sustratos que median los efectos anabólicos de la insulina responsables de inducir la captación de glucosa, la síntesis de glucógeno (glucogenogénesis), la lipogénesis y la síntesis de proteínas, estos últimos dos especialmente dependientes de la activación de TOR (Target Of Rapamycin) en el complejo TORC1 (TOR junto a la proteína Raptor y LST8) (Haeusler et al., 2018). Concomitantemente, tras la interacción insulina-receptor, se

estimula una vía mitogénica, que activa la división celular mediante la inducción de las quinasas Ras-Raf y las proteín-quininas activadas por mitógeno (MAPKs). La activación de TORC1 es fundamental para inducir el crecimiento somático en respuesta a nutrientes, la síntesis de proteínas y la fertilidad. TORC1 es un regulador maestro de las vías anabólicas para el control del desarrollo en respuesta a factores de crecimiento como la insulina (Soulard et al., 2009). Por lo tanto, la vía PI3K-AKT acciona el metabolismo celular activando la síntesis de glucógeno (estimulando a la glucógeno-sintasa), la biosíntesis de proteínas (activando la traducción general) y de lípidos (estimulando la síntesis de triglicéridos) y aumentando el transporte de vesículas intracelulares. Además, en tejidos sensibles a la insulina (como músculo esquelético, hígado y adipocitos de mamíferos), esta hormona aumenta la captación de glucosa, translocando a la membrana plasmática, transportadores de tipo GLUTs, incrementando así, la utilización de glucosa. Este aumento del consumo de glucosa ingresada a la célula se obtiene por acciones que también media la insulina, tales como la inducción de la glucólisis (activando la enzima piruvato-quinasa) y la activación de la vía de las pentosas-fosfato (estimulando a la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y a la glucoquinasa, y disminuyendo la fosfoenol-piruvato-carboxiquinasa) (Klip et al., 2019).

La insulina y los péptidos similares (IGFs, *insulin-like growth factors*) fueron descritos desde anfibios como *Branchiostoma californiensis* a vertebrados. Posteriormente, se identificaron péptidos tipo insulina en moluscos, insectos y gusanos (Lagueux et al., 1990; Gregoire et al., 1998). El genoma de *Drosophila* contiene 7 genes que codifican péptidos similares a la insulina (llamados dilp1-7), homólogos a la insulina e IGF de mamíferos, los cuales actúan a través de un receptor ortólogo al receptor de insulina humano que activa vías de señalización intracelular conservadas, regulando el metabolismo, la homeostasis de glucosa y el crecimiento celular (Ceddia et al., 2003; Teleman, 2010; Hentze et al., 2015). En *Bombyx mori* fue descrita la bombixina A2 (Nagasawa et al., 1986), molécula similar a la insulina compuesta por dos cadenas peptídicas (A y B) unidas por un puente disulfuro con un 40% de identidad a la insulina humana. En el *Caenorhabditis elegans*, son 40 los péptidos ortólogos a la insulina, los cuales son sensados por el receptor DAF2 y regulados a través del factor de transcripción DAF16 (ortólogo a FoxO), ambas proteínas involucradas en la inducción del estado larvario “dauer” y responsables de regular la morfogénesis de la larva, en forma semejante a lo que ocurre con el nematodo parásito *Strongyloides stercoralis* (Castelletto et al., 2009). De esta manera, en metazoos en general, las señales de insulina e IGFs son efectuadas a través de un receptor tipo tirosina-quinasa que, ante la unión de la hormona, se autofosforila y cataliza cascadas de reacciones de fosforilación responsables de amplificar la señalización citosólica y nuclear de la hormona para modificar la transcripción de genes (Chiefari et al., 2018).

Los parásitos helmintos, en principio, deberían ser capaces de detectar las hormonas del hospedador por los respectivos sistemas de señalización conservados evolutivamente (Stoka, 1999). Tal es el caso de *S. mansoni*, helminto parásito que es incapaz de sintetizar insulina y depende de la hormona del hospedador para promover su crecimiento, estimular la captación de glucosa, promover el metabolismo y el desarrollo de los gusanos adultos, así como también mejorar la viabilidad de las larvas *in vitro* (Saule et al., 2005, You et al., 2009). Durante su complejo ciclo de vida, los esquistosomas mantienen sus requerimientos de energía alternando entre el consumo de glucosa del hospedador y el almacenamiento en forma de glucógeno para su posterior degradación y

metabolización (You et al., 2014). Cuando una cercaria penetra en el hospedador y se transforma en esquistosómula, el parásito experimenta una transición bioquímica y cambia rápidamente de la producción de dióxido de carbono (CO₂), a través del ciclo de Krebs, a la producción de lactato, mediante glucólisis y fermentación, con sostenido consumo del glucógeno almacenado, generando una dependencia directa de la glucosa provista por el hospedador (Skelly et al., 1994; Tielens, 1994).

Para el caso de *Echinococcus* sp., varias vías de señalización conservadas evolutivamente han sido reportadas de manera previa a la publicación genómica. Particularmente, en *E. multilocularis* se han descrito, sistemas de señalización mediados por insulina y por factores de crecimiento (FGF, TGF y EGF; Spiliotis et al., 2003; Konrad et al., 2003) así como la cascada de MAPKs (Zavala -Góngora et al., 2008). Posteriormente a la publicación de los genomas (Tsai et al., 2013; Zheng et al., 2013), dos miembros de la familia de receptores de insulina tipo tirosina-quinasa han sido caracterizados funcionalmente en *E. multilocularis*, EmIR1 (EmuJ_000962900) y EmIR2 (EmuJ_000981300). Estos últimos se expresan en forma casi idéntica en *E. granulosus* (Hemer et al., 2014). Mediante análisis inmunohistoquímicos, se ha encontrado que EmIR1 se localiza principalmente en las células almacenadoras de glucógeno de la capa germinativa del metacestodo, lo que implica una función en la regulación de la homeostasis de la glucosa (similar a la descrita para el receptor de insulina de los mamíferos). EmIR2, por otro lado, se expresa principalmente en tejido proliferativo de las larvas del parásito y en células germinativas con posible función en la regulación de la proliferación y la diferenciación celular (Hemer et al., 2014). Con mucha antelación, Rogan y Richard (1986) ya habían descrito la promoción del desarrollo parasitario en presencia de insulina para *E. granulosus*. Bajo condiciones controladas de cultivo *in vitro* y en presencia de suero fetal bovino e insulina, los protoescolices de *E. granulosus* pueden progresar en la dirección quística (vesicular) a partir de protoescolices invaginados, evaginados y cápsulas prolíferas (**Figura 11**), pudiéndose constatar diversos cambios metamórficos. Estos cambios incluyen un incremento en la división celular determinada por el aumento de núcleos celulares y la inducción de la expresión de la proteína AMPK (Loos y Cumino, 2015). Estos eventos simulan *in vitro* lo que ocurre *in vivo* durante la ruptura de un quiste hidatídico en el hospedador intermediario, en el cual, cada protoescolice liberado es capaz de diferenciarse asexualmente en un nuevo quiste hidatídico estableciéndose una diseminación parasitaria denominada hidatidosis secundaria.

Al considerar las vías de señalización de insulina, es imposible ignorar el importante papel de los transportadores de glucosa en la regulación dual de la captación de glucosa y la síntesis de glucógeno. Los transportadores de glucosa y otras hexosas pertenecen dos superfamilias de proteínas: simporter sodio/soluto (SSSF) y transportadores de difusión facilitada (MFS o transportadores de tipo GLUTs), y se expresan en numerosos filos (Manolescu et al., 2007). En endoparásitos en general, está documentado el requerimiento nutricional primario vinculado a la captura de glucosa y metabolización de carbohidratos. En platelmintos, la glucosa es el principal sustrato respiratorio y el glucógeno la principal molécula de reserva de energía (McManus y Bryant, 1995). En cestodos en particular, está descrito que la captación de glucosa se encuentra mediada por mecanismos de difusión pasiva y transportadores (Jeffs y Arme, 1988). El transporte de glucosa ocurre por transporte activo (a través de transportadores de glucosa dependiente de sodio –SGLT-) y/o mediante difusión

facilitada a través de transportadores tipo GLUT (familia SLC2A), los cuales utilizan la energía del gradiente de concentración del soluto transportado para impulsar el movimiento neto a través de la membrana (Rodríguez-Contreras et al., 1998). Recientemente se han identificado dos transportadores tipo GLUTs en *E. multilocularis* (Em-GLUT1 -LC385549- y Em-GLUT2 -LC385550-) con una similaridad del 70 al 99% con posibles ortólogos en *E. granulosus* (Kashiide et al., 2018). Todos los miembros de la familia GLUTs identificados en metazoos poseen 12 α -hélices de transmembrana (TM), donde sus porciones amino y carboxilo-terminales quedan en el interior celular formando un poro acuoso central a través del cual la hexosa cruza la bicapa lipídica. Esta estructura conservada de las proteínas GLUTs se mantiene tanto en vertebrados como en insectos, gusanos y helmintos parásitos (Deng et al., 2014; Cabezas-Cruz et al., 2015).

El objetivo de este capítulo es analizar las funciones anabólicas de la insulina del hospedador en el estadio larvario de *E. granulosus* para estimar el efecto farmacológico que ejercería sobre el metabolismo y desarrollo parasitario en la interrelación parásito-hospedero durante el desarrollo de la hidatidosis secundaria.

4.2. RESULTADOS

4.2.1. Identificación *in silico*, estudio de expresión transcripcional y estimación de la actividad funcional de transportadores de glucosa tipo GLUT en *E. granulosus*

Previo al análisis de los efectos de la insulina humana en las células del estadio larvario de *E. granulosus* fueron identificados en el genoma del parásito tres transportadores de glucosa tipo GLUTs, EGR_01566, EGR_01567 y EGR_2557 pertenecientes a la familia de transportadores SLC2 (“*solute carrier family 2 facilitated glucose*”) clase I (que incluye los GLUTs 1, 2, 3, 4 y 14 de humanos). Los correspondientes ARNm fueron previamente ingresados al Genbank [Banco de Genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information)] con los números de acceso XM_024490815.1, XM_024490816 y XM_02490815.1, los cuales codificarían proteínas predichas de 492, 585 y 564 aminoácidos, respectivamente. Estas proteínas transportadoras mostraron entre 32% y 42% de identidad con las secuencias de aminoácidos de los transportadores GLUT1 (P11166.2), GLUT4 (NP001033.1) y GLUT14 (NP_703150.1) humanos. Mediante estudios *in silico* basados en la secuencia de aminoácidos, estas proteínas revelaron una estructura conservada con 12 dominios transmembrana (TM1-12) y motivos característicos de la familia SLC2 indicados en la **Figura 22**. En base a reportes previos que demostraron que la tasa de transporte de glucosa en un determinado tejido está determinada tanto por el patrón de expresión génica de los transportadores GLUTs como por la regulación a través de hormona y factores de crecimiento (McGowan et al., 1995), se estudió el nivel de expresión de los genes *gluts* de *E. granulosus* en condición control y en presencia de insulina. Mediante análisis de RT-PCR se confirmó la expresión basal de los tres genes que codifican para los transportadores de *E. granulosus*, en condiciones control tanto para protoescólices (**Figura 23A**) como para metacestodos (**Figura 23B**), denominándolos en función de su identidad con los ortólogos humanos: *Eg-glut1/4* (EGR_01567), *Eg-glut1* (EGR_01566) y *Eg-glut14* (EGR_02557). En esta condición, el nivel de

expresión génica de estos transportadores fue mayor en protoescolices que en metacestodos (excepto para *Eg-glut1*, **Figura 23A-B**). Si bien el nivel de transcripción no se modificó ante el agregado de insulina en protoescolices (datos no mostrados), la hormona tuvo la capacidad de inducir la activación de la transcripción de estos transportadores únicamente en metacestodos, corroborando estos resultados por qPCR (PCR cuantitativa) (**Figura 23B-C**). Específicamente, el tratamiento con 0,1 UI/ml de insulina indujo un incremento de dos veces en la expresión de *Eg-glut1/4* y de una vez en la expresión de *Eg-glut14* comparado con el control, no registrándose cambios en el nivel transcripcional del gen *Eg-glut1* (**Figura 23B-C**). Finalmente, con el uso del 2-NBDG en un tampón libre de sodio (lo cual excluye la actividad de transportadores tipo SGLT, Blodgett et al., 2011) y en combinación con microscopía confocal, se dio cuenta de la incorporación intracelular de glucosa en parásitos vivos (tanto protoescolices como metacestodos) a expensas de transportadores tipo GLUTs (**Figura 24A**). En protoescolices, la captación de glucosa fue evidente en presencia de la sonda, mostrando un aumento significativo de fluorescencia total en protoescolices tratados con insulina respecto de protoescolices control (**Figura 24 B**). En el caso de los metacestodos, la captación de glucosa en presencia de insulina se correlacionó con el aumento de la expresión de los genes *Eg-gluts*, reflejándose con un incremento significativo de la fluorescencia relativa en los parásitos tratados respecto de los parásitos control (**Figura 24C**).

Figura 22: Predicción de la topología de membrana y alineamiento de secuencia múltiple de proteínas de la familia SLC2 clase 1. Comparación de secuencia de aminoácidos entre transportadores GLUTs clase I de *E. granulosus* y ortólogos humanos. El consenso se indica en la última línea, total (mayúsculas), parcial (minúsculas), cambios conservativos (asteriscos), ausencia de consenso (puntos) y espacios introducidos para maximizar el alineamiento (guiones). Dominios de transmembrana (TM1 a TM12, cajas grises), residuos de glicina (G) críticos para la estabilización de estructuras en la familia de GLUTs (cajas azules transparentes), residuos funcionalmente importantes (triángulos negros), aminoácidos involucrados en la unión del azúcar (cajas verdes), motivo "QLS" en TM7 involucrado en el reconocimiento de glucosa (excluyendo fructosa, círculos negros y caja amarilla) de la misma manera que los GLUTS 1, 3 y 4 humanos (Manolescu et al., 2007) y sitio de N-glicosilación (N en rojo) (Deng et al., 2014). Números de acceso del GenBank para las proteínas Hs (*Homo sapiens*) GLUT 1 (P11166.2), GLUT2 (P11168.1), GLUT3 (NP_008862.1) y GLUT14 (NP_703150.1).

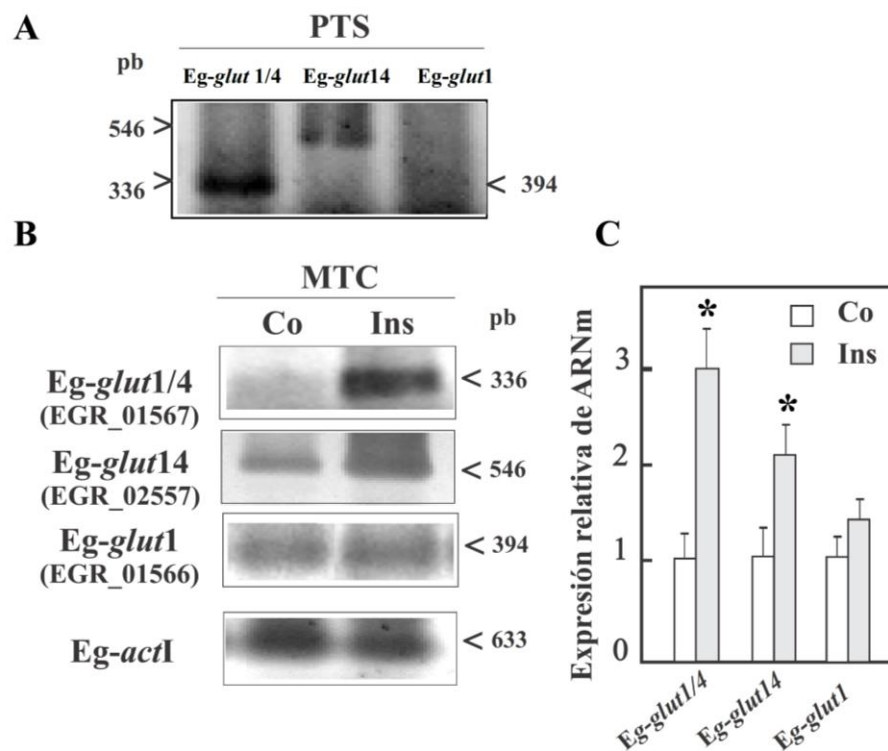


Figura 23: Expresión transcripcional de las isoformas de GLUTs de *E. granulosus*. Análisis de RT-PCR (A y B) y qPCR (C) a partir de ARN total de protoesclóides (PTS, A) control y metacestodos (MTC, B-C) incubados durante 24 h bajo condiciones control (Co) o tratados con insulina (Ins). La amplificación de *Eg-actina I* (*actI*) se utilizó como control de carga. Los tamaños moleculares de los amplicones se indican mediante puntas de flecha.

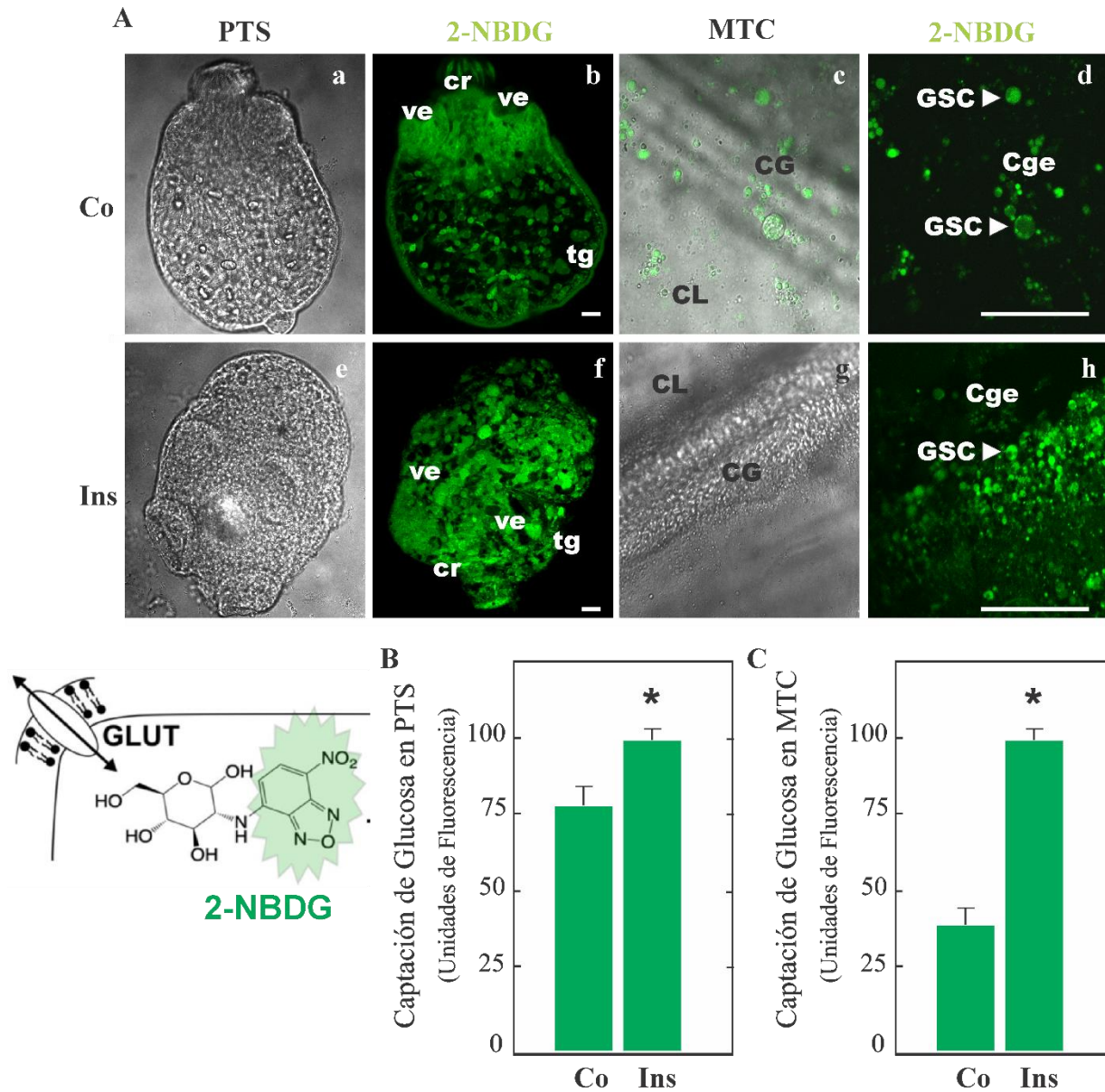


Figura 24: Captación de glucosa en presencia de insulina y 2-NBDG en protoescolices (PTS) y metacestodos (MTC) de *E. granulosus*. A) Imágenes representativas de microscopía confocal (b, d, f y h) que muestran fluorescencia del 2-NBDG en parásitos incubados en condiciones control (a-d) o tratados con insulina 0,1 UI/ml (e-h) durante 1 h. Imágenes de transmisión (a, c, e y g). Las barras indican: 20 μ m en protoescolices y 100 μ m en metacestodos. B-C) Gráfico de barras que muestra en unidades de fluorescencia arbitrarias de 2-NBDG medidas en protoescolices (B) y en metacestodos (C) control (Co) y tratados con insulina (Ins) determinados mediante integración con el software Image J a partir de 10 fotografías de cada condición. Asterisco (*) indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en comparación con el control. cr (corona rostellar), ve (ventosa), tg (tegumento), CG (capa germinal), CL (capa laminar), GSC (células que acumulan glucógeno), Cge (células de la capa germinal).

4.2.2. El almacenamiento de glucosa bajo el efecto de insulina produce inducción en la biosíntesis de glucógeno y lípidos en el estadio larvario de *E. granulosus*

Dado que, en otros sistemas celulares la insulina y péptidos análogos controlan la actividad de las enzimas metabólicas investigamos *in vitro*, el estado de la acumulación de glucosa en forma de glucógeno y de lípidos en el estadio larvario de *E. granulosus* bajo los efectos de la hormona del hospedador. Como se muestra en la **Figura 25**, en metacestodos existe un aumento en la concentración intracelular de glucosa de aproximadamente diez veces bajo el efecto de insulina (**Figura 25A**), siendo 25 ± 7 mg/dl en metacestodos control y 225 ± 5 mg/dl en metacestodos tratados con insulina (equivalentes a valores cercanos a 1,4 mM y 12,5 mM, respectivamente). Esta glucosa debió ser rápidamente fosforilada por la hexoquinasa y almacenada como glucógeno (**Figura 25B**), dado que el contenido de glucógeno aumentó cinco veces bajo el efecto de esta hormona (48 ± 4 mg/g) respecto del control (10 ± 8 mg/g). Esta glucosa intracelular fue oxidada a través de un mecanismo fermentativo constatado por el aumento en la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH, **Figura 25C**), la cual aumentó 15 veces en presencia de insulina (desde 100 ± 15 mmol/min ml en situación basal hasta 1500 ± 10 mmol/min ml en presencia de insulina). La oxidación de la glucosa permitiría generar esqueletos carbonados, poder reductor en forma de NADH y energía en forma de ATP favoreciendo otras reacciones de biosíntesis como la lipogénesis de triglicéridos (**Figura 25D**), registrándose un incremento en su acumulación de seis veces en presencia de insulina (alcanzando los 60 ± 6 mg/dl) respecto del control. Por lo expuesto y como en el resto de los metazoos, la glucosa incorporada en las células del parásito se re-direccionaría hacia la acumulación de glucógeno y lípidos neutros en las células de la membrana germinal, lo cual potenciaría el crecimiento y desarrollo del estadio larvario.

Por otro lado, debido a que los cestodos carecen de la capacidad de sintetizar ácidos grasos y colesterol, estos deben ser captados junto a los triglicéridos desde el hospedador y son almacenados en forma de gotas lipídicas (datos no publicados) en el parásito. Estas gotas lipídicas son organelas de almacenamiento y metabolización de lípidos neutros delimitadas por una capa de fosfolípidos y proteínas que se conservan desde levadura a mamíferos. En la **Figura 26** se muestra el significativo aumento en tamaño y número de las gotas lipídicas en protoescólices bajo el tratamiento con insulina, dando cuenta del mayor contenido en triglicéridos mostrado en la **Figura 25D**.

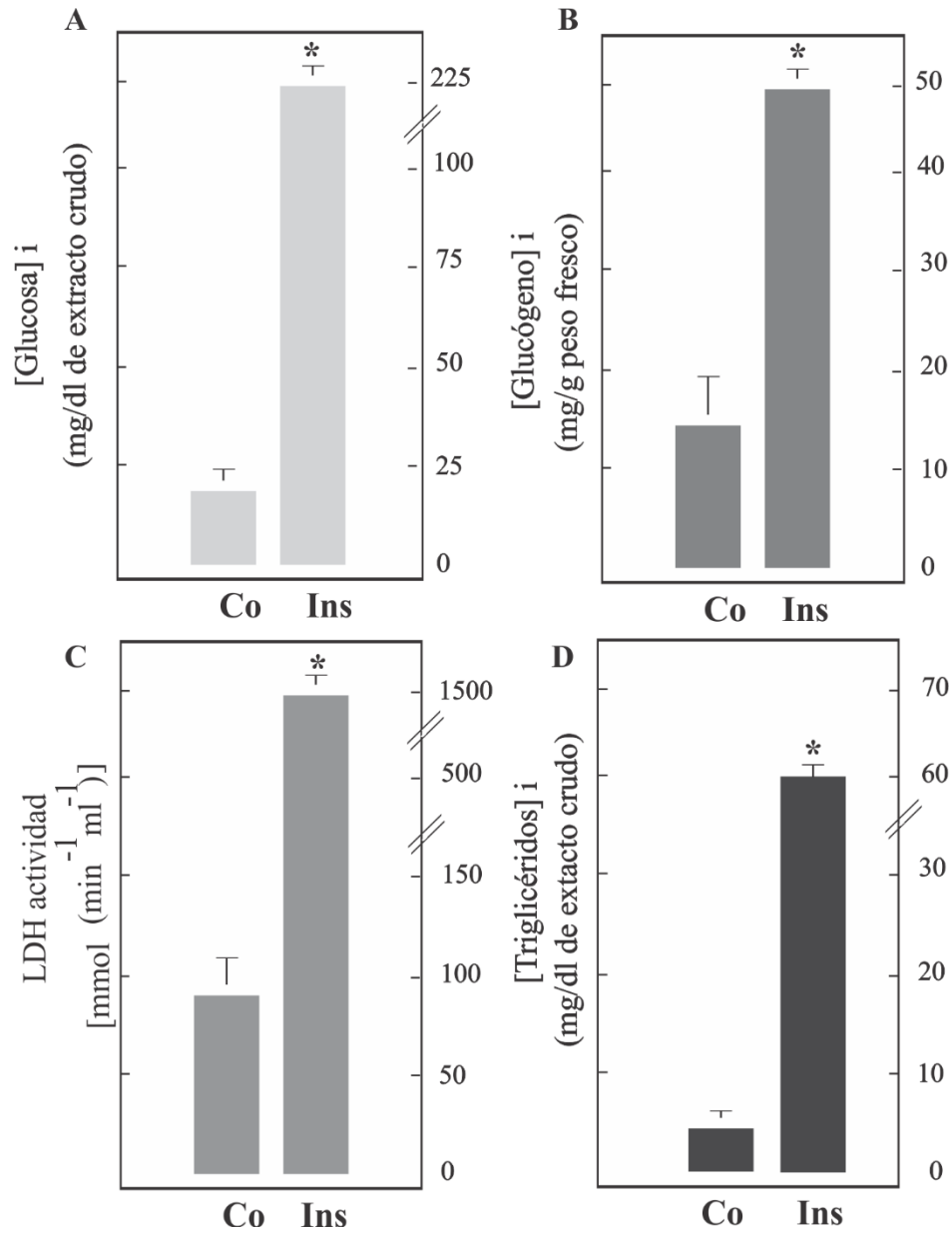


Figura 25. Cambios metabólicos inducidos por insulina en metacestodos de *E. granulosus*. Concentración intracelular de glucosa (A), contenido de glucógeno –fracción insoluble de carbohidratos- (B), actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) (C), y contenido de triglicéridos (D) medidos en células germinales de metacestodos incubados en condición control (Co) o con 1 UI/ml de insulina durante 48 h (Ins). Los valores se expresan como media \pm error estándar de la media. *Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en (A-D).

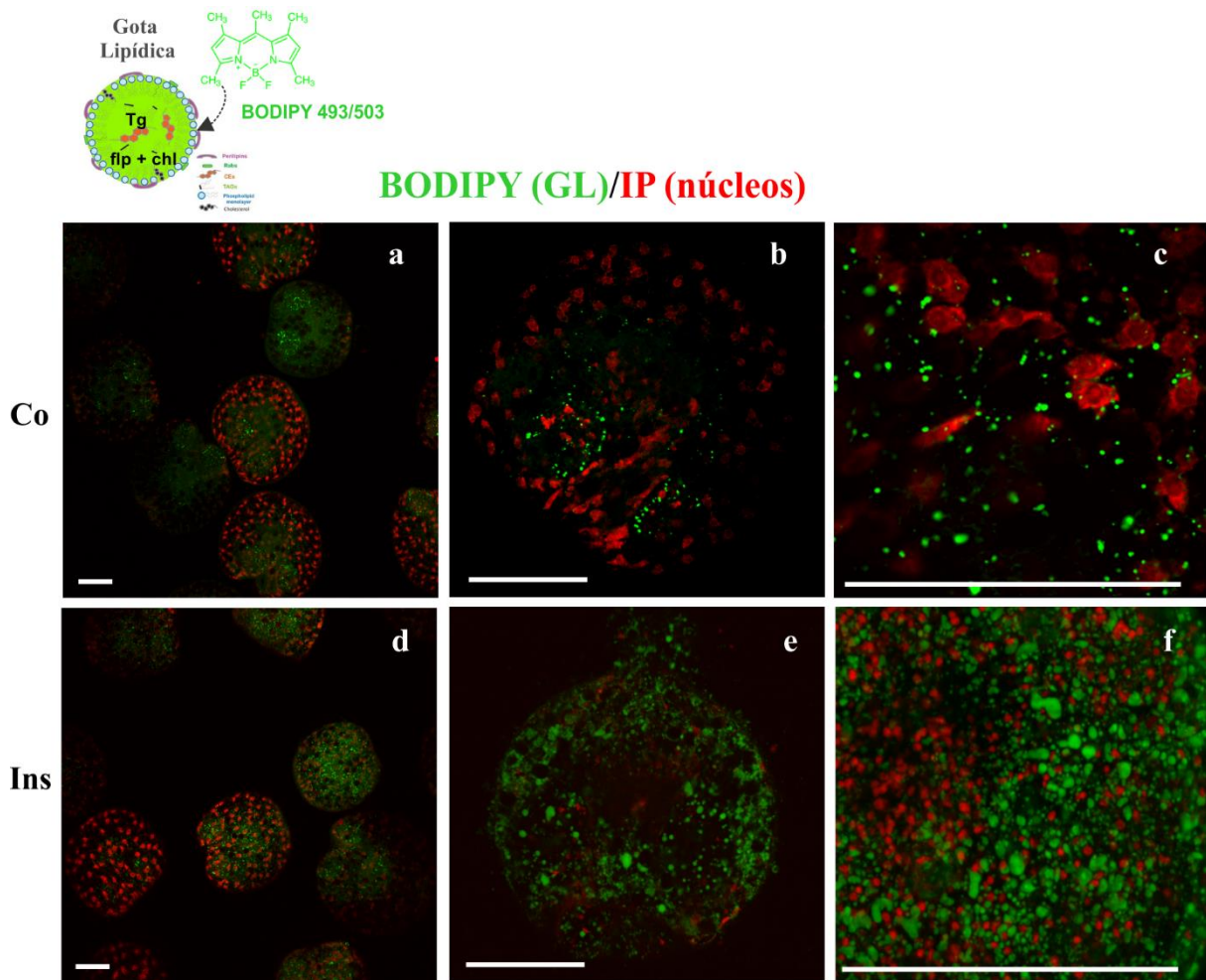


Figura 26. Detección de depósitos de lípidos neutros en formas de gotas lipídicas. Mediante microscopía confocal (fluorescencia verde de Bodipy 493/503 detecta lípidos neutros y fluorescencia roja de ioduro de propidio tiñe núcleos) de protoesquícolas control (Co, a-c) y tratados farmacológicamente con 0,1 UI/ml de insulina (Ins d-f) se evidenció un aumento en número y tamaño de gotas de lípidos en presencia de la hormona exógena.

4.2.3. La vía de transducción de señales iniciada por la unión de insulina exógena al receptor del parásito lleva a la fosforilación y activación de Eg-TOR

Previamente ha sido reportado en *E. multilocularis* que, ante el agregado de insulina exógena a las vesículas del parásito generadas *in vitro*, se induce activación del receptor de insulina y fosforilación de Em-AKT y Em-TOR (Koziol y Brehm, 2015, Loos et al., 2020a) dando cuenta de la activación de la vía de señalización conservada en el parásito. En este trabajo experimental, se corroboró en presencia de insulina, la activación y fosforilación de Eg-TOR en un residuo de serina (Ser³⁰²²) conservado. Para ello se utilizó un anticuerpo contra la porción más conservada (70% de identidad) entre la proteína del parásito (EUB64971 compuesta por 3072 aminoácidos) y la proteína ortóloga en humanos (P42345 constituida por 2549 residuos) (**Figura 27A-B**). En la **Figura 27C-D** se evidencia el aumento de fluorescencia producto del mayor grado de fosforilación de Eg-TOR

en metacestodos tratados con insulina comparado con el control. La insulina a través del complejo TORC1 también controla la síntesis de proteínas a través de la detección de aminoácidos. De esta manera se constata que todas las macromoléculas biológicas, carbohidratos, lípidos y proteínas acompañarán la inducción del crecimiento y del desarrollo promovido por la hormona en el parásito.

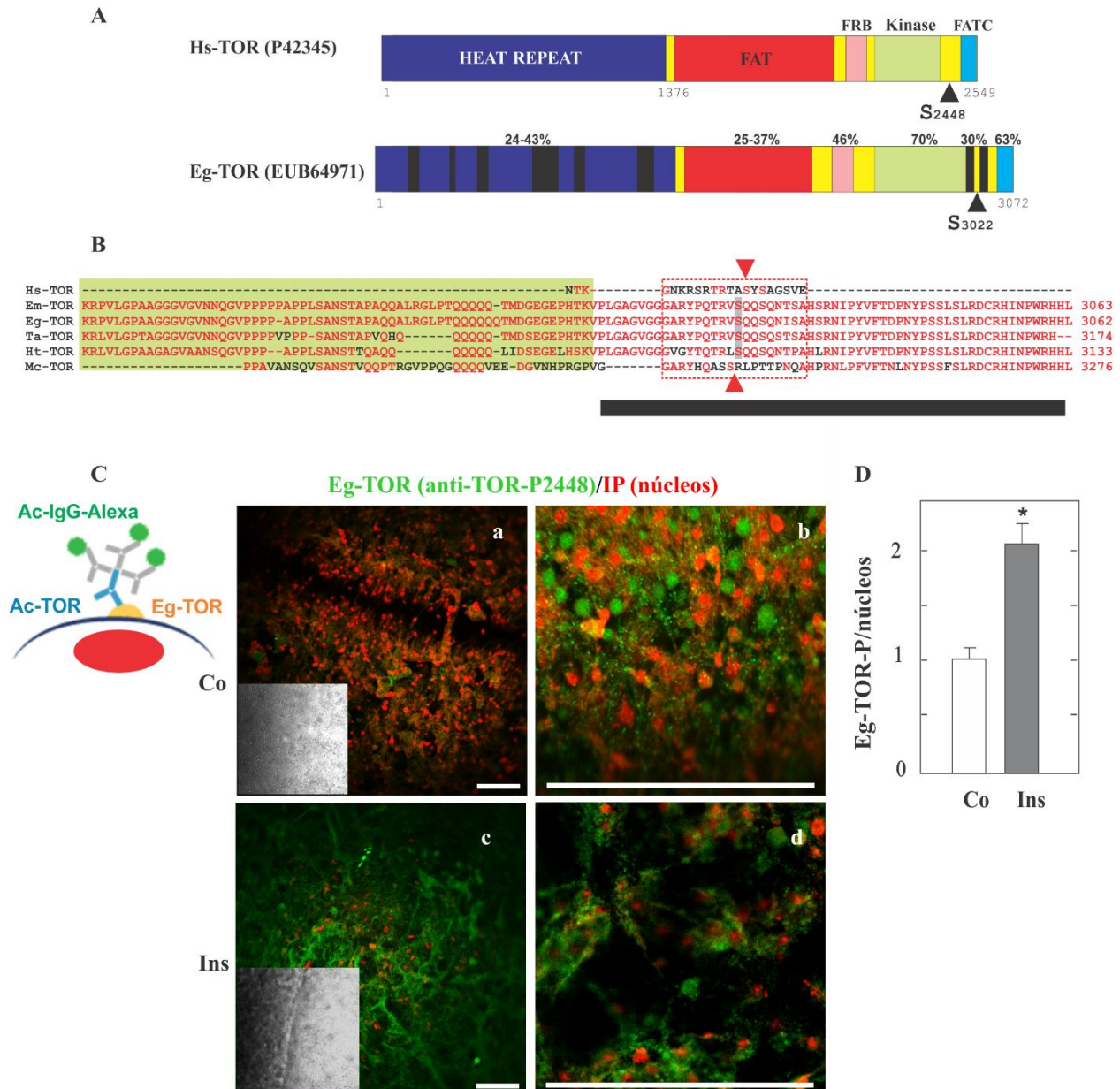


Figura 27. Análisis estructural e inmunodetección de Eg-TOR en metacestodos control y tratados con insulina exógena. (A-B) Análisis de dominios conservados entre la proteína TOR de *Homo sapiens* (Hs-TOR, P42345) y el ortólogo en el parásito (Eg-TOR, EUB64971). Eg-TOR tiene una estructura de dominio conservada que contiene una región N-terminal con repeticiones HEAT (Huntington, EF3A, ATM, TOR, caja azul), un dominio de ~600 residuos denominado FAT (FRAP, ATM, TTRAP, con 25-37% de identidad entre Hs-TOR y Eg-TOR, caja roja), el dominio FRB de unión a FKBP y rapáloidos (análogos de rapamicina) de aproximadamente 100 residuos (caja rosa), el dominio quinasa (caja verde de mayor homología entre los ortólogos analizados) que contiene los sitios de fosforilación Thr²⁴⁴⁶ y Ser²⁴⁴⁸ en Hs-TOR correspondientes a los aminoácidos Thr³⁰¹⁹ y Ser³⁰²² en Eg-TOR coincidentes con la secuencia consenso TRT-X-S, y un dominio FATC (~35

residuos) en el extremo C-terminal (caja celeste). Eg-TOR mostró además una similitud en estructuras secundaria y terciaria con TOR humano (PDB 6bcu.1, datos no mostrados). (C-D) Detección e inmunolocalización de la forma activada de Eg-TOR en metacestodos control (Co) y tratados con insulina (Ins). (C) Imágenes confocales representativas de ensayos de inmunolocalización *in toto* revelados con un anticuerpo conjugado anti-TOR humana marcado con Alexa 488 (fluorescencia verde) y contrateñido con yoduro de propidio (fluorescencia roja). Las imágenes insertadas corresponden a la microscopía de transmisión. Las barras indican 200 μm . (D) El gráfico muestra la relación entre la intensidad de fluorescencia de Eg-TOR- $\text{P}^{\text{S}3122}$ y los núcleos en metacestodos tratados con 1 U/ml de insulina (Ins) relativo al control. Los valores se expresan como error estándar medio o la media (* $p < 0.05$ en comparación con el control).

4.3. DISCUSIÓN

Ha sido descrito en nematodos, tanto para las larvas infecciosas del tercer estadio de *S. stercoralis* como para las larvas “dauer” de *C. elegans*, que bajo la señalización de péptidos similares a la insulina se controla el desarrollo larvario (Castelleto et al., 2009). De la misma manera, durante el desarrollo anormal de *Taenia solium* y *T. crassiceps* en el establecimiento de la neurocisticercosis racemosa, las células parasitarias totipotentes responden a la insulina humana promoviendo el desarrollo tumoral de larvas racemosas, sugiriendo la importancia de las hormonas del hospedador en el desarrollo y crecimiento del parásito (Orrego et al., 2021). Otro caso ampliamente citado en la literatura, es el de los esquistosomas adultos, que dependen de la insulina del hospedador para el crecimiento, viabilidad y captación de hexosas (You et al., 2014). En este trabajo experimental, demostramos que en *E. granulosus*, la insulina exógena participa en la inducción transcripcional de transportadores de glucosa tipo GLUT, conduce a una mayor captación de la hexosa y activa su utilización para la biosíntesis de glucógeno y triglicéridos, a través de la vía de señalización canónica que activa y fosforila a la proteína Eg-TOR (**Figuras 23-27**).

Las vías de señalización mediadas por insulina y sus análogos son sensibles a la disponibilidad de nutrientes en el medio extracelular y modulan el ciclo de vida desde gusanos a mamíferos (Kimura et al., 1997; Kenyon, 2005; Martins et al., 2016). De esta manera, estas vías de señalización intracelular se modulan en función de la abundancia de aminoácidos, monosacáridos, ATP/AMP y NAD/NADH e inducen el control de la longevidad en respuesta a la restricción dietaria (Pan y Finkel, 2017). Estas vías coordinan las respuestas de proteínas vitales como TOR, AMPK y FOXO, previamente identificadas y caracterizadas en el parásito por este grupo de investigación (Cumino et al., 2010; Loos y Cumino, 2015, Loos et al., 2018).

La enzima PI3K es fundamental en las acciones metabólicas y mitogénicas de la insulina (Saltiel, 2021) y activa a la AKT, quien media muchas funciones de la vía de acción de la insulina, como la supervivencia celular, la síntesis de proteínas, el aumento de la transcripción génica y la biosíntesis de glucógeno (Manning y Cantley, 2007). En *E. multilocularis* se han reportado efectos de la insulina humana en los mecanismos de señalización del parásito, siendo responsable dicha hormona de la activación de los receptores EmIR1 y EmIR2 (Hemer et al., 2014). Estos autores también reportan que la insulina exógena induce la expresión de altos niveles de EmIR1 en las células acumuladoras de glucógeno (GSC) de la capa germinal. En el presente trabajo de investigación,

vinculamos cómo la expresión estable de AKT y su activación persistente en presencia de insulina (Hemer et al., 2014), conducen a la inducción transcripcional de dos de los tres transportadores GLUT identificados en el parásito (**Figura 22-23**) de forma semejante a lo descrito en otros metazoos (Bryant et al., 2002).

El transporte de glucosa mediado por insulina es un requisito crítico para la homeostasis del monosacárido en células animales sensibles a esta hormona, tanto en tejidos especializados de vertebrados (como músculo esquelético y tejido adiposo) como en invertebrados (You et al., 2014). En estas células, la insulina desencadena la reorganización del citoesqueleto de actina, necesaria para la translocación de GLUTs a la membrana plasmática, a través de un proceso que puede ser dependiente o independiente de la activación de PI3K-AKT (Duong y Chun, 2019). Este trabajo es el primero en reportar la expresión basal de tres GLUTs en ambas formas larvarias de *E. granulosus*, dos de los cuales presentan inducción transcripcional en presencia de insulina (*Eg-glut1/4* que codifica para EGR_01567 o XP_024354681 y *Eg-glut14* que codifica la proteína EGR_02557 o XP_024353621) (**Figura 23**). La evidencia del efecto directo de la insulina en la regulación transcripcional de los genes que codifican para GLUT1 a GLUT4 fue previamente reportada en cardiomiocitos, adipocitos, hepatocitos y músculo esquelético e involucra la activación de AKT, la cual fosforila y activa una variedad de sustratos, incluidos los factores de transcripción involucrados (Petersen et al., 1995; Barthel et al., 1999; Hernandez et al., 2001; Heidbreder et al., 2007; Saliel et al., 2021).

La asignación de la nomenclatura de los *Eg-gluts* se realizó en base a los análisis filogenéticos de las tres clases de transportadores (tipo I, II y III) (Augustin 2010; Cabezas-Cruz et al., 2015) y estudios de aminoácidos indispensables para la función biológica (**Figura 22**) (Deng et al., 2014). Los tres transportadores identificados en el parásito pertenecen a la clase I de GLUTs que incluye a los ortólogos GLUTs1-4 y 14 identificados en humanos. Estos transportadores del grupo I se regulan transcripcionalmente por la concentración de glucosa en el medio, tanto en humanos como en gusanos (Cabezas-Cruz et al., 2015), y dichos estudios quedan pendientes de realizar para *Echinococcus* sp. Todos los miembros GLUTs identificados en el parásito poseen 12 α -hélices de transmembrana (Augustin 2010) con colas carboxilo y amino-terminales orientadas hacia el lado citoplásmico, idéntico a los GLUTs identificados en vertebrados, insectos y gusanos (Cabezas-Cruz et al., 2015). Asimismo, conservan motivos de aminoácido (Arg-X-Gly-Arg-Arg) en las proximidades a los dominios de TM dentro de los bucles citoplasmáticos 2, 4, 8 y 10. Cabe destacar que la presencia de un motivo "Gln-Leu-Ser" está exactamente conservado en el TM7 de EGR_01567 (*Eg-GLUT1/4*) y los GLUT1, 3 y 4 humanos, el cual estaría involucrado en el reconocimiento de la glucosa. Dicha secuencia es "Gln-Phe-Ser" y "Gln-Leu-Cys" en los otros dos transportadores del parásito (Manolescu et al., 2007; Deng et al., 2014).

En el caso particular de *Echinococcus* sp. la caracterización de los transportadores de difusión facilitada GLUTs es amplia en la bibliografía. Jeffs y Arme (1988) caracterizaron el proceso de difusión facilitada desde el punto de vista bioquímico, reportando el mecanismo por el cual el metacestodo concentra la glucosa capturada desde el hospedador. Estos investigadores reportaron cómo el quiste hidatídico tiene un transporte de glucosa menos eficiente, ya que absorbe la glucosa 55 veces más lentamente que el protoescólex. Estos datos coinciden con el nivel de expresión génica basal más elevado de los genes *Eg-gluts* en el protoscolex respecto del

metacestodo (**Figura 23**). Sin embargo, los autores también describieron que la demanda de glucosa a través del tiempo es mayor en el metacestode que en el protoescólex. Esta conclusión coincide con los resultados mostrados en este capítulo, referidos a la alta captura de la sonda 2-NBDG bajo el efecto de la insulina respecto del control (**Figura 24C**). Posterior a la caracterización de los GLUTs en *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi*, y *Leishmania* sp. (Rodríguez-Contreras et al., 2015) se reportó la actividad biológica de un transportador en *E. multilocularis* denominado Em-GLUT1 (LC385549), describiéndose un segundo transportador Em-GLUT2 (LC385550) sin actividad biológica en forma coincidente con lo descrito para *T. solium* y *S. mansoni* (Kashiide et al., 2018). Durante el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral fue caracterizado a nivel bioquímico-molecular en *E. granulosus*, un EgGLUT1 (QTT61014.1) implicado en la captación de glucosa del metacestodo, esencial para el abastecimiento de energía y la supervivencia del parásito en el hospedero intermediario (Amahong et al., 2021). Este transportador fue sensible al inhibidor WZB117 y el tratamiento con este compuesto no solo redujo significativamente la viabilidad del estadio larvario *in vitro*, sino que también condicionó el desarrollo parasitario *in vivo* (Amahong et al., 2021). La secuencia de aminoácidos predicha para el Eg-GLUT1 reportado por estos autores es diferente a las reportadas en este trabajo de Tesis, consta de 500 aminoácidos y presenta mayor identidad de secuencia (96.01%) con el gen *Eg-glut14* (que codifica para la proteína predicha XP_024353621 o EGR_02557). Sin embargo, de manera coincidente a lo reportado en esta Tesis, este transportador presenta mayor expresión en protoescólices respecto de metacestodos. Estudios posteriores deberán realizarse para identificar la totalidad de transportadores GLUT en el parásito y asignar las funciones de estos parálogos en los cestodos.

En las células del parásito, la glucosa absorbida bajo el efecto de la insulina (**Figura 24 y 25A**) fue convertida en glucógeno (**Figura 25B**), que es la principal molécula de reserva en el estadio larvario, y posteriormente metabolizada directamente por la vía glucolítica hasta fosfoenolpiruvato (PEP) según se reporta en la bibliografía (Agosin y Repetto, 1961; McManus y Smyth, 1982). El PEP debió ser metabolizado hacia la fermentación homoláctica tal como indica el aumento en la actividad de la enzima LDH en estos experimentos y en antecedentes referidos a estudios bioquímicos del metabolismo del carbono en el parásito (**Figura 25C**) (Das, et al., 2004; 2013). Además de suprimir la lipólisis, la insulina también estimula la absorción de ácidos grasos a través del aumento de la expresión de transportadores de ácidos grasos como CD36 y FATP1, ambos presentes en *Echinococcus* sp. (Stahl et al., 2002; da Silva et al., 2018; Pórfido et al., 2020). Estos efectos insulino-dependiente parecerían también tener lugar en *Echinococcus* sp., dado que, bajo el efecto de la hormona, los metacestodos aumentaron el contenido de triglicéridos (**Figura 25 D**) y los protoescólices el tamaño y el número de las gotas lipídicas, forma no tóxica en la que se almacenan los triglicéridos y el colesterol en tejidos que acumulan lípidos (**Figura 26**). Por otro lado, tras inducir mayor captación de glucosa en el parásito, la insulina podría promover efectos anabólicos adicionales como la biosíntesis de lípidos e inhibición de la lipólisis (Saltiel et al., 2021). Finalmente, la insulina también controla la síntesis de proteínas a través de un proceso estrechamente vinculado a la captura de aminoácidos y la activación del complejo TORC1. Esto ocurre vía PI3K-AKT a través de la fosforilación y activación de la proteína quinasa TOR (Walker et al., 2014). En tal sentido, en este trabajo pudimos

corroborar la activación de Eg-TOR demostrando que la Ser³⁰²², altamente conservada en la proteína del parásito, está significativamente más fosforilada en presencia de insulina (**Figura 27**).

En conclusión, podemos sugerir que la insulina presente en el torrente sanguíneo de los hospedadores intermediarios de *Echinococcus* sp. induciría el desarrollo celular parasitario a través de la vía PI3K-AKT-TOR, al incrementar la biosíntesis de carbohidratos, lípidos y proteínas y conducir a la activación de las MAPKs (Bhrem y Koziol, 2017) (**Figura 28**).

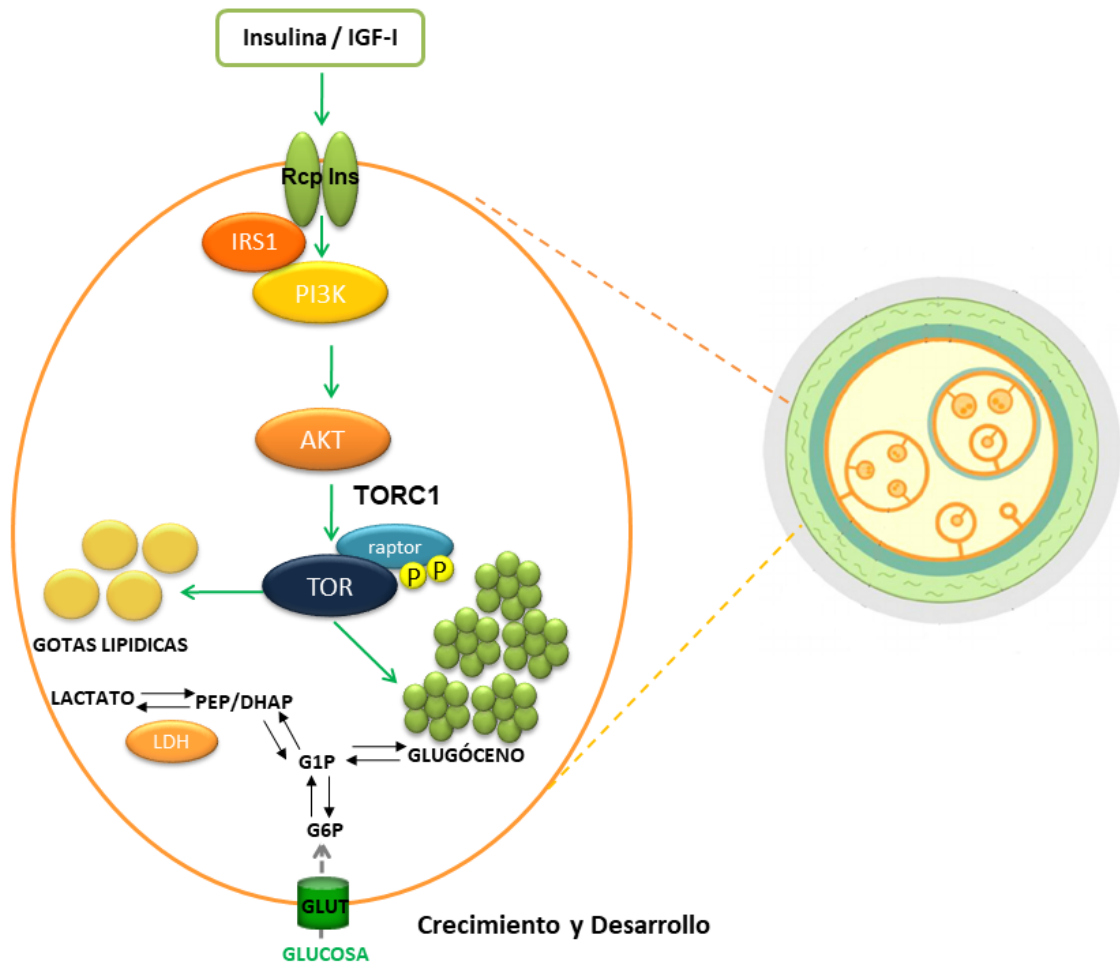


Figura 28. Vía de transducción de señales de insulina exógena en el estadio larvario de *E. granulosus*.

Debemos considerar que en casi todos los genomas de mamíferos publicados (más de 150) fueron identificados genes que codifican para la insulina (Irwin, 2021). Debido a que la glucosa es una molécula crucial para generar energía en forma de ATP, y varios tejidos de mamíferos dependen absolutamente de su disponibilidad en sangre, distintos sistemas complejos han evolucionado para mantener apropiados sus niveles séricos (Thorens, 2011), resultando la dieta la última fuente de glucosa para la mayoría de los organismos pluricelulares. Es por ello que los sistemas hormonales contra-reguladores han evolucionado para mantener la glucosa en sangre dentro de un rango estrecho y regulado. La insulina promueve la absorción de glucosa desde la sangre hacia diversos tejidos

cuando los niveles de glucosa son altos, mientras que el glucagón induce gluconeogénesis por el hígado para liberar glucosa y prevenir la hipoglucemia (Wasserman, 2009). Resultará de interés analizar en este Trabajo de Tesis los efectos de la hormona glucagón que contraregula los efectos de la insulina en los mamíferos hospedadores de *Echinococcus* sp.

Capítulo 2

Efecto metabólico del glucagón del hospedador en el estadio larvario de *Echinococcus granulosus*

5.1. INTRODUCCIÓN

Como está descrito para otros helmintos parásitos, *Echinococcus* sp. depende de las señales moleculares del hospedador para su crecimiento y desarrollo (Zhang et al., 2019). En este microambiente, este cestodo es impactado por citoquinas (como el factor de crecimiento transformante $-TGF\beta-$) y hormonas derivadas del hospedador que se unen a los receptores del parásito, influyendo en su viabilidad al inducir cambios en las vías de señalización celular conservadas entre metazoos (Hemer et al., 2014; Zhang et al., 2019, esta Tesis). Esto sugiere que *Echinococcus* puede detectar y responder a señales del hospedador para mejorar su supervivencia dentro de este hábitat. Considerando nuestra hipótesis central basada en la importancia de la glucosa como metabolito vital para el parásito (Ritler et al., 2019) y que, en el ciclo de vida de este cestodo sus hospederos definitivos e intermediarios regulan el nivel de esta hexosa en sangre en base a las acciones opuestas de la insulina y el glucagón (Hecker et al., 2019), es de interés en este capítulo revisar y analizar los posibles efectos exógenos de estas hormonas en el estadio larvario de *E. granulosus*.

Entre los trabajos pioneros en el establecimiento de sistemas *in vitro* para el desarrollo de metacestodos de *E. multilocularis* aportados por el laboratorio de Matthias Frosch (Jura et al., 1998), se introduce el uso de glucagón como promotor del crecimiento parasitario en co-cultivo con hepatocitos de rata, protocolo replicado sólo por otras pocas publicaciones (Wang et al., 2016). En la misma línea de evidencias podría sugerirse que existe una relación indirecta entre el glucagón y el desarrollo de cestodos, al vincular el efecto antihelmíntico que tiene la niclosamida al inhibir el desarrollo de gusanos adultos de *Taenia* sp. en perros (Gemmell et al., 1977), dado que la droga desencadena en mamíferos, una reducción en la sensibilidad al glucagón (Chowdhury et al., 2017). Por otro lado, en el trabajo experimental llevado a cabo por Smyth y McManus (1989) se describen ciertos factores abióticos (temperatura, pH, pCO_2 y pO_2) y bióticos dependientes del cánido (concentración de bilis, enzimas digestivas, dieta, estrés, antecedentes inmunológicos) entre los que se incluyen a las hormonas gástricas que influyen en la estrobilización, diferenciación sexual y maduración de *Echinococcus* sp. en el hospedero definitivo. Además, en este trabajo, los investigadores determinan los cambios morfológicos que sufren los protoescólices *in vitro*, simulando los procesos que ocurrirían en el tracto gastrointestinal del perro. Este proceso de maduración implica seis estadios de organogénia en los cuales, ocurren cambios irreversibles en el protoescólex que conducen

a la segmentación de proglótides, el desarrollo de gónadas y gametas, la formación de oncósferas y la disolución temprana de los corpúsculos calcáreos junto al desarrollo prominente de los canales excretores (Smyth y McManus, 1989).

Entre las funciones vitales y sistémicas de la insulina y el glucagón, se reconoce la función de ambas hormonas en el control de la glucosa disponible para las células y en la generación de energía a nivel de las mitocondrias (Hüttemann et al., 2007). Así el glucagón y la insulina, llegan a sus órganos diana y se unen a sus receptores específicos desencadenando una cascada de señalización que da respuestas que se ajustan a las circunstancias fisiológicas requeridas. El glucagón media señales durante los períodos de privación de nutrientes, contrapuesto a las de la insulina que, después de la ingestión de alimentos, inicia la activación de reacciones anabólicas que conducen a la biosíntesis de macromoléculas. Ambas hormonas mantienen la actividad mitocondrial y los procesos de fosforilación oxidativa, permitiendo el transporte de electrones, la inducción de respiración celular y la síntesis de ATP para sostener diferentes procesos celulares. Resulta de interés en este trabajo analizar el estado funcional de las mitocondrias en el estadio larvario de *E. granulosus*, además de correlacionar la actividad metabólica en relación a la glucosa y al glucógeno por parte del parásito frente a la presencia de glucagón exógeno.

Hace un siglo se demostró que la secreción de glucagón aumenta los niveles de glucosa plasmáticos (Banting et al 1922; Kimbal y Murlin, 1923), mientras que 25 años después se confirmó su secreción por parte de las células α pancreáticas en vertebrados (Sutherland y De Duve, 1948). Los efectos glucogenolíticos (hidrólisis de glucógeno), gluconeogénicos (biosíntesis de *novo* de glucosa) y cetogénicos (producción de cuerpos cetónicos) de la hormona fueron elucidados por primera vez en perros (Unger y Orci, 1975). Posteriormente fue descrita la síntesis de glucagón y péptidos tipo glucagón (GLP1) a partir del precursor proglucagón (Drucker, 1990) y recientemente la secreción extrapancreática de estas hormonas (**Figura 28**) (Lund et al., 2016). Particularmente, se ha comprobado que el glucagón completamente procesado está presente en la mucosa intestinal y su liberación por parte de las células L enteroendócrinas es mediada por el alto nivel de glucosa en el tejido ileal (Sun et al., 2021). El glucagón (cuyo nombre proviene de “agonista de glucosa” o “factor hiperglucemiante”) es un péptido de 29 aminoácidos, contra-regulador de la insulina, que estimula la producción de glucosa hepática e induce el catabolismo de carbohidratos para aumentar los niveles de glucosa en plasma.

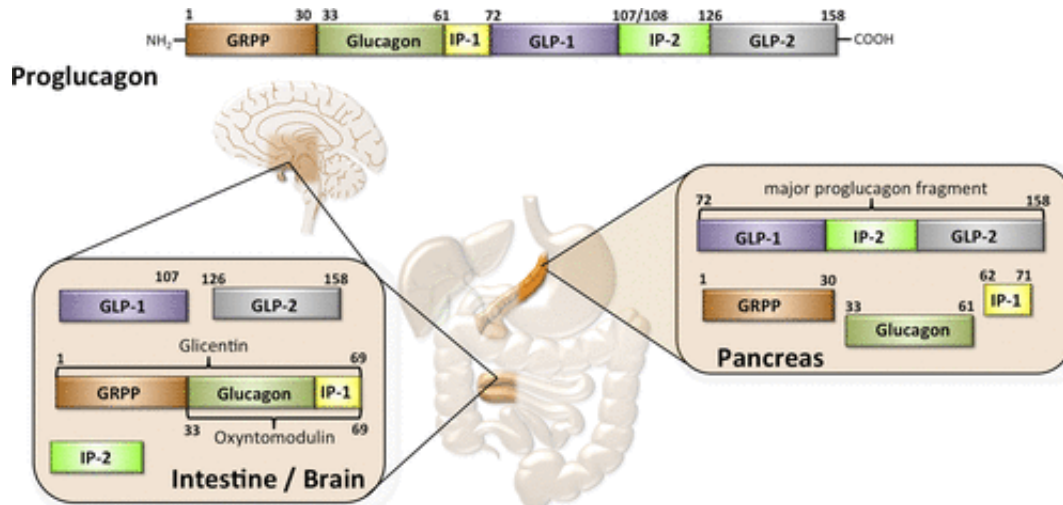


Figura 28. Esquema del procesamiento selectivo de la prohormona proglucagón según las enzimas presentes en los diferentes tejidos. En el páncreas se produce la mayoría de la hormona a expensas de la convertasa 2 de la prohormona (PC2), la cual escinde el proglucagón en glucagón, polipéptido pancreático relacionado con glicentina (GRPP), péptido interviniente 1 (IP-1) y un fragmento proglucagón principal (MPGG). Una baja concentración de la hormona se produce en el intestino (en las células enteroendócrinas tipo L) y el cerebro (en el núcleo del tracto solitario del tronco cerebral), donde el proglucagón es escindido por la convertasa 1 de la prohormona (PC1) en glicentina, oxintomodulina (OXM), péptido intermedio 2 (IP-2) y los péptidos similares al glucagón 1 y 2 (GLP-1 y GLP-2). La glicentina y la OXM contienen la secuencia completa del glucagón (correspondiente a los aminoácidos 33–61 del proglucagón). Tomado de Müller et al., 2017.

El glucagón y el GLP-1 pertenecen a la familia de las secretinas, un grupo de péptidos estructuralmente relacionados con alta identidad de secuencia, pero con efectos opuestos sobre el metabolismo energético y de la glucosa. Éstos, se forman a partir del procesamiento específico del proglucagón según las enzimas expresadas en cada tipo de célula (del páncreas, del íleo o del sistema nervioso central; **Figura 28**). El glucagón promueve su acción biológica a través de la unión y activación del receptor de glucagón (GCGR), un miembro de la familia de receptores tipo secretina clase B acoplados a la proteína G y compuesto por 7 dominios helicoidales de transmembrana (Hjorth et al., 1994).

El glucagón, la hormona del crecimiento (GrH) y el péptido vasoactivo intestinal (VIP) fueron identificados en la lamprea *Petromyzon marinus* utilizando datos de secuencia genómica y herramientas de reconstrucción filogenética. Esto sugiere, que se han originado como péptidos activos al inicio de la radiación de los vertebrados (Jékely, 2013). Sin embargo, los receptores para el glucagón, la paratohormona y el péptido activador de adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP) están presentes en los metazoos bilaterales ancestrales, como los lofotrochozoos, entre los que se incluyen a los platelmintos (Mirabeau y Joly, 2013).

La unión del glucagón a su receptor da como resultado la activación de la adenilato ciclasa, que a su vez conduce a un aumento del AMPc y la consecuente activación de la proteína-quinasa A (PKA), quien media la actividad de la hormona interactuando con los blancos metabólicos (Pilkis y Granner, 1992; Jiang y Zhang, 2003). Además de sus efectos sobre el metabolismo de hidratos de carbono, el glucagón también juega un papel en el metabolismo de los lípidos (activa la lipólisis de triglicéridos e inhibe la síntesis de lípidos en general), influye en

la ingesta de alimentos, afecta el peso corporal, inhibe la motilidad intestinal y promueve la autofagia (Müller et al., 2017; Hædersdal et al., 2018). El objetivo de este capítulo es llevar a cabo estudios bioquímicos-moleculares para dar cuenta de la actividad metabólica que ejerce el glucagón exógeno en el estadio larvario de *E. granulosus*, definiendo puntos antagónicos entre esta hormona y la insulina exógena.

5.2. RESULTADOS

5.2.1. Identificación *in silico* de un receptor putativo para glucagón en *E. granulosus*

En este trabajo se reconoció y caracterizó *in silico* un posible receptor de glucagón acoplado a la proteína G, con 25% de identidad en su secuencia primaria y secundaria con el receptor de glucagón humano (GCGR, PDB4L6R, P47871GLR_Human, **Figura 29A-B**). Este receptor denominado Eg-GCGR (EgrG_000296700, también registrado como CDS24823.1) pertenece a la familia de receptores tipo secretina clase B, posee siete regiones de transmembrana e interaccionaría con aminoácidos claves del glucagón dado que posee residuos conservados involucrados en el mantenimiento de la estructura secundaria y en la interacción con la hormona. La existencia y funcionalidad de este receptor podría dar cuenta de los efectos metabólicos observados ante la presencia de la hormona peptídica en el cestodo que se demuestran a continuación (Siu et al., 2013; Zhang et al., 2018).

5.2.2. Captación de glucosa, expresión de genes *Eg-gluts* y acumulación de compuestos de reserva de carbono bajo el efecto de glucagón exógeno en el estadio larvario de *E. granulosus*

En base a la capacidad del parásito de incorporar la sonda 2-NBDG (análogo a D-glucosa) a nivel celular, pudo ser estimada la captación de la hexosa en presencia de glucagón en experimentos a tiempos cortos. Una vez en el interior de las células, el compuesto es metabolizado preservando la fluorescencia, pudiendo acumularse en forma de glucógeno en las células de parásitos vivos durante mayor tiempo de interacción con la sonda (Louzao et al., 2008). La captación de glucosa en protoescólices control fue similar a la observada bajo el efecto del glucagón durante 1 hora de tratamiento. Cabe agregar que pudo ser detectada la incorporación del monosacárido en corpúsculos calcáreos de protoescólices en presencia de glucagón, evidenciando la capacidad que tiene la hormona en activar metabólicamente a estas células especializadas, las cuales demostraron poseer una conexión directa con el tegumento (**Figura 31**). En metacestodos tratados con glucagón, la captación de 2-NBDG y la correspondiente señal fluorescente, fue reducida respecto al control (**Figura 30A-B**). También se evidenciaron en estos metacestodos, células gigantes especializadas en el almacenamiento de glucógeno entre las células de la capa germinal (**Figura 30A (c-d)**), previamente descriptas en el parásito (Koziol et al., 2014). Estos resultados fueron

B

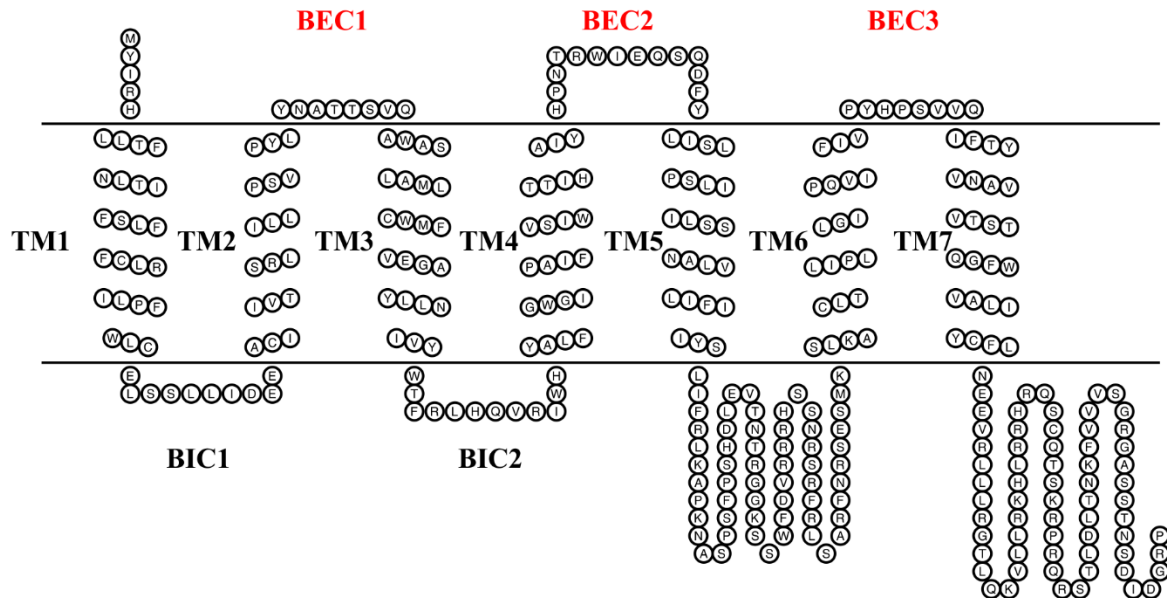


Figura 29. Caracterización *in silico* del receptor de glucagón en *E. granulosus*. **A)** Alineamiento de secuencias primarias del receptor humano de glucagón (GCGR, NP_000151) y la posible proteína ortóloga en *E. granulosus* (EgrG_000296700) y *E. multilocularis* (Emu296700) anotada en GenBank como receptor de hormona diurética GPRdh2. El consenso se indica en la última línea, total (mayúsculas), parcial (minúsculas), cambios conservativos (asteriscos), ausencia de consenso (puntos) y espacios introducidos para maximizar el alineamiento (guiones). Dominios de transmembrana (TM1 a TM7, cajas grises) y bucles extracelulares (BEC1-3) indicados según los estudios de cristalización del GCGR humano. La región N-terminal extracelular que comprende los primeros 127 residuos del receptor para glucagón humano está ausente en Eg-GCGR. La porción N-terminal del glucagón (Ser²-Leu¹⁴) interactuaría con el borde externo del TM1, TM2, TM6-7 y BEC2 del GCGR conservado en la proteína Eg-GCGR. En la región BEC1, de los residuos Arg²⁰¹, Tyr²⁰², Asp²⁰⁸ y Trp²¹⁵ que estabilizan el bucle extracelular e interactúan directamente con glucagón en la proteína humana sólo se identifica Tyr⁸⁷ en Eg-GCGR (equivalente a Trp²¹⁵). Las interacciones hidrofóbicas contribuyen al reconocimiento del ligando peptídico y datos de mutagénesis señalan como residuos claves en el GCGR a Gln¹³¹ (Arg⁴), Y¹⁴⁵ (Phe¹⁸), L³⁸² (Tre²⁵⁰), L³⁸⁶ (Ala²⁵⁴), Ser³⁹² (Ser²⁵⁸) donde los aminoácidos conservados en la proteína del parásito se indican entre paréntesis. En el TM3 el residuo Trp²⁴¹ (Trp¹¹⁵) interacciona con residuos hidrofóbicos conservados Tyr²³⁹ (Phe¹¹¹), Leu³⁵⁸ y Gly³⁵⁹ (Phe²³⁰ y Gly²³¹). Aminoácidos importantes en la actividad funcional del receptor conservados (diamante negro) y no conservados (círculos negros) en el Eg-GCGR putativo (Siu et al., 2013; Zhang et al., 2018). **B)** Estructura secundaria del Eg-GCGR compatible con un receptor acoplado citoplasmáticamente a la proteína G donde la predicción de dominios de transmembrana (TM1-3) y bucles extracelulares (BEC1-2) son ligeramente diferentes ya que no están ajustados con los estudios de cristalización.

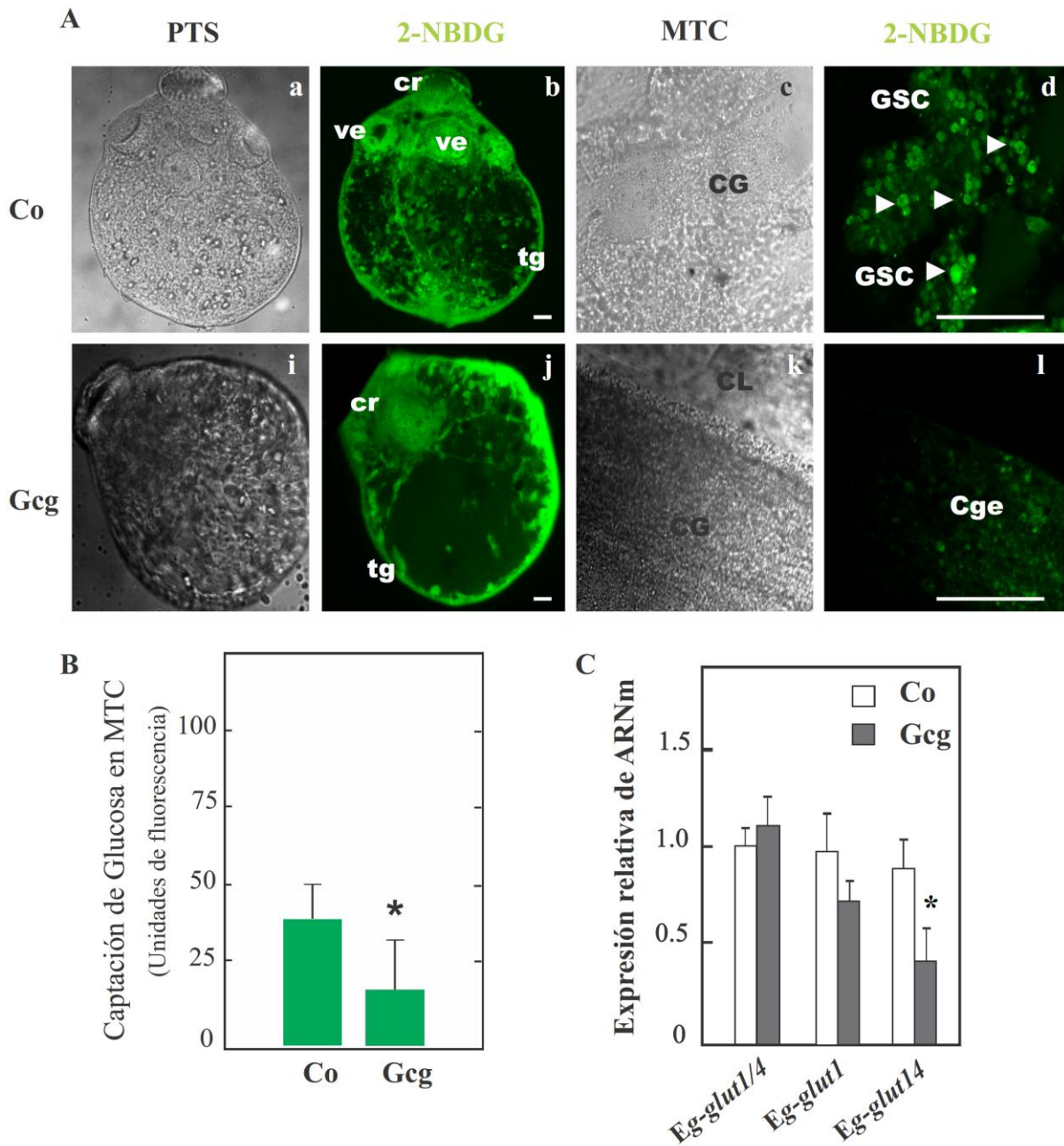


Figura 30. Cambios en la captación de glucosa en presencia de 2-NBDG y expresión de los transportadores tipo GLUT bajo el efecto de glucagón en protoescólics (PTS) y en metacestodos (MTC) de *E. granulosus*. **A)** Fotografía confocal de fluorescencia (columnas indicadas con 2-NBDG) y de campo claro (columna a la izquierda de 2-NBDG). Barras indican 10 μm . cr (Cono rostral), ve (ventosa), tg (tegumento). CG (capa germinal), Cge (células germinales), CL (capa laminar), GSC (células que almacenan glucógeno). **B)** Gráfico de barras que muestra los valores de las proporciones de fluorescencia de 2-NBDG medidas en metacestodos control (Co) y tratados con glucagón (Gcg) determinados mediante integración con el software Image J a partir de 10 fotografías de cada condición. Asterisco (*) indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en comparación con el control. **C)** Análisis de qPCR a partir de ARN total de metacestodos (MTC) incubados durante 24 h bajo condiciones control (Co) o tratados con glucagón (Gcg). Asterisco (*) indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

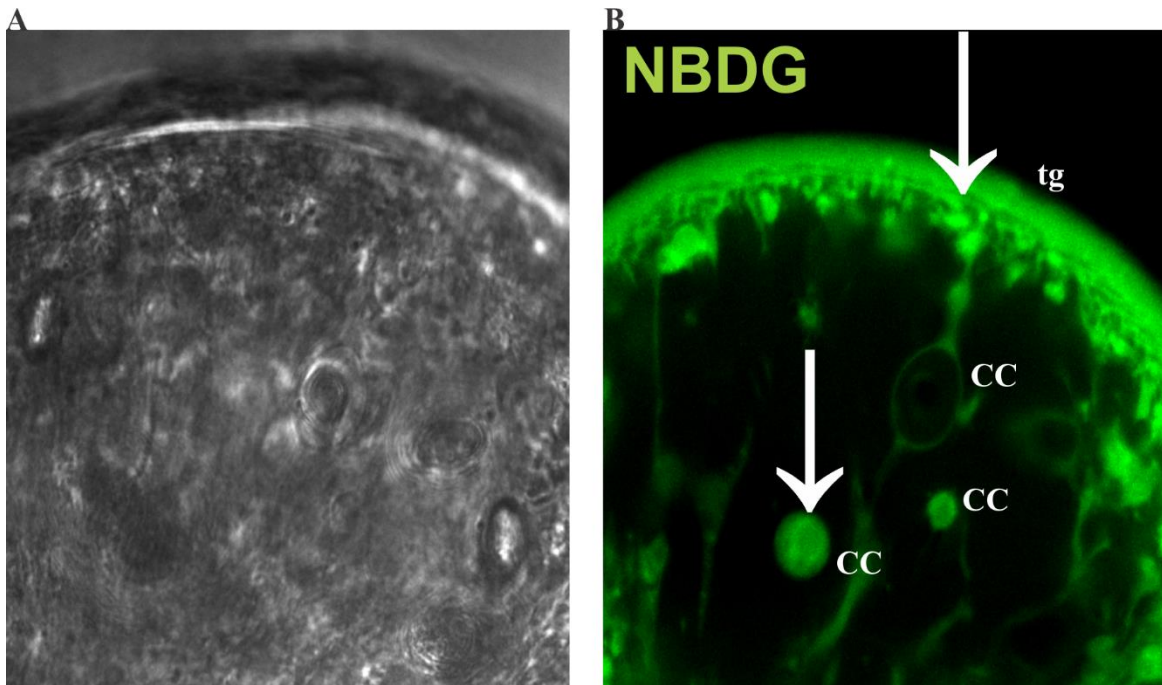
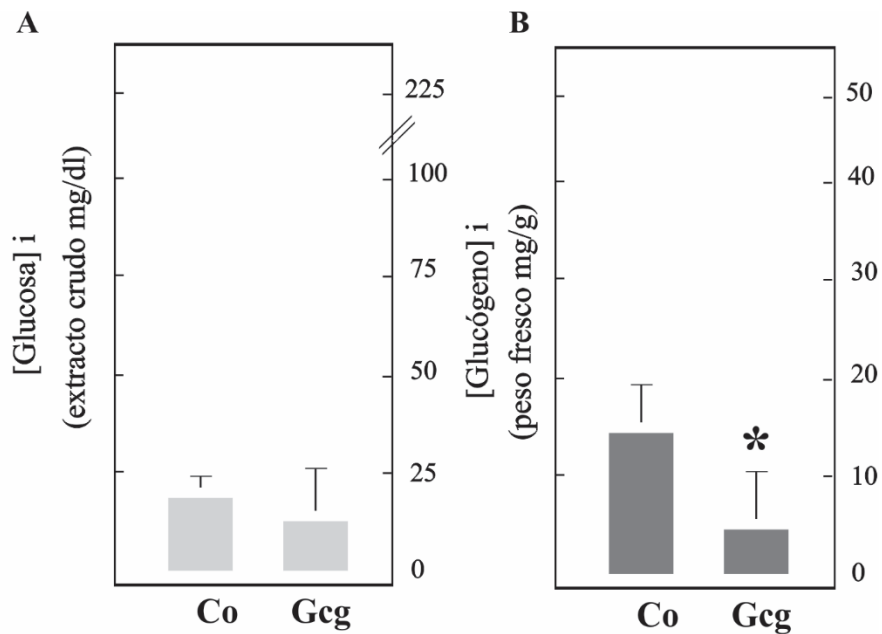


Figura 31. Captación de glucosa bajo el tratamiento con glucagón en el tegumento sincicial de protoescólices. Se indica con flechas los corpúsculos calcáreos (CC) que captan glucosa desde el medio extracelular y la evidente conexión citoplasmática de los mismos con el tegumento (tg) del parásito. A) Microscopía de transmisión B) Confocal en presencia de 2-NBDG y 0,05 $\mu\text{g/ml}$ de glucagón.



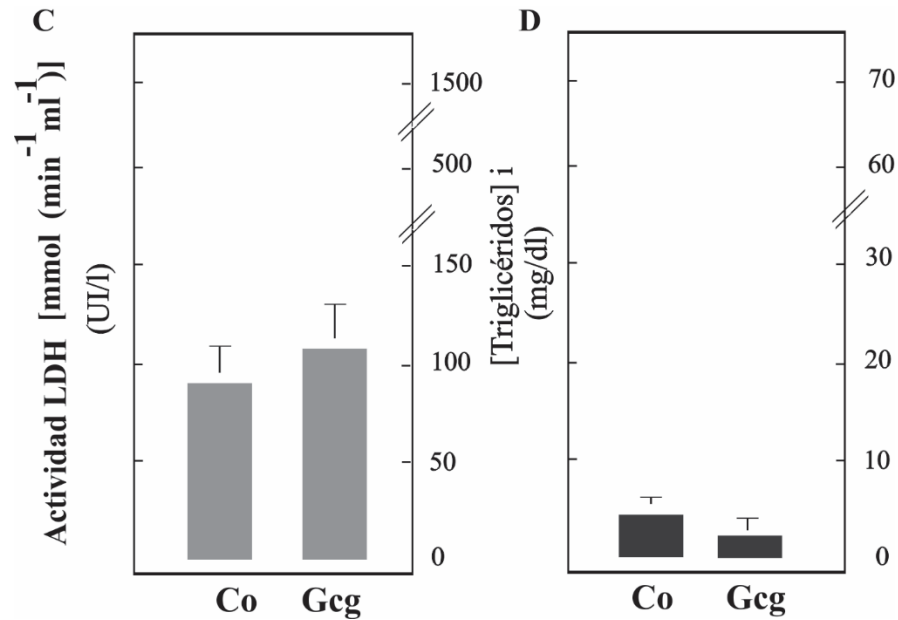


Figura 32. Cambios metabólicos inducidos por glucagón en metacistos de *E. granulosus*. A partir de células germinales de metacistos en cultivo con 5 mM de glucosa externa tanto en condiciones control (Co) como en presencia de 0,05 $\mu\text{g/ml}$ glucagón (Gcg), se determinó el contenido de glucosa libre (A), la acumulación de glucógeno (B), se estimó la tasa fermentativa en función de la actividad de LDH (C), y el contenido de lípidos neutros (D), Los valores se expresan como media \pm error estándar de la media. *Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

5.2.3. Efectos de la insulina y el glucagón exógenos en la expresión génica de las enzimas del metabolismo intermediario, la actividad mitocondrial y el flujo glucolítico en metacistos y protoescolices.

Aunque aún no se ha demostrado que la gluconeogénesis (biosíntesis de *novo* de glucosa) tiene lugar en *Echinococcus* sp., está aceptado que esta vía podría ser activa en el parásito dada la expresión de los genes que codifican a las enzimas claves del proceso (Parkinson et al., 2012). En la **Figura 33** se muestra el aumento significativo de los niveles de ARNm, en presencia de insulina y glucagón, de tres genes que codifican para enzimas que participarían en la gluconeogénesis, tales como la fructosa-1,6-bisfosfatasa (*Eg-fl,6bp*), la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (*Eg-pepck*, que también participa en la degradación fermentativa de la glucosa) y la glucosa-6-fosfatasa (*Eg-g6p*) en el estadio larvario.

Posteriormente fue determinado el estado funcional de las mitocondrias, el cual contribuye al consecuente aporte de ATP y de metabolitos del ciclo de Krebs. Utilizando la sonda JC-1 en protoescolices vivos tratados con ambas hormonas, fue evaluado el cambio de potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). JC-1 es un compuesto fluorescente con carga positiva, que ingresa selectivamente en las mitocondrias y que cambia su estado de polimerización en forma reversible cuando aumenta el Ψ_m . En las mitocondrias normales, con alto Ψ_m , JC-1 se acumula en forma de agregados con fluorescencia roja, mientras que en las mitocondrias inactivas, con bajo Ψ_m , permanece en la forma monomérica exhibiendo fluorescencia verde (Reers et al., 1991, **Figura 34C**). En protoescolices tratados con insulina y glucagón la relación de fluorescencia roja/verde de JC-1 fue de $2,8 \pm 0,5$ y

4,4 ± 0,5 respectivamente, registrándose un aumento del Ψ_m en presencia de ambas hormonas respecto de parásitos control (relación de fluorescencia roja/verde de 1,9 ± 0,7), siendo estadísticamente significativa esta relación en mitocondrias expuestas al glucagón (**Figura 34A-B**). Los efectos de la insulina se corresponden con la activación celular en el polo opuesto al escólex, donde comienzan los eventos de de-diferenciación evidentes en el desarrollo vesicular de protoescólices a metacestodos (Loos et al., 2015). Finalmente, la tasa de flujo glucolítico fue calculada en metacestodos en función de la incorporación/metabolización de glucosa y la producción de lactato intraquística. Las determinaciones fluorométricas con 2-NBDG fueron realizadas a diferentes tiempos de metabolización de la hexosa acompañada de la determinación de lactato en el líquido hidatídico (TeSlaa y Teitell, 2014). Los resultados muestran que en presencia de insulina, la tasa de glucólisis fue significativamente mayor respecto de los parásitos control y tratados con glucagón, siendo en estos últimos comparable el consumo de glucosa (**Figura 35**).

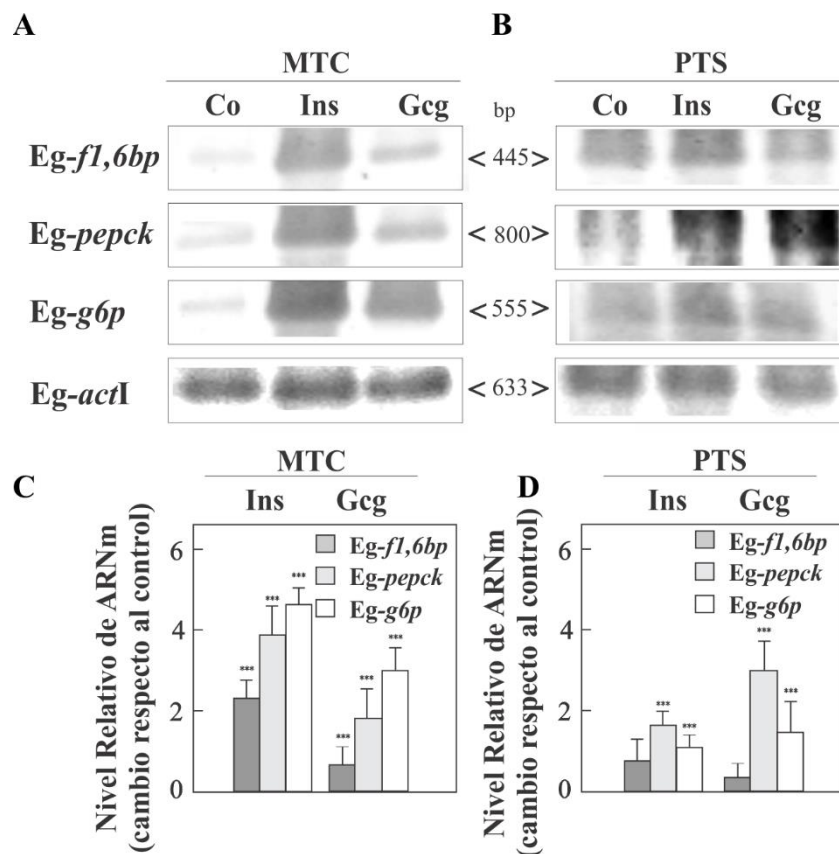


Figura 33. Análisis de la expresión de genes mediante RT-PCR (A-B) y qPCR (C-D) a partir de ARN total de metacestodos (A y C, MTC) y protozooides (B y D, PTS) en condiciones control (Co) y tratados con 0.1 uI/ml de insulina (Ins) y 0,05 µg/ml de glucagón (Gcg) durante 24 h. La amplificación de *Eg-actina I* (*Eg-actI*) se usó como control de carga. Los tamaños moleculares de los amplicones se encuentran indicados entre A y B. Los tamaños moleculares de los amplicones se indican mediante puntas de flecha. Asteriscos (***) indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

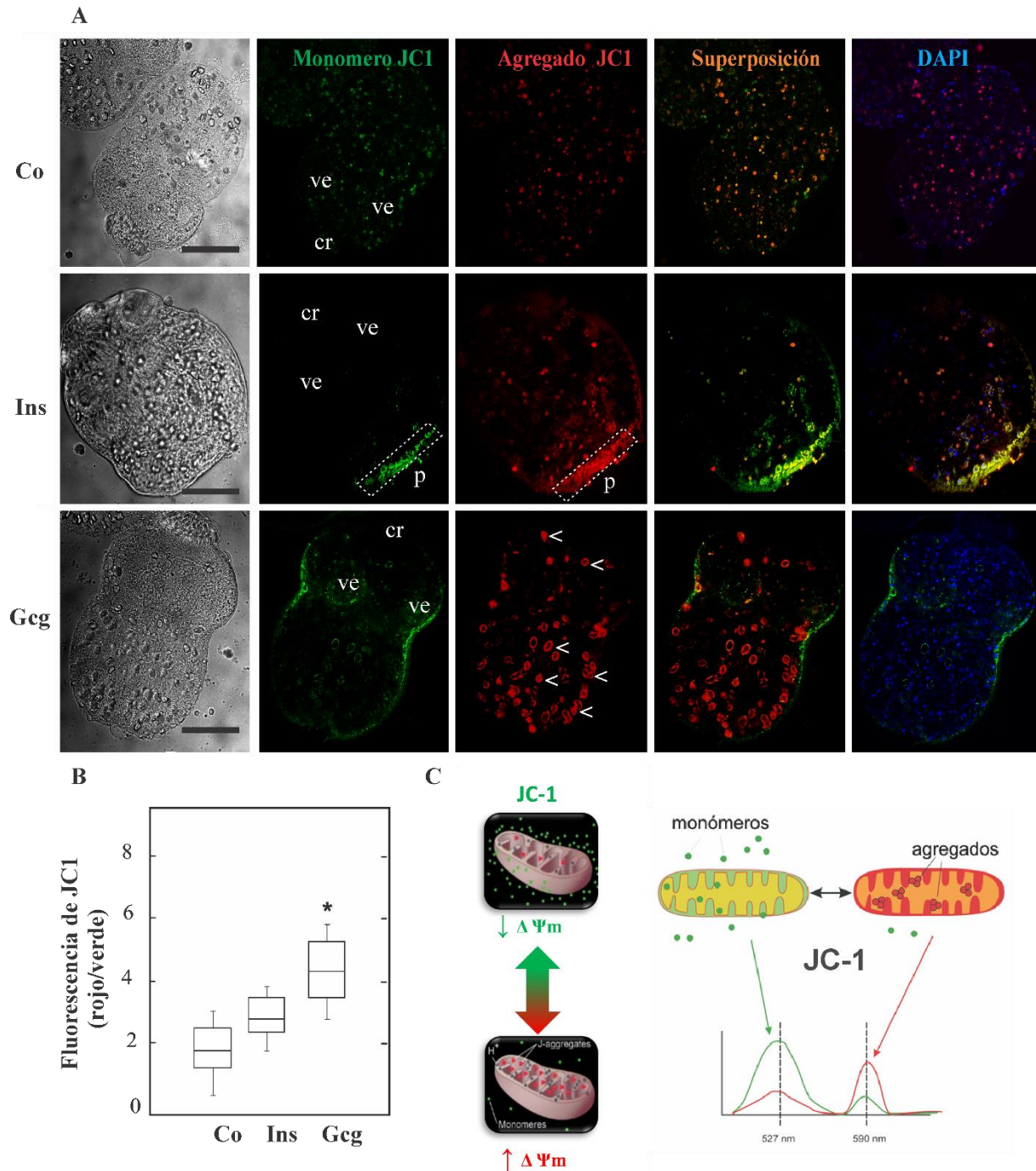


Figura 34. Actividad mitocondrial estimada con la sonda JC-1 a partir de protoesquistos de *E. granulosus*. **A**, Parásitos control y tratados con insulina o glucagón (2 h) fueron incubados con 10 $\mu\text{g/ml}$ del colorante JC-1 (30 min), lavados (Hepes 20 mM, pH 7,2) y fotografiados con el microscopio confocal (Nikon Eclipse C1 Plus). Rojo y verde (JC-1, mitocondrias activas e inactivas, respectivamente), núcleos (azul, DAPI). Barras 50 μm . Cono rostral (cr), Ventosa (ve), Protonefridio (p), Corpúsculos calcáreos (cabezas de flecha). **B**, Relación de intensidades de fluorescencia roja (longitudes de onda de excitación/emisión = 485/590, mitocondrias activas) y verde (longitudes de onda de excitación/emisión = 485/538, mitocondrias despolarizadas) analizadas para 5 protoesquistos de cada muestra. La relación de fluorescencia roja/verde fue calculada utilizando el software Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). **C**, Conceptualización de los cambios de fluorescencia emitidos por la sonda JC-1.

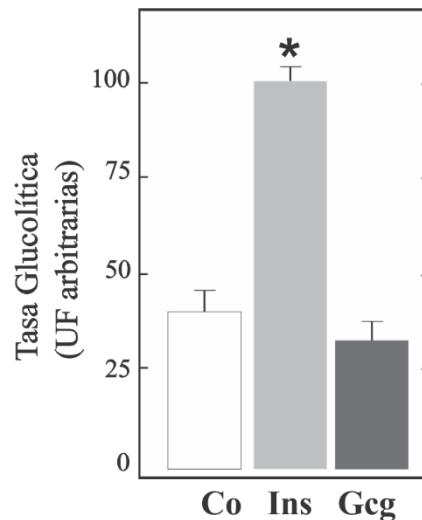


Figura 35. Tasa de flujo glucolítico representada en función de la incorporación/metabolización de glucosa y la liberación de lactato en metacestodos de *E. granulosus*. Representación del consumo de glucosa en función de la detección fluorométrica de glucosa en presencia de 2-NBDG y la conversión a lactato. Las determinaciones fluorométricas con 2-NBDG fueron realizadas a diferentes tiempos de metabolización de la hexosa previa incorporación de la sonda durante 2 h a 37°C. Las condiciones de análisis fueron realizadas en protoescólices control (Co, M199 con 5 mM de glucosa y 500 μ M de 2-NBDG), en presencia de 0,1 U/ml de insulina (Ins) y 0,05 μ g/ml de glucagón (Gcg). Asterisco (*) indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

5.3. DISCUSION

En la evolución sólo fueron identificados péptidos similares al glucagón en Branchiostoma (pez cefalocordado) y Ciona (urocordado marino), ambos en la base de la radiación de los vertebrados, sin encontrarse genes candidatos de estos péptidos en ambulacrarios ni lofotrochozoos, incluyendo entre estos últimos a los gusanos planos (Mirabeau y Joly, 2013; Elphick et al., 2018). En tal sentido, para comprender la evolución de los sistemas de señalización hormona-receptor es imprescindible incluir a los sistemas experimentales en invertebrados (Elphick et al., 2018). Como está descrito en nematodos de vida libre e insectos, los niveles circulantes de glucosa están regulados por la acción de péptidos similares a la insulina (DILPs) que promueven la absorción de glucosa, y análogos al glucagón, que conllevan a la movilización del monosacárido (Song et al., 2018). En estos invertebrados, la hormona adipoquinétina (AKH) se considera funcionalmente relacionada al glucagón de los vertebrados (Lee et al., 2004). En *Drosophila*, la liberación de AKH (por parte de células neuroendocrinas del cuerpo cardíaco) promueve la movilización del glucógeno y de la grasa del cuerpo graso (equivalente al hígado y tejido adiposo de los mamíferos) (Kim y Rulifson, 2004; Hentze et al., 2015). Recientemente se ha descrito como el sistema nervioso de *Drosophila* posee neuronas cuyos axones se bifurcan y se proyectan a las células productoras de los péptidos DILP y AKH, en respuesta a cambios en el estado energético del organismo, similar a lo descrito en vertebrados (Oh et al., 2019). Los resultados presentados en el capítulo 1 y 2 de esta Tesis Doctoral permiten interpretar en el estadio larvario de *E. granulosus*, la acción integrada de la insulina y glucagón liberados en los hospedadores mamíferos, dado que el parásito expresa receptores y vías

de transducción de señales intracelulares sensibles a estas hormonas, contribuyendo a modificar el nivel de glucosa libre y provocando inducción metabólica en ambos casos.

Durante la publicación de los genomas de *Echinococcus* sp. fueron reconocidos 76 receptores acoplados a la proteína G (GPCR) (Tsai et al., 2013; Zheng et al., 2013). Uno de estos receptores fue identificado como un putativo receptor para glucagón (Eg-GCGR, **Figura 30**), ortólogo al GCGR de mamíferos, el cual preserva dominios estructurales y aminoácidos claves conservados a través de la evolución capaces de interactuar con el glucagón e iniciar una señalización celular seguramente similar a otros metazoos. En la misma línea de evidencias, en el genoma del parásito, también fueron identificados los genes que expresan a las enzimas que pertenecen a la vía de transducción del glucagón: tres genes de adenilato ciclasa y un gen para la PKA, fundamental en la señalización de la hormona.

En *Echinococcus* sp., la glucosa activamente absorbida por el tegumento del parásito, es convertida en glucógeno y/o metabolizada directamente por la vía glucolítica, por fermentación homoláctica y por dismutación málica (**Figura 13**). Como ha sido descrito previamente en otros tipos celulares, es evidente que el glucagón exógeno en metacestodos en cultivo, reduce la captación de glucosa y su tasa de metabolización por glucólisis (**Figs 31Ac-d-k-l, 31C, 36**) (Ui et al., 1973; Müller et al., 2017). Sin embargo, en la larva propiamente dicha, los efectos de la hormona permiten la captación de glucosa desde el tegumento y la activación del metabolismo en los corpúsculos calcáreos (**Figura 32**). Es conocido que, en línea con lograr la homeostasis de energía, el glucagón induce autofagia y aumenta el número de lisosomas (Kanasaki et al., 2019). En este sentido, el glucagón también contrapone su actividad a la de la insulina, la cual inhibe la autofagia al activar a TOR (**Figura 14**). En esta Tesis demostramos como la insulina del hospedador activa a Eg-TOR (**Figura 28**) y, por ende, inhibiría la autofagia como ha sido demostrado en nuestro grupo de trabajo (Loos et al., 2018; Loos et al., 2020a; 2020b). Pero también queda claramente demostrado que, en células que tienen inducida la autofagia como los corpúsculos calcáreos (Loos et al., 2014) (**Figura 12**), el glucagón podría activar su metabolismo posiblemente a través de la inducción de la autofagia (**Figura 35**).

Como en otros helmintos parásitos, *Echinococcus* sp. basa su actividad metabólica en el almacenamiento de glucógeno a expensas de la eficiente captación de glucosa en continua competencia con el microambiente celular del hospedador (McManus y Smyth, 1982). El metabolismo del glucógeno en diferentes células del parásito está regulado por la glucógeno-sintasa y la glucógeno-fosforilasa que catalizan su biosíntesis y su degradación, respectivamente (Sarciron et al., 1988; Tandon et al., 2003). Como en otros metazoos, estas dos enzimas presentan formas activas e inactivas interconvertidas por fosforilación y desfosforilación (Nelson et al., 2000). Precisamente, PKA que se activa en presencia de glucagón, induce la fosforilación e inactivación de la glucógeno-sintasa, frenando la síntesis de glucógeno; pero también la fosforilación y activación de la glucógeno-fosforilasa, promoviendo la degradación del polisacárido y la liberación de glucosa-6-fosfato. Esta última se convierte en glucosa por acción de la glucosa-6 fosfatasa (G6Pasa) y PEP-carboxiquinasa (PEPCK), las cuales aumentan su expresión y actividad a expensas del glucagón (Vidal-Puig y O’Rahilly, 2001; Müller et al., 2017). En forma

semejante a lo descrito, el glucagón en el parásito promovería la glucógenolisis (**Figura 33B**) y el aumento de ARNm de la G6Pasa y PEPCK (**Figura 34**) potencialmente involucradas en la gluconeogénesis.

En presencia de glucagón se registraron efectos antagónicos con la insulina exógena en relación con el contenido de glucógeno, con los niveles de glucosa libre y en el flujo glucolítico en el parásito (**Figuras 26 y 36**). Mientras que en respuesta al glucagón se indujo glucógenolisis y activación mitocondrial en los corpúsculos calcáreos, en presencia de insulina se evidenció acumulación de glucógeno (por acción sobre la glucógeno-sintasa y glucógeno-fosforilasa, inversa a la ejercida por el glucagón) y activación de la vía AKT-TOR potenciando reacciones de biosíntesis de macromoléculas celulares. Bajo el efecto de la insulina se registró un aumento en la expresión de los Eg-GLUTs (**Figuras 24-26A**), que conllevó a un incremento en la absorción de glucosa, la cual fue convertida en glucógeno (**Figura 26B**) y metabolizada por un aumento en la glucólisis (**Figura 36**) (Agosin y Repetto, 1961; McManus y Smyth, 1982), en la fermentación a lactato (**Figura 26C**) y en la dismutación málica (a través de la fijación de CO₂) a expensas de la PEPCK (**Figura 34**) (Das, et al., 2004; 2013). Concomitantemente, el nivel de acumulación de glucosa intraquística fue máximo en presencia de insulina y cercano a 12,5 mM, aproximadamente diez veces superior al descrito en metacestodes control (1,4 mM), el cual a su vez está en el mismo rango de valores reportados por otros autores para quistes murinos (Jeffs y Arme, 1988). Por lo tanto, se deduce que la insulina a expensas de aumentar notablemente la captura de glucosa, potencia tanto la acumulación de glucógeno como la de glucosa, manteniendo además alta la tasa glucolítica para producir ATP y sostener otras reacciones anabólicas como la biosíntesis de gotas lipídicas y proteínas en el parásito (**Figura 36**). Esta es precisamente la acción de la insulina en metazoos, responsable del control de los procesos de transporte de glucosa y de regular las actividades de las enzimas involucradas en la glucólisis y biosíntesis de glucógeno entre otras importantes del anabolismo y proliferación celular (**Figura 28**) (Saltiel, 2021).

Finalmente, las mitocondrias son fundamentales para la generación de ATP a partir de diversas fuentes de carbono, siendo los carbohidratos los principales sustratos degradados en *Echinococcus* sp. (Ritler et al., 2019). En presencia de glucagón y utilizando la sonda JC-1, fue constatado el aumento del Ψ_m en protoescólices. Fue especialmente evidente este incremento del Ψ_m en los corpúsculos calcáreos, células biomineralizadas que concentran calcio en su citoplasma y que activan su matriz mitocondrial en presencia de glucagón como está descrito para otros tipos de células (**Figura 35**) (Boyman et al., 2020). Este notorio aumento de la actividad mitocondrial en los corpúsculos calcáreos, se correlaciona con la alta tasa de autofagia a la que están sometidas estas células, con función metabólica activa en los cestodos. Como fue descrito en hepatocitos aislados, el glucagón aumentó la actividad mitocondrial al inducir la frecuencia respiratoria, el consumo de oxígeno y la fosforilación oxidativa en respuesta a una movilización de iones calcio y acumulación de nucleótidos de adenina en forma de AMP, ADP y ATP (Aprille et al., 1982; Amigo et al., 2013). El aumento en la concentración de calcio mitocondrial es importante para la activación de las deshidrogenasas mitocondriales y la regulación de la respiración, fenómeno que estaría garantizado en los corpúsculos calcáreos. Los resultados de este capítulo se resumen en la **Figura 37**.

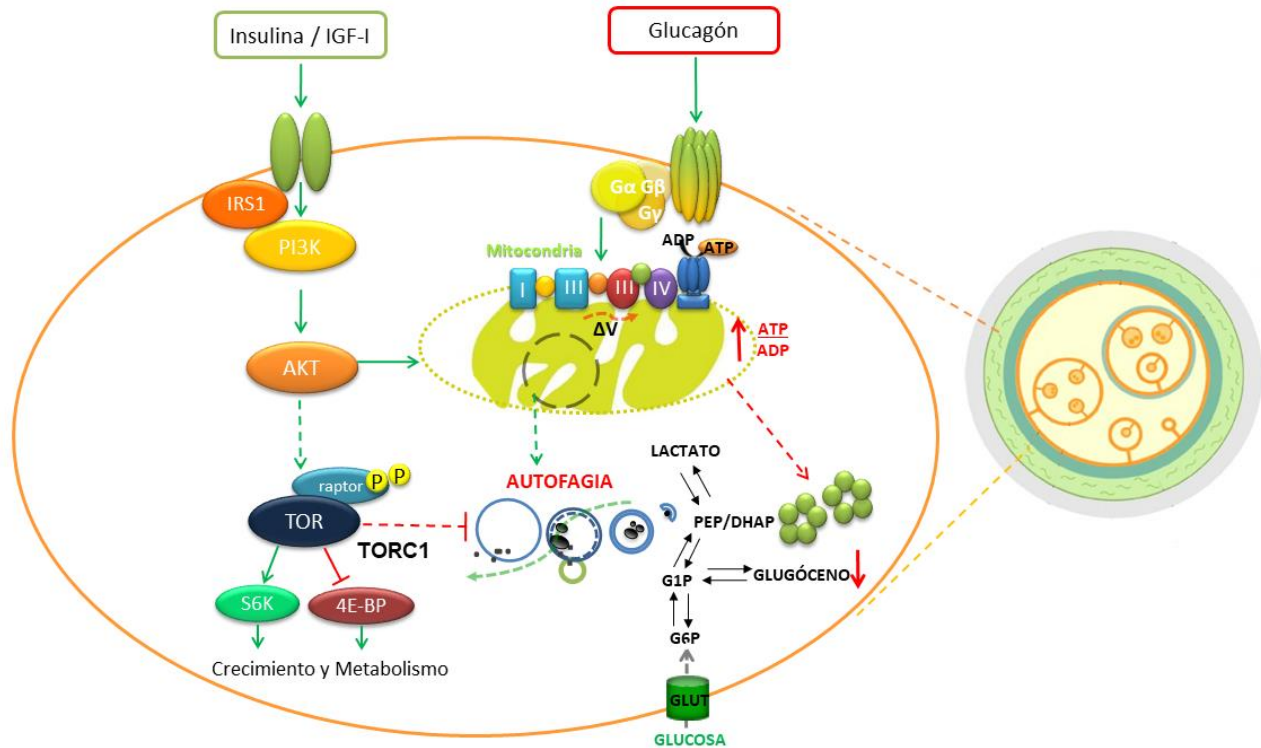


Figura 37. Vía de transducción de señales de insulina y glucagón exógenos en *E. granulosus*.

Hace más de 5 décadas se ha descrito la abundancia de células endocrinas que se asemejaban a las células α pancreáticas en la mucosa oxíntica e intestinal de cánidos (Orci et al., 1968, Sundler et al., 1976). Posteriormente fue detectada la secreción de glucagón “verdadero” en cantidades apreciables por parte de estas células gastrointestinales (Lefebvre y Luyckx 1980), confirmándose este hecho recientemente en casi todos los mamíferos estudiados (Lund et al., 2016). Por lo tanto, resultaría válido sugerir que en el intestino de cánidos en presencia de glucagón y péptidos tipo secretinas, se podría estimular la activación metabólica de los protoescólices durante el desarrollo del gusano adulto. Ese momento, es en el que los corpúsculos calcáreos dejan de ser evidentes como células refringentes porque incrementan su metabolismo a expensas de la captura de glucosa (conectados mediante prolongaciones citoplasmáticas con el tegumento) (**Figura 32**) y de la activación de sus mitocondrias (**Figura 35**), movilizándolo su contenido inorgánico (pirofosfato inorgánico y calcio) (Loos et al., 2014) para someterse a un proceso de diferenciación celular que sobrelleva con la generación de un cestodo adulto. De esta forma el parásito respondería a las hormonas enteropancreáticas del hospedador, las cuales podrían promover la homeostasis de la glucosa del parásito, pudiendo el glucagón ser requerido para el desarrollo estrobilar de la echinococosis en cánidos, y la insulina preferentemente aprovechada durante el desarrollo vesicular en el establecimiento de la equinococosis secundaria a partir del estadio larvario del parásito en hospederos herbívoros y omnívoros.

Está descrito que las diferencias en la composición de la dieta de los mamíferos potenciales hospederos de *Echinococcus* sp., pueden reflejar cambios en la señalización a través de las hormonas gastrointestinales que regulan varios procesos que van desde la absorción de nutrientes, la homeostasis de lípidos y glucosa y la ingesta

de alimentos (Irwin, 2021). Como la obtención de glucosa de la dieta no es un proceso regulado, puede conducir a niveles elevados del azúcar en sangre, casi exclusivamente, si la dieta es alta en carbohidratos. En general, las dietas de los herbívoros son ricas en hidratos de carbono y las dietas carnívoras son ricas en proteínas y ácidos grasos. En este punto, evolutivamente la dieta parece haber influido en la pérdida de algunos genes involucrados en el metabolismo de la glucosa. Tal es el caso de la pérdida del gen de la proteína reguladora de la glucoquinasa en mamíferos que no consumen carbohidratos (Irwin y Tan, 2014), como también la pérdida de genes que codifican para péptidos similares a la insulina (Insl5) en algunos linajes plenamente carnívoros como los felinos (Verbrugge et al., 2012; Hecker et al., 2019).

Entre las especies que carecen de la actividad de la glucoquinasa hepática también están los rumiantes (vacas y ovejas), los cuales fermentan el material vegetal para generar ácidos grasos de cadena corta de donde obtienen casi todas sus necesidades energéticas (Aschenbach et al., 2011), sin depender de la glucosa de la dieta. Otros herbívoros, que también participan entre los hospederos intermediarios, son los ramoneadores o pastores continuos que pasan muchas horas al día alimentándose (12–20 h para caballos, 12–18 h para elefantes, 6–12 h para cabras) y en los que la secreción pancreática es constantemente baja. A diferencia de los herbívoros, los carnívoros generalmente se alimentan a intervalos irregulares y secretan grandes cantidades de jugo pancreático durante una comida, por lo tanto, en ellos se registró la pérdida del par hormona estimulante del apetito-receptor, INSL5 (hormona)–RXFP4 (receptor). Es más, la hormona INSL5 regula la producción de glucosa en el hígado, y la pérdida de ambos genes en los carnívoros también puede estar relacionado con la baja incorporación de los carbohidratos en su dieta. Es por ello que, para mantener suficientes niveles de glucosa, los carnívoros como los felinos y los visones exhiben gluconeogénesis constante (Irwin, 2021). En el caso de los omnívoros, la detección de glucosa requiere una red de proteínas hepatocelulares que interactúan para iniciar las respuestas metabólicas apropiadas. En ayunas, cuando las concentraciones de glucosa e insulina en sangre son basales, la relación glucagón/insulina favorece la producción de glucosa hepática por medio del glucagón. Después de la ingestión de una comida, la combinación de la elevada de glucosa portal y el aumento de la relación insulina/glucagón, promueve la captación hepática de glucosa a través de la estimulación de la glucoquinasa y, simultáneamente, se reduce la glucosa hepática y se altera la expresión de genes que la metabolizan.

Capítulo 3

El octreotide y la metformina interfieren el eje Insulina-AKT-AMPK-TOR, inducen autofagia y resultan fármacos antiechinococcósicos en el estadio larvario de *E. granulosus*.

6.1. INTRODUCCIÓN

Varios de los mecanismos de señalización para la inducción de la autofagia están conservados en eucariota e involucran a las proteínas TOR y AMPK, quinasas claves en regular este proceso catabólico (Klionsky et al., 2021). TOR es una serina/treonina quinasa que actúa como sensor nutricional, la cual forma parte del complejo multiproteico TORC1, y en presencia de nutrientes, se encarga de promover el crecimiento y la proliferación celular e inhibir la autofagia (Cumino et al., 2010). En este proceso, la actividad de TORC1 resulta de la interacción de dos vías opuestas: por un lado, la vía de AKT que señala la disponibilidad de nutrientes y/o la presencia de factores de crecimiento como la insulina, y por el otro, la vía de AMPK (AMP-activated protein kinase) que da cuenta del estado de energía celular (Hardie, 2008) (**Figura 38**). AMPK es una quinasa trimérica (subunidades α , β y γ) que actúa como sensor de la energía activándose cuando los niveles de ATP son bajos, la cual regula negativamente a TOR y activa la autofagia bajo limitación de nutrientes (Mihaylova y Shaw, 2011; Loos et al., 2015; Loos et al., 2018). Se ha sugerido que la vía de señalización de AMPK representa un mecanismo para responder a la fluctuación de los niveles de glucosa, que parece haber evolucionado mucho antes que la vía de señalización de la insulina, sólo presente en organismos multicelulares (Lin y Hardie, 2018). Debido a su papel ancestral en la respuesta al estado energético de la célula y del organismo, la AMPK resultaría altamente relevante para el estadio larvario de helmintos, los cuales ajustan su metabolismo a una tasa baja de recambio de ATP (Xie y Roy, 2012). Por lo tanto, la comprensión de la naturaleza de los diferentes mecanismos reguladores de la energía en estos parásitos representa una base sólida para elegir blancos adecuados para nuevos agentes quimioterapéuticos.

Se demostró en *Echinococcus* sp. que la activación farmacológica crónica de AMPK en presencia de metformina, un fármaco antihiper glucémico y antiproliferativo, induce una considerable acción antiechinococcósica *in vitro* e *in vivo* contra metacestodos de *E. granulosus* y *E. multilocularis* (Loos et al., 2015; 2017; 2020a), afectando la señalización celular que vincula a esta proteína con TOR y la autofagia (Loos et al., 2018; 2020a; 2020b) (**Figura 38**). Los efectos antiproliferativos podrían deberse a que AMPK inhibe directamente a Raptor, un regulador positivo de TOR en el complejo TORC1, involucrado en la proliferación celular (Gwinn et al., 2008) (**Figura 38**). Además, metformina activando a la AMPK, se opondría al efecto Warburg (o glucólisis

aeróbica), que llevan a cabo las células germinales de los metacestodos para hacer frente a la alta demanda de energía y metabolitos cuando el suministro de oxígeno es limitado (Parkinson et al., 2012). Como ocurre en otros tipos celulares y dado que AMPK regula negativamente las vías anabólicas, la metformina desencadenó un mecanismo citostático deteniendo el crecimiento celular en el estadio larvario de *Echinococcus* sp. (Loos y Cumino, 2015; Loos et al., 2020a). En este capítulo analizamos los efectos provocados por la metformina, sobre el metabolismo del carbono en metacestodos para comprender el mecanismo antihelmíntico de esta biguanida.

Por otro lado, se ha descrito que, los análogos de somatostatina, como el octreotide, inhiben eficazmente la vía PI3K/AKT, mejorando los efectos antiproliferativos de la rapamicina, un inhibidor natural de TOR (Cerovac et al., 2010; Graillon et al., 2017). Por lo que resultará un objetivo atractivo en la intervención terapéutica contra *Echinococcus* sp., la interferencia de las vías PI3K/AKT/TOR (con octreotide), y AMPK/TOR (con metformina), las cuales desempeñan un rol fundamental en la proliferación, crecimiento, metabolismo y supervivencia del parásito (Cumino et al., 2010; Hemer et al., 2014; Loos et al., 2014; 2018). En este capítulo mostramos evidencias de los mecanismos de acción de estos dos fármacos en *E. granulosus*.

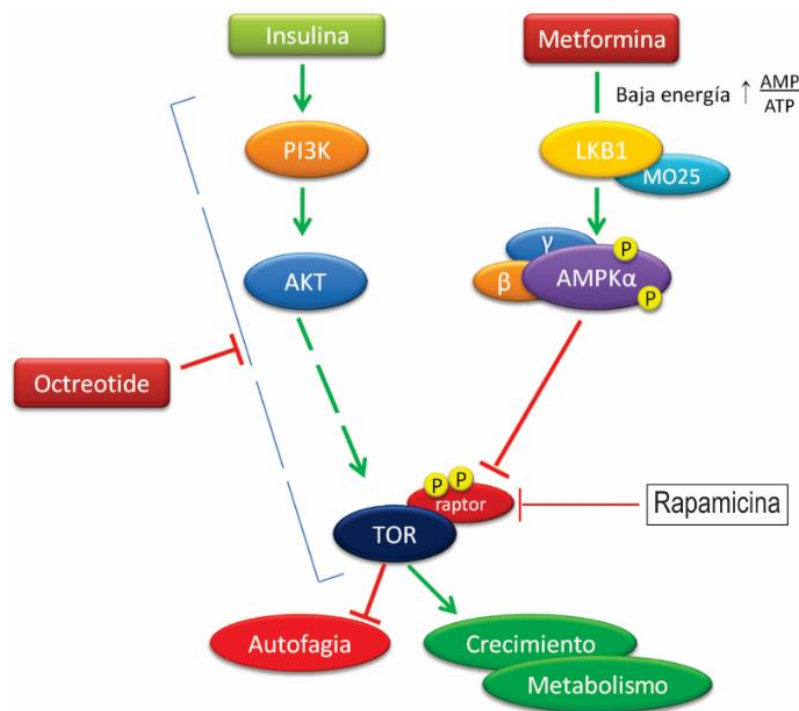


Figura 38. Regulación a través de Insulina y Metformina del eje PI3K/AKT/TOR y AMPK/TOR. El complejo TOR 1(TORC1), constituido por TOR y raptor, coordina procesos celulares diversos, tales como la proliferación, el crecimiento celular y la autofagia. Los factores de crecimiento (insulina) regulan positivamente a TORC1 vía PI3K-AKT. El octreotide desactiva la vía PI3K/AKT/TORC1 por inhibición de Akt. Un estado de privación de energía en presencia de metformina regula negativamente a TORC1 vía AMPK.

Entre las principales hormonas que regulan la homeostasis de la glucosa en los potenciales hospedadores de la echinococcosis, queda analizar a la somatostatina (SST). La SST es un tetradecapéptido producido principalmente en las células D del antro y del duodeno (65%), en el cerebro (25%) y en las células δ pancreáticas (5%), que inhibe la liberación de la insulina, glucagón, gastrina, hormona del crecimiento (GrH o somatotropina), enzimas digestivas y neuropéptidos (Müller et al., 2017). Esta hormona también es conocida como el factor

inhibidor de la liberación de la somatotropina y se identificó por primera vez en 1973 en el hipotálamo (Kumar y Singh, 2020). En el tracto gastrointestinal de mamíferos, diversas funciones son reguladas por la SST, la cual controla la liberación de ácido gástrico mediante un mecanismo de retroalimentación negativa en respuesta a proteínas, grasas y carbohidratos de la dieta (Kumar y Singh, 2020).

La acción de la SST está mediada en mamíferos a través de cinco receptores específicos (SSTR1-5), los cuales pertenecen a la familia de los receptores acoplados a la proteína G (GPCR) que poseen siete regiones transmembrana (TM1-7) con secuencias conservadas en la cara citoplasmática del TM3 y TM7 (motivos DRY y YANSCANPI/VLY, respectivamente) (Patel y Srikant, 1997). La unión del ligando a los SSTRs desencadena la inhibición de la adenilato-ciclasa, lo que conlleva a la reducción de AMPc y a la disminución en la secreción endócrina y exócrina, y a la inhibición de la PI3K y las MAPKs, lo que induce efectos inhibitorios del crecimiento y la proliferación celular (Theodoropoulou y Stalla, 2013; Müller et al. 2017). La SST de mamíferos es ortóloga en invertebrados a los péptidos denominados alostatinas de tipo C (AstC), neuropéptidos que inhiben la biosíntesis de hormonas juveniles en artrópodos y modulan el comportamiento de alimentación. La AstC se aisló por primera vez de *Manduca sexta*, y a través de análisis bioinformáticos se infiere que estos péptidos y sus receptores específicos estarían presentes en otros invertebrados del superfilo Lophotrochozoa (anélidos, moluscos y braquiópodos) (Jiang et al., 2022).

Un análogo estructural sintético de la SST es el octreotide (OCT), un octapéptido (Phe-Cys-Phe-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr) con mayor tiempo de vida media que la hormona endógena, y por lo tanto con acciones farmacológicas más prolongadas. Este fármaco ejerce efectos anti-proliferativos y anti-secretorios sobre varias líneas celulares de cáncer que expresan particularmente SSTR2, SSTR5 y SSTR3 (Olias et al., 2004). El octreotide se utiliza clínicamente para el tratamiento de la acromegalia, la enfermedad de Cushing, tumores neuroendócrinos metastásicos y actualmente está propuesto para el tratamiento de la obesidad por el control que ejerce sobre la liberación de insulina y glucagón (English e Irwin, 2019; Kumar y Singh, 2020). Estudios previos han reportado que la SST y el octreotide tienen actividad farmacológica *in vitro* contra las planarias, *S. mansoni* y recientemente demostramos el efecto antiechinococcósico en *E. granulosus* (Bautz y Schilt, 1986; Chatterjee et al., 2007; Tesis Doctoral Loos J., 2017 y esta Tesis Doctoral). Por lo tanto, en este capítulo el objetivo fue identificar un posible receptor para SST, en base a la reducción en la vitalidad *in vitro* del parásito comprobada durante el tratamiento con octreotide, verificando los posibles mecanismos de acción del mismo en *Echinococcus* sp.

6.2. RESULTADOS

6.2.1. Análisis *in silico* y estudio de la expresión génica de un receptor putativo de somatostatina/alatostatina en *E. granulosus*

Para evaluar la existencia de posibles receptores de unión a octreotide, se investigó la presencia de miembros de la familia SSTR en *E. granulosus*. Las búsquedas mediante BLAST en el genoma del parásito

revelaron tres posibles genes (GeneDB EgrG_00077100, EgrG_000954500 y EgrG_001059900) que codificarían receptores de somatostatina/alatostatina C. De ellos, el gen EgrG_00077100 codificaría para una proteína de 417 aminoácidos (GenBank XP_024350914) con la mayor identidad de secuencia (~ 51%) con los ortólogos de *Homo sapiens*. Se denominó a este gen *Eg-s/ast-r*, el cual podría codificar para el receptor de somatostatina/alatostatina buscado en *E. granulosus*. Este receptor también mostró 38-57 % y 41% de identidad de aminoácidos con el receptor de alatostatina A de *Drosophila melanogaster* (NP_726877.2) y de *Clonorchis sinensis* (GAA40600), respectivamente. Dicho receptor pertenecería a la familia de los GPCR de tipo rodopsina γ , el cual posee 7 regiones de transmembrana helicoidales tipo α y conserva secuencias importantes para el mantenimiento de la estructura terciaria. Entre éstas podemos citar la presencia de cisteínas claves (Cys=C) en la formación de puentes disulfuro en los bucles extracelulares del receptor comprometidos en la interacción con el octreotide, y motivos específicos en el TM 7 (**Figura 39A**) (Chatterjee et al., 2002, Kreienkamp, 2002; Olias et al., 2004; Alzugaray et al., 2016). Además, se estudió la expresión transcripcional del gen *Eg-s/ast-r* mediante RT-PCR a partir de ARN total de protoescolices y metacestodos, demostrándose su expresión basal y constitutiva en el estadio larvario del parásito (**Figura 39B**).

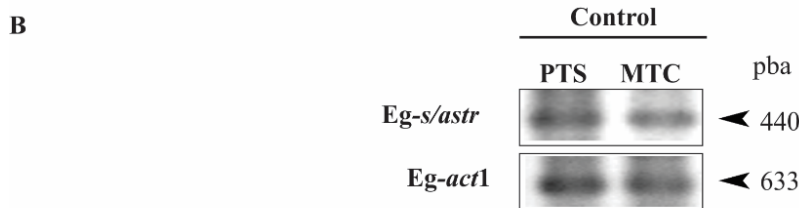
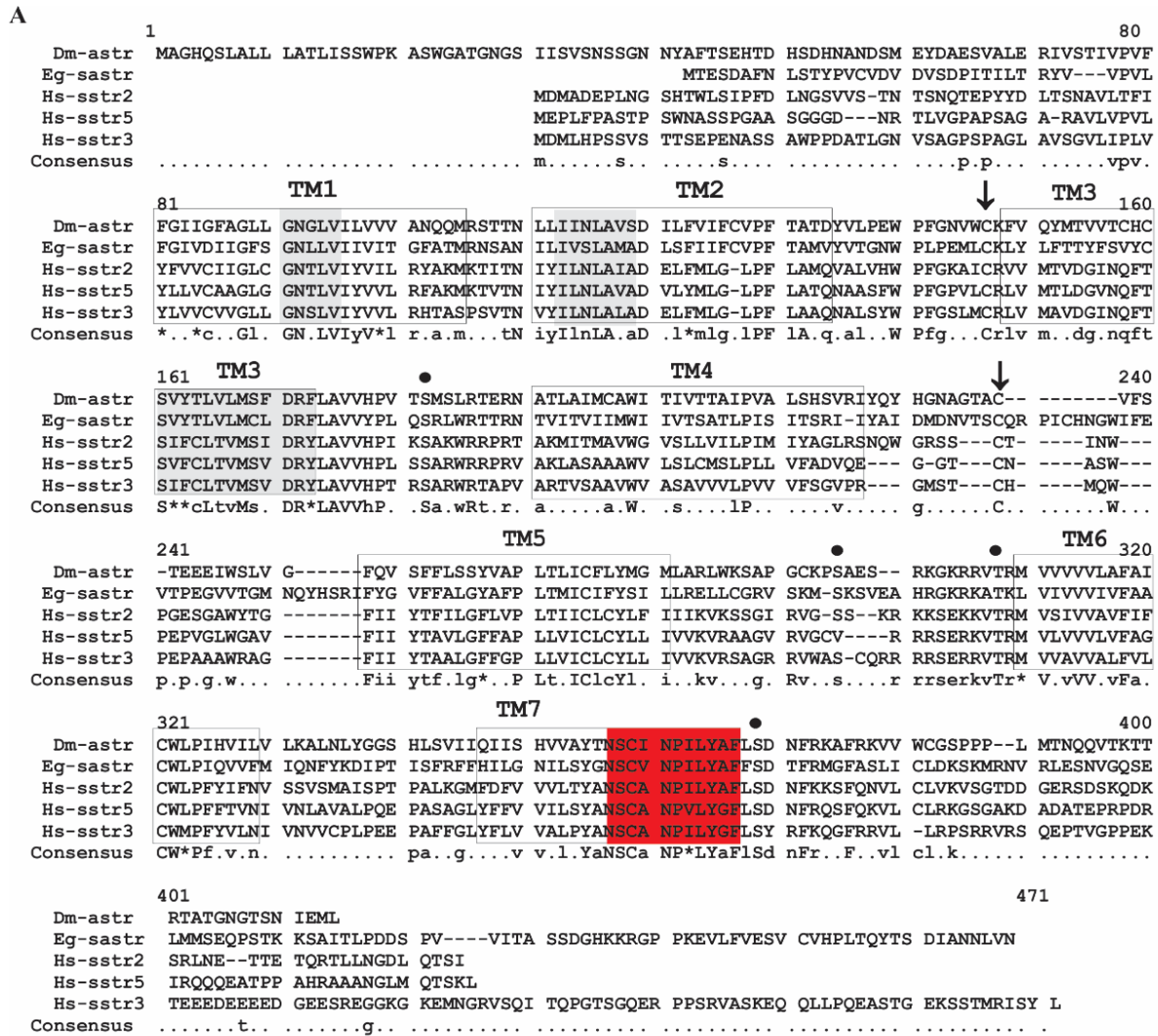


Figura 39. Análisis de secuencia y expresión del receptor de somatostatina/altostatina de *E. granulosus* (Eg-s/ast-r). (A) Alineamiento múltiple de secuencias de proteínas SSTR de *H. sapiens* con la capacidad de unir al octreotide y el receptor de alatostatina de *D. melanogaster* (Dm-ast-r). El consenso se indica en la última línea, total (letra mayúscula), parcial (letra minúscula), cambios conservativos (asterisco), ausencia de consenso (puntos) y espacios introducidos para maximizar el alineamiento (guiones). Las regiones de transmembrana de tipo hélice α están indicadas desde TM1 al TM7 (recuadros), también se indican las secuencias para el mantenimiento de la estructura terciaria (cajas grises) y dos residuos cisteínas (Cys=C) involucrados en un puente disulfuro extracelular (flechas). Se muestran tanto las secuencias específicas de los SSTRs en el TM 7 (caja color rojo) como los supuestos sitios de fosforilación conservados para PKA/C (círculo negro). Los números de acceso de GenBank son: Hs, *Homo sapiens* (SSTR2: NP_001041; SSTR3:NP_001042 y SSTR5:NP_001166031); Dm, *Drosophila melanogaster* (NP_726877.2); Eg, *Echinococcus granulosus* (XP_024350914.1). (B) Análisis de expresión génica determinado por RT-PCR a partir de ARN total de protoesclólices (PTS) y metacestodos (MTC) en condiciones control. La amplificación del gen que codifica para actina [Eg-act I - GenBank L07773-] se usó como control de carga. Los tamaños moleculares de los amplicones se indican con puntas de flecha. Eg-s/ast-r: gen del receptor de tipo somatostatina/altostatina es amplificado con oligonucleótidos específicos indicados en Materiales y Métodos dando un amplicón de 440 pares de bases.

6.2.2. El octreotide aumentó la expresión de Eg-Atg8, proteína clave en la inducción de la autofagia en el estadio larvario

Para evidenciar los potenciales efectos del octreotide en el parásito, analizamos la inducción de autofagia, dado los antecedentes que posee la droga para promover la inhibición indirecta de TOR. Mediante qPCR, se detectó que los niveles de transcripción de *Eg-atg8* aumentaron tres veces en relación con los controles, tanto en protoescolices como en metacestodos tratados con 10 μ M de octreotide (concentración a partir de la cual el sistema protoscolex- metacestodo demostró poseer efectos farmacológicos, **Figura 40A**). También por medio de ensayos de inmunolocalización *in situ*, se constató el aumento en la expresión de la proteína Eg-Atg8 (**Figura 40B**). En metacestodos control (**Figura 40Ca-d**) y tratados con octreotide (**Figura 40Ce-h**), Eg-Atg8 se detectó en forma difusa y puntiforme, pero en presencia de la droga mostró mayor señal de fluorescencia y aumento en la cantidad de estructuras punteadas compatibles con el incremento en el número de autofagosomas debido a la inducción de autofagia.

6.2.3. La metformina promovió el catabolismo de carbohidratos y el cambio en la partición de carbono en *E. granulosus*

Considerando que este grupo de investigación ha reportado como la metformina activa el consumo de glucosa en el parásito (Loos et al., 2015), se estimó la distribución del glucógeno como depósito insoluble de glucosa en experimentos de captación/acumulación de 2-NBDG durante 4 h. En la **Figura 41A** y **41C** se muestran imágenes representativas del 2-NBDG acumulado en forma de glucógeno en metacestodos y protoescolices *in vitro*. En ambos casos, la intensidad de fluorescencia derivada de la sonda, disminuyó después del tratamiento con metformina (**Figura 41Ac-d, B, Cc-d y D**). En los metacestodos, la señal fluorescente se evidenció en las escasas células de almacenamiento del polisacárido, caracterizadas por un citoplasma grande con depósitos de glucógeno en forma de gránulos (GSC, **Figura 41Ab y d**).

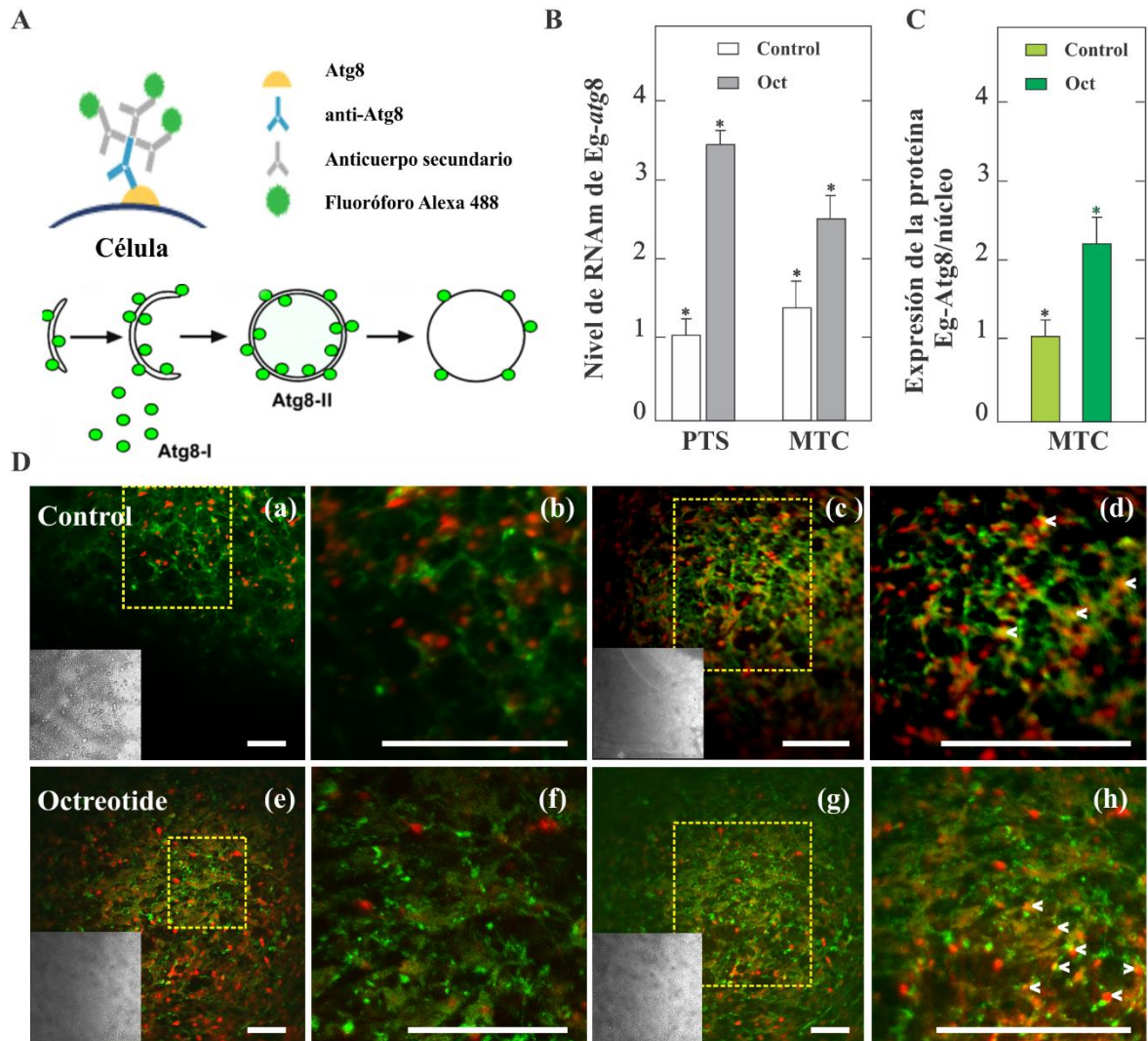


Figura 40. Activación de la autofagia en presencia de octreotide en el parásito. (A) Representación esquemática de la detección de estructuras autofágica mediante inmunohistoquímica con anticuerpos anti-Atg8. (B) Análisis por PCR cuantitativa a partir de ARN total de protoescólices (PTS) y metacestodos (MTC) para estimar la expresión del gen *Eg-atg8* incubados durante 72 h en condiciones de control (Co) o tratados con 10 μ M de octreotide (Oct). La amplificación del gen de actina (*Eg-act*) se utilizó como gen de referencia en ambas formas larvares para normalizar la expresión del gen de interés. Los resultados se expresan como el valor medio \pm desviación standard de tres experimentos independientes. *Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$) en comparación con el control. (C) Cuantificación de la fluorescencia verde producto de la expresión de la proteína *Eg-Atg8* de las imágenes de microscopía confocal mostradas en (D), relativizada a la fluorescencia roja correspondientes a los núcleos celulares. (D) Imágenes confocales de ensayos de inmunolocalización *in situ* de la proteína *Eg-Atg8* expresada en metacestodos revelado con un anticuerpo primario anti-Atg8 y un secundario conjugado con Alexa 488 -fluorescencia verde- y contrateñido con yoduro de propidio para tinción de núcleos celulares -fluorescencia roja-. Metacestodos control (a-d) y tratados con 10 μ M de octreotide (e-h). La expresión citoplasmática se observa en verde. La expresión nuclear se observa en amarillo/naranja, correspondiente a las fluorescencias combinadas (puntas de flecha). Las imágenes insertas (en a, c, e y g) corresponden a microscopía de transmisión; las áreas enmarcadas con un recuadro amarillo se muestran amplificadas en las imágenes de la derecha (b, d, f y h). Las barras corresponden a 30 μ m.

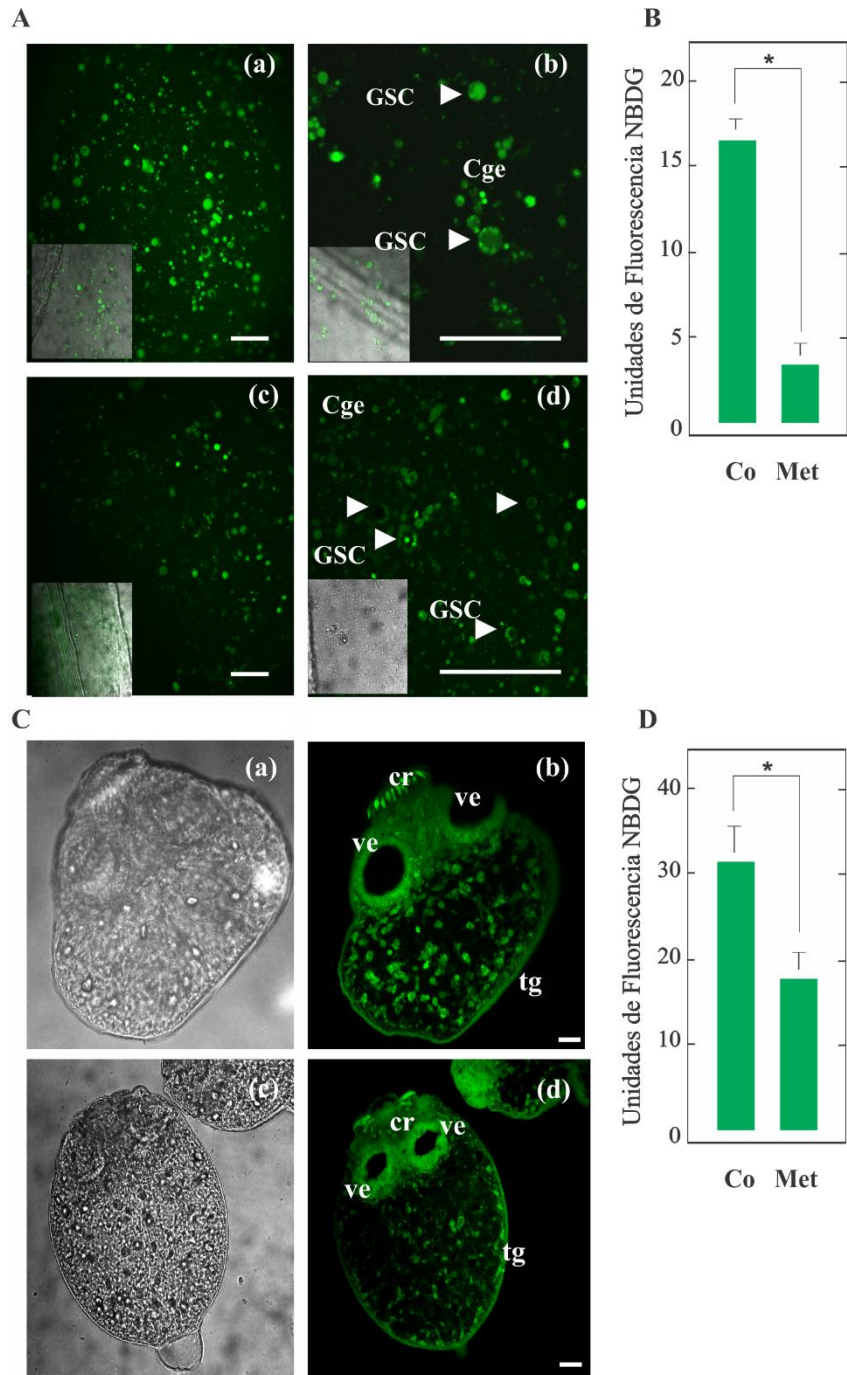


Figura 41. Detección de glucógeno fluorescente en parásitos control y tratados con 1 mM de metformina. (A) Imágenes confocales representativas que muestran la retención de 2-NBDG identificando el glucógeno en metacestodos en condiciones de control (a-b) y con la droga (c-d). GSC: células que almacenan glucógeno, GeC células germinales. Barras indican 30 μ m. (B y D) Gráficos que muestran la intensidad de fluorescencia medida en parásitos de control (Co) y tratados con Met por Image J Software. Los valores se expresan como media \pm error estándar. * Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$). (C) Imágenes confocales representativas que muestran el contenido de glucógeno en protoescólices incubados en condiciones de control (a-b) o tratados con 1 mM de metformina (c-d). tg: tegumento; cr: cono rostral; ve: ventosas. Barras indicadas: 20 μ m.

Por otra parte, se determinó la concentración de glucosa, el contenido de carbohidratos solubles (oligosacáridos y monosacáridos) y la actividad de LDH, tanto en el líquido intraquístico como en las células

germinales provenientes de metacestodos control y tratados con 1 mM de metformina en un medio con 5 mM de glucosa exógena (equiparables a la concentración de la droga alcanzada en condiciones *in vivo* y a la concentración de glucosa sanguínea murina, respectivamente). La concentración de glucosa disminuyó tanto en el líquido quístico (se redujo de 68 ± 7 mg/dl en el control a 8 ± 4 mg/dl con metformina) (**Figura 42B**) como en las células germinales de los metacestodos tratados con la droga (disminuyó de 20 ± 5 mg/dl en el control a 5 ± 2 mg/dl con el tratamiento) (**Figura 42B**). Estos resultados fueron acompañados por un aumento en la actividad de LDH en ambos compartimentos en presencia de metformina (**Figura 42A**), y son consistentes con el incremento en la degradación del glucógeno (**Figura 41A-B**) y en la metabolización de la glucosa resultante mediante su fermentación a lactato en esta condición. Además, en presencia de metformina, la fracción de azúcares solubles reductores, los cuales están involucrados en diversas reacciones biológicas (y compuestos por una fracción mayoritaria de glucosa acompañada de fructosa, manosa, ribosa, galactosa y sus formas fosforiladas), disminuyeron tres veces en el líquido hidatídico ($3,9 \pm 2$ nmoles/ μ l en el control frente a $0,8 \pm 0,5$ nmoles/ μ l con metformina) y en las células germinales ($1,5 \pm 0,5$ nmoles/ μ l en el control comparado a $0,5 \pm 0,4$ nmoles/ μ l con la droga) (**Figura 42C**). También se determinaron mediante reacciones enzimáticas, los azúcares solubles no reductores, como la sacarosa y la trehalosa, disacáridos estables con excelentes propiedades coligativas para ser acumulados intracelularmente (**Figura 42C**). Esta fracción fue consumida en el líquido hidatídico bajo el efecto de la metformina, pero mostró un aumento significativo a nivel intracelular ($11,5 \pm 5$ nmoles/ μ l en control versus 17 ± 5 nmoles/ μ l en metformina) en presencia de la droga. Este aumento de azúcares no reductores intracelulares constituyó un hallazgo y una incógnita respecto a la forma en la que se interconvirtieron en las células de la capa germinal, dado que los resultados muestran cómo se indujo una reducción en el contenido de glucógeno y un consumo de los carbohidratos solubles en el líquido hidatídico disponibles para las células germinales. Previamente Frayha y Haddad (1980) habían detectado sacarosa y trehalosa constituyendo la fracción mayoritaria de azúcares solubles en células germinales de quistes ovinos y murinos, y minoritaria en el líquido hidatídico. Sin embargo, hasta la fecha no se han reportado determinaciones ni cambios de estas fracciones de azúcares no reductores en las células germinales, como tampoco fueron identificadas las enzimas involucradas en su biosíntesis, degradación y/o interconversión con otros carbohidratos, siendo que representan un porcentaje mayoritario entre los compuestos de carbono, tanto en condiciones basales como en situaciones de estrés farmacológico.

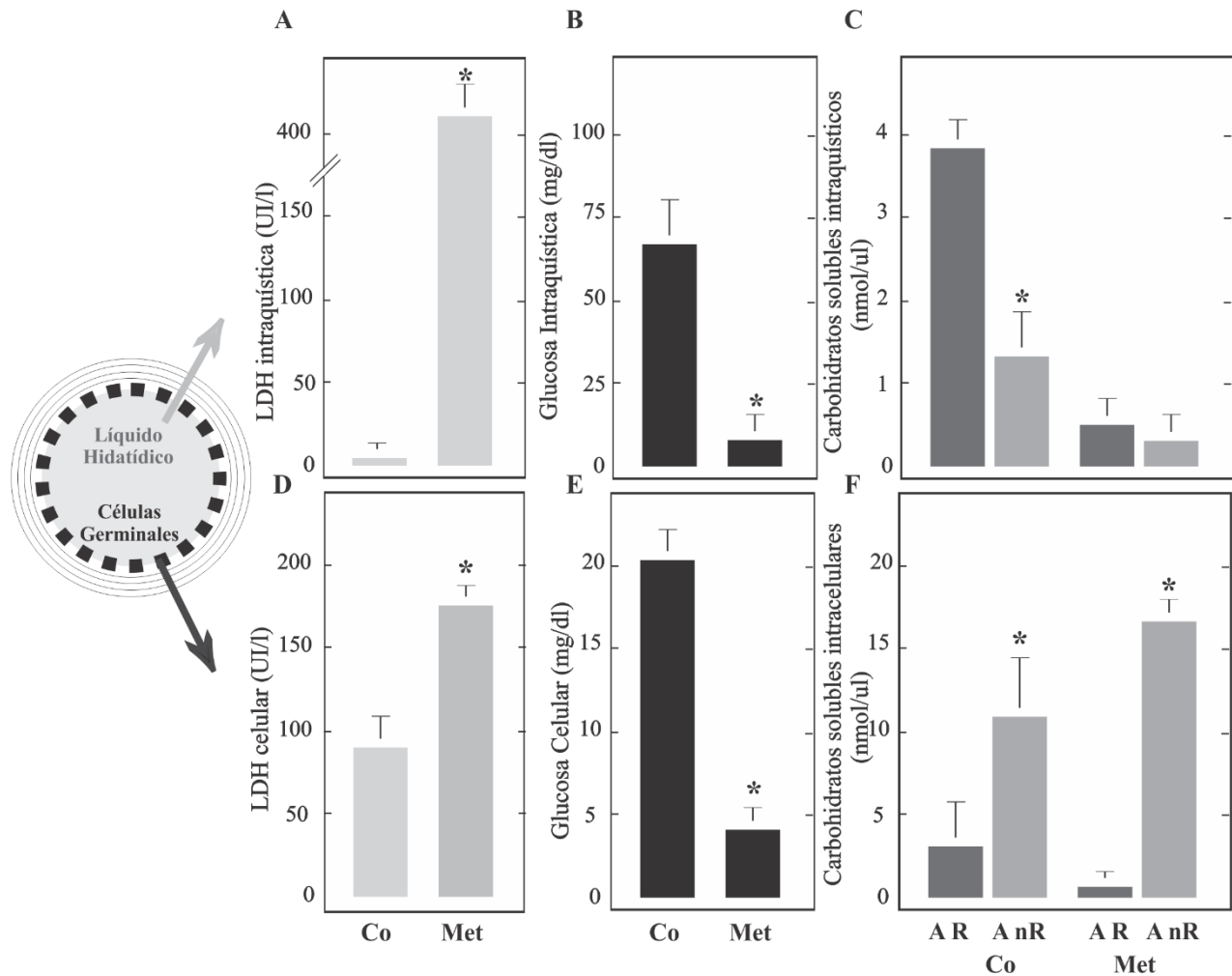


Figura 42. Cambios en el metabolismo de carbohidratos solubles inducidos por 1 mM de metformina en metacistos de *E. granulosus*. Determinaciones intraquísticas (A-C) y determinaciones intracelulares (D-F) en condiciones control (Co) o tratados con metformina (Met) durante 48 h. Actividad de la Lactato- deshidrogenasa (LDH) (A y D), concentración de glucosa (B y E), concentración de carbohidratos solubles (C y F): A R (azúcares reductores) y A nR (azúcares no reductores). Los valores se expresan como media ± error estándar. * Diferencia estadísticamente significativa (p<0,05). Considerar que la fracción de A R mostrada en (C y F) incluye a la glucosa, la cual también es determinada específicamente mediante ensayos enzimáticos en (B y E). Las equivalencias entre las unidades de concentración de los gráficos B y E con C y F, corresponden a que 18 mg/dl de glucosa (en B y E) corresponde a 1mM de glucosa y es equivalente a expresarlo como 1 nmol/μl (en C y F).

6.3. DISCUSION

Todos los metazoos, entre ellos *Echinococcus* y sus hospedadores, tienen requerimiento metabólico de glucosa y su regulación hormonal resulta clave para su supervivencia. En mamíferos, la glucosa se produce en el hígado, y esta producción está regulada por la insulina y el glucagón. Concomitantemente, la glucosa, los aminoácidos, el glucagón y el GLP-1 estimulan la secreción de SST por parte del páncreas, mientras que ésta inhibe la secreción de insulina y glucagón en este mismo órgano exócrino (Müller et al., 2017). De esta manera se mantiene la homeostasis de glucosa a expensas de la regulación de las concentraciones plasmáticas de estas tres hormonas que impactan las vías de transducción de señales celulares comunes en el reino animal. En esta Tesis

demostramos como la insulina y el glucagón administrados en forma exógena se unen a los receptores del parásito e inducen cambios metabólicos, modificando sus niveles de glucógeno y de glucosa en forma directa. En este capítulo mostramos como el octreotide, un análogo competitivo de la SST del hospedero, inhibe *in vitro* el desarrollo parasitario (**Figura. 38-40**), sugiriendo la inhibición de la vía PI3K-AKT-TOR, responsable de la activación de la autofagia en presencia de factores de crecimiento y/o insulina (Villaume et al., 2010; Loos, Negro y Cumino, 2020). En nuestros experimentos, la concentración de octreotide empleada, estuvo dentro del rango utilizado para examinar los efectos *in vitro* sobre la exocitosis y la proliferación celular (Li et al., 2018; 2021). En comparación con los benzimidazoles, el octreotide tiene una rápida acción antiparasitaria *in vitro*, ya que después de 4 y 10 días de tratamiento, el porcentaje de mortalidad varió del 20 al 55 % para protoescólices y del 10 al 90 % para metacestodos, respectivamente (Loos, Negro y Cumino, 2020). Aunque no se han identificado péptidos similares a la SST o AstC en platelmintos (Jékely, 2013), se han detectado receptores con secuencia idéntica a los SSTRs y a los receptores de AstC en los genomas de los metazoos bilaterales (Jékely, 2013; Elphick et al., 2018). Además, existe cierta evidencia bioquímica y farmacológica de la presencia de GPCR similares a SSTRs entre los cestodos y los trematodos (Sukhdeo et al., 1984; Chatterjee et al., 2005, 2007).

Curiosamente, todos los GPCR identificados en los genomas de *Echinococcus* han sido reportados como posibles blancos farmacológicos (Zheng et al., 2013; Tsai et al., 2013). En este trabajo identificamos un putativo *Eg-s/ast-r* debido a su mayor identidad con SSTR humanos, que poseen afinidad por octreotide (Chatterjee et al., 2002; Schmid y Brueggen, 2012). *Eg-s/ast-r* conserva la topología y los residuos involucrados en la afinidad y especificidad de unión al ligando descritos en el TM3 y en el bucle entre TM6 y TM7 de los SSTRs de mamíferos (Kaupmann et al., 1995; Jékely, 2013) (**Figura 39A**). No obstante, tanto el *Eg-s/ast-r* como el receptor de AstC de *Drosophila*, tienen un residuo de treonina (Thr¹⁴⁰ y Thr¹²⁶, respectivamente) en reemplazo de un aspartato característico (Asp¹²⁴) ubicado en el TM3. Esta podría ser una de las razones que explican las altas concentraciones de octreotide (en el rango micromolar) que se requieren para provocar respuestas en el parásito, a diferencia de humanos (que responden a concentraciones nanomolares). Previamente se ha reportado la expresión de *Eg-s/ast-r* en protoescólices (Tsai et al., 2013; Zheng et al., 2013) y en este trabajo se detectó la expresión del receptor también en metacestodos (**Figura 39B**). Se ha propuesto que durante la evolución de la señalización peptidérgica, la SST y la AstC constituyen un sistema ligando/receptor ortólogo, lo que sugiere una antigua co-evolución entre los genes del péptido y del receptor (Mirabeau y Joly, 2013; Jékely, 2013; Zhang et al., 2020, Koch et al., 2022). En esta línea de evidencia, se ha demostrado que las secuencias de SST y AstC conservan el motivo KR/NFYWF/KTF/C, y que ambas muestran similitud con la secuencia del octreotide (Jékely, 2013). De hecho, en este motivo de aminoácidos, los únicos cuatro residuos comunes entre el octreotide y la SST (F-W-K-T) son los responsables de la unión al SSTR (Chatterjee et al., 2002). Por lo tanto, se sugiere la presencia de un receptor promiscuo de somatostatina/alatostatina en *Echinococcus* sp., que podría dar cuenta de los efectos farmacológicos del octreotide. No se puede descartar la presencia de un posible agonista endógeno en el parásito, dado que recientemente se detectaron dichos péptidos entre los lophotrochozoos (Jiang et al., 2022; Koch et al., 2022).

Se ha demostrado que el octreotide causó inducción transcripcional de genes marcadores de autofagia, como *Eg-atg8* con mayor acumulación de la forma proteica asociada a la membrana (patrón de marcación punteada), y aumento en la formación de autofagosomas (**Figura 40**). Estos resultados están en línea con informes recientes que muestran la inducción de autofagia en tejidos tumorales y renales de pacientes tratados con el fármaco (Sun et al., 2017; Dagistanli et al., 2018). La inducción de la autofagia se caracteriza por cambios histológicos y bioquímicos específicos pudiendo actuar como una vía alternativa de muerte celular, llamada muerte celular programada tipo II, la cual ha sido descrita que se induce en presencia de octreotide (Sun et al., 2017; Mohamed et al., 2021).

También se ha reportado muerte del parásito con inducción de autofagia frente al tratamiento con metformina (Loos et al., 2015, 2017 y 2018). La acción antiproliferativa de este fármaco puede estar mediada por la inhibición indirecta de TOR, principalmente como resultado de la activación de AMPK, y la inactivación del receptor similar a la insulina, todas proteínas identificadas en el parásito y claves en la proliferación y el crecimiento celular (Gwinn et al., 2008; Hemer et al., 2014; Mogavero et al., 2017). Debido a que, *Echinococcus* sp. depende directamente de la presencia de glucosa para su desarrollo (Ritler et al., 2019), aquellos agentes farmacológicos que afecten el metabolismo del este monosacárido, proporcionan nuevas y/o complementarias estrategias de tratamiento de la echinococosis. La metformina, es una droga de baja toxicidad utilizada en humanos en el tratamiento de la diabetes tipo II, del hígado graso no alcohólico, del síndrome de ovario poliquístico y como fármaco antitumoral (Lv y Guo, 2020). La principal acción de la droga, es disminuir la producción hepática de glucosa, contraponiéndose a la actividad fisiológica del glucagón (Pernicova y Korbonits, 2014). Se ha demostrado que la metformina afecta la producción del AMPc hepático implicado en la liberación del glucagón, y este proceso contribuye en parte a la reducción en la gluconeogénesis que induce la droga (Miller et al., 2013). Además, en el entorno enterohepático, la metformina alcanza concentraciones elevadas (cercanas a 1 mM en la vena porta) que pueden inhibir la actividad del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial y con ello, inducir un estado de déficit de energía. De esta manera, la droga induciría una caída en la carga de energía, una disminución en la producción de ATP, y un aumento de los niveles de AMP celular implicado en la activación de la AMPK. Este mecanismo de acción fue demostrado en el estadio larvario de *Echinococcus* (Loos y Cumino 2015; Loos et al., 2020a). En el parásito, la metformina activó a la AMPK induciendo un aumento del consumo de glucógeno y de la fermentación homoláctica, y una disminución de la transcripción de genes del metabolismo intermediario (Loos y Cumino, 2015), sumado a la reducción de glucosa intracelular e intraquística en metacestodos (**Figura 42B-C**). En los ratones infectados experimentalmente con *Echinococcus* sp., se evidenció el efecto quimiopreventivo de esta droga, y su combinación con dosis muy bajas de albendazol (5 mg/kg/día) mejoró la terapia antiparasitaria (Loos et al., 2017; 2020). Los efectos *in vivo* de metformina no dependerían de la reducción en el suministro de glucosa al parásito por parte del hospedador, ya que en animales no diabéticos con normogluemia, la administración del fármaco no modificó la insulina plasmática, tampoco los niveles de IGF-1 ni de glucosa sanguínea (Higurashi et al., 2016) y esto fue corroborado en los experimentos con animales infectados con *Echinococcus* sp. (Loos et al., 2017; Loos, Negro y Cumino, manuscrito en preparación). Sin embargo, como el

fármaco induce la degradación permanente de glucógeno, el consumo de la glucosa y un déficit energético, también se induciría en el parásito, un estrés osmótico con la acumulación de trehalosa y sacarosa, previo a la muerte celular (**Figuras 41-42**). A continuación, resumimos los resultados mostrados en el presente capítulo, quedando abiertas diferentes proyecciones que surgen de este trabajo de Tesis Doctoral (**Figura 43**).

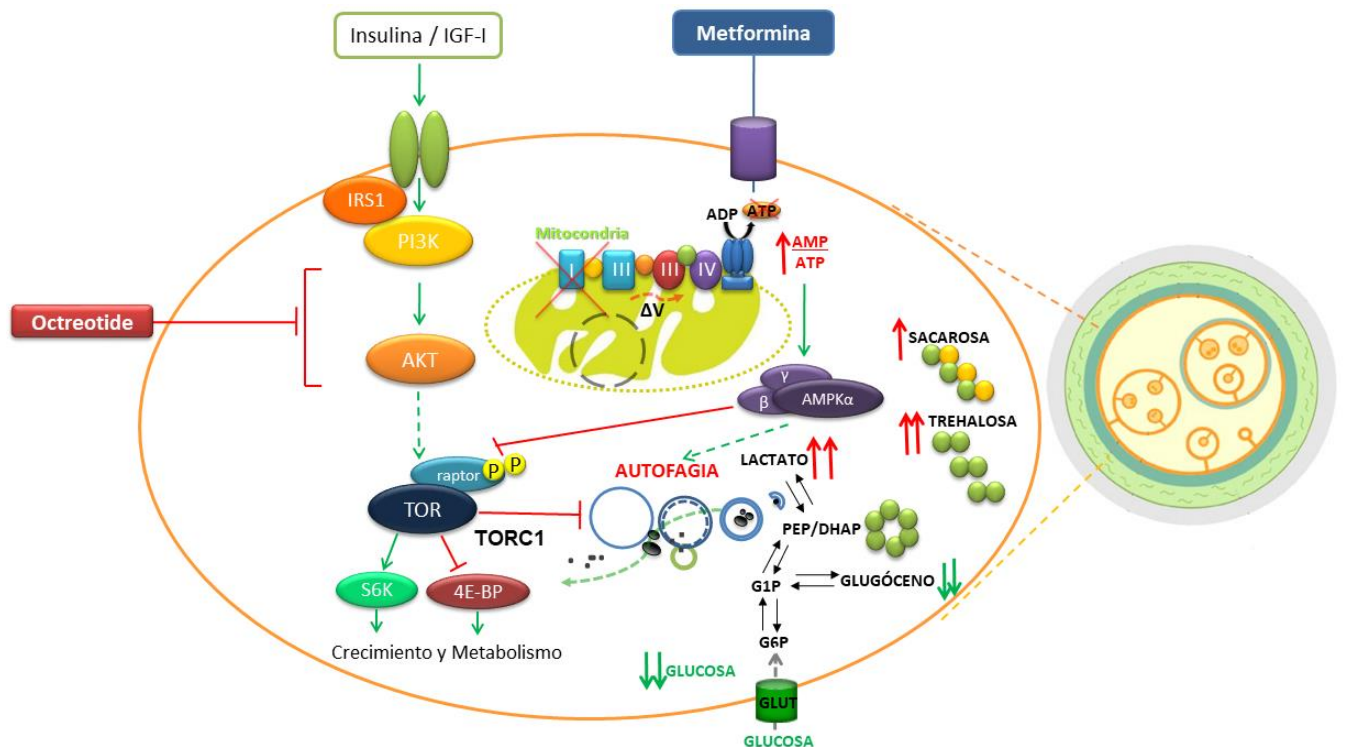


Figura 43. Interferencia farmacológica del octreotida sobre la vía de transducción de señales Insulina-PI3K-AKT-TOR-autofagia y de la metformina sobre la vía AMPK-TOR-autofagia, provocando una redistribución de hidratos de carbono intracelular con acumulación de sacarosa y trehalosa.

Cabe destacar, que no fueron descritas en el parásito, la identidad de las enzimas involucradas en la biosíntesis ni en la metabolización de la sacarosa y de la trehalosa, aun existiendo un interés especial en helmintos en interferir sus metabolismos con fines terapéuticos (Tournu et al., 2013; Cross et al., 2017). La sacarosa y la trehalosa son disacáridos no reductores, que poseen similitudes en su síntesis y sus funciones. Estos disacáridos se mantienen en altas concentraciones cuando las células deben atravesar diversos tipos de estreses, como el estrés oxidativo y la baja tensión de agua libre o anhidrobiosis (debido a la desecación, congelación, estrés osmótico e inanición) (Tournu et al., 2013; Chen et al., 2016). En estas condiciones extremas, la trehalosa es capaz de preservar la organización de las membranas celulares, tanto a nivel de los fosfolípidos como de las proteínas, y está presente en una amplia variedad de organismos heterotrófos y autótrofos (bacterias, levaduras, hongos, insectos, invertebrados y plantas), pudiendo servir como fuente de carbono y de energía. Este disacárido es esencial en ciertas condiciones ambientales o etapas del desarrollo, pudiendo ser indetectable o alcanzar un nivel hasta el 10% del peso seco en respuesta al estrés, en fases tardías del ciclo de vida, o durante el proceso de infección. En cambio, la sacarosa, representa uno de los compuestos más abundantes en la naturaleza, pero está presente

fundamentalmente, en organismos fotosintéticos y ocupa una posición relevante y única comparable sólo a la glucosa en el reino animal (Tournu et al., 2013).

En los invertebrados, la metabolización de la trehalosa participa además en la homeostasis de la glucosa; y en los nematodos, el metabolismo del glucógeno como el de la trehalosa, juegan un papel clave en el apoyo de los procesos vitales (Erkut et al., 2012). En los estadios larvarios L3 y L4 de *Anisakis simplex*, el aumento de la síntesis de trehalosa en respuesta al estrés por desecación, tiene lugar a expensas del glucógeno (Łopieńska-Biernat et al., 2015). Múltiples líneas de evidencia muestran que la trehalosa promueve la supervivencia durante la inanición a través de dos mecanismos distintos: como protector del estrés sin ser catabolizado, y/o como fuente de energía para la glucólisis. Este ciclo fútil entre la síntesis y la degradación de la glucosa y la trehalosa, es necesario para que tengan lugar los efectos fisiológicos del disacárido, y representa una paradoja, ya que durante los períodos de inanición se sintetiza un azúcar no reductor protector a la vez que se regenera la glucosa por síntesis endógena (Hibshman et al., 2017).

En *E. granulosus* se ha determinado la presencia de trehalosa y sacarosa en protoescolices y líquido hidatídico (Frayha y Haddad, 1980), pero no han sido identificados con grado de certeza en el genoma, los genes que podrían codificar alguna de las enzimas que forman parte de las rutas biosintéticas hasta ahora descritas. Por lo expuesto resultaría necesario valorar en adelante, la fracción de carbohidratos no reductores, ya que representa una fracción metabólica importante en la deriva de hidratos de carbono en *E. granulosus*. Futuros estudios bioquímico/moleculares permitirán adjudicar la ruta de biosíntesis de la trehalosa y de la sacarosa en el parásito para vincularla en forma directa o indirecta a la degradación de polisacáridos de reserva y/o estructurales.

7. CONCLUSIONES

- Insulina, glucagón y somatostatina, tres de las principales hormonas gastro-pancreáticas que regulan la homeostasis de glucosa en mamíferos, impactan directamente el desarrollo y crecimiento del estadio larvario de *E. granulosus*, pudiendo promover a partir de la activación metabólica de protoescolices, tanto el desarrollo en hospederos definitivos como intermediarios.
- La insulina se une a receptores e induce el anabolismo del carbono en el parásito, por aumentar la expresión transcripcional de transportadores tipo GLUTs, inducir la captación de glucosa, promover la acumulación del monosacárido en células germinales de metacestodos, favoreciendo su consecuente conversión en glucógeno y acumulación de triglicéridos en gotas lipídicas.
- La insulina puede promover el anabolismo parasitario activando la degradación de glucosa incorporada a las células, mediante un aumento en la glucólisis, en la fermentación homoláctica y en la actividad mitocondrial.
- La insulina promueve la acumulación de reservas de carbono y energía, e induce proliferación y crecimiento del estadio larvario a través de la fosforilación y activación de Eg-TOR.
- La insulina en el parásito activa la vía de transducción de señales canónica mediada por el eje PI3K-AKT-TOR, la cual al ser interferida farmacológicamente en presencia de octreotide, conlleva a la inducción de autofagia y muerte del estadio larvario.
- El estadio larvario de *E. granulosus* es sensible a la presencia de insulina y glucagón exógenas induciendo síntesis y degradación del glucógeno en el parásito, respectivamente.
- Tanto la insulina como el glucagón exógenos, indujeron sobreexpresión de genes que codifican para las enzimas del metabolismo intermediario en el parásito: PEP-carboxiquinasa, Fru1,6 bifosfatasa y Glu6-fosfatasa.
- La insulina y el glucagón modifican la transcripción de genes que codifican para transportadores de glucosa tipo GLUTs, por acción directa de las drogas o por cambios transcripcionales indirectos al contenido de glucosa intracelular.
- El glucagón activa la captura de glucosa y la actividad mitocondrial en los corpúsculos calcáreos, en forma coincidente con el aumento de concentración que esta hormona posee en el tejido gastrointestinal de cánidos.
- El tratamiento con metformina provoca modificaciones en el metabolismo de carbono del parásito, induciendo una reducción de glucosa intraquística e intracelular en metacestodos, con agotamiento del glucógeno e inducción de estrés nutricional y energético.

- La metformina induce un ciclo fútil del carbono en el parásito, en que la síntesis de disacáridos no reductores, sacarosa y trehalosa, tendría lugar a expensas del consumo de glucógeno y glucosa.
- La interferencia farmacológica de la vía autofágica perturbaría tanto los procesos metabólicos como las estrategias de desarrollo parasitario en cestodos, contribuyendo al descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Acha P, Szyfres B (2003). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3° ed. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud. Vol III: 195-211.
- Agosin M, Repetto Y (1961). Studies on the metabolism of *Echinococcus granulosus*. VI. Pathways of glucose C14 metabolism in *Echinococcus granulosus* scolices. *Biologica (Santiago)* 32:33-8.
- Agüero F, Noé G, Hellman U, Repetto Y, Zaha A, Cazzulo JJ (2004). Purification, cloning, and expression of the mitochondrial malate dehydrogenase (mMDH) from protoscolices of *Echinococcus granulosus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 137 (2): 207-214.
- Albani CM, Elissondo MC, Cumino AC, Chisari A, Denegri GM (2010). Primary cell culture of *Echinococcus granulosus* developed from the cystic germinal layer: biological and functional characterization. *Int J Parasitol.* 40(11):1269-75.
- Alloa C, Bolpe J, Cabrera M, Casas N, Coria J, Elissondo MC, Farace MI, Guarnera E, Hertlein C, Jensen O, Larrieu E, Madariaga MJ, Rodriguez C, Orcellet V, Santillán G, Trezeguet M, Zanini F (2009). Norma técnica y manual de procedimientos para el control de Hidatidosis en la República Argentina. Ministerio de Salud de la República Argentina y Organización Mundial de la Salud.
- Alvarez Rojas CA, Romig T, Lightowlers MW (2014). *Echinococcus granulosus sensu lato* genotypes infecting humans--review of current knowledge. *Int J Parasitol.* 44(1):9-18.
- Alzugaray ME, Hernández-Martínez S, Ronderos JR (2016). Somatostatin signaling system as an ancestral mechanism: Myoregulatory activity of an Allatostatin-C peptide in Hydra. *Peptides* 82:67-75.
- Amahong K, Yan M, Li J, Yang N, Liu H, Bi X, Vuitton DA, Lin R, Lü G (2021). EgGLUT1 Is Crucial for the Viability of *Echinococcus granulosus sensu stricto* Metacestode: A New Therapeutic Target? *Front Cell Infect Microbiol.* 11;11:747739.
- Amigo I, Traba J, González-Barroso MM, Rueda CB, Fernández M, Rial E, Sánchez A, Satrústegui J, Del Arco A (2013). Glucagon regulation of oxidative phosphorylation requires an increase in matrix adenine nucleotide content through Ca²⁺ activation of the mitochondrial ATP-Mg/Pi carrier SCaMC-3. *J Biol Chem.* 15;288(11):7791-7802.
- Aprille JR, Nosek MT, Brennan, WA (1982). Adenine nucleotide content of liver mitochondria increases after glucagon treatment of rats or isolated hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 108(2), 834–839.
- Arrabal JP, Avil HG, Rivero MR, Camicia F, Salas MM, Costa SA, Nocera CG, Rosenzvit MC, Kamenetzky L (2017). *Echinococcus oligarthrus* in the subtropical region of Argentina: First integration of morphological and molecular analyses determines two distinct populations *Veterinary Parasitology* 240: 60-67.
- Aschenbach JR, Penner GB, Stumpff F, Gäbel G. (2011). Ruminant Nutrition Symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. *J Anim Sci.* 89(4):1092-107.
- Augustin R (2010). The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB Life.* 62:315–33.
- Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA (1992). Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. *Can Med Assoc J.* 12(3):141-146.
- Barrett J (1981) *Biochemistry of Parasitic Helminths*. University Park Press, Baltimore, Maryland. 308 pp.
- Barthel A, Okino ST, Liao J, Nakatani K, Li J, Whitlock JPI, Roth RA (1999). *J. Biol. Chem.* 274, 20281-20286.
- Bautz A, Schilt J (1986). Somatostatin-like peptide and regeneration capacities in planarians. *Gen Comp Endocrinol.* 64(2):267-72.

- Beck W, Pantchev W (2010). Zoonosis Parasitarias. Zaragoza: Grupo Asis Biomedica S.L.362-365.
- Blodgett AB, Kothinti RK, Kamyshko I, Petering DH, Kumar S, Tabatabai NM (2011). A fluorescence method for measurement of glucose transport in kidney cells. *Diabetes Technol Ther.*13(7):743-51.
- Blundell TL, Humbel RE (1980). Hormone families: pancreatic hormones and homologous growth factors. *Nature.* 30;287(5785):781-7.
- Boyman L, Karbowski M, Lederer WJ (2020). Regulation of Mitochondrial ATP Production: Ca²⁺ Signaling and Quality Control. *Trends Mol Med.* 26(1):21-39.
- Brehm K, Koziol U. (2017). *Echinococcus*-Host Interactions at Cellular and Molecular Levels. *Adv Parasitol.* 95:147-212.
- Brunetti E, Kern P, Vuitton DA (2010). Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Trop.* 114(1): 1-16.
- Bryant C (1993) *Biochemistry*. En: Cox, FEG, Ed. *Modern parasitology: a textbook of parasitology*. Blackwell, Oxford: pp117-136.
- Bryant NJ, Govers R, James DE (2002). Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3(4):267–277.
- Cabezas-Cruz A, Valdés JJ, Lancelot J, Pierce RJ. (2015). Fast evolutionary rates associated with functional loss in class I glucose transporters of *Schistosoma mansoni*. *BMC Genomics.*19;16:980.
- Carmena D, Cardona GA (2013). Canine echinococcosis: global epidemiology and genotypic diversity. *Acta Trop.* 128(3):441-60.
- Castelletto ML, Massey HC Jr, Lok JB. (2009). Morphogenesis of *Strongyloides stercoralis* infective larvae requires the DAF-16 ortholog FKTF-1. *PLoS Pathog.* 5(4):e1000370.
- Ceddia RB, Bikopoulos GJ, Hilliker AJ, Sweeney G (2003). Insulin stimulates glucose metabolism via the pentose phosphate pathway in *Drosophila* Kc cells. *FEBS Lett.* 4;555(2):307-10.
- Cerovac V, Monteserin-Garcia J, Rubinfeld H, Buchfelder M, Losa M, Florio T, Paez-Pereda M, Stalla GK, Theodoropoulou M.(2010) The somatostatin analogue octreotide confers sensitivity to rapamycin treatment on pituitary tumor cells. *Cancer Res.* 15;70(2):666-74.
- Chalar C, Salomé M, Señorale-Pose M, Marín M, Williams CT, Dauphin Y (2013). A high resolution analysis of the structure and chemical composition of the calcareous corpuscles from *Mesocostoides corti*. *Micron* 44: 185-192.
- Chatterjee S, Mbaye A, De Man JG, Van Marck, EA (2002). Does the neuropeptide somatostatin have therapeutic potential against schistosomiasis? *Trends Parasitol.* 18(7), 295-298.
- Chatterjee S, Vrolix G, Depoortere I, Peeters T, Van Marck E (2005). The therapeutic effect of the neuropeptide hormone somatostatin on *Schistosoma mansoni* caused liver fibrosis. *BMC Infect Dis.* 5(1), 45.
- Chatterjee S, Op De Beeck J, Rao AV, Desai DV, Vrolix G, Rylant F, Panis T, Bernat A, Van Bergen J, Peeters D, Van Marck E (2007). Prolonged somatostatin therapy may cause down-regulation of SSTR-like GPCRs on *Schistosoma mansoni*. *J Vector Borne Dis.* 44(3), 164.
- Chen X, Li M, Li L, Xu S, Huang D, Ju M, Huang J, Chen K, Gu H (2016). Trehalose, sucrose and raffinose are novel activators of autophagy in human keratinocytes through an mTOR-independent pathway. *Sci Rep.* 22;6:28423.
- Chiefari E, Foti DP, Sgarra R, Pegoraro S, Arcidiacono B, Brunetti FS, Greco M, Manfioletti G, Brunetti A (2018). Transcriptional Regulation of Glucose Metabolism: The Emerging Role of the HMGA1 Chromatin Factor. *Front Endocrinol (Lausanne).*3;9:357.

- Chowdhury MK, Turner N, Bentley NL, Das A, Wu LE, Richani D, Bustamante S, Gilchrist RB, Morris MJ, Shepherd PR, Smith GC (2017). Niclosamide reduces glucagon sensitivity via hepatic PKA inhibition in obese mice: Implications for glucose metabolism improvements in type 2 diabetes. *Sci Rep.*5;7:40159.
- Clarkson MJ, Walters TM (1991). The growth and development of *Echinococcus granulosus* of sheep origin in dogs and foxes in Britain. *Ann Trop Med Parasitol.* 85(1):53-61.
- Cobbold TS (1879). *Parasites: a treatise on the entozoa of man and animals including some account of the ectozoa.* J. & A. Churchill, London, England. 508.
- Conlon JM (2001). Evolution of the insulin molecule: insights into structure-activity and phylogenetic relationships. *Peptides* 22(7):1183-93.
- Constantine CC, Bennet-Jenkins EM, Lymbery AJ, Jenkins DJ, Behm CA, Thompson RC (1998). Factors influencing the development and carbohydrate metabolism of *Echinococcus granulosus* in dogs. *J Parasitol.* 84(5):873-81.
- Cross M, Rajan S, Chekaiban J, Saunders J, Hamilton C, Kim JS, Coster MJ, Gasser RB, Hofmann A (2017). Enzyme characteristics of pathogen-specific trehalose-6-phosphate phosphatases. *Sci Rep.* 17;7(1):2015.
- Cucher M, Ávila HG, Macchiaroli N, Camicia F, Maldonado L, Kamenetzky L, Rosenzvit MC, Gutierrez A, Jensen O, Negro P, López RA, Perez V (2019). Especies y genotipos de *Echinococcus granulosus sensu lato* causantes de echinococcosis quística en la Argentina”, En: “La Hidatidosis en la Argentina. Un abordaje integral de la enfermedad y sus implicancias para las políticas públicas”. UNRN 55-71.
- Cumino AC, Marcozzi C, Barreiro R, Salerno GL (2007). Carbon Cycling in *Anabaena* sp. PCC 7120. Sucrose Synthesis in the Heterocysts and Possible role in Nitrogen Fixation. *Plant Physiol.* 143:1385-1397.
- Cumino AC, Elissondo MC, Denegri GM. (2009). Flubendazole interferes with a wide spectrum of cell homeostatic mechanisms in *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Parasitol Int.* 58: 270–277.
- Cumino AC, Lamenza P, Denegri GM. (2010). Identification of functional FKB protein in *Echinococcus granulosus*: its involvement in the protoscolicidal action of rapamycin derivatives and in calcium homeostasis. *Int J Parasitol.* 40(6):651-61.
- D’Alessandro A, Vizcaychipsi K (2019). Descripción morfológica, ciclo biológico y distribución geográfica de las especies del género *Echinococcus*. En: “La Hidatidosis en la Argentina. Un abordaje integral de la enfermedad y sus implicancias para las políticas públicas”. UNRN 25-54
- Dagistanli FK, Ozkaya HM, Kucukyoruk B, Biceroglu H, Metin D, Gazioglu N, Oz B, Kadioglu P, Ozturk M (2018). Preoperative Somatostatin Analogue Treatment Might Trigger Apoptosis and Autophagy in Tumor Tissues of Patients with Acromegaly: A Pilot Study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 26(3):168-175.
- da Silva ED, Cancela M, Monteiro KM, Ferreira HB, Zaha A (2018). Antigen B from *Echinococcus granulosus* enters mammalian cells by endocytic pathways. *PLoS Negl Trop Dis.* 4;12(5):e0006473.
- Das B, Tandon V, Saha N (2004). Anthelmintic efficacy of *Flemingia vestita* (Fabaceae): alterations in glucose metabolism of the cestode, *Raillietina echinobothrida*. *Parasitol Int.* 53(4):345-50.
- Das B, Tandon V, Saxena JK, Joshi S, Singh AR (2013). Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Raillietina echinobothrida*, a cestode parasite of the domestic fowl. *Parasitology.* 140(1):136-46.
- De la Sota M, Crovetto H, Guarnera E (2006). *Manual de procedimientos Hidatidosis.* SENASA.
- Denegri G, Cabrera Stáble P (2013). Epidemiología y control de cestodos en rumiantes en: Fiel, C. y Nari, A. Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes. *Fundamentos epidemiológicos para su prevención y control.* Buenos Aires: Ed. Agropecuaria Hemisferio Sur. 335-355.
- Deng D, Xu C, Sun P, Wu J, Yan C, Hu M, Yan N (2014). Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. *Nature.* 5;510(7503):121-5.

- Díaz A, Casaravilla C, Allen JE, Sim RB, Ferreira AM (2011). Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* II: immunology. *Trends Parasitol.* 27(6):264-73.
- Díaz A, Fernandez C, Pittini A, Seoane PI, Allen JE, Casaravilla C (2015). The laminated layer: Recent advances and insights into *Echinococcus* biology and evolution. *Experimental Parasitology.* 158: 23-30.
- Doolittle RF (1995). The multiplicity of domains in proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 64:287–314.
- Drucker DJ (1990). Glucagon and the glucagon-like peptides. *Pancreas* 5: 484–488.
- Dunn CW, Hejnal A, Matus DQ, Pang K, Browne WE, et al. (2008). Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 452: 745–749. 67,68.
- Duong KHM, Chun KH (2019). Regulation of glucose transport by RhoA in 3T3-L1 adipocytes and L6 myoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19;519(4):880-886.
- Eckert J, Conraths FJ, Tackmann K (2000). Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis? *Int. J. Parasitol.* 30(12-13):1283-94.
- Eckert J, Gemmell MA, Meslin FX, Pawlowski ZS (2001). *Manual of Echinococcosis Human and Animals: A Public Health Problem of Global Concern.* París: Word Organization for Animal Health (OIE) and Word Health Organization (WHO).
- Elissondo MC, Dopchiz MC, Brasesco M, Denegri G (2004). *Echinococcus granulosus*: first report of microcysts formation from protoscoleces of cattle origin using the in vitro vesicular culture technique. *Parasite* 11(4):415-8.
- Elphick MR, Mirabeau O, Larhammar D (2018). Evolution of neuropeptide signalling systems. *J. Exp. Biol.* 9;221(Pt 3):jeb151092.
- Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2007). Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat. Protoc.* 2(4):953-71.
- English A, Irwin N (2019). Nonclassical Islet Peptides: Pancreatic and Extrapancreatic Actions. *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes.* 12;12:1179551419888871.
- Enkai S, Inaoka, DK, Kouguchi H, Irie, T, Yagi, K, Kita, K (2020) Mitochondrial complex III in larval stage of *Echinococcus multilocularis* as a potential chemotherapeutic target and *in vivo* efficacy of atovaquone against primary hidatid cysts *Parasitol. Int.* 75:102004.
- Enkai S, Kouguchi H, Inaoka DK, Irie T, Yagi K, Kita K. (2021). In vivo efficacy of combination therapy with albendazole and atovaquone against primary hydatid cysts in mice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 40(9):1815-1820.
- Erkut C, Penkov S, Fahmy K, Kurzchalia TV (2012). How worms survive desiccation: Trehalose pro water. *Worm* 1;1:61-5.
- Frayha GJ, Haddad R (1980). Comparative chemical composition of protoscolices and hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus* (Cestoda). *Int J Parasitol.* 10 (5-6):359-64.
- Gemmell M A, Johnstone PD, Oudemans G (1977). The effect of niclosamide on *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena* and *Taenia ovis* infections in dogs. *Research Vet. Sci.* 22, 389–391.
- Gemmell MA, Lawson JR, Roberts MG (1986). Population dynamic in Echinococcosis and cisticercosis: biological parameters of *Echinococcus granulosus* in dogs and sheeps *Parasitology* 92 (3):599-620.
- Graillon T, Romano D, Defilles C, Saveanu A, Mohamed A, Figarella-Branger D, Roche PH, Fuentes S, Chinot O, Dufour H, Barlier A (2017). Octreotide therapy in meningiomas: in vitro study, clinical correlation, and literature review. *J Neurosurg.* 127(3):660-669.
- Gregoire FM, Chomiki N, Kachinskas D, Warden CH (1998). Cloning and developmental regulation of a novel member of the insulin-like gene family in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun.* 19;249(2):385-90.

- Grosso G, Gruttadauria S, Biondi, A, Marventano S, Mistretta A (2012). Worldwide epidemiology of liver hydatidosis including the Mediterranean area. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 18 (13), 1425-1437.
- Guarnera EA (1998). Hidatidosis en provincias no patagónicas. En: *Temas de Zoonosis y Enfermedades Emergentes*. Asociación Argentina de Zoonosis: 181-183.
- Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 25;30(2):214-26.
- Hædersdal S, Lund A, Knop FK, Vilsbøll T (2018). The Role of Glucagon in the Pathophysiology and Treatment of Type 2 Diabetes. *Mayo Clin Proc*. 93(2):217-239.
- Haeusler RA, McGraw TE, Accili D (2018). Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*.19:31–44.
- Hardie DG (2008) AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. *Int J Obes (Lond)*.32 Suppl 4:S7-12.
- Health DD (1971). The migration of oncospheres of *Taenia pisiformis*, *T. serialis* and *Echinococcus granulosus* within the intermediate host. *Int J Parasitology* 1:145-152.
- Heath DD, Lawrence SB (1991). Daily egg-production of dog infected with *Echinococcus granulosus*. *Archives de Hidatidosis* 30: 321-8
- Hecker N, Sharma V, Hiller M (2019). Convergent gene losses illuminate metabolic and physiological changes in herbivores and carnivores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 116:3,036-3,041.
- Heidbreder M, Qadri F, Jöhren O, Dendorfer A, Depping R, Fröhlich F, Wagner KF, Dominiak P (2007). Non-hypoxic induction of HIF-3alpha by 2-deoxy-D-glucose and insulin. *Biochem Biophys Res Commun*. 352(2):437-43.
- Hemer S, Brehm K (2012). In vitro efficacy of the anticancer drug imatinib on *Echinococcus multilocularis* larvae. *Int J Antimicrob Agents*. 40(5):458-62.
- Hemer S, Konrad C, Spiliotis M, Koziol U, Schaack D, Förster S, Gelmedin V, Stadelmann B, Dandekar T, Hemphill A, Brehm K (2014). Host insulin stimulates *Echinococcus multilocularis* insulin signalling pathways and larval development. *BMC Biol*.27;12:5.
- Hemphill A, Stadelmann B, Rufener R, Spiliotis M, Boubaker G, Müller J, Müller N, Gorgas D, Gottstein B (2014). Treatment of echinococcosis: albendazole and mebendazole--what else? *Parasite*.21:70.
- Hentze JL, Carlsson MA, Kondo S, Nässel DR, Rewitz KF (2015). The Neuropeptide Allatostatin A Regulates Metabolism and Feeding Decisions in *Drosophila*. *Sci Rep*.30;5:11680.
- Hernandez R, Teruel T, Lorenzo M (2001). Akt mediates insulin induction of glucose uptake and up-regulation of GLUT4 gene expression in brown adipocytes. *FEBS Lett*.13; 494(3):225-31.
- Hibshman JD, Doan AE, Moore BT, Kaplan RE, Hung A, Webster AK, Bhatt DP, Chitrakar R, Hirschey MD, Baugh LR (2017). daf-16/FoxO promotes gluconeogenesis and trehalose synthesis during starvation to support survival. *Elife*. 24;6:e30057.
- Higurashi T, Hosono K, Takahashi H, Komiya Y, Umezawa S, Sakai E, Uchiyama T, Taniguchi L, Hata Y, Uchiyama S, Hattori A, Nagase H, Kessoku T, Arimoto J, Matsuhashi N, Inayama Y, Yamanaka S, Taguri M, Nakajima A (2016). Metformin for chemoprevention of metachronous colorectal adenoma or polyps in post-polypectomy patients without diabetes: a multicentre double-blind, placebo-controlled, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 17(4):475-483.
- Hjorth SA, Adelhorst K, Pedersen BB, Kirk O, Schwartz TW (1994). Glucagon and glucagonlike peptide 1: selective receptor recognition via distinct peptide epitopes. *J Biol Chem* 269: 30121–30124.

- Hüttemann M, Lee I, Samavati L, Yu H, Doan JW (2007). Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling. *Biochim Biophys Acta*. 1773(12):1701-20.
- Irwin DM, Tan H (2014). Evolution of glucose utilization: glucokinase and glucokinase regulator protein. *Mol. Phylogenet. Evol.* 70 195-203.
- Irwin DM (2021). Evolution of the mammalian insulin (Ins) gene; Changes in proteolytic processing. *Peptides*. 135:170435.
- Jeffs SA, Arme C (1988). *Echinococcus granulosus* (Cestoda): uptake of L-amino acids by secondary hydatid cysts. *Parasitology* 96(Pt 1):145-56.
- Jékely G (2013). Global view of the evolution and diversity of metazoan neuropeptide signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110(21), 8702-8707.
- Jiang G, Zhang BB (2003). Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E671–E678.
- Jiang HM, Yang Z, Xue YY, Wang HY, Guo SQ, Xu JP, Li YD, Fu P, Ding XY, Yu K, Liu WJ, Zhang G, Wang J, Zhou HB, Susswein AJ, Jing J (2022). Identification of an allatostatin C signaling system in mollusc *Aplysia*. *Sci Rep*. 24;12(1):1213.
- Jura H, Bader A, Hartmann M, Maschek H, Frosch M (1996) Hepatic tissue culture model for study of host-parasite interactions in alveolar echinococcosis. *Infection and Immunity* 64 (9): 3484-3490.
- Jura H, Bader A, Frosch M (1998). In vitro activities of benzimidazoles against *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42(5):1052-6.
- Kamenetzky L, Gutierrez AM, Canova SG, Haag KL, Guarnera EA, Parra A, García GE, Rosenzvit MC. (2002). Several strains of *Echinococcus granulosus* infect livestock and humans in Argentina. *Infect Genet Evol.* 2(2):129-36.
- Kanasaki K, Kawakita E, Koya D (2019). Relevance of Autophagy Induction by Gastrointestinal Hormones: Focus on the Incretin-Based Drug Target and Glucagon. *Front Pharmacol.* 16;10:476.
- Kashiide T, Kikuta S, Yamaguchi M, Irie T, Kouguchi H, Yagi K, Matsumoto J (2018). Molecular and functional characterization of glucose transporter genes of the fox tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Mol Biochem Parasitol.* 225:7-14.
- Kaupmann K, Bruns C, Raulf F, Weber HP, Mattes H, Lübbert H (1995). Two amino acids, located in transmembrane domains VI and VII, determine the selectivity of the peptide agonist SMS 201-995 for the SSTR2 somatostatin receptor. *EMBO J.* 14(4):727-35.
- Kenyon C (2005). The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell* 120, 449–460.
- Khalil LF, Jones A, Bray RA (2006). *Keys the Cestode Parasites of Vertebrates*. Wallingford: CAB International. 665-673.
- Kim SK, Rulifson EJ (2004). Conserved mechanisms of glucose sensing and regulation by *Drosophila corpora cardiaca* cells. *Nature* 431, 316–320.
- Kimball CP, Murlin JR. (1923). Aqueous extracts of pancreas, III: some precipitation reactions of insulin. *J Biol Chem.* 58:337-346.
- Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G (1997). *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, NY)* 277, 942–946.
- Klionsky DJ, Petroni G, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cadwell K, Cecconi F, Choi AMK, Choi ME, Chu CT, Codogno P, Colombo MI, Cuervo AM, Deretic V, Dikic I, Elazar Z, Eskelinen EL, Fimia GM, Gewirtz DA, Green DR, Hansen M, Jäättelä M, Johansen T, Juhász G, Karantza V, Kraft C, Kroemer G, Ktistakis NT, Kumar S, Lopez-Otin C, Macleod KF, Madeo F, Martinez J, Meléndez A, Mizushima N, Münz C, Penninger JM, Perera RM, Piacentini M, Reggiori F, Rubinsztein DC, Ryan KM, Sadoshima J, Santambrogio L, Scorrano L, Simon HU, Simon AK,

- Simonsen A, Stolz A, Tavernarakis N, Tooze SA, Yoshimori T, Yuan J, Yue Z, Zhong Q, Galluzzi L, Pietrocola F (2021). Autophagy in major human diseases. *EMBO J.* 1;40(19):e108863.
- Klip A, McGraw TE, James DE. (2019). Thirty sweet years of GLUT4. *J Biol Chem.*294:11369–81.
- Koch TL, Ramiro IBL, Flórez Salcedo P, Engholm E, Jensen KJ, Chase K, Olivera BM, Bjørn-Yoshimoto WE, Safavi-Hemami H (2022). Reconstructing the Origins of the Somatostatin and Allatostatin-C Signaling Systems Using the Accelerated Evolution of Biodiverse Cone Snail Toxins. *Mol Biol Evol.* 10;39(4):msac075.
- Kolb H, Kempf K, Röhling M, Martin S. (2020). Insulin: too much of a good thing is bad. *BMC Med.*18(1):224.
- Konrad C, Kroner A, Spiliotis M, Zavala-Góngora R, Brehm K (2003). Identification and molecular characterisation of a gene encoding a member of the insulin receptor family in *Echinococcus multilocularis*. *Int J Parasitol.*33(3):301-12.
- Koziol U, Rauschendorfer T, Zanon Rodriguez L, Krohne G, Brehm K (2014). The unique stem cell system of the immortal larva of the human parasite *Echinococcus multilocularis*. *EvoDevo,* 5 (1)10.
- Koziol U, Brehm K (2015). Recent advances in *Echinococcus* genomics and stem cell research. *Vet Parasitology*213 (3), 92-102.
- Kreienkamp HJ (2002). Organisation of G-protein-coupled receptor signalling complexes by scaffolding proteins. *Curr Opin Pharmacol.* 2(5):581-6.
- Kumar U, Singh S (2020). Role of Somatostatin in the Regulation of Central and Peripheral Factors of Satiety and Obesity. *Int J Mol Sci.* 7;21(7):2568
- Kumaratilake LM, Thompson RC, Eckert J (1986). *Echinococcus granulosus* of equine origin from different countries possess uniform morphological characteristics. *Int J Parasitol.*16 (5):529-40.
- Küster T, Stadelmann B, Aeschbacher D, Hemphill A (2014). Activities of fenbendazole in comparison with albendazole against *Echinococcus multilocularis* metacestodes in vitro and in a murine infection model. *Int J Antimicrob Agents.* 43(4):335-42.
- Lacey, E. (1990). Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol Today* 6(4): 112-115.
- Lagueux M, Lwoff L, Meister M, Goltzené F, Hoffmann JA (1990). cDNAs from neurosecretory cells of brains of *Locusta migratoria* (Insecta, Orthoptera) encoding a novel member of the superfamily of insulins. *Eur J Biochem.* 12;187(1):249-54.
- Lascano EF, Coltorti EA, Varela Diaz VM (1975). "Fine structure of the germinal membrane of *Echinococcus granulosus* cysts,"*Journal of Parasitology,* 61(5) 853–860.
- Lee G, Park JH (2004). Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167, 311–323.
- Lefebvre PJ, Luyckx AS (1980). Neurotransmitters and glucagon release from the isolated, perfused canine stomach. *Diabetes* 29:697–701.
- Li Y, Wang S, Gao X, Zhao Y, Li Y, Yang B, Zhang N, Ma L (2018). Octreotide Alleviates Autophagy by Up-Regulation of MicroRNA-101 in Intestinal Epithelial Cell Line Caco-2. *Cell Physiol Biochem.* 49(4):1352-1363.
- Li SC, Martijn C, Cui T, Essaghir A, Luque RM, Demoulin JB, Castaño JP, Öberg K, Giandomenico V (2021). The somatostatin analogue octreotide inhibits growth of small intestine neuroendocrine tumour cells. *PLoS One.* 7(10):e48411.
- Lin SC, Hardie DG (2018). AMPK: Sensing Glucose as well as Cellular Energy Status. *Cell Metab.* 6;27(2):299-313.
- Lombardero, OJ (1983). *Echinococcus granulosus*. *Parasitología. Boletín de Hidatidosis* 13 (38): 2-8.

- Łopieńska-Biernat E, Zaobidna EA, Dmitryjuk M (2015). Expression of Genes Encoding the Enzymes for Glycogen and Trehalose Metabolism in L3 and L4 Larvae of *Anisakis simplex*. *J Parasitol Res.* 2015:438145.
- Loos J, Caparros P, Nicolao MC, Denegri GM, Cumino AC (2014). Identification and pharmacological induction of autophagy in the larval stages of *Echinococcus granulosus*: an active catabolic process in calcareous corpuscles. *Int. J. Parasitol.* 44:415–427.
- Loos JA, Cumino AC (2015). In Vitro Anti-Echinococcal and Metabolic Effects of Metformin Involve Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Larval Stages of *Echinococcus granulosus*. *PLoS One.*12;10(5):e0126009.
- Loos JA, Nicolao MC, Cumino AC (2018). Metformin promotes autophagy in *Echinococcus granulosus* larval stage. *Mol Biochem Parasitol.* 224:61-70.
- Loos JA, Dávila VA, Brehm K, Cumino AC (2020a). Metformin Suppresses Development of the *Echinococcus multilocularis* Larval Stage by Targeting the TOR Pathway. *Antimicrob Agents Chemother.* 20;64(9):e01808-19.
- Loos JA, Negro P, Cumino AC (2020b). In vitro anti-echinococcal activity of octreotide: Additive effect of metformin linked to autophagy. *Acta Trop.* 203:105312.
- Loos JA, Coccimiglio M, Nicolao MC, Rodriguez Rodrigues C, Cumino AC (2021) Metformin improves the therapeutic efficacy of low-dose albendazole against experimental echinococcosis. *Parasitology* 149: 138-144.
- Louzao MC, Espiña B, Vieytes MR, Vega FV, Rubiolo JA, Baba O, Terashima T, Botana LM (2008). "Fluorescent glycogen" formation with sensibility for in vivo and in vitro detection. *Glycoconj J.* 25(6):503-10.
- Lund A, Bagger JI, Wewer Albrechtsen NJ, Christensen M, Grøndahl M, Hartmann B, Mathiesen ER, Hansen CP, Storkholm JH, van Hall G, Rehfeld JF, Hornburg D, Meissner F, Mann M, Larsen S, Holst JJ, Vilsbøll T, Knop FK (2016). Erratum. Evidence of Extraprostatic Glucagon Secretion in Man. *Diabetes.*65(6):1752.
- Lv Z, Guo Y (2020). Metformin and its benefits for various diseases. *Frontiers in Endocrinology* 11, 191.
- Manning BD, Cantley LC (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129(7):1261–1274.
- Manolescu AR, Witkowska K, Kinnaird A, Cessford T, Cheeseman C (2007). Facilitated hexose transporters: new perspectives on form and function. *Physiology (Bethesda)* 234-40
- Martins R, Lithgow GJ, Link W (2016). Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity. *Aging Cell.*15(2):196-207.
- McCullough JS, Fairweather I, (1987). The structure, composition, formation and possible functions of calcareous corpuscles in *Trilocularia acanthiaevulgaris* Olson 1867 (Cestoda, Tetracystida). *Parasitol. Res.* 74 (2): 175-182.
- McGowan KM, Long SD, Pekala PH (1995). Glucose transporter gene expression: regulation of transcription and mRNA stability. *Pharmacol Ther.* 66(3):465-505.
- McManus DP, Smyth JD (1982). Intermediary carbohydrate metabolism in protoscoleces of *Echinococcus granulosus* (horse and sheep strains) and *E. multilocularis*. *Parasitology.* 84 (Pt 2):351-66.
- McManus DP, Bryant C (1995). Biochemistry, physiology and molecular biology of *Echinococcus*. In: Thompson RCA, Lymbery A, editors. *Echinococcus* and hydatid disease. Wallingford: CAB International.135-171
- McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB (2003). Echinococcosis. *Lancet.*18;362(9392):1295-304.
- McManus D, Gray DJ, Zhang W, Yang Y (2012). Diagnosis, treatment, and management of echinococcosis. *BMJ.* 344: e3866.
- McManus DP (2013). Current status of the genetics and molecular taxonomy of *Echinococcus* species. *Parasitology.* 140(13):1617-23.

- Mehlhorn H (2001) Encyclopedic reference of parasitology. Disease, treatment, therapy. Second edition. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Mihaylova MM, Shaw RJ (2011). The AMPK signaling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol.* 2;13(9):1016-23.
- Miller JC, Colagiuri S (1994). The carnivore connection: dietary carbohydrate in the evolution of NIDDM. *Diabetologia.*37(12):1280-6.
- Miller RA, Chu Q, Xie J, Foretz M, Viollet B, Birnbaum MJ (2013). Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature.* 494(7436):256-260.
- Mirabeau O, Joly JS (2013). Molecular evolution of peptidergic signaling systems in bilaterians. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110(22), E2028-E2037.
- Mizushima N, Yoshimori T, Levine B (2010). Methods in mammalian autophagy research. *Cell.* 140, 313-326.
- Mogavero A, Maiorana MV, Zanutto S, Varinelli L, Bozzi F, Belfiore A, Volpi CC, Gloghini A, Pierotti MA, Gariboldi M.(2017). Metformin transiently inhibits colorectal cancer cell proliferation as a result of either AMPK activation or increased ROS production. *Sci Rep.* 7:15992.
- Mohamed DZ, El-Sisi AEE, Sokar SS, Shebl AM, Abu-Risha SE (2021). Targeting autophagy to modulate hepatic ischemia/reperfusion injury: A comparative study between octreotide and melatonin as autophagy modulators through AMPK/PI3K/AKT/mTOR/ULK1 and Keap1/Nrf2 signaling pathways in rats. *Eur J Pharmacol.* 15;897:173920.
- Moro P, Schantz PM (2009). Echinococcosis: a review. *Int J Infect Dis.*13(2):125-33.
- Morseth, DJ (1967). Fine structure of the hydatid cyst and protoscolex of *Echinococcus granulosus*. *J Parasitol.* 53 (2): 312-325.
- Müller TD, Finan B, Clemmensen C, DiMarchi RD, Tschöp MH (2017). The New Biology and Pharmacology of Glucagon. *Physiol Rev.* 97(2):721-766.
- Nagasawa H, Kataoka H, Isogai A, Tamura S, Suzuki A, Mizoguchi A, Fujiwara Y, Suzuki A, Takahashi SY, Ishizaki H (1986). Amino acid sequence of a prothoracicotropic hormone of the silkworm *Bombyx mori*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(16):5840-3.
- Naito H (1990). Triglicéridos. En Kaplan L, Pesce A Técnicas de laboratorio, fisiopatología – métodos de análisis. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 1223 - 235.
- Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y (2007). Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell* 13;130(1):165-78.
- Nelson RW, Robertson J, Feldman EC, Briggs C (2000). Effect of the alpha-glucosidase inhibitor acarbose on control of glycemia in dogs with naturally acquired diabetes mellitus. *J Am Vet Med Assoc.*15;216(8):1265-9.
- Nicolao MC, Elissondo MC, Denegri GM, Goya AB, Cumino AC (2014). In vitro and in vivo effects of tamoxifen against larval stage *Echinococcus granulosus*. *Antimicrob Agents Chemother* 58(9):5146-54.
- Nicolao MC, Rodriguez Rodrigues C, Cumino AC (2019). Extracellular vesicles from *Echinococcus granulosus* larval stage: Isolation, characterization and uptake by dendritic cells. *PLoS Negl Trop Dis.*7;13(1):e0007032.
- Oaks JA, Holy JM (1994). *Hymenolepis diminuta*: two morphologically distinct tegumental secretory mechanisms are present in the cestode. *Exp Parasitol.*79(3):292-300.
- Oh Y, Lai JS, Mills HJ, Erdjument-Bromage H, Giammarinaro B, Saadipour K, Wang JG, Abu F, Neubert TA, Suh GSB (2019). A glucose-sensing neuron pair regulates insulin and glucagon in *Drosophila*. *Nature.* 574(7779):559-564.

- Olias G, Viollet C, Kusserow H, Epelbaum J, Meyerhof W (2004). Regulation and function of somatostatin receptors. *J Neurochem.* 89(5), 1057-1091.
- Orci L, Junod A, Pictet R, Renold AE, Rouiller C (1968). Granulolysis in a cells of endocrine pancreas in spontaneous and experimental diabetes in animals. *J Cell Biol.* 38(2):462-6.
- Orrego MA, Verastegui MR, Vasquez CM, Koziol U, Laclette JP, Garcia HH, Nash TE (2021). Cysticercosis Working Group in Peru. Identification and culture of proliferative cells in abnormal *Taenia solium* larvae: Role in the development of racemose neurocysticercosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 22;15(3):e0009303.
- Pan H, Finkel T (2017). Key proteins and pathways that regulate lifespan. *J Biol Chem.* 21;292(16):6452-6460.
- Parkinson J, Wasmuth JD, Salinas G, Bizarro CV, Sanford C, Berriman M, Ferreira HB, Zaha A, Blaxter ML, Maizels RM, Fernández C (2012). A transcriptomic analysis of *Echinococcus granulosus* larval stages: implications for parasite biology and host adaptation. *PLoS Negl Trop Dis.* 6(11):e1897.
- Patel YC, Srikant CB (1997). Somatostatin receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 8(10):398-405.
- Pauluzzi S (1964). La fissazione del complemento per l'idatidosi. ii. standardizzazione biologica del potere antigene del liquido cistico e di altri materiali idatidei [complement fixation in hydatidosis. ii. biological standardization of the antigenic capacity of the cystic fluid and of other hydatid materials]. *Boll Ist Sieroter Milan.* 43:11-22.
- Pawłowski Z, Stefaniak J (2003). The pig strain of *Echinococcus granulosus* in humans: a neglected issue? *Trends Parasitol.* 19(10):439.
- Pelletier J, Bellot G, Pouysségur J, Mazure NM (2013). Biochemical titration of glycogen in vitro. *J Vis Exp.* 24;(81):e50465).
- Pernicova I, Korbonits M (2014). Metformin mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat Rev Endocrinol.* 10(3):143-156.
- Petersen S, Bahr M, Eckel J (1995). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213, 533-540.
- Pilkis SJ, Granner DK (1992). Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol* 54: 885–909.
- Podolsky DK (1997). Healing the epithelium: solving the problem from two sides. *J Gastroenterol.* 32(1):122-6.
- Porchia AC, Curatti L, Salerno GL (1999). Sucrose metabolism in cyanobacteria: sucrose synthase from *Anabaena* sp. strain PCC 7119 is remarkably different from the plant enzymes with respect to substrate affinity and amino-terminal sequence. *Planta*;210(1):34-40.
- Pórfido JL, Herz M, Kiss F, Kamenetzky L, Brehm K, Rosenzvit MC, Córscico B, Franchini GR. (2020). Fatty acid-binding proteins in *Echinococcus* spp.: the family has grown. *Parasitol Res.* 119(4):1401-1408.
- Rabinowitz JD, White E (2010). Autophagy and metabolism. *Science* 330 (6009), 1344-1348.
- Reers M, Smith TW, Chen LB (1991). J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry.* 7;30(18):4480-6.
- Rinaldi F, De Silvestri A, Tamarozzi F, Cattaneo F, Lissandrin R, Brunetti, E. (2014). Medical treatment versus “Watch and Wait” in the clinical management of CE3b echinococcal cysts of the liver. *BMC Infect Dis.* 14(1): 492.
- Ritler D, Rufener R, Li JV, Kämpfer U, Müller J, Bühr C, Schürch S, Lundström-Stadelmann B (2019). In vitro metabolomic footprint of the *Echinococcus multilocularis* metacestode. *Sci Rep.* 19;9(1):19438.
- Rodríguez-Contreras D, Skelly PJ, Landa A, Shoemaker CB, Laclette JP (1998). Molecular and functional characterization and tissue localization of 2 glucose transporter homologues (TGTP1 and TGTP2) from the tapeworm *Taenia solium*. *Parasitology.* 117(Pt 6):579-88.

- Rodriguez-Contreras D, Aslan H, Feng X, Tran K, Yates PA, Kamhawi S, Landfear SM (2015). Regulation and biological function of a flagellar glucose transporter in *Leishmania mexicana*: a potential glucose sensor. *FASEB J.* 29(1):11-24.
- Rogan MT, Richards KS (1986). In vitro development of hydatid cysts from posterior bladders and ruptured brood capsules of equine *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 92(2): 370–390.
- Romano SN, Gorelick DA (2018). Crosstalk between nuclear and G protein-coupled estrogen receptors. *Gen Comp Endocrinol.* 15;261:190-197.
- Rosenzvit MC, Zhang W, Motazedian H, Smyth D, Pearson M, Loukas A, Jones MK, McManus DP (2006). Identification of membrane-bound and secreted proteins from *Echinococcus granulosus* by signal sequence trap. *Int J Parasitol.* 36(1):123-30.
- Sakamoto T, Sugimura M (1970). Studies on Echinococcosis XXIII: Electron microscopical observation on histogenesis of larval *Echinococcus multilocularis*. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 18 (3), 131-144.
- Sakamoto T, Cabrera P (2003). Immunohistochemical observations on cellular response in unilocular hydatid lesions and lymph nodes of cattle. *Acta Tróp.* 85: 271-279.
- Saltiel AR (2021). Insulin signaling in health and disease. *J Clin Invest.* 4;131(1):e142241.
- Sarciron ME, Azzar G, Got R, Petavy AF. (1988). *Exp Parasitol.* 66(1):1-6.
- Saule P, Vicogne J, Delacre M, Macia L, Tailleux A, Dissous C, Auriault C, Wolowczuk I (2005). Host glucose metabolism mediates T4 and IL-7 action on *Schistosoma mansoni* development. *J Parasitol.* 91(4):737-44.
- Schermerhorn T (2013). Normal glucose metabolism in carnivores overlaps with diabetes pathology in non-carnivores. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3;4:188.
- Schmid HA, Brueggen J (2012). Effects of somatostatin analogs on glucose homeostasis in rats. *J Endocrinol.* 212(1), 49-60.
- Sikes JM, Newmark PA (2013). Restoration of anterior regeneration in a planarian with limited regenerative ability. *Nature.* 1;500(7460):77-80.
- Siles-Lucas M, Casulli A, Cirilli R, Carmena D (2018). Progress in the pharmacological treatment of human cystic and alveolar echinococcosis: Compounds and therapeutic targets. *PLoS Negl Trop Dis.* 12(4):e0006422.
- Siracusano A, Delunardo F, Teggi A, Ortona E (2012). Host-parasite relationship in cystic echinococcosis: an evolving story. *Clin Dev Immunol.* 639362.
- Siu FY, He M, de Graaf C, Han GW, Yang D, Zhang Z, Zhou C, Xu Q, Wacker D, Joseph JS, Liu W, Lau J, Cherezov V, Katritch V, Wang MW, Stevens RC (2013). Structure of the human glucagon class B G-protein-coupled receptor. *Nature.* 499(7459):444-9.
- Skelly PJ, Kim JW, Cunningham J, Shoemaker CB (1994). Cloning, characterization, and functional expression of cDNAs encoding glucose transporter proteins from the human parasite *Schistosoma mansoni*, *J. Biol. Chem.* 269 4247–4253.
- Smyth JD, McManus DP (1989). *The Physiology and Biochemistry of Cestodes* [Hardcover] Smyth, J. D. and McManus, D. P. Cambridge University Press, ISBN 10: 0521355575.
- Soulard A, Cohen A, Hall MN (2009). TOR signaling in invertebrates. *Curr Opin Cell Biol* 21:825– 836.
- Soulsby EJJ (1982). *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals.* 7^o ed. London: Baillière Tindall. 119-124.
- Spiliotis M, Kroner A, Brehm K (2003). Identification, molecular characterization and expression of the gene encoding the epidermal growth factor receptor orthologue from the fox-tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Gene.* 24;323:57-65.

- Spiliotis M, Konrad C, Gelmedin V, Tappe D, Brückner S, Mösch HU, Brehm K (2006). Characterisation of EmMPK1, an ERK-like MAP kinase from *Echinococcus multilocularis* which is activated in response to human epidermal growth factor. *Int J Parasitol.* ;36(10-11):1097-112.
- Spiliotis M, Lechner S, Tappe D, Scheller C, Krohne G, Brehm K (2008). Transient transfection of *Echinococcus multilocularis* primary cells and complete in vitro regeneration of metacystode vesicles. *Int J Parasitol.*38(8-9):1025-39.
- Stahl A, Evans JG, Pattel S, Hirsch D, Lodish HF (2002). Insulin causes fatty acid transport protein translocation and enhanced fatty acid uptake in adipocytes. *Dev Cell.* 2(4):477–488.
- Stoka AM (1999). Phylogeny and evolution of chemical communication: an endocrine approach. *J Mol Endocrinol.* 22(3):207-25.
- Sukhdeo MV, Hsu SC, Thompson CS, Mettrick DF (1984). *Hymenolepis diminuta*: behavioral effects of 5-hydroxytryptamine, acetylcholine, histamine and somatostatin. *J Parasitol.* 70(5):682-8.
- Sun H, Zou S, Candiotti KA, Peng Y., Zhang Q, Xiao W, Wen Y, Wu J, Yang J (2017). Octreotide attenuates acute kidney injury after hepatic ischemia and reperfusion by enhancing autophagy. *Sci Rep.* 7, 42701.
- Sun EW, Martin AM, de Fontgalland D, Sposato L, Rabbitt P, Hollington P, Wattchow DA, Colella AD, Chataway T, Wewer Albrechtsen NJ, Spencer NJ, Young RL, Keating DJ (2021). Evidence for Glucagon Secretion and Function Within the Human Gut. *Endocrinology.*1;162(4):bqab022.
- Sundler F, Alumets J, Holst J, Larsson LI, Håkanson R (1976). Ultrastructural identification of cells storing pancreatic-type glucagon in dog stomach. *Histochemistry.* 19;50(1):33-7.
- Sutherland EW, De Duve C (1948). Origin and distribution of the hyperglycemic-glycogenolytic factor of the pancreas. *J Biol Chem.*175(2):663-674.
- Swiderski Z (1983). *Echinococcus granulosus*: hook-muscle systems and cellular organisation of infective oncospheres. *Int J Parasitol.* 13(3):289-99.
- Tandon V., Das B., Saha N. (2003). *Parasitol. Internat* 52:170-183.
- Tatusov RL, Koonin EV, Lipman DJ (1997). A genomic perspective on protein families. *Science* 278:631– 637.
- Teleman, A A (2010). Molecular mechanisms of metabolic regulation by insulin in *Drosophila*. *Biochem J* 425, 13–26.
- TeSlaa T, Teitell MA(2014). Techniques to monitor glycolysis. *Methods Enzymol.* 542:91-114.
- Theodoropoulou M, Stalla GK (2013). Somatostatin receptors: from signaling to clinical practice. *Front Neuroendocrinol.* 34(3):228-52.
- Thompson RCA (1977). Hydatidosis in Great Britain *Helminthological Abstracts Series A* 46, 837-61.
- Thompson RCA (1995). *Biology and Systematics of Echinococcus* en: Thompson, R.C.A. and Lymbery A.J. *Echinococcus* and Hydatid Disease. Wallingford: CAB International: 1- 27.
- Thomson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997). The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Research* 24: 4876-4882.
- Thompson RCA, Mc Manus DP (2002). Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends in Parasitology:* 18: 452-457.
- Thompson RCA (2008). The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. *Experimental Parasitology* 119: 439-445.
- Thorens B (2011) Brain glucose sensing and neural regulation of insulin and glucagon secretion *B. Diabetes, Obes. Metab.* 13 (Suppl. 1): 82–88.

- Tielens AG (1994). Energy generation in parasitic helminths. *Parasitol Today*. 1994 10(9):346-52.
- Tourmu H, Fiori A, Van Dijk P (2013). Relevance of trehalose in pathogenicity: some general rules, yet many exceptions. *PLoS Pathog*. 9(8):e1003447.
- Tsai IJ, Zarowiecki M, Holroyd N, Garciarrubio A, Sanchez-Flores A, Brooks KL, Tracey A, Bobes RJ, Fragoso G, Sciutto E, Aslett M, Beasley H, Bennett HM, Cai J, Camicia F, Clark R, Cucher M, De Silva N, Day TA, Deplazes P, Estrada K, Fernández C, Holland PW, Hou J, Hu S, Huckvale T, Hung SS, Kamenetzky L, Keane JA, Kiss F, Koziol U, Lambert O, Liu K, Luo X, Luo Y, Macchiaroli N, Nichol S, Paps J, Parkinson J, Pouchkina-Stantcheva N, Riddiford N, Rosenzvit M, Salinas G, Wasmuth JD, Zamanian M, Zheng Y (2013). The *Taenia solium* Genome Consortium, Cai, X., Soberón X, Olson PD, Lacleste JP, Brehm K, Berriman M The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature*. 496, 57-63.
- Tzertzinis G, Egaña AL, Palli SR, Robinson-Rechavi M, Gissendanner CR, Liu C, Unnasch TR, Maina CV (2010). Molecular evidence for a functional ecdysone signaling system in *Brugia malayi*. *PLoS Negl Trop Dis*. 9;4(3):e625.
- Ui M, Claus TH, Exton JH, Park CR (1973). Studies on the mechanism of action of glucagon on gluconeogenesis. *J Biol Chem* 248: 5344–5349.
- Unger RH, Orci L (1975). The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Lancet*. 4;1(7897):14-6.
- Van den Bossche, H (1986). Mode of action of anticestodal agents. En: Campbell, W.C., & Rew, R.S. (Eds). *Chemotherapy of Parasitic Diseases*. Springer US, 495-503.
- Vanek M (1980). A morphological study of hidatids of *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) for pigs. *Folia Parasitologia* 27, 7-46.
- Verbrugge A, Hesta M, Daminet S, Janssens GP (2012). Nutritional modulation of insulin resistance in the true carnivorous cat: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 52(2):172-82.
- Vidal-Puig A, O’Rahilly S (2001). Metabolism. Controlling the glucose factory. *Nature* 413: 125–126.
- Villaume K, Blanc M, Gouysse G, Walter T, Couderc C, Nejari M, Vercherat C, Cordier-Bussat M, Roche C, Scoazec JY (2010). VEGF secretion by neuroendocrine tumor cells is inhibited by octreotide and by inhibitors of the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Neuroendocrinology* 91 (3), 268–278.
- Vizcaychipi KA, Helou M, De Matteo K, Macchiaroli N, Cucher M, Rosenzvit M, D’Alessandro A (2013). Primera identificación de *Echinococcus vogeli* en una paca en la provincia de Misiones, Argentina. *Rev Arg de Microbiol* (on line 11-04-14), vol 45, 3: 169-173.
- Vuitton DA, Millon L, Gottstein B, Giraudoux P (2014). Proceedings of the International Symposium: Innovation for the Management of Echinococcosis Besançon, *Parasite*. 21: 28.
- Vuitton DA, Mc Manus DP, Rogan MT, Romig T, Gottstein B, Naidich A, Tuxun T, Wen H, Menezes da Silva A. and the World Association of Echinococcosis (2020). International consensus on terminology to be used in the field of echinococcoses. *Parasite*, 27, 41.
- Walker DK, Drummond MJ, Dickinson JM, Borack MS, Jennings K, Volpi E, Rasmussen BB (2014). Insulin increases mRNA abundance of the amino acid transporter SLC7A5/LAT1 via an mTORC1-dependent mechanism in skeletal muscle cells. *Physiol Rep*. 2(3):e00238.
- Wang H, Li J, Guo B, Zhao L, Zhang Z, McManus DP, Wen H, Zhang W (2016). In vitro culture of *Echinococcus multilocularis* producing protoscoleces and mouse infection with the cultured vesicles. *Parasit Vectors*. 25;9(1):411.
- Wasserman DH. (2009). Four grams of glucose. *Am J Physiol Endocrinol Metab*;296(1):E11-21.

- Wen H, Vuitton L, Tuxun T, Li J, Vuitton DA, Zhang W, McManus DP (2019). Echinococcosis: Advances in the 21st Century. *Clin Microbiol Rev.* 13;32(2):e00075-18.
- Xiao N, Yang YQ, You JQ, Shen BG, Jiao W, Chai JJ (1994). Effects of benzimidazole compounds on mice infected with secondary cysts of *Echinococcus granulosus*. *Chinese Medical Journal*, 107 (7): 521-532.
- Xiao N, Qiu J, Nakao M, Li T, Yang W, Chen X, Schantz PM, Craig PS, Ito A (2005). *Echinococcus shiquicus* n.sp. a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. *Int J Parasitol* 35: 693-701.
- Xie M, Roy R (2012). Increased levels of hydrogen peroxide induce a HIF-1-dependent modification of lipid metabolism in AMPK compromised *C. elegans* dauer larvae. *Cell Metab.* 5;16(3):322-35.
- Yamada K, Nakata M, Horimoto N, Saito M, Matsuoka H, Inagaki N (2000). Measurement of glucose uptake and intracellular calcium concentration in single, living pancreatic b-cells. *J. Biol. Chem.* 275, 22278–22283.
- Yamada K, Saito M, Matsuoka H, Inagaki N (2007). A real-time method of imaging glucose uptake in single, living mammalian cells. *Nat Protoc.* 2(3):753-62.
- You H, Zhang W, Moertel L, McManus DP, Gobert GN (2009). Transcriptional profiles of adult male and female *Schistosoma japonicum* in response to insulin reveal increased expression of genes involved in growth and development. *Int J Parasitol.* 39(14):1551-9.
- You H, Stephenson RJ, Gobert GN, McManus DP (2014). Revisiting glucose uptake and metabolism in schistosomes: new molecular insights for improved schistosomiasis therapies. *Front Genet.* 11;5:176.
- Zavala-Góngora R, Derrer B, Gelmedin V, Knaus P, Brehm K (2008). Molecular characterisation of a second structurally unusual AR-Smad without an MH1 domain and a Smad4 orthologue from *Echinococcus multilocularis*. *Int J Parasitol.* 38(2):161-76.
- Zhang H, Qiao A, Yang L, Van Eps N, Frederiksen KS, Yang D, Dai A, Cai X, Zhang H, Yi C, Cao C, He L, Yang H, Lau J, Ernst OP, Hanson MA, Stevens RC, Wang MW, Reedtz-Runge S, Jiang H, Zhao Q, Wu B (2018). Structure of the glucagon receptor in complex with a glucagon analogue. *Nature.* 3;553(7686):106-110.
- Zhang C, Li J, Aji T, Li L, Bi X, Yang N, Li Z, Wang H, Mao R, Lü G, Shao Y, Vuitton DA, Wen H, Lin R (2019). Identification of Functional MKK3/6 and MEK1/2 Homologs from *Echinococcus granulosus* and Investigation of Protoscolecid Activity of Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway Inhibitors In Vitro and In Vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* 63(1):e01043-18.
- Zhang Y, Yañez Guerra LA, Egertová M, Zampronio CG, Jones AM, Elphick MR (2020). Molecular and functional characterization of somatostatin-type signalling in a deuterostome invertebrate. *Open Biol.* 10(9):200172.
- Zheng H, Zhang W, Zhang L, Zhang Z, Li J, Lu G, Zhu Y, Wang Y, Huang Y, Liu J, Kang H, Chen J, Wang L, Chen A, Yu S, Gao Z, Jin L, Gu W, Wang Z, Zhao L, Shi B, Wen H, Lin R, Jones MK, Brejova B, Vinar T, Zhao G, McManus DP, Chen Z, Zhou Y, Wang S. (2013). The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. *Nat Genet.* 45(10):1168-11675.